

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**MODULATION DE L' APOPTOSE DES NEUTROPHILES
HUMAINS PAR LE MERCURE**

Par
Eliane Moisan

Mémoire présenté
pour l' obtention
du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en Sciences Expérimentales de la Santé

Jury d' évaluation

Président du jury
et examinateur interne

M. Alain Fournier, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Mme Catherine Jumarie, PhD
Centre de recherche en toxicologie de
l' environnement, UQAM

Directeur de recherche

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

Codirecteur de recherche

M. Edouard Kouassi, PhD
Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Remerciements

Ce mémoire de maîtrise constitue le résultat de nombreux mois d'efforts non sans rebondissements. Heureusement, j'ai été soutenue tout au long par des personnes que je voudrais remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de maîtrise, le professeur Denis Girard, pour sa patience, sa compréhension, ses précieux conseils et surtout pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à un moment stratégique.

Je veux également exprimer ma gratitude envers mon codirecteur, le professeur Édouard Kouassi, pour avoir cru en moi, pour m'avoir accueillie à l'INRS-Institut Armand-Frappier et pour m'avoir donné l'occasion de mettre en valeur mon potentiel de communication en milieu scientifique.

Je veux remercier Sylvie Arbour, qui fut une assistante de recherche exemplaire au début de mon projet et qui m'a montré les techniques de cytométrie en flux en faisant preuve d'une patience incroyable. Je la remercie également pour son sens de l'écoute et pour tous les bons moments que nous avons partagés.

Un gros merci à tous mes collègues de laboratoire, Martin Pelletier, Valérie Lavastre, Claude Rathé et Amélie Bouchard. Merci pour les sourires à chaque matin, pour le dynamisme, pour l'esprit d'équipe et pour tous les précieux conseils.

Je tiens également à remercier mes parents et mon frère Frédéric, qui ont su me soutenir, notamment pendant les moments difficiles, et qui m'ont encouragée à réaliser tous mes rêves.

Table des matières

Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des abréviations	vi
Liste des figures et des tableaux	viii
Sommaire	ix
Introduction	x
SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	2
1 LE NEUTROPHILE	3
1.1 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE ET SES CELLULES	3
1.1.1 <i>L'immunité spécifique</i>	3
1.1.2 <i>L'immunité non spécifique</i>	5
1.2 RÔLE DU NEUTROPHILE DANS L'INFLAMMATION.....	6
1.2.1 <i>Induction de l'inflammation</i>	7
1.2.2 <i>La destruction du micro-organisme</i>	8
1.2.3 <i>Résolution de l'inflammation</i>	11
1.2.4 <i>Désordres inflammatoires</i>	12
2 LA MORT CELLULAIRE	15
2.1 L'APOPTOSE.....	15
2.1.1 <i>Caractéristiques morphologiques et biochimiques</i>	16
2.1.2 <i>Les principales voies apoptotiques</i>	17
2.1.3 <i>L'apoptose des neutrophiles</i>	20
2.2 LA NÉCROSE.....	34
2.2.1 <i>La nécrose primaire</i>	35
2.2.2 <i>La nécrose secondaire</i>	35

2.2.3	<i>Distinctions et similitudes entre apoptose et nécrose</i>	36
3	LE MERCURE	38
3.1	LES FORMES DE MERCURE	38
3.1.1	<i>Le mercure métallique (Hg⁰)</i>	38
3.1.2	<i>Le mercure inorganique (Hg²⁺)</i>	38
3.1.3	<i>Le mercure organique</i>	38
3.2	LES PRINCIPALES SOURCES DE MERCURE	39
3.2.1	<i>Les sources naturelles</i>	39
3.2.2	<i>Les sources reliées à l'activité humaine</i>	39
3.3	LA CINÉTIQUE DU MERCURE	40
3.3.1	<i>Absorption</i>	40
3.3.2	<i>Distribution</i>	41
3.3.3	<i>Biotransformation</i>	42
3.3.4	<i>Élimination</i>	43
3.4	LES EFFETS TOXIQUES DU MERCURE	43
3.4.1	<i>Système nerveux</i>	43
3.4.2	<i>Système rénal</i>	44
3.4.3	<i>Système immunitaire</i>	45
	SECTION 2 : ARTICLE	46
	Résumé en français de l'article	50
	Texte original de l'article	51
	Discussion et conclusion	72
	Références	78

Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$	potentiel transmembranaire mitochondrial
ADN	acide désoxyribonucléique
AIF	« Apoptosis Inducing Factor »
Apaf	« Apoptotic protease-activating factor »
ATP	adenosine triphosphate
CD	« cluster of differentiation »
CGD	« chronic granulomatous disease »
CH ₃ HgCl	chlorure de méthylmercure
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
ERK	« extracellular signal-related kinase »
FADD	« Fas-associating protein with death domain »
FasL	ligand de Fas
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
f-MLP	N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine
G-CSF	« granulocyte colony-stimulating factor »
GM-CSF	« granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »
GSH	glutathion
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
Hg ⁰	mercure métallique ou élémentaire
Hg ²⁺	mercure inorganique
HgCl ₂	chlorure de mercure
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
KDa	kilodalton
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	« mitogen activated protein kinases »
MeHgCl	chlorure de méthylmercure

MEK	« ERK-activating kinase »
MPO	myéloperoxydase
NAC	N-acétyl cystéine
NADPH	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NK	« natural killer »
NO	oxyde nitrique
O ₂ ^{·-}	superoxyde
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase
PI	iodure de propidium
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKC	protéine kinase c
PLC	phospholipase c
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	polymorphonucléaire
POPs	polluants organiques persistants
¹ O ₂	oxygène singulet
·OH	hydroxyle
RcT	récepteur de lymphocyte T
ROS	« reactive oxygen species »
Tc	lymphocyte T cytotoxique
Th	lymphocyte T «helper»
TNF	« tumor necrosis factor »
TNFR	récepteur pour le TNF
TRADD	«TNFR1-associated death domain protein »
Ts	lymphocyte T suppresseur
UV	ultraviolet
VAA-I	<i>Viscum album</i> agglutinine-I

Liste des figures et des tableaux

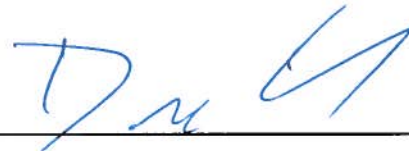
Figure 1. Migration des neutrophiles vers le site inflammatoire.....	8
Figure 2. Phagocytose et destruction des micro-organismes.....	9
Figure 3. Assemblage de la NADPH oxydase.....	10
Figure 4. Rôle de l'apoptose des neutrophiles et de la phagocytose par les macrophages dans le processus de résolution de l'inflammation	12
Figure 5. Principales voies apoptotiques	19
Tableau 1. Comparaison entre apoptose, nécrose primaire et nécrose secondaire	36

Sommaire

Le mercure est un contaminant de l'environnement qui perturbe le système immunitaire. Il a été démontré que de faibles niveaux de mercure organique et inorganique induisent l'apoptose des cellules mononucléées humaines (lymphocytes T et B, monocytes). Cependant, les effets du mercure sur la viabilité et le type de mort cellulaire induits chez les neutrophiles humains constituent un sujet très peu étudié. Dans la présente étude, nous avons comparé deux formes chimiques de mercure, soit une forme de mercure organique (MeHgCl) et une forme de mercure inorganique (HgCl₂). Des études de cinétiques et de concentrations-réponses ont été effectuées *in vitro* par cytométrie en flux afin de déterminer les niveaux d'apoptose et de nécrose subis par les neutrophiles en présence des deux formes de mercure. Les résultats démontrent que le MeHgCl, à de faibles concentrations (1-7,5 µM), inhibe l'apoptose des neutrophiles humains, contrairement à ce qui a été observé avec les cellules mononucléées. De faibles niveaux de HgCl₂ inhibent l'apoptose des neutrophiles, mais de façon moins importante que le MeHgCl. De plus fortes concentrations de mercure organique et inorganique furent nécrotiques, le MeHgCl étant plus toxique que le HgCl₂. De plus, des différences ont été perçues au niveau des modes de mort cellulaire induits par les deux formes de mercure chez les neutrophiles humains. Tandis que le MeHgCl induit l'apoptose de tous les neutrophiles en même temps, des concentrations supérieures à 100 µM de HgCl₂ induisent directement la nécrose sans qu'il n'y ait de transition évidente en apoptose.



Étudiante



Directeur de recherche

Introduction

Les neutrophiles sont des cellules du système immunitaire faisant partie d'un regroupement de cellules que l'on nomme les polymorphonucléaires. Premières cellules à arriver au site inflammatoire, elles ont pour fonction de phagocyter et détruire les micro-organismes par la dégranulation et par la production de radicaux libres. Les neutrophiles vont spontanément en apoptose, mécanisme qui joue un rôle clé dans la résolution de l'inflammation. En absence de phagocytose par les macrophages, les neutrophiles apoptotiques subissent la nécrose secondaire et perdent alors leur intégrité membranaire. Il y a alors relâchement du contenu intracellulaire dans le milieu environnant et persistance de l'inflammation chez l'organisme. Une perturbation au niveau de la reconnaissance par les macrophages ou une dérégulation de la machinerie apoptotique des neutrophiles peut donc mener à des désordres inflammatoires.

Le mercure est un contaminant de l'environnement qui existe sous plusieurs formes, soit le mercure métallique, le mercure inorganique et le mercure organique. Ce métal lourd a des effets toxiques notamment sur les systèmes nerveux, rénal et immunitaire. Certaines observations faites sur des modèles animaux et chez des personnes intoxiquées au mercure montrent que ce métal peut induire des effets immunotoxiques tels que l'immunosuppression, l'immunostimulation, l'autoimmunité et des réactions d'hypersensibilité. Les effets du mercure sur les cellules du système immunitaire peuvent varier selon plusieurs facteurs tels que le bagage génétique, la forme chimique et la concentration de mercure, le type de cellules et l'état d'activation des cellules. Des études *in vitro* ont montré que les formes de mercure organiques et inorganiques induisent l'apoptose des lymphocytes T et B et des monocytes humains, le mercure organique étant davantage toxique que le mercure inorganique. Des cellules T activées sont résistantes à l'apoptose induite par le mercure organique. De plus, des lymphocytes T Jurkat en présence de mercure organique sont résistants à l'apoptose médiée via le récepteur Fas.

Le but de la présente étude vient du fait que les effets du mercure sur la viabilité et le type de mort cellulaire induits chez les neutrophiles humains sont peu connus. Nous avons

premièrement voulu comparer deux formes chimiques de mercure, soit une forme de mercure organique (MeHgCl) et une forme de mercure inorganique (HgCl₂). De plus, nous avons étudié les effets de ces deux formes de mercure sur la viabilité et le type de mort cellulaire induits chez les neutrophiles isolés de sang périphérique humain. Pour ce faire, nous avons incubé les neutrophiles en présence d'une gamme de concentrations de mercure (1-1000 µM) pendant différentes périodes de temps et les cellules ont été ensuite analysées par cytométrie en flux. L'annexine V-FITC et l'iodure de propidium ont été utilisés afin de marquer respectivement les cellules apoptotiques et nécrotiques. Les résultats ont été confirmés par l'utilisation du Hoechst 33342, un agent intercalant de l'ADN et par l'observation de la morphologie des neutrophiles en microscopie optique.

La revue de la littérature qui compose la première section de ce mémoire discute premièrement de la nature des neutrophiles, ainsi que de leur rôle dans les processus inflammatoires. La seconde partie explique et compare les principaux types de mort cellulaire, soit l'apoptose, la nécrose secondaire et la nécrose primaire. L'accent est mis sur l'apoptose en expliquant les principales voies apoptotiques, également en présentant les principaux mécanismes et modulateurs d'apoptose des neutrophiles. La dernière section de la revue de littérature porte sur le mercure. Nous y comparons les trois formes de mercure au niveau de leurs propriétés chimiques et au niveau de leurs effets sur le système nerveux, le système rénal et plus particulièrement sur le système immunitaire.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

1 LE NEUTROPHILE

1.1 Le système immunitaire et ses cellules

Le système immunitaire constitue le système de défense de l'organisme contre tout corps étranger. Nous sommes constamment mis en présence de micro-organismes et certains d'entre eux peuvent causer des pathologies. Parmi les agents pathogènes, nous retrouvons certains virus, bactéries, champignons et parasites. Le système immunitaire a la capacité de discerner toutes les molécules faisant partie de l'organisme (le soi) de celles qui y sont étrangères (le non-soi). Lorsqu'une molécule faisant partie du non-soi est mise en contact avec l'organisme, celle-ci est prise en charge par les différentes cellules de l'immunité spécifique et non-spécifique. Les cellules de l'immunité spécifique regroupent les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les cellules de l'immunité non spécifique (immunité naturelle ou innée) comprennent principalement les monocytes (qui se différencient en macrophages), les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les cellules NK (Janeway, 1997).

1.1.1 L'immunité spécifique

Comme c'est le cas pour toutes les cellules du système immunitaire, les lymphocytes proviennent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Un progéniteur lymphoïde commun donne naissance aux lymphocytes B et aux lymphocytes T, qui poursuivent leur maturation respective au niveau de la moelle osseuse et du thymus. Ces cellules quittent par la suite les organes lymphoïdes centraux (moelle osseuse et thymus) pour se rendre aux organes lymphoïdes périphériques (ganglions lymphatiques, rate et tissus lymphoïdes associés aux surfaces muqueuses) où elles vont engager les réponses immunes (Janeway, 1997).

Les lymphocytes B activés se transforment en plasmocytes et sécrètent alors des anticorps solubles qui reconnaissent un antigène précis. Ces anticorps, ou immunoglobulines (Ig),

vont par la suite recruter d'autres cellules ou molécules afin de détruire le pathogène ciblé. On retrouve cinq classes d'anticorps (isotypes) à la surface des cellules B : IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. Chaque isotype possède une fonction particulière dans la réponse immune. Chaque cellule B ne possède qu'un seul type d'immunoglobulines à sa surface. Initialement, les anticorps ont été observés dans le plasma et dans les liquides extracellulaires, que l'on désignait à l'époque par le terme «humeurs». C'est pourquoi nous disons que les lymphocytes B induisent l'immunité humorale (Janeway, 1997).

L'immunité cellulaire quant à elle, met en jeu les lymphocytes T. Ces cellules reconnaissent les antigènes à l'aide de leur récepteur T (RcT). La défense immune à médiation cellulaire peut se faire à l'aide des lymphocytes T cytotoxiques (Tc) qui reconnaissent directement les cellules infectées par un pathogène intracellulaire (virus). Il existe également des lymphocytes T suppresseurs (Ts) et des lymphocytes T auxiliaires que l'on nomme également «helper» (Th). Les cellules Th ont pour rôle principal d'activer les cellules B, leur permettant de se multiplier et de se différencier en plasmocytes. En plus du RcT, les lymphocytes T possèdent des co-récepteurs membranaires qui jouent un rôle dans la reconnaissance de l'antigène. Chez les cellules Tc, c'est le CD8 qui agit comme co-récepteur en reconnaissant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, présentant des antigènes de provenance intracellulaire. Pour leur part, les lymphocytes Th possèdent le co-récepteur CD4 qui reconnaît les cellules présentant l'antigène à l'aide des molécules du CMH de classe II à leur surface. Le rôle des molécules du CMH chez les cellules présentatrices d'antigène (CPA) est d'internaliser et fragmenter des peptides à l'intérieur des cellules et de les présenter aux lymphocytes T. Toutes les cellules nucléées peuvent exprimer le CMH de classe I, tandis qu'un nombre limité de CPA expriment le CMH de classe II (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B). Les CPA constituent le lien entre l'immunité non spécifique et l'immunité spécifique (Janeway, 1997).

1.1.2 L'immunité non spécifique

L'immunité non spécifique regroupe plusieurs cellules de la lignée myéloïde. En plus des monocytes qui se différencient en macrophages, il y a également les granulocytes ou polymorphonucléaires (PMN). Les cellules cytotoxiques NK sont des cellules qui reconnaissent et détruisent les cellules infectées par un virus. La cellule NK reconnaît alors les modifications membranaires (expression du CMH de classe I) encourues par l'infection virale. Ces cellules sont également impliquées dans la destruction de certaines cellules tumorales.

Les PMN comprennent les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles. Ces cellules possèdent un noyau multilobé de forme variable et possèdent également un grand nombre de granules à l'intérieur de leur cytoplasme. Le nom des trois types de PMN provient de leur réaction à certaines colorations. Les basophiles, dont les granules sont fortement colorés par des colorations basiques, jouent un rôle dans la protection des surfaces muqueuses. Les éosinophiles ont des granules qui réagissent en présence de colorants acides. Ces cellules protègent l'organisme principalement contre les infections parasitaires. Tout comme les macrophages, les neutrophiles sont des cellules à fonction phagocytaire. Elles ont pour but de défendre l'organisme principalement contre les infections par des bactéries. Leurs granules se colorent en présence de colorants acides et basiques (Janeway, 1997; Edwards, 1994).

Le noyau des neutrophiles est multilobé et comporte deux à quatre segments reliés par des filaments de chromatine. Les organelles les plus abondants du cytoplasme sont les granules, qui contiennent une variété de protéines anti-microbiennes. On ne retrouve dans le cytoplasme qu'un petit nombre d'appareils de Golgi et de réticulum endoplasmique. Il est difficile d'y détecter des organelles caractéristiques des mitochondries, ce qui nous laisse croire que ces cellules n'en ont qu'un petit nombre qui sont de forme irrégulière. Il se pourrait alors que les neutrophiles puisent leur énergie dans la glycolyse, qui est un processus indépendant de l'oxygène (Edwards, 1994).

Les neutrophiles comptent pour 40 à 65 % des leucocytes et sont retrouvés dans le sang à des concentrations d'environ $3-5 \times 10^6$ cellules/ml de sang chez l'humain. Ce nombre peut augmenter de façon dramatique lors de l'infection. Ce sont également les cellules qui ont la plus courte durée de vie parmi tous les leucocytes (8-20 h dans la circulation sanguine), mais elles peuvent survivre pendant plusieurs jours dans les tissus. Puisqu'il existe un grand nombre de neutrophiles dans le sang et que ces cellules meurent rapidement par apoptose, la moelle osseuse doit en produire un grand nombre de façon quotidienne, ce qui démontre le rôle important du neutrophile pour combattre les infections. Ce sont les premières cellules recrutées à un site d'infection. Elles répondent aux signaux chimiques provenant du site inflammatoire en quittant la circulation sanguine et en se rendant au site d'infection. Les neutrophiles activés utilisent alors des mécanismes dépendants (flambée oxydative) ou indépendants (dégranulation) de l'oxygène afin de détruire une grande variété de pathogènes (Edwards, 1994).

1.2 Rôle du neutrophile dans l'inflammation

L'inflammation est une réaction induite généralement en réponse à un dommage infligé aux tissus de l'organisme. Cette réaction se caractérise par l'apparition de douleur, de rougeur, de chaleur et d'un gonflement au site infecté. Ce processus implique le recrutement de cellules spécialisées qui quittent la circulation sanguine pour se rendre au site inflammatoire. Le neutrophile, qui est spécialisé dans la lutte contre les infections bactériennes, est la première cellule recrutée au site inflammatoire. Attiré par les agents chimioattractants, le neutrophile se dirige vers les micro-organismes. Il les phagocyte et les tue par des mécanismes dépendants et indépendants de l'oxygène. Une fois le pathogène éliminé, le neutrophile meurt par apoptose. Il est alors reconnu par les macrophages environnants qui vont le phagocyter. Il y a alors résolution de l'inflammation. Le dérèglement d'une de ces étapes de l'inflammation peut mener à des désordres inflammatoires de grande importance (Trowbridge, 1997; Janeway, 1997; Maslinska et Gajewski, 1998).

1.2.1 Induction de l'inflammation

Lorsqu'un tissu est infecté par une bactérie ou tout autre pathogène, il y a un relâchement de cytokines et médiateurs inflammatoires. Les facteurs chimioattractants relâchés peuvent provenir des bactéries, des cellules infectées, de l'activation du complément ou des cellules immunes déjà en place. Les facteurs sont alors perçus par les récepteurs membranaires couplés aux protéines G des neutrophiles circulants dans les vaisseaux sanguins à proximité du site inflammatoire (Haribabu *et al*, 2000; Katanaev, 2001). Ces facteurs chimioattractants affectent également les cellules endothéliales qui tapissent le capillaire sanguin et ces dernières sécrètent des molécules qui recrutent les neutrophiles en circulation. De plus, il peut y avoir sécrétion de certains facteurs, telles les prostaglandines, qui affectent la perméabilité vasculaire, ce qui aide au passage des protéines sériques vers le site inflammatoire (Edwards, 1994; Trowbridge, 1997).

La figure 1 résume les étapes du recrutement des neutrophiles circulant dans les vaisseaux sanguins pour se rendre au site inflammatoire. Le neutrophile doit tout d'abord quitter la circulation sanguine. C'est l'étape de la marginalisation (1). Le neutrophile roule puis adhère physiquement à l'endothélium. Ces événements font appel à des molécules d'adhésion présentes chez les neutrophiles et chez les cellules endothéliales. Les sélectines, présentes à la surface du neutrophile, aident ce dernier à rouler sur les cellules de l'endothélium (2). Les intégrines sont les molécules d'adhésion qui prennent la relève des sélectines. Cette interaction entre les intégrines des neutrophiles et celles des cellules endothéliales résulte en un attachement de plus forte affinité (3). Le neutrophile subit par la suite des modifications au niveau de son cytosquelette et change de conformation afin de s'insérer entre deux cellules endothéliales par diapédèse (4) (Edwards, 1994; Alberts, 1994; Trowbridge, 1997; Smith, 2000; Wagner et Roth, 2000).

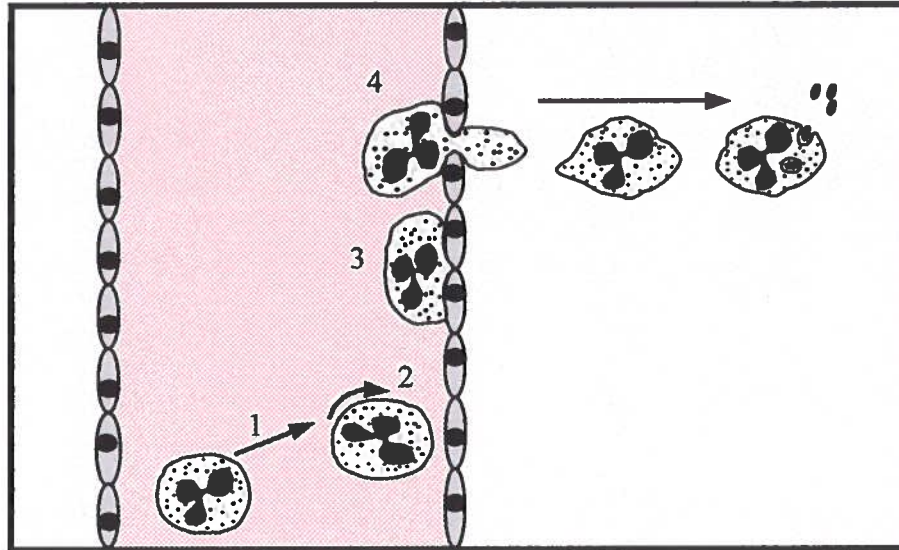


Figure 1. Migration des neutrophiles vers le site inflammatoire (inspiré de Edwards, 1994).

1.2.2 La destruction du micro-organisme

Rendu dans le tissu, le neutrophile se dirige vers le gradient d'agents chimioattractants, dont la concentration augmente en direction du site d'infection, jusqu'à ce qu'il atteigne le pathogène. Il est difficile pour le neutrophile de phagocyter la plupart des pathogènes sans l'aide des opsonines. Les opsonines comprennent les anticorps produits par les plasmocytes qui se fixent à la surface des bactéries. Le neutrophile reconnaît ces opsonines grâce à ses récepteurs qui se lient aux fragments Fc des anticorps. De plus, il existe un autre type d'opsonines qui provient d'un système de molécules du plasma, c'est-à-dire le fragment C3b du complément. Le fragment C3b se lie aux micro-organismes suite à l'activation du complément et le neutrophile reconnaît ces opsonines grâce à ses récepteurs C3b présents à sa surface. Ces deux types de récepteurs viennent alors fixer le pathogène opsonisé et il y a invagination de la membrane plasmique (figure 2). Une fois le pathogène phagocyté, celui-ci se retrouve dans le phagosome du neutrophile où il y a des granules cytoplasmiques qui viennent s'y fusionner pour former ce que l'on nomme le phagolysosome. Il y a dégranulation dans le phagolysosome et activation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, ce qui détruit le micro-

organisme (Trowbridge, 1997; Hampton, Kettle et Winterbourn, 1998; Wagner et Roth, 2000; Witko-Sarsat *et al*, 2000).

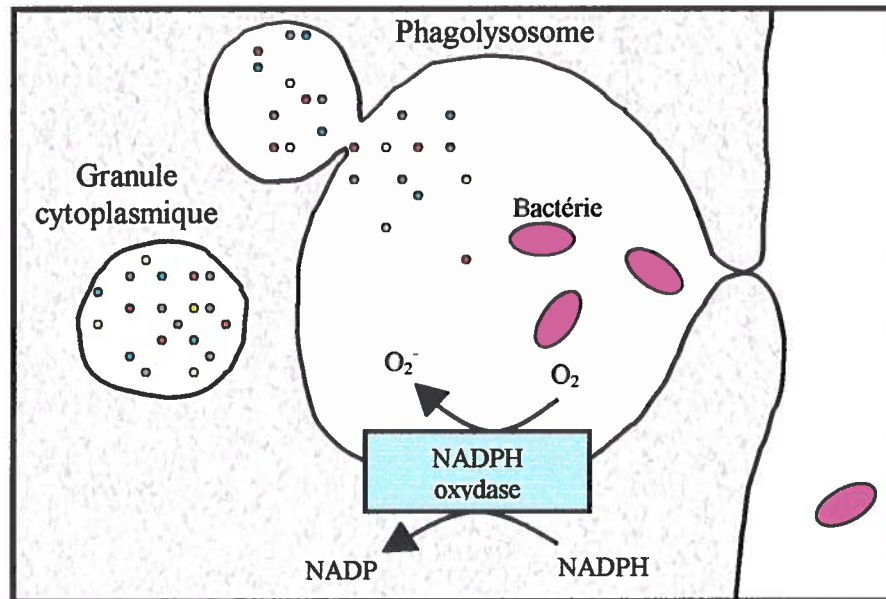


Figure 2. Phagocytose et destruction des micro-organismes (inspiré de Edwards, 1994).

L'efficacité de la destruction des micro-organismes dépend de deux mécanismes cruciaux indépendants ou dépendants de l'oxygène : le relâchement d'enzymes et de protéines antimicrobiennes par les granules et la production de radicaux libres par la NADPH oxydase (flambée oxydative). Il existe quatre types de granules cytoplasmiques. Les granules azurophiles contiennent de la myéloperoxydase, des sérine protéases et des protéines antibiotiques. Ces granules sont retrouvés sous plusieurs formes, grosseurs et leur contenu en protéines peut varier. Les granules secondaires, ou granules spécifiques, contiennent notamment de la lactoferrine et de la collagénase. Les granules tertiaires contiennent principalement de la gélatinase. En plus de leur capacité à répandre leur contenu dans le phagolysosome, le quatrième type de granules, les vésicules sécrétoires, ont la possibilité de se fusionner à la membrane plasmique. Les protéines présentes dans les différents granules sont biologiquement inertes dans le cytoplasme du neutrophile tant qu'il n'y a pas activation de la dégranulation (Edwards, 1994; Trowbridge, 1997; Witko-Sarsat *et al*, 2000).

La NADPH oxydase est l'enzyme responsable de la production de radicaux oxygénés (ROS pour «reactive oxygen species») dans le phagolysosome, ce que l'on appelle la flambée oxydative. Cette enzyme catalyse la production de superoxyde (O_2^-) par la réduction de l'oxygène, la NADPH étant le donneur d'électrons. Les anions superoxyde produits servent par la suite à la production d'une variété de molécules telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et l'oxygène singulet (1O_2). Puisque la production de ces radicaux libres peut causer des dommages importants, la NADPH oxydase est régulée de sorte qu'elle ne fonctionne pas lorsque le neutrophile est inactif. La figure 3 présente les cinq composantes de l'enzyme avant et après activation du neutrophile. À l'état de repos, trois des cinq composantes ($p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ et $p67^{PHOX}$) se retrouvent dans le cytosol sous forme de complexe, tandis que les deux autres composantes ($p22^{PHOX}$ et $gp91^{PHOX}$) sont situées sur la membrane des vésicules sécrétoires et des granules spécifiques. Ces deux dernières sont connues également sous le nom de cytochrome b_{558} . La séparation de ces deux groupes garantit l'inactivité de l'enzyme. En plus des cinq composantes de la NADPH oxydase, Rap1A et Rac2 sont deux petites protéines se liant au GTP qui auraient un rôle à jouer dans l'assemblage et l'activation de l'enzyme. Lorsque le neutrophile est activé, la composante $p47^{PHOX}$ devient hautement phosphorylée et tout le complexe cytosolique migre vers la membrane pour s'associer au cytochrome b_{558} . La NADPH oxydase est alors fonctionnelle (Hampton, Kettle et Winterbourn, 1998; Babior, 1999; Serhan et Ward, 1999; Witko-Sarsat *et al*, 2000).

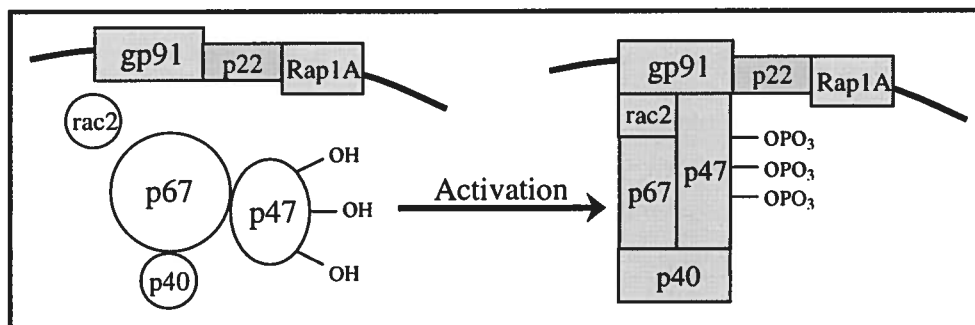


Figure 3. Assemblage de la NADPH oxydase (inspiré de Babior, 1999).

Certaines molécules produites par les neutrophiles peuvent augmenter la réponse inflammatoire par le recrutement d'un plus grand nombre de neutrophiles et d'autres types de cellules immunes. D'autres molécules produites par les neutrophiles dans le but de détruire les micro-organismes (enzymes dégradatives et dérivés oxygénés) peuvent causer des dommages aux tissus environnants, ce qui pourrait amplifier la réponse inflammatoire (Edwards, 1994).

1.2.3 Résolution de l'inflammation

Lorsque l'agent infectieux est contrôlé, les fonctions du neutrophile sont diminuées et celui-ci meurt par apoptose. Les neutrophiles apoptotiques subissent des modifications au niveau de leur membrane tout en maintenant leur intégrité membranaire, ce qui permet aux macrophages présents dans le tissu de les reconnaître et de les phagocyter. Parmi ces modifications membranaires, notons la perte d'asymétrie des phospholipides. Il y a alors expression des phosphatidylsérines vers le milieu extracellulaire, ce qui constitue une bonne méthode de détection des cellules apoptotiques en utilisant de l'annexine V, puisque cette molécule reconnaît et se fixe aux phosphatidylsérines externalisées. Il est important de noter que la phagocytose des neutrophiles apoptotiques inhibe le relargage de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages (Savill et Haslett, 1995; Homburg *et al*, 1995; Hart, Haslett et Dransfield, 1996; Haslett, 1999; Giles *et al*, 2000).

La diminution des effets toxiques des neutrophiles au site inflammatoire suivie de la phagocytose de ces neutrophiles apoptotiques constitue le principal mécanisme responsable de la résolution de l'inflammation aiguë (figure 4). Un défaut dans la machinerie apoptotique du neutrophile ou dans l'efficacité de leur phagocytose peuvent perturber la résolution de la réponse inflammatoire. S'il y a persistance des neutrophiles activés dans le milieu, il peut y avoir recrutement de macrophages et de lymphocytes, ce qui permet le changement de l'inflammation aiguë en inflammation chronique. Il en est de même avec les neutrophiles nécrotiques qui perdent leur intégrité membranaire et relâchent leur contenu intracellulaire dans le milieu environnant, augmentant la réponse inflammatoire. C'est ainsi que l'on peut assister à l'émergence de maladies

inflammatoires. Une meilleure compréhension de ces mécanismes responsables de la résolution de l'inflammation pourrait avoir une grande implication dans le traitement de désordres inflammatoires de toutes sortes (Savill *et al*, 1989; Savill et Haslett, 1995; Trowbridge, 1997; Giles *et al*, 2000; Witko-Sarsat *et al*, 2000).

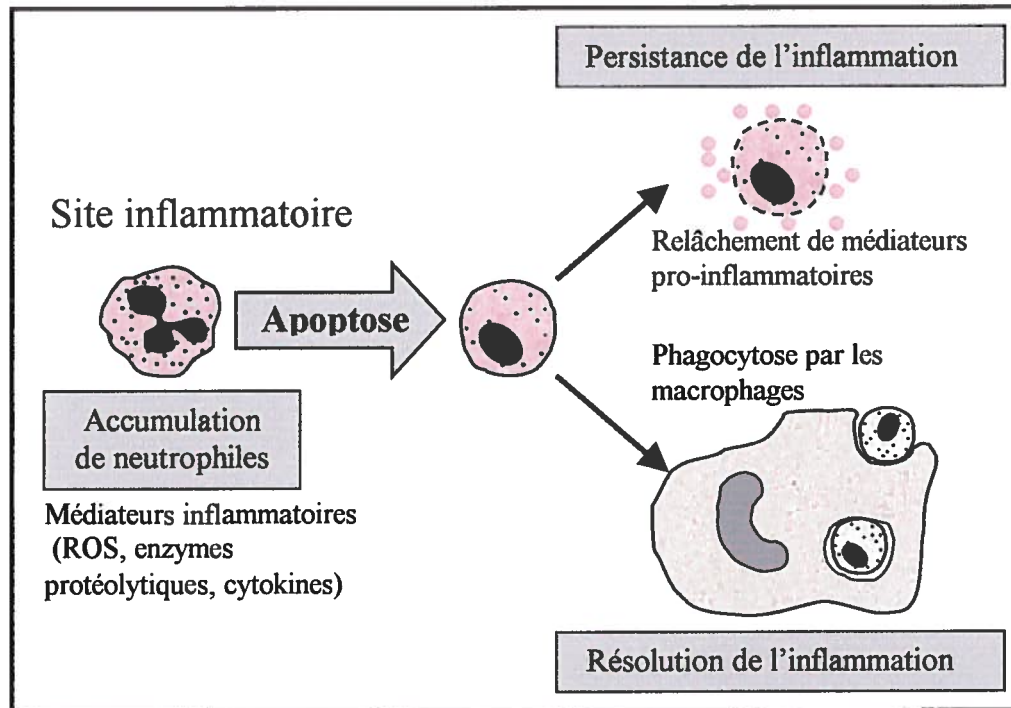


Figure 4. Rôle de l'apoptose des neutrophiles et de la phagocytose par les macrophages dans le processus de résolution de l'inflammation (inspirée de Giles *et al*, 2000).

1.2.4 Désordres inflammatoires

Le rôle du neutrophile dans l'organisme est d'une importance cruciale dans la lutte contre les bactéries. Un dérèglement d'une des fonctions du neutrophile peut avoir des conséquences désastreuses chez l'individu lorsque celui-ci souffre d'une infection quelconque. Puisque cette cellule produit des molécules dommageables pour l'organisme, une suractivité de celle-ci peut causer des maladies. Il en va de même avec la neutropénie, c'est-à-dire lorsque les individus produisent un nombre insuffisant de neutrophiles dans le sang, ce qui cause chez ces patients des infections bactériennes récurrentes. La neutropénie peut être due à une maladie, telle que la neutropénie congénitale, l'anémie

aplasique, l'agranulocytose ou la leucémie myéloïde aiguë. La neutropénie peut être la conséquence d'une thérapie. Certains médicaments utilisés dans le traitement de désordres inflammatoires ont un effet immunosuppresseur et par le fait même diminuent le nombre de neutrophiles dans l'organisme de façon importante. L'administration d'un traitement chimiothérapeutique à un patient atteint de cancer peut causer des dommages aux cellules de la moelle osseuse, ce qui diminue le taux de neutrophiles dans le sang et augmente ainsi le risque d'infections par les bactéries (Edwards, 1994).

Un défaut dans la production de ROS chez les neutrophiles peut mener à la maladie granulomateuse chronique («chronic granulomatous disease» ou CGD). Cette maladie est causée par un défaut dans le fonctionnement de l'enzyme productrice de radicaux libres, la NADPH oxydase. Malgré le fait que le neutrophile a la capacité de phagocyter les bactéries, l'absence ou le mauvais fonctionnement d'une des sous-unités de la NADPH oxydase empêche la cellule de détruire certains pathogènes par la flambée oxydative. Les individus atteints de CGD souffrent d'infections de toutes sortes et meurent habituellement avant l'âge de dix ans. L'incidence de la maladie granulomateuse chronique est rare et touche en majorité les garçons, ce qui indique que cette maladie est souvent reliée à une transmission par le chromosome-X (X-CGD) (Edwards, 1994; Serhan et Ward, 1999).

La myéloperoxydase est une protéine antimicrobienne présente dans les granules cytoplasmiques du neutrophile. Cette enzyme augmente l'activité bactéricide du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les patients ayant une déficience totale en myéloperoxydase peuvent se défendre contre la plupart des micro-organismes, tandis que certains comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens* sont détruits beaucoup plus lentement par les neutrophiles. Il existe de nombreuses situations qui peuvent mener à une déficience en myéloperoxydase. La grossesse, une intoxication au plomb, la maladie de Hodgkin, des infections bactériennes prolongées et des cancers disséminés peuvent causer cette anomalie (Edwards, 1994).

Une déficience des granules spécifiques des neutrophiles est une maladie très rare qui se caractérise par des infections récurrentes à la peau et aux poumons. *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des pathogènes communs chez cette maladie. Ces patients possèdent des neutrophiles ayant un noyau à l'apparence bilobée plutôt que polymorphe. Ces neutrophiles ne possèdent pas de protéines présentes dans les granules spécifiques telles que la lactoférine et la gélatinase. La myéloperoxydase est présente à un niveau normal, mais ces cellules présentent des difficultés au niveau de la chimiotaxie. Certaines protéines présentes dans les granules azurophiles telles que la défensine et des peptides antimicrobiens sont absents également chez les neutrophiles de ces patients (Edwards, 1994).

Le syndrome Chediak-Higashi est une maladie autosomale récessive rare qui fut caractérisée en premier par la présence de granules cytoplasmiques de grande taille chez les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes d'un patient souffrant d'infections. Les neutrophiles des patients souffrant de cette maladie contiennent des granules azurophiles et des granules spécifiques de format géant qui se forment pendant l'hématopoïèse au niveau des cellules souches. Cette anomalie perturbe la chimiotaxie, la dégranulation et l'activité bactéricide des neutrophiles. Ces effets couplés à la neutropénie qui survient dans l'organisme résultent en des risques accrus d'infections, plus particulièrement au niveau de la peau, du tractus respiratoire et au niveau des muqueuses (Edwards, 1994).

L'arthrite rhumatoïde est une maladie autoimmune qui affecte environ 1% de la population mondiale. Cette maladie apparaît en majorité chez les gens âgés entre 30 et 50 ans. L'arthrite rhumatoïde affecte principalement le tissu synovial des articulations, causant une diminution importante de leurs fonctions. Lors du développement de cette maladie il y a destruction du cartilage de l'articulation. Celui-ci perd alors ses propriétés protectrices contre les dommages physiques au niveau des os de l'articulation. Il y a production excessive de liquide synovial qui est infiltré par de grandes quantités de neutrophiles, nous indiquant que ces cellules jouent un certain rôle dans cette pathologie (Edwards, 1994; Serhan et Ward, 1999).

2 LA MORT CELLULAIRE

Il existe deux types principaux de mort cellulaire, soit l'apoptose et la nécrose. L'apoptose peut se caractériser par une forme de suicide cellulaire pendant lequel la cellule déclenche toute une machinerie de protéines qui induisent des changements morphologiques et biochimiques contrôlés. Cette dernière est par la suite reconnue par des phagocytes environnants qui ingèrent les corps apoptotiques sans induire aucune réponse inflammatoire. La nécrose pour sa part constitue un type de mort cellulaire où la cellule subit des changements importants dans son environnement qui provoquent la rupture de la membrane plasmique. Le relâchement du contenu intracellulaire dans le milieu environnant a pour effet d'induire une réponse inflammatoire.

2.1 L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle primordial dans plusieurs aspects du développement et dans le maintien de l'homéostasie (Meier, Finch et Evan, 2000). Lors du développement du système nerveux, il y a production d'une multitude de neurones et de cellules gliales qui migrent et forment de nombreuses connections. L'apoptose permet alors de préserver un nombre raisonnable de cellules nerveuses fonctionnelles. Au niveau du système immunitaire, l'apoptose joue un rôle lors de la différenciation des cellules B et T, afin d'éviter de se retrouver avec des cellules immunes autoréactives. De plus, l'apoptose permet l'élimination des cellules impliquées dans une réponse inflammatoire lorsque celle-ci est contrôlée (Savill et Fadok, 2000). C'est une forme de mort cellulaire que l'on peut qualifier de propre, puisqu'elle permet d'éliminer efficacement des cellules sans affecter le milieu environnant. Un débalancement au niveau du taux normal d'apoptose des cellules de l'organisme peut avoir de conséquences désastreuses. Une incidence trop élevée de l'apoptose chez certaines cellules peut entraîner des maladies dégénératives. Si à l'inverse le taux d'apoptose est trop diminué, il y a un risque d'émergence de cancers et de maladies autoimmunes (White, 1993; McConkey, Zhivotovsky et Orrenius, 1996).

2.1.1 Caractéristiques morphologiques et biochimiques

Les cellules apoptotiques subissent des altérations morphologiques telles que la perte du volume cellulaire, la condensation de la chromatine, le clivage de l'ADN en fragments oligonucléosomiaux de 180 pb et la formation de corps apoptotiques. De plus, la cellule apoptotique subit des changements au niveau de l'asymétrie des phospholipides membranaires, notamment les phosphatidylsérines qui sont alors exposés vers le milieu extracellulaire permettant la reconnaissance par les phagocytes environnants. De plus, il y a activation d'endonucléases telles que la DNase I, responsables de la formation des fragments d'ADN que l'on nomme également le « DNA ladder ». Malgré le fait que la cellule apoptotique maintienne son intégrité membranaire, celle-ci perd tout contact avec les cellules environnantes et avec la matrice extracellulaire (van Engeland *et al*, 1997; Hengartner, 2000).

Les changements morphologiques et biochimiques observés lors de l'apoptose sont principalement le fruit de l'activation des caspases. Ce type de protéases (cystéines aspartases) a été observé pour la première fois chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ces protéases clivent après des résidus acide aspartique spécifiques situés sur des protéines telles que la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) et certaines protéines du cytosquelette. Les caspases sont synthétisées et présentes en temps normal dans la cellule sous forme de précurseurs inactifs. Ces proenzymes contiennent trois domaines : un domaine NH₂-terminal, une grande sous-unité et une petite sous-unité. L'activation des caspases implique le clivage des trois domaines et l'association de la petite et la grosse sous-unité pour former la protéase active sous forme d'hétérodimère. Les caspases participent à l'apoptose à plusieurs niveaux, notamment en coupant tout contact avec les cellules environnantes, en réorganisant le cytosquelette, en éliminant la réplication et la réparation de l'ADN, en détruisant l'ADN et la structure nucléaire et en induisant la formation de corps apoptotiques (McConkey et Orrenius, 1996; McConkey, Zhivotovsky et Orrenius, 1996; Thornberry et Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000).

2.1.2 Les principales voies apoptotiques

2.1.2.1 L'apoptose via un récepteur membranaire

Certains récepteurs à la surface des cellules ont la possibilité d'induire l'apoptose lorsqu'ils se lient à leur ligand. Les molécules FasL (Fas ligand) et TNF (« Tumor Necrosis Factor ») sont des cytokines qui font partie de la famille TNF. FasL se lie à son récepteur, soit le récepteur Fas, qui est une protéine membranaire également connue sous le nom de APO-1 ou CD95. Le système Fas-FasL joue un rôle important lors de trois principales circonstances, soit : (i) la délétion de lymphocytes T activés à la fin de la réponse immune, (ii) la destruction de cellules infectées par des virus ou des cellules cancéreuses par les lymphocytes T cytotoxiques et (iii) l'élimination de cellules inflammatoires des sites immunoprivilégiés tels que l'œil (Nagata et Golstein, 1995; Nagata, 1997; Ashkenazi et Dixit, 1998; Krammer, 2000).

Le TNF pour sa part se lie aux récepteurs TNFR1 et TNFR2. Cette cytokine est produite essentiellement par des macrophages activés et par les cellules T en réponse à une infection. Il est à noter que, contrairement à FasL, TNF a la possibilité d'induire ou de retarder l'apoptose, l'inhibition de l'apoptose s'effectuant via l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Les deux récepteurs de mort liés à leur ligand doivent être oligomérisés (trimères) afin d'induire des transductions de signaux dans la cellule. Tel que montré à la figure 5, les récepteurs Fas et TNFR1 contiennent des domaines de mort au niveau cytoplasmique qui permettent le recrutement de molécules adaptatrices comme FADD (« Fas-associating protein with death domain ») et TRADD (« TNFR1-associated death domain protein »). L'association de ces protéines permet le recrutement et l'activation de la caspase-8, qui à son tour active toute la cascade apoptotique menant à la mort cellulaire (Nagata, 1997; Ashkenazi et Dixit, 1998).

2.1.2.2 L'apoptose mitochondriale

La mitochondrie constitue une forme de centrale énergétique pour la cellule. Mais la mitochondrie exerce également le rôle de senseur de stress cellulaire et l'apoptose peut survenir à partir de cet organelle. Trois mécanismes principaux peuvent induire l'apoptose mitochondriale soit (i) la perturbation dans la chaîne de transport d'électrons, de la phosphorylation oxydative et de la production d'adénosine triphosphate (ATP), (ii) le relâchement de protéines qui activent la cascade de caspases et (iii) l'altération du potentiel redox de la cellule. Dans plusieurs scénarios apoptotiques, le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) chute, indiquant l'ouverture d'un pore. L'inhibition de l'ouverture de ce pore peut bloquer l'apoptose dans certaines situations, suggérant que ce pore joue un rôle important dans l'orchestration de l'apoptose mitochondriale. L'ouverture du pore mitochondrial, qui constitue un événement apoptotique précoce, permet la sortie de molécules inductrices de la cascade comme le cytochrome c (Zamzami *et al*, 1996; Kroemer, Dallaporta et Resche-Rigon, 1998; Green et Reed, 1998; Desagher et Martinou, 2000).

Le cytochrome c contribue à la formation de l'apoptosome (figure 5), qui est une structure composée de l'association du cytochrome c, de l'Apaf-1 (pour « apoptotic protease-activating factor 1 ») et de la caspase-9. La formation de l'apoptosome mène au clivage et à l'activation de la caspase-9. La caspase-9 clive à son tour la caspase-3 et ce clivage est suivi par l'activation de la cascade des caspases en aval, menant à l'apoptose de la cellule. Une autre protéine activatrice des caspases peut être relâchée de la mitochondrie suite à l'ouverture d'un pore membranaire, soit l'AIF ou « apoptosis-inducing factor » (Li *et al*, 1997; Green et Reed, 1998; Desagher et Martinou, 2000; Martinou, Desagher et Antonsson, 2000).

2.1.2.3 La famille Bcl-2

Il existe un autre lien entre apoptose et mitochondries. Les protéines de la famille Bcl-2 sont des produits de gènes régulateurs qui jouent le rôle d'agonistes ou d'antagonistes à

l'apoptose. Ces protéines situées dans les membranes mitochondriales (figure 5), constituent une sorte d'interrupteur qui déclenche ou non la mort cellulaire par apoptose grâce à des liens protéine-protéine. Bcl-2 est un des membres de cette famille de polypeptides qui régulent l'apoptose via leur homo- ou hétéro-dimérisation. Les membres de cette famille partagent deux régions d'homologie, nommées BH1 et BH2, qui médient la dimérisation et possiblement les fonctions effectrices des peptides. Il existe des protéines qui, comme Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w et Mcl-1 ont pour effet d'inhiber l'apoptose des cellules, tandis qu'il y en a qui, comme Bax, Bik, Bak, Bad et Bcl-xs promouvoient la mort cellulaire par apoptose. Il semblerait que la formation d'hétérodimères Bcl-2/Bax à la membrane mitochondriale ont pour effet d'inhiber l'apoptose, tandis que la formation d'homodimères Bax/Bax induisent la formation du pore membranaire qui permet la sortie du cytochrome c de la mitochondrie et éventuellement l'activation de la machinerie apoptotique (McConkey, Zhivotovsky et Orrenius, 1996; Nagata, 1997; Desagher et Martinou, 2000).

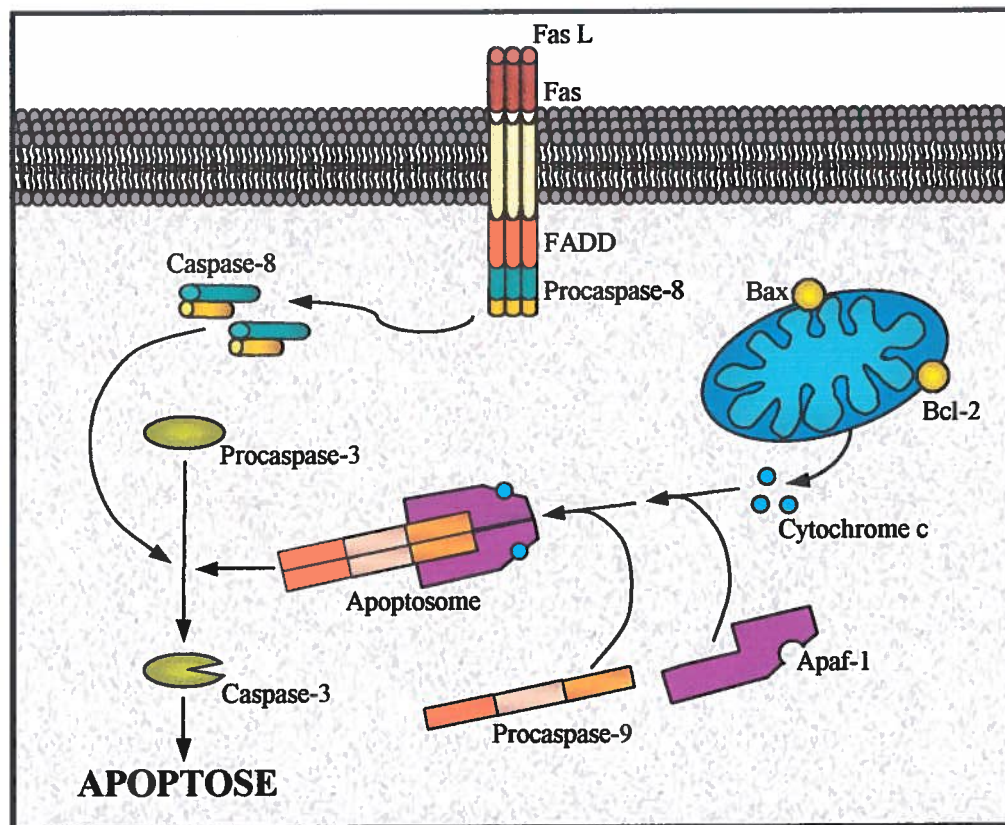


Figure 5. Principales voies apoptotiques (inspirée de Hengartner, 2000).

2.1.3 L'apoptose des neutrophiles

2.1.3.1 Les particularités de l'apoptose chez les neutrophiles

Comme il a été mentionné auparavant, les neutrophiles ont la plus courte durée de vie parmi tous les leucocytes et vont spontanément en apoptose en absence de cytokines ou de médiateurs pro-inflammatoires. Ces cellules possèdent quelques particularités au niveau de l'apoptose, en ce sens qu'elles possèdent par exemple un faible nombre de mitochondries de structure atypique. Il paraît difficile pour l'instant de détecter l'initiation de l'apoptose grâce à une sortie du cytochrome c des mitochondries de ces cellules en conditions physiologiques (Pryde *et al*, 2000). De plus, les neutrophiles ne possèdent pas la protéine anti-apoptotique Bcl-2, la caspase-2 ainsi que PARP, qui est un substrat de clivage de la caspase-3 présent chez la plupart des cellules (Santos-Beneit et Mollinedo, 2000; Sanghavi *et al*, 1998). C'est pourquoi l'étude de l'apoptose des neutrophiles est particulière. En plus du fait que ces cellules vont spontanément en apoptose, il existe une multitude de molécules susceptibles de moduler positivement ou négativement la mort des neutrophiles (Whyte *et al*, 1999; Ward *et al*, 1999; Akgul, Moulding et Edwards, 2001). Parmi ces substances, nous retrouvons les cytokines, certaines drogues et médicaments, des toxiques de l'environnement et bien d'autres. Certains modulateurs ont le pouvoir de modifier ou de maintenir l'activité de composantes intracellulaires préexistantes et d'autres ont pour effet d'activer ou d'inhiber des voies de signalisation intracellulaires, menant ou non à la synthèse de nouvelles protéines impliquées dans la régulation de la mort cellulaire des neutrophiles.

2.1.3.2 Les modulateurs de l'apoptose des neutrophiles

2.1.3.2.1 Les cytokines

Un grand nombre de cytokines inflammatoires telles que $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-15 , $\text{IFN-}\gamma$, G-CSF et GM-CSF activent les neutrophiles et prolongent leur survie. Les cellules maintiennent alors leur capacité de produire des radicaux libres, d'exprimer des gènes et

de détruire les micro-organismes (Colotta *et al*, 1992; Klebanoff *et al*, 1992; Brach *et al*, 1992; Lee, Whyte et Haslett, 1993; Pericle *et al*, 1994; Homburg *et al*, 1995; Girard *et al*, 1996; Girard, Paquin et Beaulieu, 1997; Moulding *et al*, 1998; Ward *et al*, 1999). Peu de cytokines ont le pouvoir d'induire l'apoptose chez les neutrophiles. L'IL-6 et le TNF- α sont des cytokines qui peuvent ou bien induire ou bien retarder l'apoptose de ces cellules, tout dépendant des conditions expérimentales utilisées. Nous verrons ici quelques exemples.

Les facteurs de croissance GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) sont de puissants inhibiteurs d'apoptose des neutrophiles (Colotta *et al*, 1992; Brach *et al*, 1992). L'administration de GM-CSF chez des patients souffrant de cancer aide à renforcer la réponse immune suite à l'administration d'agents chimiothérapeutiques. L'injection de GM-CSF chez ces patients augmente la concentration de neutrophiles dans le sang périphérique.

L'IL-4 est une cytokine de type Th-2. Il a été démontré que des neutrophiles traités avec de l'IL-4 résistent à l'apoptose spontanée tout en maintenant leurs fonctions cytosquelettiques. L'apoptose des neutrophiles est diminuée par la capacité de l'IL-4 à augmenter la synthèse *de novo* de protéines telles que l'actine. L'actine, sous sa forme active, est un inhibiteur de la DNase I, une enzyme qui joue un rôle central dans la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose (Girard, Paquin et Beaulieu, 1997).

L'IL-8, qui est une chimiokine, retarde l'apoptose médiée par Fas et celle médiée par les récepteurs de TNF- α (Leuenroth *et al*, 1998; Kettritz *et al*, 1998). L'interleukine-8 joue un rôle clé dans l'accumulation de leucocytes au site d'inflammation. Cette cytokine est un puissant chimioattractant qui induit la dégranulation et le relâchement d'enzymes digestives chez le neutrophile. Non seulement ces cellules répondent à l'activation par l'IL-8, mais elles sont également aptes à produire elles-mêmes cette cytokine lorsque stimulées. Ce cercle vicieux a pour effet d'intensifier la réponse inflammatoire (Girard, Paquin et Beaulieu, 1997; Leuenroth *et al*, 1998).

L'IL-15 agit sur plusieurs cellules du système immunitaire, notamment sur les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules NK et les neutrophiles. Cette cytokine est retrouvée entre autres dans le liquide synovial de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde. Ce liquide contient également un nombre important de neutrophiles, ce qui laisse croire que l'IL-15 a la capacité de recruter les neutrophiles dans le milieu et par le fait même d'amplifier la réponse inflammatoire. De plus, l'IL-15 induit chez le neutrophile la production d'IL-8. L'IL-15 induit une augmentation de la phagocytose et prolonge la durée de vie des neutrophiles. Cette cytokine active le facteur de transcription NF- κ B (McDonald *et al*, 1998). De plus, l'IL-15 induit la synthèse *de novo* de plusieurs protéines, notamment l'actine (Girard *et al*, 1996).

Les effets de l'IL-2 sur les neutrophiles sont controversés. Pericle *et al* (1994) ont montré que cette cytokine induit la synthèse *de novo* d'ARN et de protéines. Ils ont également affirmé que l'IL-2 diminue l'apoptose spontanée des neutrophiles en culture à moins de 40% après 72 heures, par rapport à un taux d'apoptose supérieur à 80% chez des neutrophiles en absence de cytokines. Mais d'autres études ont ultérieurement montré que l'IL-2 n'a aucun effet sur les fonctions des neutrophiles, incluant le taux d'apoptose spontanée (Girard *et al*, 1996; McDonald *et al*, 1998).

L'interleukine-6 est un médiateur important des réponses inflammatoires qui est produit par plusieurs types de cellules comme les monocytes/macrophages. Cette cytokine est à la fois pro- et anti-apoptotique. Les effets *in vitro* de l'IL-6 sur les neutrophiles varient selon plusieurs facteurs tels que la concentration de la cytokine dans le milieu et la concentration cellulaire (Afford *et al*, 1992; Biffi *et al*, 1995; Biffi *et al*, 1996). Par exemple, lorsque incubés entre 1 et 5 millions de cellules/ml, les neutrophiles ne sont pas affectés par la présence d'IL-6 (19-100 ng/ml). Cependant, cette cytokine retarde l'apoptose des cellules observées après 24 heures lorsqu'elles se retrouvent à des concentrations entre 10 et 20 millions de cellules/ml (Biffi *et al*, 1995).

Le TNF- α est un agoniste puissant des neutrophiles et constitue une autre cytokine à doubles effets sur leur apoptose (Salamone *et al*, 2001). On a tout d'abord observé sa capacité à induire la mort cellulaire. Il fut observé par la suite que le TNF- α peut également prolonger la survie des neutrophiles en inhibant l'apoptose, par des voies de signalisation qui impliquent le facteur de transcription NF- κ B (van den Berg *et al*, 2001). Les signaux médiés par TNF α passent par trois voies de signalisation principales : (i) l'activation de caspases menant à l'apoptose via le récepteur TNF situé à la membrane cellulaire; (ii) l'activation de la p38MAPK; et (iii) l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Wallach *et al*, 1999). Cette cytokine induit l'apoptose lors des premières heures d'incubation, alors qu'elle inhibe l'apoptose après 18 heures de culture (Murray *et al*, 1997). Ces effets inverses ne sont plus perçus lorsqu'il y a inhibition de la synthèse protéique et toute la population de neutrophiles subit alors l'apoptose en moins de 2 heures d'incubation. Ceci suggère que les effets opposés de TNF α sont médiés via l'activation rapide d'une voie de signalisation pro-apoptotique chez les cellules susceptibles, accompagné de l'expression de protéines qui protègent ultérieurement les cellules survivantes contre les signaux pro-apoptotiques (Murray *et al*, 1997; Ward *et al*, 1999; Akgul, Moulding et Edwards, 2001). TNF- α peut avoir plusieurs effets sur les neutrophiles également selon la concentration que l'on retrouve. Cette cytokine prévient l'apoptose des neutrophiles à de faibles concentrations (0,1-1 ng/ml). Cet effet dépend entre autre de la synthèse *de novo* de protéines et est similaire à l'action d'autres cytokines inflammatoires telles que IFN- γ et GM-CSF. À de plus fortes concentrations (10-100 ng/ml), l'effet de TNF- α sur les neutrophiles est pro-apoptotique, même en présence de GM-CSF et IFN- γ (van den Berg *et al*, 2001).

2.1.3.2.2 Drogues et médicaments

La régulation de l'apoptose des neutrophiles est une cible importante pour les interventions thérapeutiques *in vivo*. L'induction d'apoptose aide à résoudre la réponse inflammatoire. Dans le cas inverse, un prolongement de la survie des neutrophiles stimule

l'inflammation. Cependant, le manque de connaissances sur les mécanismes de régulation de l'apoptose des neutrophiles ne facilite pas la tâche (Cox et Austin, 1997).

Les glucocorticoïdes, hormones synthétisées dans l'organisme en période de stress, sont employés dans le traitement de maladies inflammatoires telles que l'asthme (Barnes *et al*, 1993) et l'arthrite rhumatoïde (Goulding *et al*, 1998). Malgré qu'ils induisent l'apoptose des éosinophiles et des thymocytes (Ward *et al*, 1999), les corticostéroïdes tels que la dexaméthasone, la 6 alpha-méthylprednisolone et l'hydrocortisone inhibent l'apoptose des neutrophiles (Liles et Klebanoff, 1995; Meagher *et al*, 1996; Sendo, Kato et Yazawa, 1997). Les glucocorticoïdes se lient à des récepteurs à glucocorticoïdes situés dans le cytoplasme de la cellule cible, et la formation d'un complexe entre le ligand et son récepteur régule l'expression de gènes spécifiques. Il se pourrait alors que cette hormone induise l'expression de protéines inhibitrices d'apoptose des neutrophiles (Barnes *et al*, 1993; Kato *et al*, 1995). Des inhibiteurs de transcription (cycloheximide) et de traduction (actinomycine) réduisent les effets anti-apoptotiques des corticostéroïdes (Cox et Austin, 1997).

La *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) est une lectine de plante qui possède deux sous-unités distinctes, soit la chaîne A et la chaîne B. La chaîne A confère la propriété inhibitrice de synthèse protéique à la VAA-I, molécule qui agit comme un inactivateur de ribosomes. La chaîne B permet à la VAA-I de se lier à des résidus galactosides terminaux situés sur la membrane de nombreuses cellules (Bussing, 1996; Savoie *et al*, 2000). La VAA-I peut induire la synthèse protéique à de faibles concentrations, alors qu'elle a un rôle inhibiteur à des concentrations supérieures à 500 ng/ml. Ces fortes concentrations induisent l'apoptose des neutrophiles selon un mécanisme dépendant des caspases. Les faibles concentrations de VAA-I n'ont aucun effet sur le taux d'apoptose des neutrophiles, ce qui suggère une corrélation entre l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la synthèse *de novo* de protéines. Ces résultats suggèrent également que la VAA-I peut accélérer l'apoptose des neutrophiles sans la synthèse de nouveaux facteurs. Il semble que la machinerie nécessaire à l'exécution de l'apoptose soit déjà présente. La VAA-I est un

puissant immunomodulateur qui offre donc une stratégie thérapeutique intéressante visant à combattre diverses maladies inflammatoires (Savoie *et al*, 2000).

La cigarette constitue un facteur de risque de maladies telles que l'emphysème pulmonaire et les bronchites chroniques. De plus, il a été démontré qu'elle cause une accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires (Hunninghake *et al*, 1983). La nicotine, un constituant majeur de la fumée de cigarette, prolonge la survie des neutrophiles *in vitro* et préserve leurs fonctions de chimiotaxie et de production de superoxyde (Aoshiba *et al*, 1996). L'acroléine, un aldéhyde insaturé toxique retrouvé dans la fumée de cigarette, peut retarder l'apoptose des neutrophiles, induire l'activation des kinases ERK et p38MAPK et activer la production d'IL-8. Ceci indique que la nicotine et l'acroléine pourraient contribuer aux processus inflammatoires dans les voies respiratoires induits par la fumée de cigarette en augmentant le recrutement de neutrophiles et en prolongeant leur durée de vie (Finkelstein, Nardini et van der Vliet, 2001).

Des intoxications aiguës à l'éthanol produisent une chute du niveau de neutrophiles dans l'organisme. L'éthanol *in vitro* et *in vivo* accélère l'apoptose des neutrophiles humains et stimule la production d'oxyde nitrique chez ces cellules (Singhal *et al*, 1999).

Lors d'études cliniques effectuées auprès de travailleurs dans le domaine de la santé, il a été démontré que certains produits utilisés lors des anesthésies, tels que le N₂O, le sevoflurane et l'isoflurane, inhibent l'apoptose des neutrophiles à des concentrations inférieures aux niveaux recommandés (Goto *et al*, 2000).

La clozapine, ou Clozaril, est une dibenzodiazépine antipsychotique utilisée dans le traitement de la schizophrénie. Son utilisation est cependant limitée puisque ce médicament cause l'agranulocytose chez certains patients. Les patients qui reçoivent un tel traitement doivent même subir un compte du nombre de leurs neutrophiles à chaque semaine durant les premiers mois de traitement. La clozapine est bioactivée en un ion nitrenium toxique par le cytochrome P450 et les enzymes peroxydases. Ce métabolite

instable se lie de manière covalente aux protéines intracellulaires et diminue les niveaux de glutathion (GSH) dans la cellule. La clozapine accélère l'apoptose des neutrophiles *in vitro* à des concentrations thérapeutiques. Les mécanismes d'induction de l'apoptose des neutrophiles par la clozapine sont peu connus, mais il semblerait que la chute du niveau de GSH et le stress oxydatif auraient un rôle à jouer dans l'induction de la cascade apoptotique (Williams *et al*, 2000).

Les neutrophiles jouent un rôle important dans l'arthrite rhumatoïde et dans d'autres maladies inflammatoires. L'arthrite rhumatoïde est caractérisée par une infiltration massive de neutrophiles dans les articulations. L'auranofine, un sel d'or utilisé pour traiter cette maladie, possède des propriétés anti-inflammatoires. Ce médicament affecte de nombreux types de cellules, incluant les neutrophiles, les cellules endothéliales et les lymphocytes. Cependant, il a deux types d'effets sur les neutrophiles, puisqu'il retarde l'apoptose de ces cellules à de faibles concentrations et est cytotoxique à de plus fortes concentrations. Aux concentrations activatrices, l'auranofine active la phospholipase C (PLC), et par conséquent active la protéine kinase C (PKC), ce qui suggère que le médicament inhibe l'apoptose des neutrophiles via l'activation de transductions de signaux. Fait étrange, les concentrations inhibitrices d'apoptose *in vitro* correspondent à celles retrouvées en clinique, alors que le but de ce traitement est d'éliminer les neutrophiles activés afin de diminuer tout dommage aux tissus. Il se pourrait cependant que les effets du médicament diffèrent chez les neutrophiles activés *in vivo* situés dans les articulations de patients par rapport aux effets retrouvés *in vitro* chez des neutrophiles au repos (Liu *et al*, 2000).

La cytarabine, ou AraC, est un médicament antinéoplasique utilisé dans le traitement de plusieurs types de leucémies et lymphomes. Cet agent chimiothérapeutique induit l'apoptose, accompagnée d'une augmentation de la génération d'oxydants intracellulaires et de phosphorylations sur des résidus tyrosine. De plus, l'AraC augmente le relâchement de ROS provoqué par le N-formyl-leucyl-phénylalanine (f-MLP) (Iacobini *et al*, 2001).

2.1.3.2.3 Toxiques de l'environnement

Les toxiques de l'environnement peuvent avoir des conséquences néfastes sur la santé des gens, notamment au niveau de leur système immunitaire. Malheureusement, peu d'études ont pour objet l'influence des toxiques de l'environnement sur l'apoptose des neutrophiles. Deux d'entre elles sont présentées dans cette section, alors que celle touchant les effets du mercure sur les neutrophiles sera abordée plus loin dans cet ouvrage.

Le toxaphène est un insecticide qui appartient à la classe de produits chimiques identifiés « Polluants Organiques Persistants » (POPs). À cause de sa pression de vapeur élevée, le toxaphène peut être transporté dans l'atmosphère à des distances importantes. Cet insecticide organochloré persiste dans les sols et les sédiments des lacs et, dû à sa nature lipophile, il peut être bioaccumulé chez les organismes vivants. Le toxaphène est un puissant activateur des neutrophiles, puisqu'il active la production de superoxyde via l'activation des PKC et de façon moins importante les tyrosines kinases. De plus, il active la phagocytose et induit l'apoptose des neutrophiles. L'induction d'apoptose n'est cependant perçue qu'à de fortes concentrations supérieures à 25 µg/ml après 24 heures d'incubation (Gauthier *et al*, 2001).

Fongicide et insecticide employé contre les termites, l'arsenite de sodium est un sel de métal lourd (arsenic) inducteur d'apoptose des neutrophiles. Les antioxydants glutathion, NAC et taurine ont la capacité d'inhiber l'apoptose médiée par l'arsenite de sodium, ce qui suggère que l'induction de la mort cellulaire par ce toxique est associée à une augmentation de l'activité oxydative des cellules (Watson, *et al*, 1996b).

2.1.3.2.4 Autres modulateurs de l'apoptose des neutrophiles

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des molécules présentes à la surface des bactéries. Les voies de transduction de signaux dépendantes de phosphorylations sur des résidus tyrosine jouent un rôle majeur dans la protection des neutrophiles contre l'apoptose par

les lipopolysaccharides. Ce retard d'apoptose maintient les neutrophiles fonctionnels lors des processus inflammatoires (Sweeney *et al*, 1998).

Il a été démontré que les neutrophiles sont sensibles à la mort cellulaire médiée par Fas et que ces cellules sont les seuls phagocytes matures qui expriment FasL à leur surface (Iwai *et al*, 1994; Liles *et al*, 1996; Mincheff *et al*, 1998; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000). Certains ont alors cru que l'interaction autocrine ou paracrine de CD95 et son ligand constituait le mécanisme principal d'apoptose spontanée des neutrophiles (Liles *et al*, 1996; Hsieh *et al*, 1997; Majewska, Sulowska et Baj, 2000). Cette affirmation a été réfutée par plusieurs études (Fadeel *et al*, 1998; Brown et Savill, 1999; Renshaw *et al*, 2000). Bien que ce mécanisme ne soit pas encore résolu, plusieurs observations indiquent que Fas n'est pas majoritairement impliqué dans l'apoptose spontanée des neutrophiles. Il a été démontré que des neutrophiles de souris déficientes en Fas et FasL subissent tout de même l'apoptose spontanée à un taux similaire à des neutrophiles de souris normales (Fecho et Cohen, 1998; Villunger *et al*, 2000). Ottonello *et al* (1999) ont pour leur part montré que seules des molécules de FasL agrégées ou liées à une membrane sont aptes à induire l'apoptose des neutrophiles, tandis que des molécules de FasL solubles ont plutôt un rôle chimiotactique sur ces cellules.

Contrairement à d'autres types cellulaires, l'hypoxie retarde l'apoptose des neutrophiles. Des neutrophiles incubés pendant 44 heures sans oxygène restent viables à plus de 95%, tandis que des neutrophiles sous des conditions normoxiques (21% O₂) sont tous en apoptose et en nécrose après ce temps d'incubation. Dans des conditions normoxiques, certains antioxydants tels que la catalase retardent l'apoptose de ces cellules (Hannah *et al*, 1995). Le milieu hypoxique augmente l'expression de la molécule anti-apoptotique Mcl-1, qui est associée à l'activation de la p38MAPK (Leuenroth *et al*, 2000a). Des patients souffrant de CGD ont des neutrophiles davantage résistants à l'apoptose par rapport à des neutrophiles de patients normaux (Kasahara *et al*, 1997). Il a été démontré que des molécules oxydantes telles les radicaux hydroxyles et l'oxyde nitrique induisent l'apoptose des neutrophiles. Cette induction pourrait se faire de plusieurs façons. Les oxydants pourraient médier l'apoptose en oxydant directement les déoxyriboses de

l'ADN, menant à des bris dans les brins d'ADN. Ces oxydants pourraient également modifier des enzymes impliquées dans l'apoptose (protéases et nucléases) et réagir avec des molécules antioxydantes comme le glutathion (Rollet-Labelle *et al*, 1998; Fortenberry *et al*, 1998).

La régulation du statut redox des cellules par les molécules antioxydantes a également une influence sur l'induction de l'apoptose des neutrophiles. La catalase, une enzyme qui détruit le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), protège les neutrophiles activés contre l'apoptose (Lundqvist-Gustafsson et Bengtsson, 1999). Le glutathion (GSH), un antioxydant naturel à groupements thiols, protège les neutrophiles contre les dommages oxydatifs. Les niveaux intracellulaires de cette molécule baissent de façon importante lorsqu'il y a induction de l'apoptose (Watson *et al*, 1996c).

Des molécules oxydantes produites par les neutrophiles ou présentes dans le milieu extracellulaire peuvent donc stimuler l'apoptose de ces cellules. Cet effet aurait un rôle important à jouer lors de l'inflammation. Lorsque recrutés à un site inflammatoire, les neutrophiles passent d'un milieu normoxique à un milieu hypoxique, ce qui prolonge leur durée de vie. Lorsque beaucoup de ROS produits par les neutrophiles sont présents dans le milieu inflammatoire, il y a induction de l'apoptose de ces cellules et les macrophages se chargent alors de phagocyter les neutrophiles apoptotiques (Akgul, Moulding et Edwards, 2001).

En tant que puissant agent oxydant, les rayons UV induisent des modifications des bases de l'ADN et altèrent les membranes cellulaires. Les neutrophiles sont très sensibles à l'apoptose médiée par ce type de rayonnement. Les dommages causés aux neutrophiles par les UV pourraient être expliqués par une génération importante de ROS intracellulaires qui seraient impliqués dans les dommages causés à la membrane et au code génétique des cellules (Bogdanov *et al*, 1997; Sweeney *et al*, 1997).

La voie sphingomyéline-céramide est activée entre autres par des agents chimiothérapeutiques tels la daunorubicine et également par TNF, les antigènes anti-Fas,

les céramides et les radiations ionisantes. Lorsque cette voie de signalisation est activée, la sphingomyéline est hydrolysée par la sphingomyélinase pour former les céramides (Raffray et Cohen, 1997). Les céramides sont des seconds messagers intracellulaires impliqués dans l'inhibition de la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose chez plusieurs types de cellules. La *N*-acétylsphingosine (C₂-céramide) inhibe la production de superoxyde et induit l'apoptose des neutrophiles de façon dose-dépendante. Cette induction d'apoptose est reliée à la capacité de la C₂-céramide à diminuer l'influx de calcium intracellulaire et d'inhiber la protéine kinase C, qui est la cible de l'activateur PMA (Wong, Li et Hunchuk, 1995; Ohta *et al*, 1994).

Comme mentionné précédemment, les neutrophiles jouent un rôle majeur dans les mécanismes de défense contre les micro-organismes, plus particulièrement les bactéries. Certains de ces micro-organismes peuvent avoir une influence sur l'induction ou l'inhibition de la mort cellulaire des neutrophiles. Le virus Epstein-Barr, faisant partie de la famille des *Herpesviridae*, peut se lier aux neutrophiles et causer l'agrégation cellulaire et la synthèse protéique (Beaulieu, Paquin et Gosselin, 1995). Ce virus a la capacité de pénétrer les cellules et de se localiser dans le noyau. Il induit également l'apoptose des neutrophiles, ce qui pourrait représenter un mécanisme de défense de la cellule hôte servant à avorter le processus d'infection du virus Epstein-Barr. Il semble que cette induction d'apoptose soit médiée par le système Fas/FasL, puisque la présence du virus en culture induit une augmentation de l'expression de Fas et de FasL sur les membranes des neutrophiles, ainsi que le relargage de FasL soluble dans le milieu de culture. Il se pourrait également que d'autres médiateurs aient un rôle à jouer dans cette induction de l'apoptose (Larochelle *et al*, 1998).

Le virus de l'influenza A, un virus faisant partie de la famille des *Orthomyxoviridae*, augmente le risque de développement d'importantes infections bactériennes chez l'organisme. Or, ce virus accélère l'apoptose des neutrophiles. De plus, tout comme le virus Epstein-Barr, le virus de l'influenza A augmente l'expression de Fas et FasL à la surface cellulaire et augmente également les niveaux de FasL solubles dans le milieu extracellulaire. L'incubation simultanée des neutrophiles avec le virus de l'influenza A et

la bactérie *Escherichia coli* augmente l'induction de l'apoptose des neutrophiles par rapport aux taux observés en présence du virus seulement. De plus, ces deux micro-organismes augmentent la production de ROS sollicitée par la présence de la bactérie. Cette accélération de l'apoptose des neutrophiles par l'influenza A en présence d'une bactérie telle que *E coli* pourrait expliquer la chute du nombre de neutrophiles chez les patients infectés par un tel virus (Watson *et al*, 1996a; Colamussi *et al*, 1999).

Contrairement aux virus mentionnés ci-haut, certaines bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* et *Candida albicans* prolongent la survie des neutrophiles après leur phagocytose. Cette inhibition de l'apoptose spontanée des neutrophiles suite à la phagocytose des bactéries en présence de cytokines pro-inflammatoires et de produits bactériens constitue un important mécanisme de défense innée contre de tels pathogènes (Baran *et al*, 1996; Sweeney *et al*, 1998).

2.1.3.2.5 Les points communs

Le statut redox des cellules, incluant les niveaux d'antioxydants naturels, joue un rôle important dans l'activation de l'apoptose des neutrophiles et constitue un point commun entre plusieurs types de modulateurs d'apoptose des neutrophiles. Des modifications des niveaux de ROS et de molécules antioxydantes comme le glutathion influencent directement la survie des neutrophiles. Certains produits activateurs d'apoptose des neutrophiles (éthanol, cytarabine, toxaphène, arsenite de sodium, ultraviolets) induisent une hausse de l'activité oxydative des cellules, contribuant à augmenter le stress oxydatif de celles-ci. L'induction de l'apoptose par les oxydants ne nécessite pas toujours l'intervention des voies de transduction de signaux. Les niveaux intracellulaires de GSH gouvernent également les niveaux d'apoptose des neutrophiles. Ceci est en relation directe avec la capacité de ces molécules à capter et détoxifier les oxydants se trouvant dans la cellule. Des agents qui font diminuer les niveaux intracellulaires de GSH tels que la clozapine causent un stress oxydatif à la cellule, ce qui déclenche alors la machinerie apoptotique.

Plusieurs médiateurs de l'inflammation ont pour autre point commun d'avoir une influence sur les niveaux cytosoliques de calcium et sur le pH intracellulaire. L'inflammation peut activer les neutrophiles et par le fait même augmenter légèrement leurs niveaux de calcium intracellulaire, ce qui a pour effet d'inhiber l'apoptose de ces cellules (Krause *et al*, 1990; Whyte *et al*, 1993). Chacon-Cruz *et al* (1998) ont montré qu'une diminution des réserves de calcium intracellulaire et une augmentation du niveau de calcium cytosolique retarde l'apoptose des neutrophiles. Ces observations soulèvent un certain paradoxe puisque, contrairement aux neutrophiles, une élévation du niveau cytosolique de calcium a pour effet d'induire l'apoptose chez d'autres types cellulaires (Whyte *et al*, 1993; Trump et Berezsky, 1995; McConkey *et al*, 1996). L'inflammation est également accompagnée d'une acidification du milieu interstitiel. Un pH acide peut activer les neutrophiles et retarder leur apoptose. Le pH acide contribue donc à intensifier la réponse inflammatoire (Trevani *et al*, 1999; Leblebicioglu et Walters, 1999).

S'il faut trouver un seul point commun entre les différents modulateurs de l'apoptose des neutrophiles (cytokines et autres), nous pouvons affirmer que la plupart (si ce n'est pas tous) influencent la synthèse protéique. Ceci nous indique que la survie des neutrophiles peut être régulée par la synthèse *de novo* de protéines qui ne sont pas exprimées de façon constitutive. Les agents qui régulent l'apoptose des neutrophiles pourraient agir en modifiant l'activité de protéines préexistantes (via des réactions de phosphorylation) ou pourraient réguler des voies de signalisation qui mènent à l'activation de facteurs de transcription spécifiques qui induisent l'expression de gènes clé (Akgul, Moulding et Edwards, 2001).

Bien que les neutrophiles n'expriment pas la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Van Der Vliet *et al*, 1997; Moulding *et al*, 2001), ceux-ci expriment cependant les protéines pro-apoptotiques Bax, Bid, Bak et Bad (Weinmann, Gaetgens et Walzog, 1999; Santos Beneit et Mollinedo, 2000). Les neutrophiles expriment également l'ARNm des protéines anti-apoptotiques Mcl-1, A1 et Bcl-XL, mais seules les protéines Mcl-1 et A1 ont été clairement observées dans les cellules. Mcl-1 est exprimé chez les neutrophiles circulant dans le sang et les niveaux de cette protéine diminuent lorsque les cellules sont en

apoptose. Des agents qui retardent l'apoptose maintiennent les niveaux de Mcl-1 constants pour une certaine période. Cette protéine peut donc être impliquée dans un mécanisme de survie médiée par certaines cytokines et l'expression de protéines anti-apoptotiques (Moulding *et al*, 1998; Leuenroth *et al*, 2000b). La demi-vie de l'ARNm et de la protéine Mcl-1 est courte, tandis que les demi-vies des protéines pro-apoptotiques sont longues. Cette différence pourrait nous indiquer que l'apoptose des neutrophiles est gouvernée entre autres par les niveaux cellulaires de protéines de survie telles que Mcl-1. En absence de synthèse *de novo* de Mcl-1, l'activité des protéines pro-apoptotiques, ayant une plus longue durée de vie, va prédominer et les cellules vont alors en apoptose. Cependant, en présence de signaux de survie, l'expression des protéines anti-apoptotiques maintient la survie de la cellule (Akgul, Moulding et Edwards, 2001).

Dans les voies de transduction de signaux, les activités de plusieurs kinases, phosphatases, phospholipases et autres enzymes sont régulées par leur phosphorylation et leur déphosphorylation. Les phosphorylations sur des résidus tyrosine jouent un rôle critique dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Plusieurs cytokines inflammatoires qui retardent l'apoptose augmentent la phosphorylation sur des résidus tyrosine de nombreuses protéines, notamment les isoformes des MAPK (« mitogen activated protein kinases ») (Nahas *et al*, 1996). Ces cascades de phosphorylation pourraient être importantes dans le contrôle de l'activation ou de l'inhibition de divers processus requis pour la régulation de la mort cellulaire (Akgul, Moulding et Edwards, 2001).

Il existe deux types de MAPK qui sont impliqués dans les processus de régulation de l'apoptose des neutrophiles. Il s'agit de ERK, une MAPK qui est activée par MEK sous sa forme phosphorylée et de la p38MAPK (Akgul, Moulding et Edwards, 2001). Le rôle de la p38MAPK dans le contrôle de l'apoptose et de la survie des neutrophiles est obscur. Certains croient que cette kinase est impliquée dans l'apoptose spontanée des neutrophiles (Aoshiba *et al*, 1999), mais d'autres prétendent le contraire (Frasch *et al*, 1998; Villunger *et al*, 2000). La p38MAPK peut être stimulée par certains stress qui accélèrent l'apoptose (hyperosmolarité ou irradiations) (Frasch *et al*, 1998). Le rôle de la

p38MAPK devient embêtant en observant qu'elle est activée en milieu hypoxique (Klein *et al*, 2000) et qu'elle est inhibée en présence de LPS (Leuenroth *et al*, 2000a), deux situations où il y a retard de l'apoptose. Il se pourrait que les signaux régissant la survie ou la mort des neutrophiles se situent en aval de la p38MAPK et que des signaux de survie générés par d'autres systèmes (comme ERK) modulent les signaux de mort générés par la p38MAPK (Akgul, Moulding et Edwards, 2001). L'activation de ERK mène pour sa part à la survie des neutrophiles. Le puissant inhibiteur d'apoptose GM-CSF active cette kinase (Wei *et al*, 1996). Des agents qui retardent l'apoptose des neutrophiles tels que le GM-CSF et l'IL-8 activent également la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et cette activation génère des signaux de survie qui peuvent inhiber les signaux de mort de la p38MAPK (Frasch *et al*, 1998). Les effets pro- et anti-apoptotiques de TNF α sur les neutrophiles peuvent alors s'expliquer en partie par les voies de signalisation activées par cette cytokine. L'activation de la p38MAPK par le TNF- α génère des signaux de mort (Suzuki *et al*, 1999), tandis que l'activation du facteur de transcription NF- κ B par cette même cytokine peut générer des signaux de survie (McDonald, Bald et Cassatella, 1997).

Plusieurs points demeurent obscurs concernant la régulation de l'apoptose des neutrophiles. Nous ne connaissons toujours pas toutes les divergences entre les mécanismes d'apoptose spontanée des neutrophiles et ceux induits par une multitude de modulateurs. De nombreuses études ont pour but de définir les différents messagers intracellulaires impliqués dans la mort cellulaire des neutrophiles. De telles études sont d'une importance capitale afin de démystifier les différents moyens d'induire ou d'inhiber l'apoptose des neutrophiles et ainsi pouvoir traiter des maladies reliées à une dérégulation du nombre de neutrophiles ou de leur état d'activation dans l'organisme.

2.2 La nécrose

Contrairement à l'apoptose, la nécrose est un mode de mort cellulaire qui n'implique pas la dégradation de protéines et de l'ADN. La nécrose est un processus irréversible lors duquel il y a arrêt de l'homéostasie suite à une perturbation majeure de la cellule et qui se

termine par la rupture de la membrane plasmique et le relâchement de tout le contenu intracellulaire dans le milieu. Généralement, l'évolution de la mort cellulaire vers la nécrose s'explique par des dérangements progressifs au niveau du métabolisme et des niveaux d'énergie, plus particulièrement par la baisse des niveaux d'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaires. Les lésions à la membrane cellulaire se font en trois étapes principales. Il y a tout d'abord des altérations au niveau des systèmes de transport ioniques membranaires. Par la suite, il y a augmentation de la perméabilité membranaire de façon non spécifique qui se termine finalement par la rupture physique de la membrane plasmique (Buja, Eigenbrodt et Eigenbrodt, 1993; Raffray et Cohen, 1997).

2.2.1 La nécrose primaire

La nécrose primaire constitue une forme de mort cellulaire accidentelle ou pathologique qui est très peu ou pas du tout régulée. Elle peut survenir par exemple lorsque les cellules se retrouvent en présence de fortes concentrations d'une substance toxique ou lorsqu'elles subissent un dommage physique important. Il y a dès les premiers instants gonflement de la cellule et des organelles cytoplasmiques. Le noyau est détruit et la chromatine nucléaire forme des agrégats dans le cytoplasme. La perte d'intégrité membranaire survient tôt dans le processus et il y a alors relâchement du contenu intracellulaire dans le milieu et induction de réponse inflammatoire chez l'organisme (Buja, Eigenbrodt et Eigenbrodt, 1993; Hébert *et al*, 1996; Raffray et Cohen, 1997).

2.2.2 La nécrose secondaire

La nécrose secondaire est une forme de nécrose qui survient suite à l'apoptose. Lorsque les cellules apoptotiques ne sont pas reconnues par les cellules phagocytaires, il y a destruction du noyau et du contenu intracellulaire. Ces cellules perdent éventuellement leur intégrité membranaire, ce qui peut causer une réponse inflammatoire en conditions physiologiques. La nécrose secondaire peut survenir également dans le cas de cellules apoptotiques en culture *in vitro* en absence de phagocytes (Hébert *et al*, 1996; Raffray et Cohen, 1997).

2.2.3 Distinctions et similitudes entre apoptose et nécrose

Le tableau 1 présente les principales différences entre l'apoptose, la nécrose primaire et la nécrose secondaire.

Tableau 1. Comparaison entre apoptose, nécrose primaire et nécrose secondaire (inspiré de Dallaporta et Resche-Rigon, 1998).

Apoptose	Nécrose primaire	Nécrose secondaire
<ul style="list-style-type: none"> • Physiologique ou pathologique • Hautement régulé • Maintien de l'intégrité membranaire • Élimination par la phagocytose • Participation d'enzymes cellulaires causant des modifications morphologiques et biochimiques particulières 	<ul style="list-style-type: none"> • Accidentel • Toujours pathologique • Peu ou pas régulé • Rupture de la membrane plasmique • Perte du contenu cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytolyse secondaire à l'apoptose

Il existe cependant quelques observations présentant certaines similitudes entre apoptose et nécrose. Il semblerait que ces deux modes de mort cellulaire peuvent constituer un processus continu dans certaines situations, ce que certains nomment l'apoptose (Formigli *et al*, 2000). Une même substance peut causer l'apoptose à de faibles doses et la nécrose à des concentrations plus élevées. L'apoptose et la nécrose partagent des messagers, activateurs et inhibiteurs communs. La chute du potentiel transmembranaire des mitochondries peut survenir pendant ces deux modes de mort cellulaire et il a été démontré que Bcl-2 peut inhiber l'apoptose et dans certains modèles la nécrose. Il semblerait que ce soit l'amplitude de l'insulte, plutôt que sa nature, qui détermine quel type de mort la cellule va subir. Une modification du niveau d'ATP intracellulaire est un facteur déterminant qui peut changer la mort cellulaire par apoptose en nécrose (Kroemer, Dallaporta et Resche-Rigon, 1998; Levin *et al*, 1999; Formigli *et al*, 2000).

Les formes de mort cellulaire qui ne cadrent pas avec les trois formes principales (apoptose, nécrose primaire et nécrose secondaire) ont souvent été désignées sous le

terme de mort atypique. Pour mieux définir ces formes de mort atypique qui sont causées par des médicaments et des toxiques de l'environnement, Raffray et Cohen (1997) ont proposé trois modalités additionnelles : (i) l'apoptose et la nécrose concomitantes; (ii) l'apoptose et la nécrose séquentielles; et (iii) la nécrose survenant par-dessus l'apoptose.

L'apoptose et la nécrose concomitantes peuvent survenir chez une population de cellules ayant des seuils apoptotiques différents. Une insulte uniforme chez une telle population de cellules peut induire l'apoptose des cellules ayant un seuil apoptotique élevé, tandis que les cellules ayant un seuil apoptotique faible subissent la nécrose. Lors de l'apoptose et la nécrose séquentielles, il y a induction de l'apoptose suivi par la nécrose à un stade ultérieur (ou vice versa). Ce type de mort cellulaire peut être dû à une perturbation au niveau d'interactions entre cellules de types interdépendants. La nécrose survenant par-dessus l'apoptose est un mode de mort cellulaire très peu caractérisé. Dans une telle situation, l'apoptose est initiée chez les cellules, mais le processus apoptotique est très tôt interrompu par la perte d'intégrité membranaire. La nécrose qui survient par-dessus l'apoptose peut avoir lieu suite à une injure à amplitude progressive, ou lorsque les conditions sont près du seuil nécrogénique (Raffray et Cohen, 1997).

3 LE MERCURE

3.1 Les formes de mercure

On retrouve du mercure de façon naturelle dans l'environnement sous trois formes principales, soit le mercure métallique, le mercure inorganique et le mercure organique.

3.1.1 Le mercure métallique (Hg^0)

Le mercure métallique, ou élémentaire, constitue un métal lourd de couleur grise qui est liquide à la température de la pièce (20°C). Le mercure métallique est la forme pure ou élémentaire du mercure, puisqu'il n'est combiné à aucun autre élément. Cette forme de métal est couramment utilisée dans les thermomètres et dans quelques interrupteurs électriques. Ayant une haute pression de vapeur à la température pièce, une partie du mercure métallique s'évapore pour former des vapeurs de mercure qui sont incolores et inodores (Sato, 2000). Plus la température est élevée, plus il y a formation de vapeurs de mercure à partir du mercure élémentaire (Rischer et DeWaskin, 1999).

3.1.2 Le mercure inorganique (Hg^{2+})

Il y a formation de mercure inorganique lorsque celui-ci se combine avec des éléments tels que le chlore (HgCl_2), le soufre ou l'oxygène. Ces molécules sont appelées des sels de mercure et se retrouvent la plupart du temps sous forme de poudre ou de cristaux (Rischer et DeWaskin, 1999).

3.1.3 Le mercure organique

Lorsque le mercure se combine avec des atomes de carbone, on nomme ces molécules résultantes du mercure organique. Il y a potentiellement un grand nombre de composés de mercure organique, mais la forme la plus retrouvée dans l'environnement est le méthylmercure. Tout comme le mercure inorganique, le méthylmercure existe sous forme

de sels tels que le chlorure de méthylmercure (CH_3HgCl ou MeHgCl) (Rischer et DeWaskin, 1999).

3.2 Les principales sources de mercure

3.2.1 Les sources naturelles

Il existe naturellement certaines formes de mercure dans l'environnement. Le mercure entre dans l'environnement par l'érosion des roches minérales et des sols sous l'action du vent et de l'eau et par l'activité volcanique. Les niveaux de mercure provenant de sources naturelles sont demeurés constants avec le temps, mais l'activité humaine depuis l'industrialisation a haussé le taux de mercure dans l'environnement (Rischer et DeWaskin, 1999).

Les formes de mercure les plus couramment retrouvées dans l'environnement sont le mercure métallique, le sulfite de mercure, le chlorure de mercure et le méthylmercure. Certains micro-organismes et processus naturels peuvent changer le mercure environnemental d'une forme à une autre. Le composé de mercure le plus généré par les micro-organismes et les processus naturels à partir d'autres formes est le méthylmercure. C'est sous cette forme que le mercure peut s'accumuler dans la chaîne alimentaire. Le mercure organique peut parfois se retrouver en grandes concentrations dans les tissus de poissons de cours d'eau douce ou salée et également chez les mammifères marins. Plus l'animal vit longtemps, plus celui-ci risquera d'accumuler de grandes quantités de méthylmercure. Lorsqu'ils poussent dans des sols contaminés, les champignons peuvent accumuler eux aussi de grandes quantités de mercure organique (Rischer et DeWaskin, 1999).

3.2.2 Les sources reliées à l'activité humaine

Le mercure métallique peut servir à extraire l'or dans les mines. De plus, le mercure élémentaire est utilisé dans la fabrication de certains thermomètres, baromètres, batteries,

tubes fluorescents et interrupteurs électriques. Les amalgames dentaires sont constitués d'environ 50% de mercure métallique. Cet élément est encore de nos jours utilisé dans certains remèdes religieux en Amérique Latine et en Asie. Il est également utilisé lors de certains rituels pratiqués dans des religions comme le Vaudou (Rischer et DeWaskin, 1999).

Le mercure inorganique peut servir comme substance fongicide. De plus, ce type de mercure a déjà été utilisé dans des crèmes blanchissantes pour la peau. Le chlorure de mercure est un puissant agent désinfectant. Certains produits chimiques contenant du mercure sont toujours utilisés pour leurs propriétés antibactériennes. Ces produits incluent le mercurochrome et le thimérosal. Le sulfite de mercure est un des colorants rouges utilisés pour les tatoos (Rischer et DeWaskin, 1999).

Le méthylmercure fut utilisé autrefois pour protéger les semences contre les infections fongiques. L'utilisation de cette forme de mercure est désormais interdite dans de nombreux pays depuis que nous en connaissons les effets toxiques pour la santé (Rischer et DeWaskin, 1999).

3.3 La cinétique du mercure

Une personne peut être contaminée au mercure en respirant de l'air contaminé, en ingérant de la nourriture ou de l'eau contaminée, ou en ayant un contact direct avec du mercure. Ce ne sont pas toutes les formes de mercure qui entrent facilement dans l'organisme, alors il est important de comprendre comment les principales formes de mercure agissent sur nous.

3.3.1 Absorption

Si quelqu'un ingère une petite quantité de mercure métallique par voie orale, par exemple à partir d'un thermomètre buccal brisé, il n'y aura pratiquement aucun mercure qui entrera dans le sang par l'estomac ou les intestins. La plupart des expositions concernant

le mercure métallique se font par inhalation via les vapeurs de mercure. Si une personne respire des vapeurs de mercure, la plupart du contenu dans les vapeurs va entrer dans la circulation sanguine directement à partir des poumons et va se loger à plusieurs endroits dans l'organisme (Rischer et DeWaskin, 1999).

Les composés de mercure inorganique comme le chlorure de mercure sont sous forme de poudres et ne se volatilisent pas généralement à la température de la pièce comme le mercure élémentaire. S'il est inhalé, le mercure inorganique n'entre habituellement pas aussi facilement dans l'organisme que les vapeurs de mercure élémentaire. Lorsque le mercure inorganique est ingéré par voie orale, une certaine quantité (10 à 40%) est absorbée par le tractus intestinal. Le mercure inorganique peut également entrer dans l'organisme par la peau, mais à de très petites quantités comparé à l'absorption via le tractus intestinal (Rischer et DeWaskin, 1999).

Le méthylmercure est la forme de mercure la plus facile à absorber dans l'organisme via le tractus intestinal (environ 95%). Suite à l'ingestion de poissons ou toute autre nourriture contaminée au méthylmercure, ce dernier entre facilement dans la circulation sanguine et va se loger dans tout l'organisme. Seulement de faibles quantités de méthylmercure peuvent entrer par absorption à travers la peau. Les composés de mercure organique peuvent former de très faibles quantités de vapeurs de mercure et entrer dans l'organisme par la respiration (Rischer et DeWaskin, 1999).

3.3.2 Distribution

Une fois dans l'organisme, le mercure métallique peut y rester pendant des semaines, voire des mois. La plupart du mercure métallique se loge dans les reins, mais une certaine quantité peut atteindre le système nerveux central. Grâce à sa nature lipophile, le mercure métallique peut traverser la barrière placentaire et la barrière hémato-encéphalique (Rischer et DeWaskin, 1999).

Lorsque le mercure inorganique atteint la circulation sanguine, celui-ci se dirige vers plusieurs tissus. Cependant, sa nature faiblement lipophile réduit sa capacité à traverser les barrières ainsi que de s'accumuler dans le cerveau et chez le fœtus en développement. Le mercure inorganique se loge en grande partie dans les reins (Rischer et DeWaskin, 1999).

La distribution du mercure organique se fait pratiquement comme le mercure élémentaire et se répartit de façon plus diffuse que le mercure inorganique. Lorsque le mercure organique circule dans le sang, celui-ci peut se déplacer dans une multitude de tissus et se loger en majorité dans le cerveau grâce à sa nature liposoluble. Le mercure organique se trouvant dans le sang d'une femme enceinte peut se transmettre dans le sang de l'enfant en développement et ainsi se loger dans le cerveau et autres tissus de son organisme. Le méthylmercure peut également se transmettre de la mère à son bébé lors de l'allaitement (Rischer et DeWaskin, 1999).

Au niveau cellulaire, le mercure a une forte affinité pour les groupements sulfhydryles. Il semblerait que le mercure inorganique et organique puissent entrer dans les cellules par diffusion passive à travers la membrane plasmique, le mercure organique exécutant ce processus de façon beaucoup plus rapide que le mercure inorganique. Ceci s'expliquerait par la faible polarité du mercure inorganique, qui réagirait avec les doubles liens de résidus acides gras dans la membrane plasmique, ce qui ralentit le transport à-travers cette dernière. Le méthylmercure, étant davantage lipophile, a plus de facilité à traverser la zone hydrophobe de la bicouche lipidique des cellules (Clarkson, 1997; Braeckman *et al*, 1998).

3.3.3 Biotransformation

Une fois absorbées, les formes métallique et inorganique du mercure entrent dans un cycle d'oxydation-réduction. Le mercure métallique est oxydé en un cation divalent inorganique dans le sang et les poumons de l'organisme. Dans le cerveau, le mercure élémentaire qui s'y est logé se transforme en mercure inorganique et il est emprisonné à

cet endroit pour longtemps. À l'inverse, une petite quantité du mercure inorganique absorbé peut être réduit en mercure métallique. Tout comme le mercure métallique, le mercure organique peut être transformé en mercure inorganique par notre organisme, mais cette conversion se produit moins fréquemment que pour le mercure élémentaire. Lorsque cette transformation se déroule dans le cerveau, le mercure inorganique peut y rester emprisonné pendant longtemps (Risner et DeWaskin, 1999).

3.3.4 Élimination

La plupart du mercure métallique absorbé quitte l'organisme dans l'urine et les fèces, alors que de faibles quantités sont libérées par la respiration en vapeurs de mercure. Une petite quantité du mercure inorganique absorbé peut être transformé en mercure métallique et peut alors quitter l'organisme via la respiration. Étant hydrosoluble, le mercure inorganique quitte l'organisme principalement par l'urine et les fèces après une période de plusieurs semaines ou mois. Le méthylmercure est pour sa part excrété après une période de plusieurs mois par la bile et ensuite passe par les fèces ou l'urine principalement sous forme inorganique (Risner et DeWaskin, 1999).

3.4 Les effets toxiques du mercure

Toutes les formes de mercure causent des effets toxiques dans de nombreux tissus et organes, dépendant de la forme chimique du mercure, le niveau d'exposition, la durée de l'exposition et le site exposé dans l'organisme (Zalups, 2000). Les dommages sont principalement perçus au niveau du système nerveux, du système rénal et du système immunitaire.

3.4.1 Système nerveux

C'est le mercure organique qui a la possibilité de traverser le plus facilement la barrière hémato-encéphalique et donc de s'accumuler dans le système nerveux central (Aschner et Aschner, 1990). Les principales cibles atteintes par le méthylmercure sont les cellules

granuleuses du cervelet, les cellules nerveuses du cortex de la scissure calcarine (région responsable de la vision) et les neurones senseurs des ganglions dorsaux de la moelle épinière (Chang, 1990). Au niveau des neurones, le mercure perturbe la régulation du relâchement des neurotransmetteurs en modifiant le fonctionnement des canaux calciques (Denny et Atchison, 1996). Le mercure peut causer des dommages neurologiques considérables qui se caractérisent par une multitude de symptômes tels que des changements de personnalité et de comportement, des pertes de mémoire, une démarche anormale, une ataxie, un champ de vision restreint et la surdité. Les personnes intoxiquées au méthylmercure courent également le risque de développer avec le temps des maladies neurodégénératives (Carpenter, 2001). Une intoxication au méthylmercure chez la femme enceinte peut provoquer chez le fœtus des désordres neurologiques et un développement retardé (Satoh, 2000). Puisque le mercure organique est difficilement éliminé du système nerveux central, les dommages causés par ce toxique mènent habituellement à des déficits neurologiques permanents (Chang, 1990).

3.4.2 Système rénal

Chez les humains et autres mammifères, les reins sont les premiers organes ciblés par le mercure élémentaire et inorganique. Cette accumulation de mercure se produit en quelques heures seulement. Certains niveaux de mercure organique peuvent s'accumuler dans le système rénal, mais de façon beaucoup moins importante. L'accumulation de mercure inorganique dans le cortex rénal et dans la médulla se passe principalement au niveau des segments du tubule proximal (Zalups, 2000). Ce mécanisme se produit de façon beaucoup plus efficace lorsque le mercure inorganique est conjugué avec des molécules transporteuses riches en groupements sulfhydryles, telles que le glutathion, l'albumine et la cystéine (Zalups, 1998). La plus grande partie du mercure contenu dans le néphron est sous la forme inorganique, ce qui suggère que le mercure organique est oxydé en mercure inorganique avant ou après qu'il entre dans les cellules épithéliales du tubule rénal. Le mercure présent à l'intérieur de ces cellules a pour effets d'altérer le métabolisme des thiols intracellulaires, de causer un stress oxydatif, la peroxydation lipidique et le dysfonctionnement mitochondrial (Zalups, 2000). Il a été démontré que des

expositions au mercure, chez les humains et autres animaux, peuvent générer des maladies autoimmunes au niveau des reins telles que la glomérulonéphrite à complexes immuns et la néphropathie membraneuse (Hua *et al*, 1993; Bagenstose, Salgame et Monestier, 1999; Bigazzi, 1999).

3.4.3 Système immunitaire

Puisqu'une intoxication au mercure peut se concrétiser en maladies autoimmunes, nous pouvons en déduire que ce toxique influence les fonctions des différentes cellules qui composent le système immunitaire. Les effets des différentes formes de mercure peuvent varier selon le type cellulaire observé.

3.4.3.1 Cellules mononucléées

De nombreuses études chez la souris et le rat ont pour but d'étudier les désordres autoimmuns induits par une intoxication au mercure. Chez certaines races de rongeurs, le mercure inorganique induit une maladie autoimmune caractérisée par une augmentation du niveau d'anticorps de type IgE, et par la production d'anticorps dirigés contre la membrane basale des glomérules responsables de la glomérulonéphrite qui s'ensuit. La production d'autoanticorps mène à l'accumulation de complexes immuns au niveau des reins. Cette maladie est la conséquence d'une activation polyclonale des cellules B dépendante des cellules T (Hirsch *et al*, 1982; Pelletier *et al*, 1990; Dubey *et al*, 1991; Hu, Moller et Abedi-Valugerdi, 1999).

D'autres études ont montré que de faibles doses de mercure organique chez les souris modifient le statut redox et diminuent les niveaux de GSH chez les splénocytes et les thymocytes (Thompson *et al*, 1998). De plus, des souris exposées au mercure organique subissent une diminution de la production d'anticorps de type IgM par les lymphocytes B, qui sont les anticorps responsables de la réponse immune primaire (Koller, Exon et Brauner, 1977). Une administration de mercure organique ou inorganique perturbe le

niveau de prolifération des lymphocytes T et B induite par des agents mitogènes (Dieter *et al*, 1983; Brown *et al*, 1988; Hultman et Johansson, 1991).

Chez l'humain, il a été démontré que de faibles concentrations (1-10 μ M) de mercure organique (MeHgCl) et inorganique (HgCl₂) inhibent les fonctions des cellules B et T telles que la prolifération cellulaire, l'expression de marqueurs de surface de cellules activées, la production de cytokines et la production d'immunoglobulines. Le mercure organique s'est avéré être 5 à 10 fois plus toxique que le mercure inorganique (Shenker *et al*, 1992a; Shenker *et al*, 1992b; Shenker *et al*, 1993a; Shenker *et al*, 1993b). De telles concentrations diminuent les niveaux de GSH intracellulaires, diminuent le potentiel transmembranaire des mitochondries et induisent l'apoptose de ces cellules, suite à un stress oxydatif (Guo *et al*, 1998; Shenker, Guo et Shapiro, 1998; Shenker, Guo et Shapiro, 1999).

Lorsque les cellules T sont activées par des mitogènes, celles-ci sont résistantes à l'apoptose induite par le mercure organique (0-5 μ M de MeHgCl). Ceci s'expliquerait par le fait que les lymphocytes T à l'état activé produisent davantage de molécules riches en groupements sulfhydryles telles que le glutathion et les métallothionéines, ce qui permet à la cellule de contrôler l'état oxydatif intracellulaire. De plus, ces cellules T activées expriment de plus hauts niveaux de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (Shenker *et al*, 1997; Close, Guo et Shenker, 1999). Pour sa part, la lignée humaine de cellules T Jurkat est protégée par le mercure inorganique (0-10 μ M de HgCl₂) contre l'apoptose médiée par des anticorps anti-Fas (Whitekus *et al*, 1999).

Chez les monocytes, il y a une diminution de la capacité phagocytaire, formation de dérivés oxygénés, chute du potentiel transmembranaire des mitochondries et induction de l'apoptose par des concentrations allant de 0 à 10 μ M de mercure inorganique (Christensen, Mogensen et Rungby, 1988; Shenker *et al*, 1992b) et de 0 à 5 μ M de mercure organique (InSug *et al*, 1997). De plus, ces deux formes de mercure inhibent la synthèse protéique, les fonctions de migration et de phagocytose de macrophages murins (Christensen, Mogensen et Rungby, 1988; Christensen *et al*, 1993).

3.4.3.2 Neutrophiles

Le chlorure de mercure entre 0 et 1 μM inhibe plusieurs fonctions des neutrophiles, telles que l'adhérence, la polarisation, la chimiotaxie et la phagocytose (Contrino *et al*, 1988; Obel *et al*, 1993). De façon contradictoire, le mercure inorganique aux mêmes concentrations augmente le métabolisme oxydatif de ces cellules (Contrino *et al*, 1988; Jansson et Harms-Ringdahl, 1993). Une autre étude a montré que le chlorure de mercure inhibe la polarisation et la phagocytose de manière dose-dépendante à des concentrations allant de 2,5 à 10 μM . Une concentration plus faible de 1 μM de HgCl_2 augmente le niveau de phosphorylation sur des résidus tyrosine, plus particulièrement au niveau d'une protéine de 37 kDa encore inconnue. De plus, cette forme de mercure perturbe les voies de signalisation via l'agrégation de certains récepteurs de surface (Worth *et al*, 2001). Cette même forme de mercure à de faibles concentrations inhibe la production d'anions superoxyde et la chimiotaxie (Obel *et al*, 1993). Chez plusieurs animaux, différentes cellules phagocytaires (incluant les neutrophiles) peuvent dégrader le mercure organique en mercure inorganique via la production de dérivés oxygénés (Suda *et al*, 1992).

Quelques études ont été effectuées auprès de travailleurs exposés à des concentrations de mercure métallique et inorganique considérées acceptables. De telles études ont montré que les neutrophiles de ces travailleurs avaient une capacité de chimiotaxie et de phagocytose diminuée. Ces effets sur les neutrophiles étaient perceptibles jusqu'à 6 mois après l'exposition au mercure (Perlingeiro et Queiroz, 1994; Perlingeiro et Queiroz, 1995; Vimercati *et al*, 2001).

Très peu d'études ont été effectuées concernant les effets du mercure sur la modulation de la mort cellulaire des neutrophiles humains. La présente étude a été réalisée dans le but de définir les effets du mercure organique (chlorure de méthylmercure ou MeHgCl) et inorganique (chlorure de mercure ou HgCl_2) sur la viabilité et le type de mort cellulaire induits chez les neutrophiles humains.

SECTION 2 : ARTICLE

Titre

PROLONGATION OF HUMAN NEUTROPHIL SURVIVAL BY LOW-LEVEL MERCURY VIA INHIBITION OF SPONTANEOUS APOPTOSIS

Auteurs

Eliane Moisan, Sylvie Arbour, Nhi Nguyen, Marie-Josée Hébert, Denis Girard, Jacques Bernier, Michel Fournier et Edouard Kouassi

Publié dans

Journal of Toxicology and Environmental Health (2002) 65:183-203.

Contribution personnelle

J'ai participé à la réalisation des expériences qui ont permis d'obtenir les résultats contenus dans 5 figures sur 8, soit les figures 1, 2, 3, 4 et 6. J'ai principalement travaillé sur les cinétiques et doses-réponses, sur l'isolation des neutrophiles et sur l'analyse des cellules en cytométrie en flux à l'aide de la combinaison de sondes annexine V-FITC et iodure de propidium. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit. Ma contribution à cet article est évaluée à environ 75%, et elle concerne essentiellement (i) la démonstration des effets anti-apoptotiques du mercure, et (ii) la mise en évidence des propriétés distinctes des formes organiques et inorganiques du mercure sur l'induction de la mort des neutrophiles.

Contribution des co-auteurs

Sylvie Arbour : Elle a effectué les études morphologiques par microscopie optique (fig.7). De plus, elle a aidé lors des études cinétiques et doses-réponses en cytométrie en flux. Elle a participé à la rédaction du manuscrit.

Nhi Nguyen : Elle a réalisé l'étude des effets du MeHgCl à de fortes concentrations sur l'apoptose des neutrophiles, et elle a réussi à démontrer la modalité de mort cellulaire par

nécrose survenant par-dessus l'apoptose. Elle a participé à la réalisation des figures 4, 5 et 8 du manuscrit.

Marie-Josée Hébert : Elle a contribué à la démonstration des différentes formes de mort cellulaire induites par le mercure, en fournissant des conseils judicieux sur l'utilisation de la combinaison des sondes HT et PI, combinaison qu'elle avait précédemment utilisée dans d'autres travaux (Hébert *et al*, 1996).

Denis Girard : Il a aidé aux techniques d'isolation des neutrophiles humains, aux études morphologiques, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Jacques Bernier et Michel Fournier : Ils ont contribué à la conception du projet et aux discussions des résultats dans le cadre d'une subvention d'équipe avec Edouard Kouassi (Titre de la subvention: Immunotoxicity of heavy metals; organisme subventionnaire: Toxic Substances Research Initiative)

Edouard Kouassi : Il est le responsable du projet. Il a participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats, aux analyses statistiques, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Résumé en français de l'article

Les travaux antérieurs ont montré que de faibles niveaux de mercure organique et inorganique induisent la mort cellulaire par apoptose chez les cellules mononucléées humaines (MNC), mais leurs effets potentiels sur la viabilité et la mort des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) humains sont peu connus. Contrairement aux MNC, les PMN subissent l'apoptose spontanée *in vivo* et *in vitro*. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que les PMN pourraient différer des MNC dans leurs réactions à de faibles niveaux de mercure. Les effets du chlorure de méthylmercure (MeHgCl) et du chlorure de mercure (HgCl₂) ont été évalués lors d'études de doses-réponses et de cinétiques sur la viabilité des PMN et sur leurs modes de mort cellulaire suite à des incubation *in vitro* à 37°C. La mort cellulaire par apoptose et par nécrose a été évaluée par la liaison de l'annexine V-fluorescéine isothiocyanate aux phosphatidylsérines externalisés en combinaison avec l'iodure de propidium (PI), et l'analyse par cytométrie en flux. Le décompte de noyaux pyknotiques et les propriétés fluorescentes de la sonde Hoechst 33342 se liant à l'ADN en combinaison avec le PI ont été utilisés pour confirmer la mort cellulaire par apoptose et pour caractériser la séquence de la mort cellulaire induite par le mercure. Les résultats montrent que de faibles concentrations de MeHgCl (1-7,5 µM), qui étaient cytotoxiques aux MNC, inhibent l'apoptose spontanée des PMN. De faibles niveaux de HgCl₂ reproduisent les effets anti-apoptotiques du MeHgCl chez les PMN, mais de façon moins importante. De plus fortes concentrations de MeHgCl et de HgCl₂ sont apparues comme nécrogéniques pour les PMN, mais le MeHgCl s'est montré plus toxique. De légères différences ont été observées au niveau des modes de mort cellulaire induits par les deux types de mercure. Ces résultats révèlent pour la première fois que (1) de faibles niveaux de mercure organique et inorganique protègent les PMN humains de la mort cellulaire via l'inhibition de l'apoptose spontanée, et (2) les PMN sont plus résistants que les MNC aux effets cytotoxiques induits par le mercure. Puisqu'un délai de l'apoptose et l'augmentation de la résistance de la mort cellulaire induite par un toxique peuvent mener à une accumulation excessive de PMN vieillissants, les résultats de cette étude montrent que le mercure pourrait avoir des implications au niveau de l'autoimmunité et de l'inflammation.



PROLONGATION OF HUMAN NEUTROPHIL SURVIVAL BY LOW-LEVEL MERCURY VIA INHIBITION OF SPONTANEOUS APOPTOSIS

Eliane Moisan, Sylvie Arbour, Nhi Nguyen

Human Health Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Quebec, Canada

Marie-Josée Hébert

Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada

Denis Girard, Jacques Bernier, Michel Fournier, Edouard Kouassi

Human Health Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Quebec, Canada

Low levels of organic and inorganic mercury compounds have been reported previously to induce cell death by apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells (MNC), but little is known about their potential effects on the viability and death of polymorphonuclear neutrophils (PMN). In contrast to MNC, PMN are known to undergo readily spontaneous apoptosis both in vivo and in vitro. Therefore, it was hypothesized that PMN may differ from MNC in their reactions to low mercury levels. The effects of methylmercuric chloride (MeHgCl) and mercuric chloride (HgCl₂) were evaluated in concentration-response and time-course studies on human PMN viability and on their modes of cell death after in vitro incubation at 37°C. Cell death by apoptosis or necrosis was assessed by annexin V-fluorescein isothiocyanate binding to externalized phosphatidylserine in conjunction with propidium iodide, and flow cytometry analysis. Morphologic counting of pyknotic nuclei and the fluorescence properties of the DNA-binding dye Hoechst 33342 in combination with propidium iodide were used to further confirm apoptotic cell death and to characterize the sequence of Hg-induced cell death. Results show that low concentrations of MeHgCl (1–7.5 μM) that were cytotoxic to MNC actually inhibited PMN spontaneous apoptosis. Low-level HgCl₂ reproduced the anti-apoptotic effects of MeHgCl on PMN, but to a lower extent. Higher concentrations of MeHgCl and HgCl₂ were necrogenic to PMN, but MeHgCl was about an order of magnitude more toxic, and discrete differences were observed in the modalities of cell death induced by both species. These data reveal for the first time that (1) low levels of organic and inorganic mercury species protect human PMN from cell death via inhibition of spontaneous apoptosis, and (2) PMN are more resistant than MNC to mercury-induced cytotoxicity. Since delayed apoptosis and increased resistance to toxicant-induced cell death may lead to excessive accumulation of senescent PMN, evidence indicates that findings of this study may have implications for mercury-induced autoimmunity and inflammation.

Received 12 April 2001; accepted 26 June 2001.

We thank Sophie Ouellet for technical assistance with the flow cytometry analysis. This work was supported in part by CNTC, and by TSRI (grant 44). Éliane Moisan is a recipient of a fellowship from Centre Interuniversitaire de Recherche en Toxicologie, and Nhi Nguyen is a recipient of a fellowship from Fondation Armand-Frappier.

Address correspondence to Edouard Kouassi, PhD, Human Health Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier, 245 boulevard Hymus, Pointe-Claire, Quebec, H9R 1G6, Canada. E-mail: edouard.kouassi@inrs-iaf.quebec.ca

A large number of individuals are exposed to low-level mercury (Hg) through occupational, environmental, and even therapeutic sources. The toxic potential of this heavy metal to numerous organ systems, including the immune system, has been well recognized (Lawrence & McCabe, 1995; Moszczynski, 1997; Pollard & Hultman, 1997). Hence, data from several animal models and clinical observations in humans indicate that the immunotoxicity produced by Hg encompasses all the known categories of immune alterations, including direct immunosuppression or immunostimulation, hypersensitivity reactions, and autoimmunity (Kosuda et al., 1994; Nadarajah et al., 1996; Ratcliffe et al., 1996; Loftenius et al., 1998; Descotes et al., 2000; Sweet & Zelikoff, 2001). The actual immunotoxic effect of Hg may depend on several factors including genetic background, chemical form and concentration of the metal, cell type, and activation status of the cells. A number of *in vitro* studies have shown that Hg is apoptogenic in human peripheral blood mononuclear cells (MNC) in the resting state of cell activation, including monocytes (InSug et al., 1997), T lymphocytes (Guo et al., 1998; Shenker et al., 1997), and B lymphocytes (Shenker et al., 1993a). In contrast, activated human T cells appeared resistant to Hg-induced apoptosis (Close et al., 1999). Additionally, the human leukemic Jurkat T-cell line that was used as a model of activated T lymphocytes has been reported recently to be protected by inorganic Hg against CD95 (Fas)-mediated apoptosis (Whitekus et al., 1999).

In comparison with MNC, little is known about the effects of mercury compounds on polymorphonuclear neutrophils (PMN) cell death and survival. Among all leukocytes, PMN possess the shortest life span, dying spontaneously by apoptosis as one mechanism of resolution of excessive inflammatory reactions *in vivo*. Indeed, changes at the membrane surface of apoptotic cells, such as externalization of phosphatidylserine, target them for phagocytosis by surrounding macrophages (Savill et al., 1990; Homburg & Roos, 1996). Dysregulation of this normal apoptotic phenomenon in PMN may lead either to cell loss with subsequent immunosuppression and increased susceptibility to bacterial infections, or to excessive cell accumulation with harmful consequences such as chronic inflammation and autoimmunity (Thompson, 1995; Waalkes et al., 2000).

Isolated PMN retain their constitutive apoptosis death pathway *in vitro*, and in the absence of phagocytosis by macrophages, the apoptotic PMN subsequently progress to secondary necrosis. This apoptotic mode of PMN death is usually opposed to primary necrosis that is provoked by sudden changes in the environment, leading to rupture of the plasma membrane and release of proinflammatory mediators. Besides primary necrosis, apoptosis, and secondary necrosis, Raffray and Cohen (1997) proposed three additional operational forms of cell death caused by pharmacological and environmental toxicants. These include (1) intercurrent apoptosis and necrosis, in which heterogeneous apoptosis and necrosis are seen simultaneously in a single cell population exposed to a nominally uniform insult;

(2) sequential apoptosis/necrosis, where apoptosis precedes necrosis, or vice versa, as for example in two interdependent, but different, cell types, in which apoptosis can be induced in a cell population providing a vital support function for a second cell type, causing necrosis of the latter; and (3) necrosis supervened over apoptosis, in which apoptosis is initiated in highly primed cells, but is soon overwhelmed by collapse of cellular integrity. Thus, determination of the effects of a given toxicant on the modality of cell death is required for a proper characterization of its cytotoxicity.

The objective of the present study was to evaluate the effects of methylmercuric chloride (MeHgCl) and mercuric chloride (HgCl₂) on human PMN viability and modality of cell death upon *in vitro* incubation. To this end, a wide concentration range of each chemical form of Hg was used, with several incubation time points to evaluate cell death after addition of the toxicant. Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) binding to externalized phosphatidylserine was used in conjunction with propidium iodide (PI), and flow cytometry analysis, to assess apoptosis and necrosis. Apoptosis was confirmed by two additional indices, including morphologic counting of pyknotic nuclei, and flow cytometry analysis of the fluorescence properties of the DNA-binding dye Hoechst 33342 (HT) in combination with PI. The HT/PI assay allows one to further discriminate between secondary and primary necrosis.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

MeHgCl and HgCl₂ were purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA). Stock solutions (10 mM) of MeHgCl and HgCl₂ were prepared in RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) and distilled H₂O, respectively. These stock solutions were appropriately diluted in RPMI 1640 before addition to cell culture media to yield the indicated final concentrations.

Cell Isolation and Culture

Human polymorphonuclear neutrophils (PMN) and mononuclear cells (MNC) were isolated from heparinized venous blood drawn from randomly selected male and female healthy volunteers (mean age 28 yr; range 22–40) under informed consent. PMN and MNC were purified by dextran sedimentation, followed by Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Inc., Baie d'Urfee, Quebec, Canada) gradient centrifugation and hypotonic lysis of residual erythrocytes (Girard et al., 1998). Cells were collected, washed in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and resuspended at 1×10^6 /ml in RPMI 1640 supplemented with 2 mM glutamine (Gibco), 5% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). Neutrophil preparations were 98% pure with less than 2%

eosinophil contamination, while MNC preparations contained mostly lymphocytes (95–98%) and a small proportion of monocytes (2–5%) as determined by their light-scatter properties in flow cytometry. Cells were incubated in culture medium alone (control) or with increasing concentrations of MeHgCl or HgCl₂, for various lengths of time at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. At long time periods when many of the neutrophils had become adherent, cells were harvested by repeated pipetings and washings. The efficacy of this procedure was verified by observation under light microscope, confirming that all the cells were successfully removed. The osmolality of cell suspensions was verified (Precision System, Inc., Natick, MA) and did not change with MeHgCl or HgCl₂ concentrations up to 1 mM. For induction of typical primary necrosis, cells were heated at 56°C in a water bath.

Assessment of Phosphatidylserine Externalization by Annexin V Binding

After treatment, cells were washed to remove excess chemicals, and resuspended in 1 × binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.2, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl₂) at a final concentration of 1 × 10⁶ cells/ml. One hundred microliters of this suspension was mixed with 5 µl annexin V-FITC (Pharmingen, Mississauga, Ontario, Canada) and 10 µl PI (50 µg/ml) (Molecular Probes, Eugene, OR) (Vermes et al., 1995). The cells were vortexed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. A volume of 400 µl of binding buffer was added and incubation was continued for additional 15 min in the dark. Cells were then analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled, 15-mW argon laser emitting at 488 nm. The filters for detection of FITC and PI fluorescences were 530/30 and 575/26 nm, respectively. All samples were analyzed by setting appropriate forward- and side-scatter gates around the PMN population, and by excluding cellular debris; 10,000 events per sample were analyzed.

Nuclear Morphology

Nuclear morphology was assessed in cytocentrifuge preparations of neutrophils stained with Wright Giemsa (Sigma). Cells were examined by light microscopy at 400× final magnification, and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei (Girard et al., 1998).

Assessment of Neutrophil Apoptosis, Secondary Necrosis, and Primary Necrosis by HT/PI Assay

Cells were washed and resuspended in PBS to a final concentration of 1 × 10⁶ cells/ml. Cells were incubated at 37°C for 10 min with 2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bis-1*H*-benzimidazole (Hoechst 33342, HT, 1 µg/ml) (Sigma), washed again to prevent further uptake of HT, and resuspended in 1 ml PBS. PI (Sigma) was added to each sample to a final concentration of 5 µg/ml, immediately before dual-laser flow cyto-

metry analysis on a FACStar-Plus flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). HT was excited at 325 nm using an ultraviolet (UV) laser light, and PI at 488 nm with an argon laser. HT and PI fluorescences were detected by using 424/44-nm and 575/26-nm filters, respectively (Hébert et al., 1996). In some experiments, cells were triple stained with annexin V-FITC, HT, and PI, and fluorescence was analyzed by dual-laser flow cytometry. Forward- and side-scatter gates were set as already described, and 10,000 events per sample were analyzed.

Statistics

Evaluation of the results was performed with analysis of variance (ANOVA). One-way ANOVA for repeated measures and simple contrast analysis were used when comparing the influence of each low-level Hg concentration on PMN viability/apoptosis/necrosis and the control condition without Hg after 24 h of culture. A two-way ANOVA was used when assessing the influence of high-level Hg concentration and time of incubation on each cell death mode. In all cases, the criterion for significance was set at $p < .05$.

RESULTS

Protection of PMN From Spontaneous Apoptosis by Low-Level MeHgCl and HgCl₂

Only 20% of control PMN were viable after 24 h of culture, while 60% were apoptotic, and the remaining 20% were necrotic (Figure 1). In the presence of low-level MeHgCl (1–7.5 μM), the percentage of viable PMN concentration-dependently increased up to 60% (Figure 1). The effect was significant at concentrations of 4 μM MeHgCl and above, and it reached a maximum between 5 and 7.5 μM . This effect was associated with a concentration-dependent inhibition of cells undergoing spontaneous apoptosis, while the percentage of necrotic cells was not affected. Similarly, HgCl₂ concentration-dependently increased the percentage of viable PMN by inhibiting spontaneous apoptosis; in this case, the effect was significant at 3 μM , but its magnitude was lower than that induced by MeHgCl, reaching a maximum of 40% of viable cells at 4–7.5 μM (Figure 1). Time-course studies using optimal concentrations of MeHgCl (5 μM) showed that PMN survival was prolonged by several hours, with as many as about 60% of cells remaining viable after 48 h in the presence of 5 μM MeHgCl, versus less than 10% of viable cells in control samples (Figure 2). Prolongation of cell survival by MeHgCl was due to delayed apoptosis, while the kinetics and extent of necrotic cell death were not affected (Figure 2).

Induction of Apoptosis and Necrosis in MNC by Low-Level MeHgCl

For comparative purposes, the effects of low-level MeHgCl were evaluated on MNC. In the absence of MeHgCl, more than 80% of control MNC were viable after 48 h of culture (Figure 3). These cells appeared

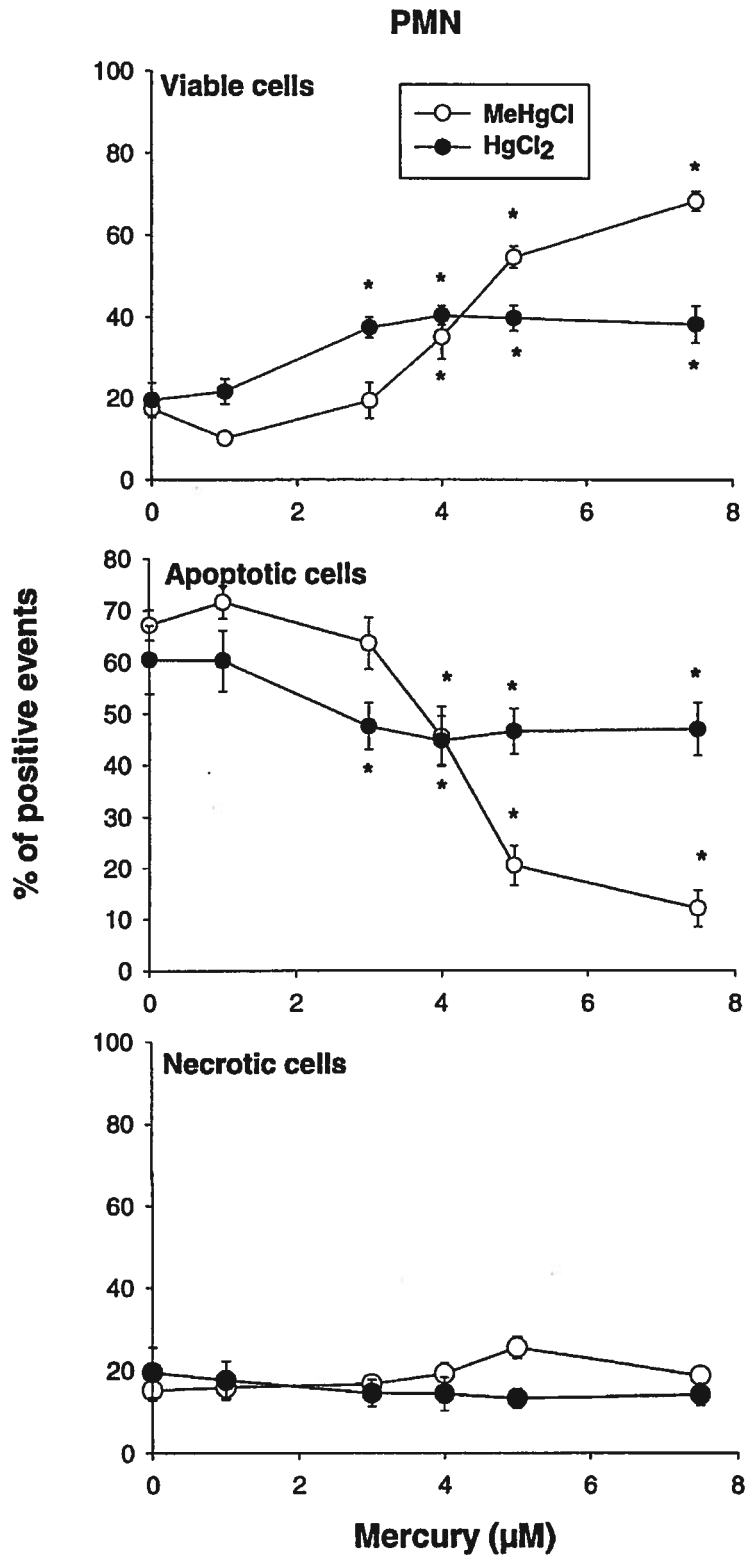


FIGURE 1. Dose-dependent augmentation of PMN viability and inhibition of apoptosis by low-dose MeHgCl and HgCl₂ after 24 h of culture. Data on the percentage of viable, apoptotic, and necrotic cells are derived from the same experiments, and results represent the mean \pm SE of at least three different experiments.

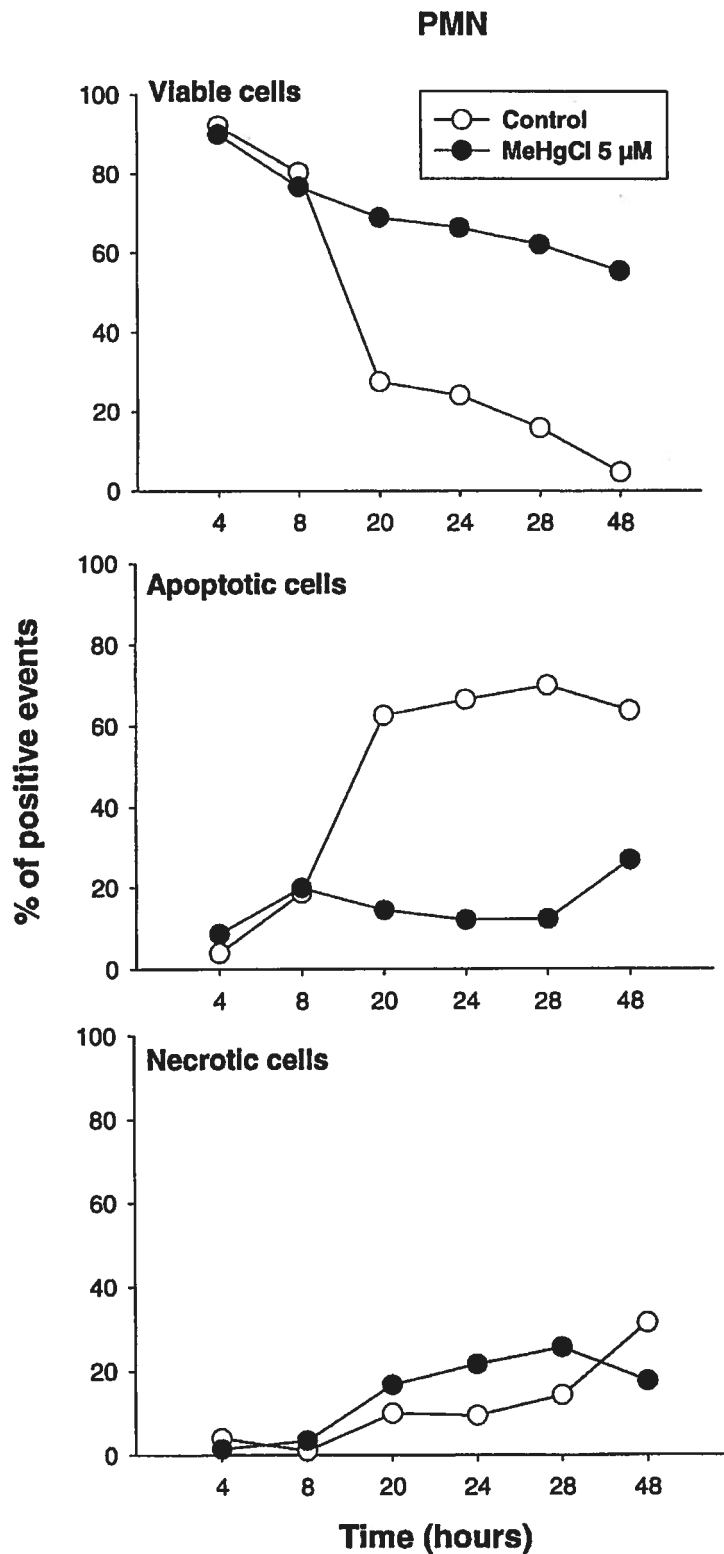


FIGURE 2. Time course of low-dose (5 μM) MeHgCl effects on PMN viability and cell death by apoptosis and necrosis. Data are representative of three different experiments.

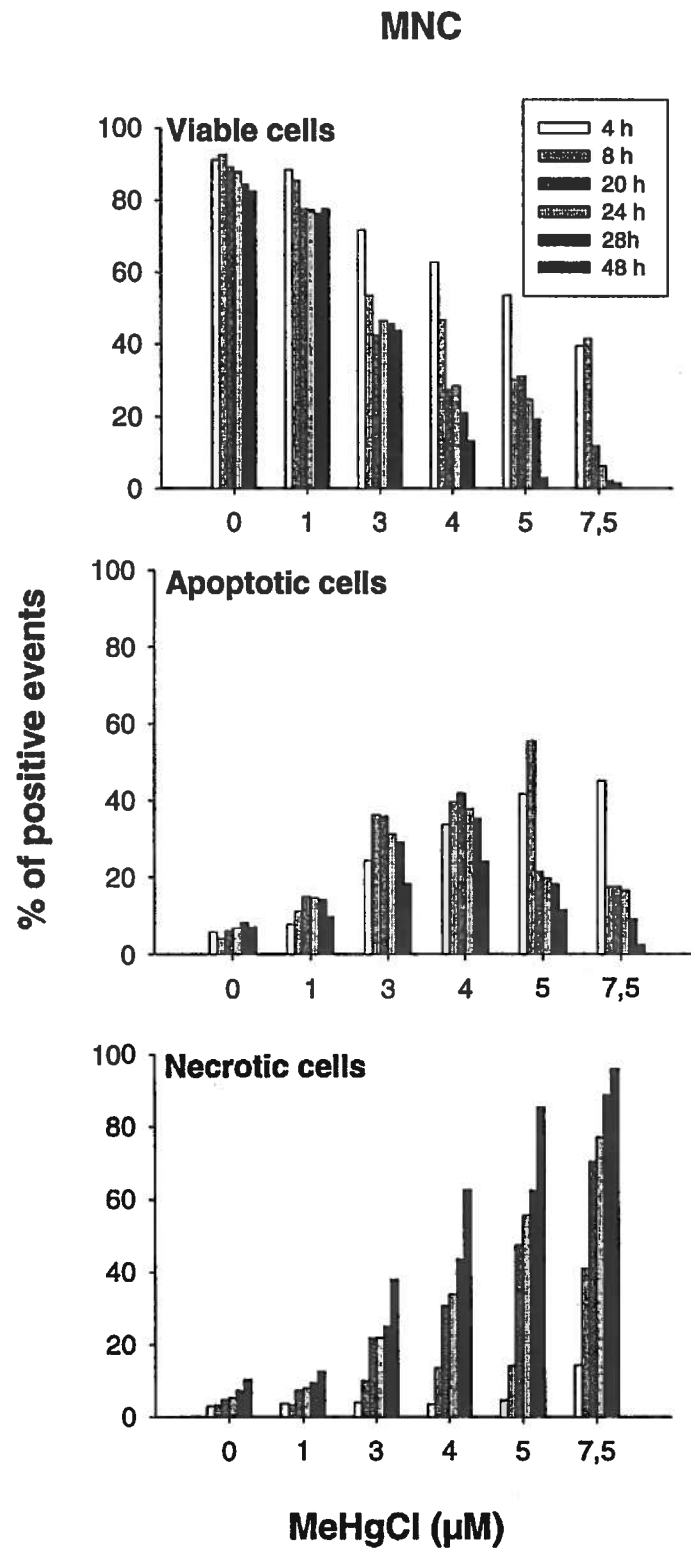


FIGURE 3. Dose response and time course of low-level MeHgCl-induced cytotoxic effects on MNC. Data are representative of three different experiments.

relatively resistant to spontaneous apoptosis, since less than 10% of apoptotic MNC was found throughout the culture period (Figure 3). The percentage of viable MNC was concentration- and time-dependently decreased by low-level MeHgCl down to nearly 0% at 5–7.5 μM after 48 h (Figure 3). Inhibition of MNC viability was associated with induction of apoptosis, which was followed by necrosis. Apoptosis was accelerated when MeHgCl concentrations increased, reaching a maximum of about 60% of MNC in this mode of cell death after 8 h of culture in the presence of 5 μM MeHgCl. Determinations at shorter time points (15 min–4 h) indicated that the percentage of apoptotic MNC did not exceed 60%, even at concentrations of 7.5 μM MeHgCl and above (data not shown). MeHgCl-induced necrosis in MNC was also concentration and time dependent, with nearly 100% necrotic cells in the presence of 7.5 μM MeHgCl after 48 h of incubation, versus less than 10% necrotic cells in control cultures during the same period (Figure 3).

Cytotoxic Effects of High-Level MeHgCl and HgCl₂ on PMN

At high levels (≥ 10 μM) of MeHgCl and HgCl₂, PMN underwent necrosis, but the sequence of cell death was dependent on Hg species, Hg concentration, and time of incubation. With MeHgCl, the concentration of 10 μM had no consistent effect on cell viability, as a result of a combination of both antiapoptotic and necrogenic effects. These opposite effects were apparent after 8 h of culture (Figure 4) and were also present at longer time points (not shown). At concentrations of 30 μM and above, apoptosis was induced rapidly within 15 min in 80–95% of cells (Figure 4). The duration of the apoptosis phase was shortened by increasing MeHgCl concentration, with cells being in that state during 2 h, 1 h, 45 min, and 30 min, in the presence of 30, 50, 100, and 1000 μM MeHgCl, respectively, before entry into necrosis. Almost all PMN were necrotic by 8, 4, 2, and 1 h following exposure to 30, 50, 100, and 1000 μM MeHgCl, respectively (Figure 4). Typical cytograms of control cells and cells treated with MeHgCl (100 μM), or heated at 56°C are shown in Figure 5, indicating rapid induction of apoptosis in MeHgCl-treated cells, before their entry into necrosis, while heat-treated cells underwent necrosis without previous apoptosis. Thus, the modality of MeHgCl-induced cytotoxicity in PMN was compatible with necrosis supervened over apoptosis.

In PMN treated with HgCl₂, concentrations of 10–50 μM induced both inhibition of apoptosis and augmentation of necrosis, yielding inconsistent effects on the percentage of viable cells (Figure 6). At higher concentrations (≥ 100 μM), HgCl₂ induced necrosis within 15 min without any apparent transition into apoptosis, except at 100 μM , where part of PMN (50–60%) progressively underwent apoptosis during the first 60 min of treatment, before entry into necrosis (Figure 6).

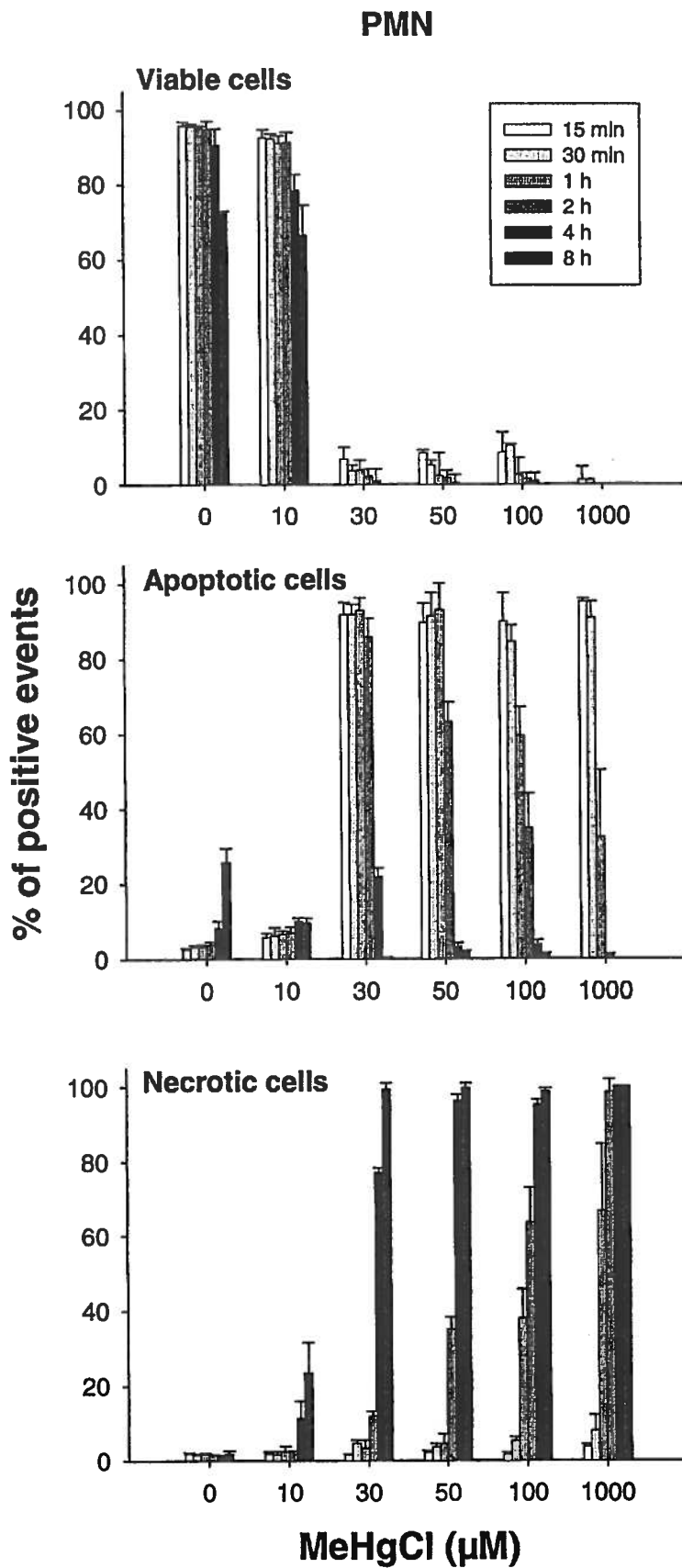


FIGURE 4. Dose response and time course of high-level MeHgCl-induced cytotoxic effects on PMN. Results represent the mean ± SE of at least three experiments.

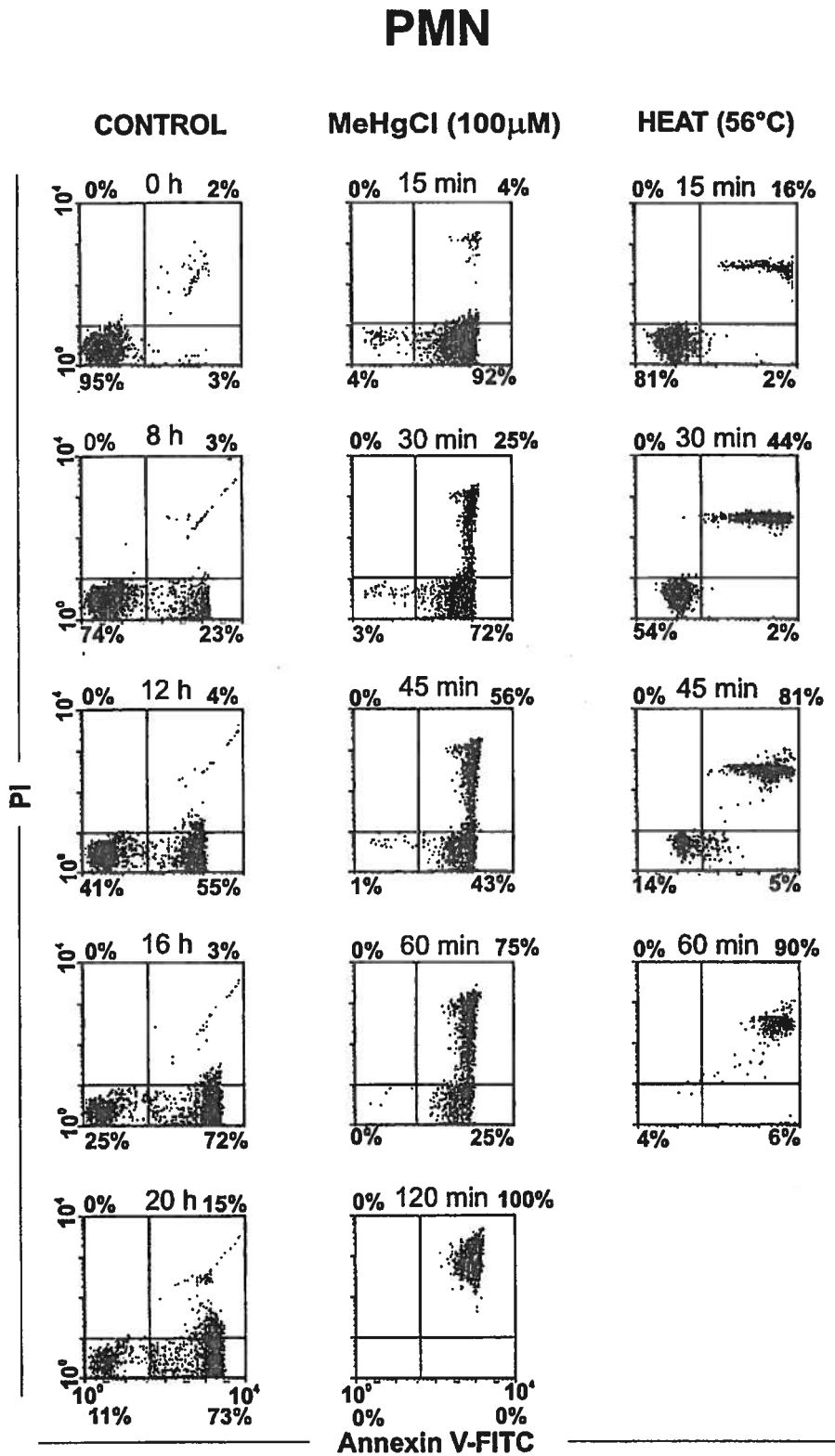


FIGURE 5. Representative time course of phosphatidylserine externalization detected by annexin V binding. Treated PMN were stained with annexin V-FITC and PI and analyzed by flow cytometry. Indicated are the percentages of cells that were annexin V-negative and PI-negative (lower left quadrant corresponding to viable cells), annexin V-positive/PI-negative (lower right quadrant representing apoptotic cells), annexin V-positive/PI-positive (upper right quadrant, necrotic cells), and annexin V-negative/PI-positive (upper left quadrant).

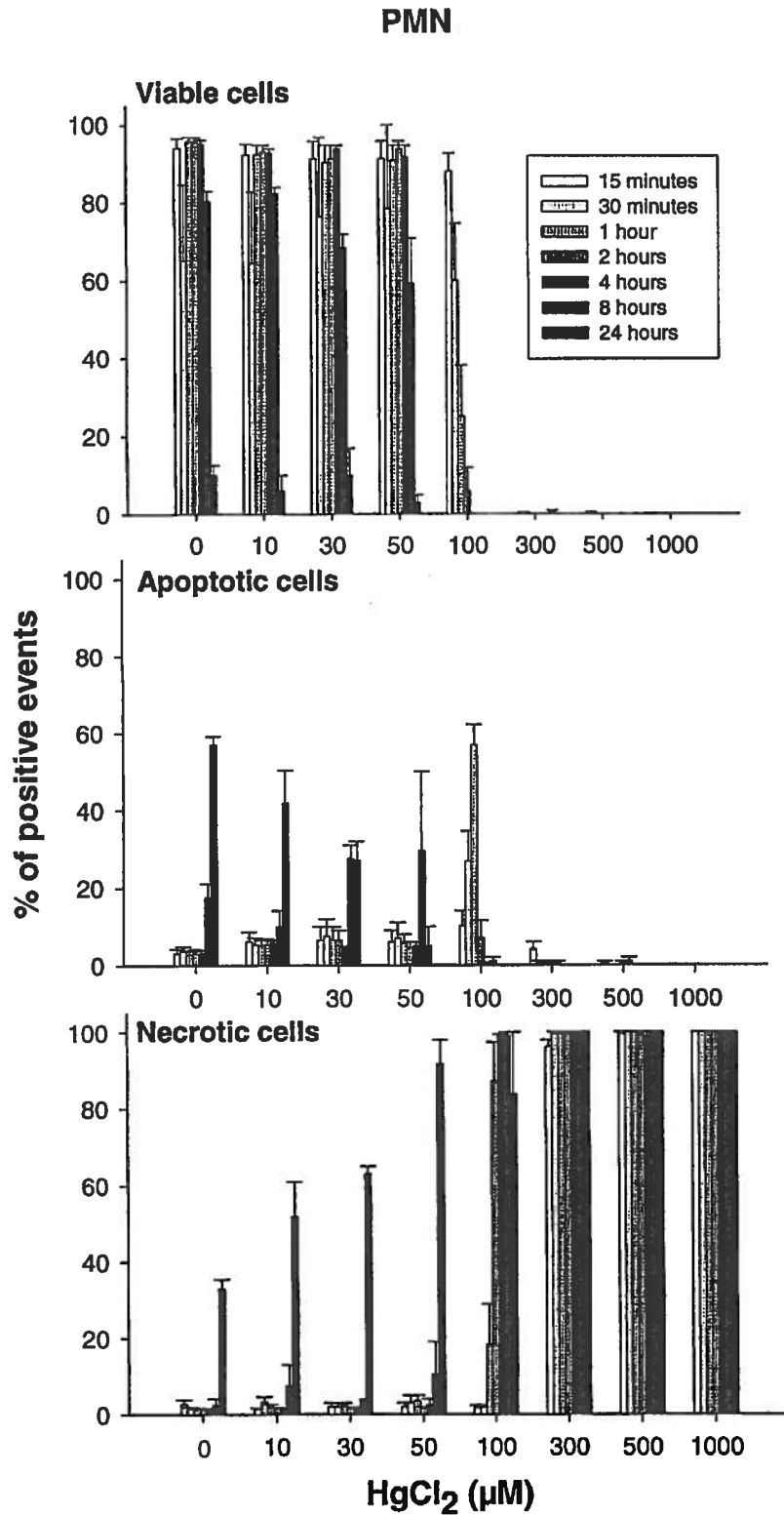


FIGURE 6. Dose response and time course of high-level HgCl₂-induced cytotoxic effects on PMN. Results represent the mean ± SE of three experiments.

Further Characterization of MeHgCl-Induced Necrosis Supervened Over Apoptosis in PMN

To confirm that cells treated with high-level MeHgCl underwent apoptosis before necrosis, two other hallmarks of apoptosis were used, including (1) morphologic counting of pyknotic nuclei and (2) HT/PI staining followed by flow cytometry analysis. In Figure 7, cytocentrifuge preparations were performed and the morphology of PMN was observed by light microscopy. A control population of freshly isolated normal PMN showed the morphology of intact cells with polysegmented nuclei (Figure 7A). After 20 h of culture, the PMN displayed pyknotic nuclei with condensation of their chromatin and coalescence of the nuclear lobes (Figure 7B), a typical characteristics of apoptotic cells (Hébert et al., 1996). In Figure 7C, cells treated for 15 min with MeHgCl (100 μ M) exhibited the same characteristic pyknotic nuclei as cells undergoing constitutive apoptosis. After 2 h of treatment with MeHgCl (100 μ M), cell swelling and loss of the plasma membrane integrity were observed, similar to the morphology of cells heated at 56°C for 1 h, and consistent with the morphology of primary necrotic cells (data not shown).

Four populations of human PMN could be distinguished by HT/PI (Figure 8). These included (1) PMN displaying low fluorescence with both HT and PI, which represents viable neutrophils (cluster A); (2) apoptotic cells exhibiting high fluorescence for HT and low fluorescence for PI (cluster B); (3) PMN displaying low fluorescence with HT and high fluorescence with PI, representing cells in secondary necrosis (cluster C); and (4) cells in primary necrosis characterized by high fluorescence with both HT and PI (cluster D). Control PMN (Figure 8, left panel) asynchronously underwent apoptosis after several hours of incubation, with a consistent percentage of apoptotic cells at 8 h (19% in cluster B), which increased with time and reached a maximum by 16 h (64%). After this spontaneous apoptosis, PMN progressed to secondary necrosis that was detectable after 20 h (11% in cluster C), and increased further upon prolonged incubation for several days (data not shown). There were a few percentages of cells in the primary necrosis cluster that did not change significantly with incubation time (1–6%). Exposure of PMN to MeHgCl (100 μ M) led very rapidly to an increased rate of apoptosis with 80% apoptotic cells within 15 min of treatment (Figure 8, middle panel). Cells remained in the apoptosis state for 30–45 min, and then progressed to primary necrosis, with 11%, 29%, and 94% of cells necrotic after 45, 60, and 120 min. This sequence of cell death was not found with heat shock of 56°C, which induced primary necrosis in a time-dependent manner culminating at 89% necrotic cells after 1 h, without any transition in apoptosis at earlier time points (Figure 8, right panel). Triple-color staining with annexin V-FITC, HT, and PI indicated that annexin V-positive and PI-positive cells induced

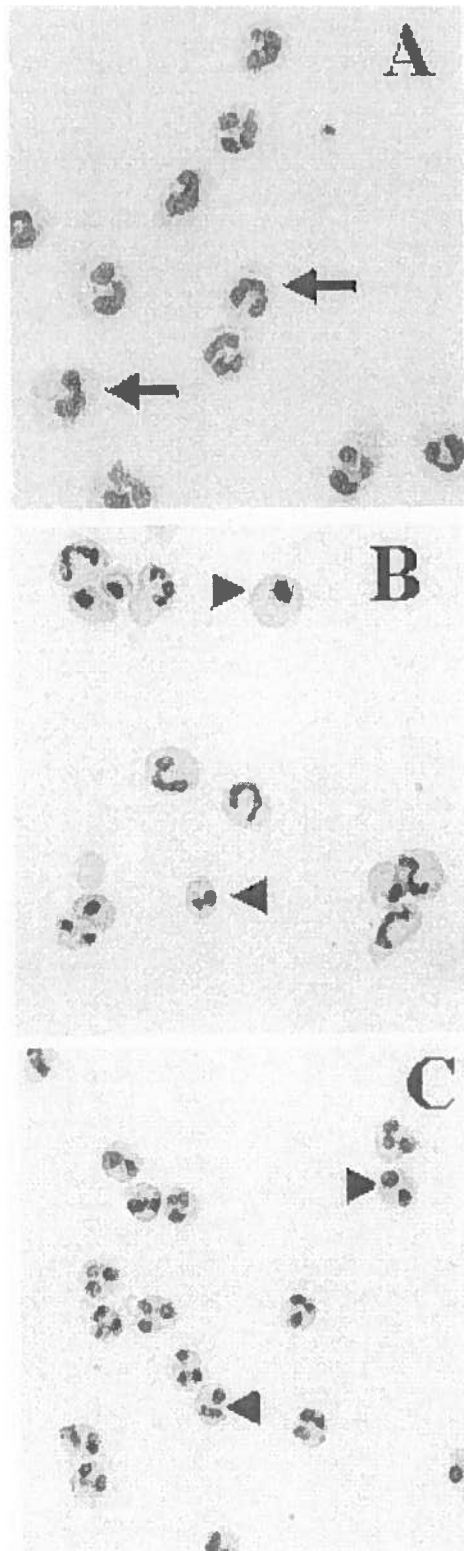


FIGURE 7. PMN morphology assessed by cytology following high-level MeHgCl treatment. The cells were stained with Wright–Giemsa and then examined by light microscopy. (A) Control cells show normal morphology with polysegmented nucleus (arrows). (B) After 20 h, PMN undergo spontaneous apoptosis that is characterized by a condensation of chromatin and coalescence of the nuclear lobes (filled arrowheads). (C) When treated with MeHgCl at 100 μ M for 15 min, a classical morphology of apoptotic cells was induced.

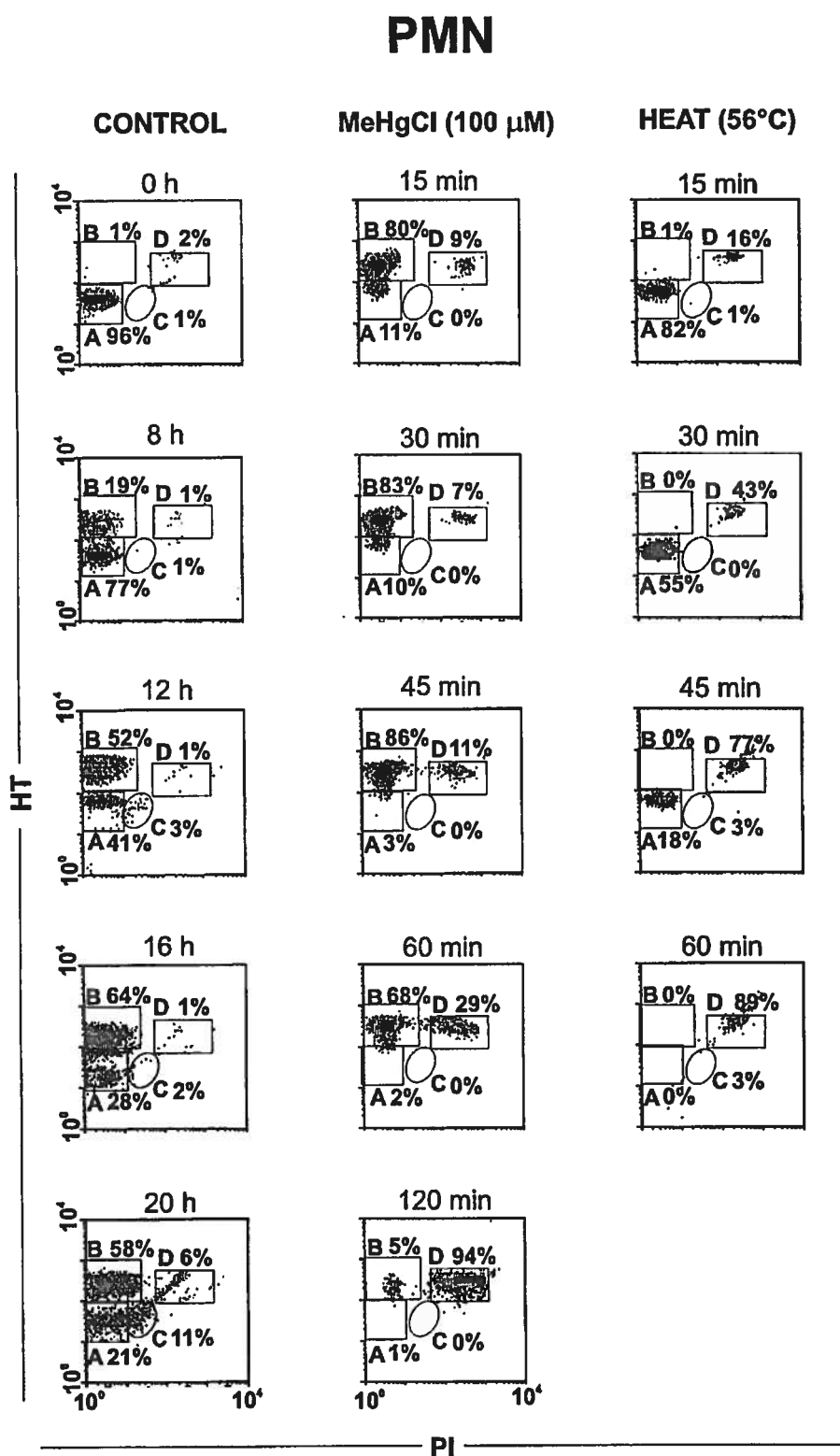


FIGURE 8. Representative sequence of PMN death assessed by HT/PI assay after high-level MeHgCl treatment. PMN were incubated with buffer (control, left panel), with 100 μ M MeHgCl (middle panel), with 100 μ M MeHgCl (middle panel), or heated at 56°C (right panel) for the indicated periods of time. Cells were then stained with HT and PI. PMN from cluster A (normal PMN), B (apoptotic PMN), C (secondary necrotic cells), and D (primary necrotic PMN) were identified by flow cytometry. Numbers indicate the percentage of positive cells in the corresponding cluster.

by MeHgCl (100 μM) or by heating at 56°C displayed high HT fluorescence and were indeed in the primary necrosis state (data not shown).

DISCUSSION

The results of our study clearly demonstrate that low and nontoxic concentrations (1–7.5 μM) of both MeHgCl and HgCl₂ concentration-dependently protect PMN from spontaneous apoptosis, leading to improved survival rate. The optimal antiapoptotic concentrations are 5–7.5 μM and 4–7.5 μM for MeHgCl and HgCl₂, respectively. These findings are in keeping with those reported recently showing that HgCl₂ at concentrations of 1–10 μM attenuates CD95-mediated apoptosis in the human leukemic Jurkat T cell line (Whitekus et al., 1999). Thus, the antiapoptotic effects described in the latter study with inorganic Hg can be extended to organomercurials as well, in normal human PMN. Alteration of human PMN functions by low-level Hg have been reported previously both in vitro (Malamud et al., 1985; Contrino et al., 1988; Obel et al., 1993) and in vivo (Perlingeiro & Queiroz, 1994, 1995), but it is not known whether part of these effects is related to inhibition of PMN spontaneous apoptosis. Genetically prone animal models of Hg-induced autoimmunity are described in rodents (reviewed in Lawrence & McCabe, 1995), and there is some evidence from clinical studies suggesting that exposure to Hg may result in autoimmune responses to various self-antigens in humans (Schrallhammer-Benkler et al., 1992; Bigazzi, 1999; El-Fawal et al., 1999). It is conceivable that attenuation of PMN constitutive apoptosis by Hg may lead to excessive accumulation of senescent PMN, and this may contribute to Hg-induced autoimmunity.

Low-level MeHgCl induced a greater effect than HgCl₂ in protecting PMN from constitutive apoptosis, although the concentration-response curve of HgCl₂ is shifted to the left as compared to that of MeHgCl. These findings could be explained by the greater membrane permeability of MeHgCl leading to more complex toxicant–cell interactions. Indeed, in comparison with inorganic Hg, the organic forms could gain more easy access to cellular and molecular targets localized either in the cell membrane or inside the cytoplasm and the nucleus (Clarkson, 1997), some of which may be critical for the control of PMN spontaneous apoptosis. The molecular mechanisms of delay of apoptosis by organic and inorganic Hg are still unknown. In the Jurkat cell model, attenuation of CD95-mediated apoptosis by Hg was associated with blockade of caspase-3 activation. However, Hg does not impair the apoptosis induced by tumor necrosis factor α (TNF α), which has activation of caspase-3 as a common feature with CD95. It is suggested that the target for Hg is not caspase-3 itself, but an unknown signaling component that is upstream of caspase-3 and downstream of CD95 (Whitekus et al., 1999). The role of the CD95/Fas Ligand system in spontaneous PMN apoptosis is still controversial, while several other proapoptotic as well as antiapoptotic proteins, including

those of the Bcl-2 family, have been associated with regulation of PMN apoptosis and survival (reviewed in Akgul et al., 2001). Hence, future work will elucidate whether attenuation of constitutive PMN apoptosis by Hg uses CD95-specific signaling pathways as in Jurkat T cells, or other molecular mechanisms specific to PMN.

In marked contrast to their anti-apoptotic effects on PMN, low concentrations of MeHgCl (1–7.5 μM) concentration- and time-dependently induce apoptosis and also necrosis in MNC. The cytotoxic effects of low-level MeHgCl on MNC are consistent with the results of previous studies with organic and/or inorganic Hg on these cells (Shenker et al., 1993a, 1997; InSug et al., 1997; Guo et al., 1998), although the latter described predominantly apoptogenic effects, without significant necrosis. About 10-fold higher MeHgCl concentrations were required to induce similar cytotoxic effects in PMN as compared to MNC, suggesting that PMN are relatively resistant to Hg cytotoxicity. Thus, PMN are probably not a significant target for the direct cytotoxic effects of Hg in *in vivo* situation. A relative resistance of PMN to the cytotoxic effects of cadmium has been reported previously (Enger et al., 1983), suggesting that this phenomenon is not restricted to Hg, but may be shared with other heavy metals. The reasons for the differential sensitivity of PMN and MNC to low-level Hg are not known, but this may reflect their differential propensity to undergo spontaneous apoptosis. Thus, as mentioned earlier, Hg may interact directly and/or indirectly, with some pro- and/or antiapoptotic molecules specifically expressed in the PMN, but absent in the MNC, to downregulate apoptosis in the former. Differences in the expression of some cytoprotective molecules, such as the nonprotein thiol antioxidant glutathione, which contributes to maintenance of cellular redox status, and which is more expressed in PMN than in lymphocytes (Scott et al., 1990), may also play a role in their sensitivity to Hg-induced cytotoxicity. Interestingly, induction of apoptosis in T and B lymphocytes by Hg has been associated with reduction in their glutathione reserve together with increased generation of reactive oxygen species (Shenker et al., 1993b, 1999). In addition, activated T lymphocytes that are reportedly more resistant than resting T cells to Hg-induced apoptosis (Close et al., 1999) are known to express higher levels of intracellular glutathione (Messina & Lawrence, 1989). Thus, by modulating cellular redox status, Hg may in turn modulate the functions of several redox-sensitive molecules, such as caspases, which are involved in regulation of apoptosis. Conversely, the metal-binding protein metallothionein, which confers resistance to heavy-metal toxicity in several systems, may not play a significant role as mediator of PMN resistance to Hg cytotoxic effects. Indeed, this family of protein is poorly induced by heavy metals in PMN (Enger et al., 1983; Yurkow & DeCoste, 1999), while it is readily induced in monocytes (Mesna et al., 1995; Koropatnick & Zalups, 1997) and in T and B lymphocytes (Mesna et al., 1995; Yurkow & Decoste, 1999).

Because of their similar level of annexin V binding, cells in primary and secondary necrosis were not readily distinguishable on the basis of annexin V-FITC fluorescence, consistently with a previous report (Louagie et al., 1998). Therefore, HT and PI staining was used followed by flow cytometry analysis to discriminate between PMN cell death by secondary necrosis and by primary necrosis, in addition to detection of cell death by apoptosis (Hébert et al., 1996). Results demonstrate that the sequential mode of cell death induced by MeHgCl and HgCl₂ in PMN is compatible with necrosis supervened over apoptosis. However, there are a number of differences between the concentration-response relationships and kinetics of both chemical forms. Indeed, MeHgCl is about an order of magnitude more cytotoxic than HgCl₂, with virtually no viable cells remaining after 15 min of incubation in the presence of 30 and 300 μM of MeHgCl and HgCl₂, respectively. Moreover, whatever the concentration between 30 and 1000 μM, MeHgCl always induces a burst of apoptosis that affects all the cells, and which is followed by necrosis. In contrast, apoptosis precedes necrosis only in a limited concentration range of HgCl₂ (100 μM), and in a fraction of the cells only (50–60%); at higher concentrations of HgCl₂ (300–1000 μM), necrosis was induced in the first 15 min without any evidence of transition in apoptosis. As mentioned earlier for their antiapoptotic potential at low concentrations, the differences in the modality of the cytotoxic effects of high-level MeHgCl and HgCl₂ can be explained by the higher membrane permeability for the organic form, although other unknown mechanisms could be involved. Studies by Shenker et al. (2000) have shown that MeHgCl is more apoptogenic than HgCl₂ in MNC, and that these forms utilize different signaling pathways to induce apoptosis in the MNC.

Raffray and Cohen (1997) underlined the fact that the necrosis supervened over apoptosis modality of cell death is not indisputably established to date, since the difficulties of following rapid and potentially asynchronous changes in individual cells are experimentally challenging. The findings of the present study may contribute to establish more firmly this operational form of toxicant-induced necrotic cell death occurring in cell types that exhibit low apoptotic threshold, such as PMN, immature thymocytes, and activated mature T lymphocytes. This is owing to observations of very early as well as later flow cytometric, and morphologic changes following exposure of human PMN to increasing concentrations of different Hg species. The data reveal also two additional interesting findings. First, although the necrotic cells induced by MeHgCl (100 μM) are secondarily derived from cells that have undergone apoptosis, they do not exhibit the same morphologic and fluorescence characteristics as secondary necrotic cells found in normal PMN after spontaneous apoptosis. Rather, 100 μM MeHgCl-induced necrotic cells share common features with heat-treated cells that are in primary necrosis. This reinforces the idea that in the necrosis supervened over apoptosis cell death mode, initi-

ation of apoptosis is soon overwhelmed by collapse of cellular integrity, which is characteristic of primary necrosis in conditions of sudden changes in cellular microenvironment. Second, intermediary Hg concentrations (10 μM MeHgCl, and 10–50 μM HgCl₂) may exist that do not affect significantly PMN cell viability and for which interindividual variability is greater. These intermediary concentrations represent a threshold below which protection against spontaneous apoptosis is afforded, and above which necrosis is induced rapidly. Lack of alteration of PMN viability at such intermediary concentrations is probably due to overlap and mutual neutralization of these two opposite effects.

The results of our study support the notion that Hg-induced immunotoxicity critically depends on the immune cell type, and also on Hg species and concentration. More importantly, evidence shows that low levels of Hg in both organic and inorganic forms protect primary cultures of human PMN from cell death by apoptosis. The potential contribution of these anti-apoptotic effects in Hg-induced autoimmunity and in other Hg-induced immune alterations deserves further investigation.

REFERENCES

- Akgul, C., Moulding, D. A., and Edwards, S. W. 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 487:318–322.
- Bigazzi, P. E. 1999. Metals and kidney autoimmunity. *Environ. Health Perspect.* 107(suppl. 5):753–765.
- Clarkson, T. W. 1997. The toxicology of mercury. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 34:369–403.
- Close, A. H., Guo, T. L., and Shenker, B. J. 1999. Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. *Toxicol. Sci.* 49:68–77.
- Contrino, J., Marucha, P., Ribaldo, R., Ference, R., Bigazzi, P. E., and Kreutzer, D. L. 1988. Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. *Am. J. Pathol.* 132:110–118.
- Descotes, J., Choquet-Kastylevsky, G., Van Ganse, E., and Vial, T. 2000. Responses of the immune system to injury. *Toxicol. Pathol.* 28:479–481.
- El-Fawal, H. A., Waterman, S. J., De Feo, A., and Shamy, M. Y. 1999. Neuroimmunotoxicology: Humoral assessment of neurotoxicity and autoimmune mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 107(suppl. 5):767–775.
- Enger, M. D., Hilderbrand, C. E., and Stewart, C. C. 1983. Cd²⁺ responses of cultured human blood cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 69:214–224.
- Girard, D., Boiani, N., and Beaulieu, A. D. 1998. Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88:232–240.
- Guo, T. L., Miller, M. A., Shapiro, I. M., and Shenker, B. J. 1998. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: Evidence of mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153:250–257.
- Hébert, M. J., Takano, T., Holthofer, H., and Brady, H. R. 1996. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J. Immunol.* 157:3105–3115.
- Homburg, C. H., and Roos, D. 1996. Apoptosis of neutrophils. *Curr. Opin. Hematol.* 3:94–99.
- InSug, O., Datar, S., Koch, C. J., Shapiro, I. M., and Shenker, B. J. 1997. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: Evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology* 124:211–224.

- Koropatnick, J., and Zalups, R. K. 1997. Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human monocytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation. *Br. J. Pharmacol.* 120:797–806.
- Kosuda L. I., Hosseinzadeh, H., Greiner, D. L., and Bigazzi, P. E. 1994. Role of RT6⁺ T lymphocytes in mercury-induced renal autoimmunity: Experimental manipulations of susceptible and resistant rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 42:303–321.
- Lawrence, D. A., and McCabe, M. J., Jr. 1995. Immune modulation by toxic metals. In *Metal toxicology*, eds. R. A. Goyer, C. D. Klaassen, and M. P. Waalkes, pp. 305–337. New York: Academic Press.
- Loftenius, A., Sandborgh-Englund, G., and Ekstrand, J. 1998. Acute exposure to mercury from amalgam: No short-time effect on the peripheral blood lymphocytes in healthy individuals. *J. Toxicol. Environ. Health A* 54:547–560.
- Louagie, H., Cornelissen, M., Philippe, J., Vral, A., Thierens, H., and De Ridder, L. 1998. Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in gamma irradiated lymphocytes. *Cell. Biol. Int.* 22:277–283.
- Malamud, D., Dietrich, S. A., and Shapiro, I. M. 1985. Low levels of mercury inhibit the respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:1145–1151.
- Mesna, O. J., Steffensen, I.-L., Hjertholm, and Andersen, R. A. 1995. Accumulation of metallothionein and its multiple forms by zinc, cadmium and dexamethasone in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes. *Chem. Biol. Interact.* 94:225–242.
- Messina, J. P., and Lawrence, D. A. 1989. Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase. *J. Immunol.* 143:1974–1981.
- Moszczynski, P. 1997. Mercury compounds and the immune system: A review. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 10:247–258.
- Nadarajah, V., Neiders, M. E., Aguirre, A., and Cohen, R. E. 1996. Localized cellular inflammatory responses to subcutaneously implanted dental mercury. *J. Toxicol. Environ. Health* 49:113–125.
- Obel, N., Hansen, B., Christensen, M. M., Nielsen, S. L., and Rungby, J. 1993. Methyl mercury, mercuric chloride, and silver lactate decrease superoxide anion formation and chemotaxis in human polymorphonuclear leucocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* 12:361–364.
- Perlingeiro, R. C., and Queiroz, M. L. 1994. Polymorphonuclear phagocytosis and killing in workers exposed to inorganic mercury. *Int. J. Immunopharmacol.* 16:1011–1017.
- Perlingeiro, R. C., and Queiroz, M. L. 1995. Measurement of the respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from mercury-exposed workers. *Hum. Exp. Toxicol.* 14:281–286.
- Pollard, K. M., and Hultman, P. 1997. Effects of mercury on the immune system. In *Metal ions in biological systems*, eds. A. Sigel and H. Sigel, pp. 421–440. New York: Marcel Dekker.
- Raffray, M., and Cohen, G. M. 1997. Apoptosis and necrosis in toxicology: A continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol. Ther.* 75:153–177.
- Ratcliffe, H. E., Swanson, G. M., and Fischer, L. J. 1996. Human exposure to mercury: A critical assessment of the evidence of adverse health effects. *J. Toxicol. Environ. Health* 49:221–270.
- Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., and Haslett, C. 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343:170–173.
- Schrallhammer-Benkler, K., Ring, J., Przybilla, B., Meurer, M., and Landthaler, M. 1992. Acute mercury intoxication with lichenoid drug eruption followed by mercury contact allergy and development of antinuclear antibodies. *Acta Dermatol. Venereol.* 72:294–296.
- Scott, R. B., Collins, J. M., Matin, S., White, F., and Swerdlow, P. S. 1990. Simultaneous measurement of neutrophil, lymphocyte, and monocyte glutathione by flow cytometry. *J. Clin. Lab. Anal.* 4:324–327.
- Shenker, B. J., Berthold, P., Rooney, C., Vitale, L., DeBolt, K., and Shapiro, I. M. 1993a. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15:87–113.
- Shenker, B. J., Mayro, J. S., Rooney, C., Vitale, L., and Shapiro, I. M. 1993b. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. IV. Alterations in cellular glutathione content. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15:273–90.

- Shenker, B. J., Datar, S., Mansfield, K., and Shapiro, I. M. 1997. Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: A flow cytometric analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143:397–406.
- Shenker, B. J., Guo, T. L., O. I., and Shapiro, I. M. 1999. Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: Temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157:23–35.
- Shenker, B. J., Guo, T. L., and Shapiro, I. M. 2000. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: Evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ. Res.* 84:89–99.
- Sweet, L. I., and Zelikoff, J. T. 2001. Toxicology and immunotoxicology of mercury: A comparative review in fish and humans. *J. Toxicol. Environ. Health B* 4:161–205.
- Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456–1462.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods* 184:39–51.
- Waalkes, M. P., Fox, D. A., States, J. C., Patierno, S. R., and McCabe, M. J. 2000. Metals and disorders of cell accumulation: Modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxicol. Sci.* 56:255–261.
- Whitekus, M. J., Santini, R. P., Rosenspire, A. J., and McCabe, M. J. 1999. Protection against CD95-mediated apoptosis by inorganic mercury in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 162:7162–7170.
- Yurkow E. J., and DeCoste, C. J. 1999. Effects of cadmium on metallothionein levels in human peripheral blood leukocytes: A comparison with zinc. *J. Toxicol. Environ. Health A* 58:313–327.

Discussion et conclusion

Les neutrophiles sont les premières cellules à arriver au site inflammatoire et elles ont pour but de phagocyter et de détruire les micro-organismes s'y trouvant. Ces cellules vont spontanément en apoptose, mécanisme qui joue un rôle clé dans la résolution de l'inflammation. Une perturbation au niveau de la reconnaissance des neutrophiles apoptotiques par les macrophages ou une dérégulation de la machinerie apoptotique des neutrophiles peut mener à des désordres inflammatoires.

Le mercure est un contaminant de l'environnement qui existe sous plusieurs formes, soit le mercure métallique, le mercure inorganique et le mercure organique. Ce métal lourd a des effets toxiques notamment sur les systèmes nerveux, rénal et immunitaire. Les effets du mercure sur les cellules du système immunitaire peuvent varier selon plusieurs facteurs, tels que le bagage génétique, la forme chimique et la concentration de mercure, le type de cellules et l'état d'activation des cellules. Le but de cette étude vient du fait que les effets du mercure sur la viabilité et le type de mort cellulaire induits chez les neutrophiles humains sont peu connus.

Nous avons premièrement voulu comparer deux formes chimiques de mercure, soit une forme de mercure organique (MeHgCl) et une forme de mercure inorganique (HgCl₂). De plus, nous avons étudié les effets de ces deux formes de mercure sur la viabilité et le type de mort cellulaire induits chez les neutrophiles isolés de sang périphérique humain. Pour ce faire, nous avons incubé les neutrophiles à une gamme de concentrations de mercure (1-1000 µM) pendant différentes périodes de temps et les cellules ont été ensuite analysées par cytométrie en flux. L'annexine V-FITC et l'iodure de propidium ont été utilisés afin de respectivement marquer les cellules apoptotiques et nécrotiques. Les résultats ont été confirmés par l'utilisation du Hoechst 33342, un agent intercalant de l'ADN et par observation de la morphologie des neutrophiles en microscopie optique.

Les résultats de cette étude montrent que de faibles concentrations non toxiques (1-7,5 µM) de mercure organique et inorganique retardent l'apoptose des neutrophiles et ce, de

façon dose-dépendante. Les concentrations anti-apoptotiques optimales sont respectivement de 5 à 7,5 μM et de 4 à 7,5 μM pour le MeHgCl et le HgCl_2 . Ces résultats sont analogues à ceux d'une étude démontrant que le HgCl_2 à des concentrations de 1-10 μM retardent l'apoptose médiée par des anticorps anti-Fas chez la lignée humaine de lymphocytes T Jurkat, qui a été utilisée comme modèle de lymphocytes T activés (Whitekus *et al*, 1999).

De nombreuses études relatent les différentes perturbations de fonctions des neutrophiles humains (chimiotaxie, phagocytose, etc.) induites par de faibles niveaux de mercure, mais nous ignorons si ces effets sont reliés à l'inhibition de l'apoptose (Contrino *et al*, 1988; Worth *et al*, 2001). De nombreuses observations chez les modèles animaux et études cliniques montrent que des intoxications au mercure peuvent mener à des maladies autoimmunes (Hirsch *et al*, 1982; Pelletier *et al*, 1990; Hu Moller et Abedi-Velugherdi, 1999). Sachant de plus que les neutrophiles sont des cellules grandement impliquées dans les réponses inflammatoires, nous pouvons suggérer que le maintien de la viabilité des neutrophiles par le mercure pourrait mener à leur accumulation dans l'organisme, ce qui pourrait contribuer à l'émergence de désordres autoimmuns.

De faibles niveaux de MeHgCl ont eu davantage d'effets sur l'inhibition de l'apoptose des neutrophiles que le HgCl_2 . Cette différence de réponse pourrait s'expliquer par le fait que le MeHgCl , étant liposoluble, a une plus grande perméabilité membranaire que le HgCl_2 , ce qui permettrait au mercure organique d'avoir davantage d'interactions avec les cellules (Braeckman *et al*, 1996; Clarkson, 1997). Le chlorure de méthylmercure pourrait atteindre plus facilement les cibles localisées à la membrane, à l'intérieur du cytoplasme et dans le noyau des neutrophiles, ce qui peut constituer un facteur critique dans le contrôle de l'apoptose de ces cellules.

Dans le modèle de la cellule T Jurkat, l'inhibition de l'apoptose médiée par Fas via le mercure inorganique fut associée à l'inhibition de l'activation de la caspase-3. Le HgCl_2 dans ce modèle a cependant été incapable d'inhiber l'apoptose médiée par $\text{TNF}\alpha$ chez les cellules Jurkat. Sachant que la caspase-3 est également impliquée dans l'apoptose par le

TNF α , il a été suggéré que la cible du mercure inorganique n'est pas la caspase-3 elle-même, mais qu'une autre composante pour le moment inconnue de la signalisation située entre le récepteur Fas et la caspase-3 serait impliquée (Whitekus *et al*, 1999). Le système Fas-FasL ne semblerait pas être le mécanisme principal responsable de l'apoptose spontanée des neutrophiles. Il serait toutefois intéressant de regarder si l'inhibition de l'apoptose des neutrophiles par le mercure utilise les voies de signalisation spécifiques au système Fas-FasL ou si d'autres cibles sont impliquées.

Contrairement aux effets observés chez les neutrophiles, de faibles niveaux de MeHgCl (1-7,5 μ M) induisent l'apoptose et la nécrose chez les cellules mononucléées de façon dose- et temps-dépendante. Les effets toxiques du mercure organique que nous avons observés chez les cellules mononucléées corroborent les résultats de nombreuses études avec le mercure organique et inorganique chez ces cellules, bien que les auteurs de ces études aient perçu principalement de l'apoptose sans qu'il y ait induction importante de nécrose (Shenker *et al*, 1993a; Shenker *et al*, 1997; Insug *et al*, 1997; Guo *et al*, 1998). Des concentrations environ 10 fois plus élevées de MeHgCl ont été nécessaires à l'induction d'apoptose et de nécrose chez les neutrophiles par rapport aux cellules mononucléées, ce qui suggère que les neutrophiles sont relativement résistants à la cytotoxicité induite par le mercure. Ceci nous indique également que les neutrophiles ne sont probablement pas une cible significative pour les effets directs de cytotoxicité du mercure en situation *in vivo*.

Ces observations reflètent la différence entre les neutrophiles et les cellules mononucléées au niveau de leur tendance naturelle à subir l'apoptose spontanée. Le mercure pourrait interagir directement ou indirectement avec des molécules pro- ou anti-apoptotiques exprimées exclusivement chez le neutrophile, et non chez les cellules mononucléées, afin de retarder leur apoptose. Une différence au niveau de l'expression de molécules cytoprotectrices, telles que le glutathion (protéine plus fortement exprimée chez les neutrophiles que chez les lymphocytes), pourrait jouer un rôle dans la sensibilité à la cytotoxicité induite par le mercure (Scott *et al*, 1990). D'autres études ont montré que l'induction de l'apoptose chez les lymphocytes T et B par le mercure est associée à une

diminution de la réserve de glutathion intracellulaire, couplé à une augmentation de la génération de radicaux libres (Shenker *et al*, 1993b; Shenker *et al*, 1999).

Une étude a montré que les lymphocytes T à l'état activé sont davantage résistants à l'apoptose induite par le mercure que des lymphocytes T au repos (Close, Guo et Shenker, 1999). Sachant que les cellules T activées expriment davantage de glutathion intracellulaire, nous pouvons penser que le mercure interfère avec certaines protéines, comme les caspases, qui sont impliquées dans la régulation de l'apoptose et qui sont sensibles au statut redox de la cellule. Il serait intéressant de regarder si le mercure a un effet sur le statut redox des neutrophiles et s'il a une influence sur les niveaux de protéines cytoprotectrices comme le glutathion.

Les expériences effectuées avec de fortes concentrations de mercure organique et inorganique montrent que le mode de mort cellulaire induit par le mercure chez les neutrophiles est la nécrose qui survient par-dessus l'apoptose, processus lors duquel l'apoptose est initiée chez les cellules, mais la cascade apoptotique est rapidement interrompue par une perte d'intégrité membranaire (Raffray et Cohen, 1997). Il existe cependant de nombreuses différences entre les relations de doses-réponses et les cinétiques des deux formes de mercure. Le mercure organique s'est avéré plus toxique que le mercure inorganique. De fortes concentrations de MeHgCl induisent l'apoptose de tous les neutrophiles en même temps, et les cellules subissent ensuite la nécrose. Le HgCl₂ pour sa part induit l'apoptose qui précède la nécrose dans un écart de concentrations très limité (environ 100 µM) chez une fraction des cellules seulement (50-60 % des cellules). Des concentrations supérieures à 100 µM induisent directement la nécrose, sans qu'il n'y ait de transition évidente en apoptose. Comme mentionné pour les effets anti-apoptotiques des faibles concentrations de mercure, les différences au niveau des modes de mort cellulaires induits par de fortes concentrations de MeHgCl et de HgCl₂ peuvent être expliquées par les propriétés physicochimiques des deux formes de mercure.

Les résultats de cette étude contribuent à mieux définir la nécrose qui survient par-dessus l'apoptose comme mode de mort cellulaire induit par des toxiques chez des cellules ayant

un seuil apoptotique faible comme les neutrophiles, les thymocytes immatures et les lymphocytes T à l'état activé. Les neutrophiles qui vont en apoptose spontanée subissent éventuellement la nécrose secondaire en absence de phagocytose par les macrophages. Même si les cellules qui subissent la nécrose par de fortes concentrations de MeHgCl ont subi précédemment l'apoptose, elles ne présentent pas les mêmes caractéristiques morphologiques et fluorescentes que des cellules en nécrose secondaire. De plus, les neutrophiles en présence de fortes concentrations de mercure organique partagent des caractéristiques communes avec les cellules en nécrose primaire suite au chauffage de ces dernières. Ces observations viennent supporter l'idée que lors de la nécrose qui survient par-dessus l'apoptose, l'initiation de l'apoptose est rapidement interrompue par une perte d'intégrité membranaire, qui est une caractéristique de la nécrose primaire lors de changements brusques de l'environnement (Raffray et Cohen, 1997).

Nous avons observé de plus qu'il existerait des concentrations intermédiaires de mercure organique (10 μM) et inorganique (10-50 μM) qui n'affectent pas significativement la viabilité cellulaire des neutrophiles et pour lesquelles la variabilité entre individus est plus grande. Ces concentrations intermédiaires représentent un seuil au-dessous duquel il y a protection contre l'apoptose et au-dessus duquel la nécrose est induite rapidement. Le maintien de la viabilité des neutrophiles à ces concentrations pourrait être dû à une neutralisation de la somme des effets pro- et anti-apoptotiques du mercure.

En perspective, il serait intéressant éventuellement de regarder les mécanismes anti-apoptotiques du mercure chez les neutrophiles au niveau intracellulaire, plus particulièrement au niveau de certains effets communs perçus chez les neutrophiles en présence d'agents qui retardent l'apoptose. Sachant que plusieurs cytokines inflammatoires qui retardent l'apoptose augmentent la phosphorylation sur des résidus tyrosines de nombreuses protéines, il serait intéressant de regarder si le mercure a le même effet. Nous pourrions également vérifier si l'inhibition de l'apoptose par le mercure se fait via la synthèse *de novo* de protéines qui ne sont pas exprimées de façon constitutive. Il se pourrait que de faibles concentrations de mercure régulent des voies de signalisation qui mènent à l'activation de facteurs de transcription spécifiques qui

induisent l'expression de gènes clé chez le neutrophile. Il serait alors intéressant de vérifier si le mercure maintient l'expression ou induit la synthèse de protéines anti-apoptotiques telles que Mcl-1 et A1.

Les résultats de l'étude montrent que le mercure est un agoniste pouvant moduler l'apoptose des neutrophiles et que les effets immunotoxiques du mercure dépendent grandement du type de cellules immunes, de l'espèce et des concentrations de mercure. Nous ne connaissons pas les mécanismes responsables des effets anti-apoptotiques du mercure organique et inorganique chez les neutrophiles. Cependant, la survie de ces cellules pourrait expliquer en partie les désordres inflammatoires et autoimmuns provoqués par une exposition au mercure.

Références

- AFFORD, S. C., J. Pongracz, R. A. Stockley, J. Crocker et D. Burnett. 1992. "The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 21612-6.
- AKGUL, C., D. A. Moulding et S. W. Edwards. 2001. "Molecular control of neutrophil apoptosis". FEBS Letters, vol. 487, p. 318-22.
- ALBERTS, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. 1994 Molecular Biology of the Cell. New-York : Garland Publishing Inc., 1294 p.
- AOSHIBA, K., A. Nagai, S. Yasui et K. Konno. 1996. "Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis". Journal of Laboratory and Clinical Medicine, vol. 127, p. 186-94.
- AOSHIBA, K., S. Yasui, M. Hayashi, J. Tamaoki et A. Nagai. 1999. "Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils". Journal of Immunology, vol. 162, p. 1692-700.
- ASHKENAZI, A. et V. M. Dixit. 1998. "Death receptors: signaling and modulation". Science, vol. 281, p. 1305-8.
- ASCHNER, M. et J. L. Aschner. 1990. "Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport". Neuroscience and Biobehavioral Reviews, vol. 14, p. 169-76.
- BABIOR, B. M. 1999. "NADPH oxidase: an update". Blood, vol. 93, p. 1464-76.
- BAGENSTOSE, L. M., P. Salgame et M. Monestier. 1999. "Murine mercury-induced autoimmunity: a model of chemically related autoimmunity in humans". Immunologic Research, vol. 20, p. 67-78.
- BARAN, J., K. Guzik, W. Hryniewicz, M. Ernst, H. D. Flad et J. Pryjma. 1996. "Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria". Infection and Immunity, vol. 64, p. 4242-8.
- BARNES, P. J. et S. Pedersen. 1993. "Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. Report of a workshop held in Eze, France, October 1992". American Review of Respiratory Disease, vol. 148, p. S1-26.
- BEAULIEU, A. D., R. Paquin et J. Gosselin. 1995. "Epstein-Barr virus modulates de novo protein synthesis in human neutrophils". Blood, vol. 86, p. 2789-98.
- BIFFL, W. L., E. E. Moore, F. A. Moore et C. C. Barnett Jr. 1995. "Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent". Journal of Leukocyte Biology, vol. 58, p. 582-4.

- BIFFL, W. L., E. E. Moore, F. A. Moore, C. C. Barnett Jr, V. S. Carl et V. N. Peterson. 1996. "Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis". Archives of Surgery, vol. 131, p. 24-9; discussion 29-30.
- BIGAZZI, P. E. 1999. "Metals and kidney autoimmunity". Environmental Health Perspectives, vol. 107 Suppl 5, p. 753-65.
- BOGDANOV, K. V., A. B. Chukhlovin, A. Y. Zaritskey, O. I. Frolova et B. V. Afanasiev. 1997. "Ultraviolet irradiation induces multiple DNA double-strand breaks and apoptosis in normal granulocytes and chronic myeloid leukaemia blasts". British Journal of Haematology, vol. 98, p. 869-72.
- BRACH, M. A., S. deVos, H. J. Gruss et F. Herrmann. 1992. "Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death". Blood, vol. 80, p. 2920-4.
- BRAECKMAN, B., R. Cornelis, U. Rzeznik et H. Raes. 1998. "Uptake of HgCl₂ and MeHgCl in an insect cell line (*Aedes albopictus* C6/36)". Environmental Research, vol. 79, p. 33-40.
- BROWN, D. L., K. R. Reuhl, S. Bormann et J. E. Little. 1988. "Effects of methyl mercury on the microtubule system of mouse lymphocytes". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 94, p. 66-75.
- BROWN, S. B. et J. Savill. 1999. "Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes". Journal of Immunology, vol. 162, p. 480-5.
- BUJA, L. M., M. L. Eigenbrodt et E. H. Eigenbrodt. 1993. "Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death". Archives of Pathology and Laboratory Medicine, vol. 117, p. 1208-14.
- BUSSING, A. 1996. "Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: A review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L.". Apoptosis, vol. 1, p. 25-32.
- CHACON-CRUZ, E., D. G. Oelberg, P. Davis et E. S. Buescher. 1998. "Membrane depolarization and depletion of intracellular calcium stores are associated with delay of apoptosis in human neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, p. 759-66.
- CARPENTER, D. O. 2001. "Effects of metals on the nervous system of humans and animals". International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, vol. 14, p. 209-18.
- CHANG, L. W. 1990. "The neurotoxicology and pathology of organomercury, organolead, and organotin". Journal of Toxicological Sciences, vol. 15 Suppl 4, p. 125-51.

CHRISTENSEN, M., S. C. Mogensen et J. Rungby. 1988. "Toxicity and ultrastructural localization of mercuric chloride in cultured murine macrophages". Archives of Toxicology, vol. 62, p. 440-6.

CHRISTENSEN, M. M., S. Ellermann-Eriksen, J. Rungby et S. C. Mogensen. 1993. "Comparison of the interaction of methyl mercury and mercuric chloride with murine macrophages". Archives of Toxicology, vol. 67, p. 205-11.

CLARKSON, T. W. 1997. "The toxicology of mercury". Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, vol. 34, p. 369-403.

CLOSE, A. H., T. L. Guo et B. J. Shenker. 1999. "Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis". Toxicological Sciences, vol. 49, p. 68-77.

COLAMUSSI, M. L., M. R. White, E. Crouch et K. L. Hartshorn. 1999. "Influenza A virus accelerates neutrophil apoptosis and markedly potentiates apoptotic effects of bacteria". Blood, vol. 93, p. 2395-403.

COLOTTA, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani et A. Mantovani. 1992. "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products". Blood, vol. 80, p. 2012-20.

CONTRINO, J., P. Marucha, R. Ribaldo, R. Ference, P. E. Bigazzi et D. L. Kreutzer. 1988. "Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro". American Journal of Pathology, vol. 132, p. 110-8.

COX, G. et R. C. Austin. 1997. "Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 224-30.

DENNY, M. F. et W. D. Atchison. 1996. "Mercurial-induced alterations in neuronal divalent cation homeostasis". Neurotoxicology, vol. 17, p. 47-61.

DESAGHER, S. et J. C. Martinou. 2000. "Mitochondria as the central control point of apoptosis". Trends in Cell Biology, vol. 10, p. 369-77.

DIETER, M. P., M. I. Luster, G. A. Boorman, C. W. Jameson, J. H. Dean et J. W. Cox. 1983. "Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 68, p. 218-28.

DUBEY, C., B. Bellon, F. Hirsch, J. Kuhn, M. C. Vial, M. Goldman et P. Druet. 1991. "Increased expression of class II major histocompatibility complex molecules on B cells in rats susceptible or resistant to HgCl₂-induced autoimmunity". Clinical and Experimental Immunology, vol. 86, p. 118-23.

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

- FADEEL, B., A. Ahlin, J. I. Henter, S. Orrenius et M. B. Hampton. 1998. "Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species". Blood, vol. 92, p. 4808-18.
- FECHO, K. et P. L. Cohen. 1998. "Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, p. 373-83.
- FINKELSTEIN, E. I., M. Nardini et A. van der Vliet. 2001. "Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco- related lung disease?". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, vol. 281, p. L732-9.
- FORMIGLI, L., L. Papucci, A. Tani, N. Schiavone, A. Tempestini, G. E. Orlandini, S. Capaccioli et S. Z. Orlandini. 2000. "Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis". Journal of Cellular Physiology, vol. 182, p. 41-9.
- FORTENBERRY, J. D., M. L. Owens, M. R. Brown, D. Atkinson et L. A. Brown. 1998. "Exogenous nitric oxide enhances neutrophil cell death and DNA fragmentation". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 18, p. 421-8.
- FRASCH, S. C., J. A. Nick, V. A. Fadok, D. L. Bratton, G. S. Worthen et P. M. Henson. 1998. "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 8389-97.
- GAUTHIER, M., C. J. Roberge, M. Pelletier, P. A. Tessier et D. Girard. 2001. "Activation of human neutrophils by technical toxaphene". Clinical Immunology, vol. 98, p. 46-53.
- GILES, K. M., S. P. Hart, C. Haslett, A. G. Rossi et I. Dransfield. 2000. "An appetite for apoptotic cells? Controversies and challenges". British Journal of Haematology, vol. 109, p. 1-12.
- GIRARD, D., M. E. Paquet, R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1996. "Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15". Blood, vol. 88, p. 3176-84.
- GIRARD, D., R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1997. "Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis". Biochemical Journal, vol. 325 (Pt 1), p. 147-53.
- GIRARD, D., R. Paquin, P. H. Naccache et A. D. Beaulieu. 1996. "Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions". Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, p. 412-9.

- GOTO, Y., J. Gallagher, N. Fanning, J. Wang, S. McCusker, P. Redmond et G. Shorten. 2000. "Does chronic occupational exposure to volatile anesthetic agents influence the rate of neutrophil apoptosis?". Canadian Journal of Anaesthesia, vol. 47, p. 350-3.
- GOULDING, N. J., H. S. Euzger, S. K. Butt et M. Perretti. 1998. "Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation". Inflammation Research, vol. 47 Suppl 3, p. S158-65.
- GREEN, D. R. et J. C. Reed. 1998. "Mitochondria and apoptosis". Science, vol. 281, p. 1309-12.
- GUO, T. L., M. A. Miller, I. M. Shapiro et B. J. Shenker. 1998. "Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 153, p. 250-7.
- 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.
- HANNAH, S., K. Mecklenburgh, I. Rahman, G. J. Bellingan, A. Greening, C. Haslett et E. R. Chilvers. 1995. "Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro". FEBS Letters, vol. 372, p. 233-7.
- HARIBABU, B., R. M. Richardson, M. W. Verghese, A. J. Barr, D. V. Zhelev et R. Snyderman. 2000. "Function and regulation of chemoattractant receptors". Immunologic Research, vol. 22, p. 271-9.
- HART, S. P., C. Haslett et I. Dransfield. 1996. "Recognition of apoptotic cells by phagocytes". Experientia, vol. 52, p. 950-6.
- HASLETT, C. 1999. "Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 160, p. S5-11.
- HEBERT, M. J., T. Takano, H. Holthofer et H. R. Brady. 1996. "Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids". Journal of Immunology, vol. 157, p. 3105-15.
- HENGARTNER, M. O. 2000. "The biochemistry of apoptosis". Nature, vol. 407, p. 770-6.
- HIRSCH, F., J. Couderc, C. Sapin, G. Fournie et P. Druet. 1982. "Polyclonal effect of HgCl₂ in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease". European Journal of Immunology, vol. 12, p. 620-5.
- HOMBURG, C. H., M. de Haas, A. E. von dem Borne, A. J. Verhoeven, C. P. Reutelingsperger et D. Roos. 1995. "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro". Blood, vol. 85, p. 532-40.

- HSIEH, S. C., M. H. Huang, C. Y. Tsai, Y. Y. Tsai, S. T. Tsai, K. H. Sun, H. S. Yu, S. H. Han et C. L. Yu. 1997. "The expression of genes modulating programmed cell death in normal human polymorphonuclear neutrophils". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 233, p. 700-6.
- HU, H., G. Moller et M. Abedi-Valugerdi. 1999. "Mechanism of mercury-induced autoimmunity: both T helper 1- and T helper 2-type responses are involved". Immunology, vol. 96, p. 348-57.
- HUA, J., L. Pelletier, M. Berlin et P. Druet. 1993. "Autoimmune glomerulonephritis induced by mercury vapour exposure in the Brown Norway rat". Toxicology, vol. 79, p. 119-29.
- HULTMAN, P. et U. Johansson. 1991. "Strain differences in the effect of mercury on murine cell-mediated immune reactions". Food and Chemical Toxicology, vol. 29, p. 633-8.
- HUNNINGHAKE, G. W. et R. G. Crystal. 1983. "Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers". American Review of Respiratory Disease, vol. 128, p. 833-8.
- IACOBINI, M., A. Menichelli, G. Palumbo, G. Multari, B. Werner et D. Del Principe. 2001. "Involvement of oxygen radicals in cytarabine-induced apoptosis in human polymorphonuclear cells". Biochemical Pharmacology, vol. 61, p. 1033-40.
- INSUG, O., S. Datar, C. J. Koch, I. M. Shapiro et B. J. Shenker. 1997. "Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve". Toxicology, vol. 124, p. 211-24.
- IWAI, K., T. Miyawaki, T. Takizawa, A. Konno, K. Ohta, A. Yachie, H. Seki et N. Taniguchi. 1994. "Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas- mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils". Blood, vol. 84, p. 1201-8.
- JANEWAY, C. A. et P. Travers. 1997. Immunobiologie, Bruxelles : Département De Boeck Université, 582 p.
- JANSSON, G. et M. Harms-Ringdahl. 1993. "Stimulating effects of mercuric- and silver ions on the superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes". Free Radical Research Communications, vol. 18, p. 87-98.
- KASAHARA, Y., K. Iwai, A. Yachie, K. Ohta, A. Konno, H. Seki, T. Miyawaki et N. Taniguchi. 1997. "Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils". Blood, vol. 89, p. 1748-53.
- KATANAEV, V. L. 2001. "Signal transduction in neutrophil chemotaxis". Biochemistry, vol. 66, p. 351-68.

- KATO, T., Y. Takeda, T. Nakada et F. Sendo. 1995. "Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro". Natural Immunity, vol. 14, p. 198-208.
- KETTRITZ, R., M. L. Gaido, H. Haller, F. C. Luft, C. J. Jennette et R. J. Falk. 1998. "Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha- mediated apoptosis of human neutrophils". Kidney International, vol. 53, p. 84-91.
- KLEBANOFF, S. J., S. Olszowski, W. C. Van Voorhis, J. A. Ledbetter, A. M. Waltersdorff et K. G. Schlechte. 1992. "Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage". Blood, vol. 80, p. 225-34.
- KLEIN, J. B., M. J. Rane, J. A. Scherzer, P. Y. Coxon, R. Kettritz, J. M. Mathiesen, A. Buridi et K. R. McLeish. 2000. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways". Journal of Immunology, vol. 164, p. 4286-91.
- KOLLER, L. D., J. H. Exon et J. A. Brauner. 1977. "Methylmercury: decreased antibody formation in mice". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 155, p. 602-4.
- KRAMMER, P. H. 2000. "CD95's deadly mission in the immune system". Nature, vol. 407, p. 789-95.
- KRAUSE, K.-H., K. P. Campbell, M. J. Welsh et D. P. Lew. 1990. "The calcium signal and neutrophil activation". Clinical Biochemistry, vol. 23 , p. 159-66.
- KROEMER, G., B. Dallaporta et M. Resche-Rigon. 1998. "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis". Annual Review of Physiology, vol. 60, p. 619-42.
- LAROCHELLE, B., L. Flamand, P. Gourde, D. Beauchamp et J. Gosselin. 1998. "Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils". Blood, vol. 92, p. 291-9.
- LEBLEBICIOGLU, B. et J. Walters. 1999. "Alkaline conditions accelerate polymorphonuclear leukocyte apoptosis in vitro". Infection and Immunity, vol. 67, p. 2019-21.
- LEE, A., M. K. Whyte et C. Haslett. 1993. "Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators". Journal of Leukocyte Biology, vol. 54, p. 283-8.
- LEUENROTH, S., C. Lee, P. Grutkoski, H. Keeping et H. H. Simms. 1998. "Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interactions". Surgery, vol. 124, p. 409-17.

- LEUENROTH, S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala et H. H. Simms. 2000a. "The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 158-66.
- LEUENROTH, S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala et H. H. Simms. 2000b. "Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity". Surgery, vol. 128, p. 171-7.
- LEVIN, S., T. J. Bucci, S. M. Cohen, A. S. Fix, J. F. Hardisty, E. K. LeGrand, R. R. Maronpot et B. F. Trump. 1999. "The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists". Toxicologic Pathology, vol. 27, p. 484-90.
- LI, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri et X. Wang. 1997. "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade". Cell, vol. 91, p. 479-89.
- LILES, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo et S. J. Klebanoff. 1996. "Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils". Journal of Experimental Medicine, vol. 184, p. 429-40.
- LILES, W. C. et S. J. Klebanoff. 1995. "Regulation of apoptosis in neutrophils--Fas track to death?". Journal of Immunology, vol. 155, p. 3289-91.
- LIU, J., T. Akahoshi, R. Namai, T. Matsui et H. Kondo. 2000. "Effect of auranofin, an antirheumatic drug, on neutrophil apoptosis". Inflammation Research, vol. 49, p. 445-51.
- LUNDQVIST-GUSTAFSSON, H. et T. Bengtsson. 1999. "Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 65, p. 196-204.
- MAJEWSKA, E., Z. Sulowska et Z. Baj. 2000. "Spontaneous apoptosis of neutrophils in whole blood and its relation to apoptosis gene proteins". Scandinavian Journal of Immunology, vol. 52, p. 496-501.
- MASLINSKA, D. et M. Gajewski. 1998. "Some aspects of the inflammatory process". Folia Neuropathologica, vol. 36, p. 199-204.
- MARTINO, J. C., S. Desagher et B. Antonsson. 2000. "Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing". Nat Cell Biol, vol. 2, p. E41-3.
- MCCONKEY, D. J. 1996. "The role of calcium in the regulation of apoptosis". Scanning Microscopy, vol. 10, p. 777-94.
- MCCONKEY, D. J. et S. Orrenius. 1996. "Signal transduction pathways in apoptosis". Stem Cells, vol. 14, p. 619-31.

- MCCONKEY, D. J., B. Zhivotovsky et S. Orrenius. 1996. "Apoptosis--molecular mechanisms and biomedical implications". Molecular Aspects of Medicine, vol. 17, p. 1-110.
- MCDONALD, P. P., A. Bald et M. A. Cassatella. 1997. "Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils". Blood, vol. 89, p. 3421-33.
- MCDONALD, P. P., M. P. Russo, S. Ferrini et M. A. Cassatella. 1998. "Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils". Blood, vol. 92, p. 4828-35.
- MEAGHER, L. C., J. M. Cousin, J. R. Seckl et C. Haslett. 1996. "Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes". Journal of Immunology, vol. 156, p. 4422-8.
- MEIER, P., A. Finch et G. Evan. 2000. "Apoptosis in development". Nature, vol. 407, p. 796-801.
- MINCHEFF, M., D. Loukinov, S. Zoubak, M. Hammett et H. Meryman. 1998. "Fas and Fas ligand expression on human peripheral blood leukocytes". Vox Sanguinis, vol. 74, p. 113-21.
- 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.
- MOULDING, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart et S. W. Edwards. 1998. "Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival". Blood, vol. 92, p. 2495-502.
- MURRAY, J., J. A. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. Van Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett et E. R. Chilvers. 1997. "Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro". Blood, vol. 90, p. 2772-83.
- NAGATA, S. 1997. "Apoptosis by death factor". Cell, vol. 88, p. 355-65.
- NAGATA, S. et P. Golstein. 1995. "The Fas death factor". Science, vol. 267, p. 1449-56.
- NAHAS, N., T. F. Molski, G. A. Fernandez et R. I. Sha'afi. 1996. "Tyrosine phosphorylation and activation of a new mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascade in human neutrophils stimulated with various agonists". Biochemical Journal, vol. 318 (Pt 1), p. 247-53.
- OBEL, N., B. Hansen, M. M. Christensen, S. L. Nielsen et J. Rungby. 1993. "Methyl mercury, mercuric chloride, and silver lactate decrease superoxide anion formation and chemotaxis in human polymorphonuclear leucocytes". Human and Experimental Toxicology, vol. 12, p. 361-4.

OHTA, H., Y. Yatomi, E. A. Sweeney, S. Hakomori et Y. Igarashi. 1994. "A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils". FEBS Letters, vol. 355, p. 267-70.

OTTONELLO, L., G. Tortolina, M. Amelotti et F. Dallegri. 1999. "Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes". Journal of Immunology, vol. 162, p. 3601-6.

PELLETIER, L., J. Rossert, R. Pasquier, M. C. Vial et P. Druet. 1990. "Role of CD8+ T cells in mercury-induced autoimmunity or immunosuppression in the rat". Scandinavian Journal of Immunology, vol. 31, p. 65-74.

PERICLE, F., J. H. Liu, J. I. Diaz, D. K. Blanchard, S. Wei, G. Forni et J. Y. Djeu. 1994. "Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils". European Journal of Immunology, vol. 24, p. 440-4.

PERLINGEIRO, R. C. et M. L. Queiroz. 1995. "Measurement of the respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from mercury-exposed workers". Human and Experimental Toxicology, vol. 14, p. 281-6.

PERLINGEIRO, R. C. et M. L. Queiroz. 1994. "Polymorphonuclear phagocytosis and killing in workers exposed to inorganic mercury". International Journal of Immunopharmacology, vol. 16, p. 1011-7.

PRYDE, J. G., A. Walker, A. G. Rossi, S. Hannah et C. Haslett. 2000. "Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 33574-84.

RAFFRAY, M. et G. M. Cohen. 1997. "Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death?". Pharmacology and Therapeutics, vol. 75, p. 153-77.

RENSHAW, S. A., S. J. Timmons, V. Eaton, L. R. Usher, M. Akil, C. D. Bingle et M. K. Whyte. 2000. "Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor". Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 662-8.

RISCHER, J. et R. DeWoskin. 1999. Toxicological profile for mercury. U.S. Department of health and human services. Public Health service and Agency for toxic substances and disease registry. Atlanta., 617 p.

ROLLET-LABELLE, E., M. J. Grange, C. Elbim, C. Marquetty, M. A. Gougerot-Pocidallo et C. Pasquier. 1998. "Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis". Free Radical Biology and Medicine, vol. 24, p. 563-72.

- SALAMONE, G., M. Giordano, A. S. Trevani, R. Gamberale, M. Vermeulen, J. Schettinni et J. R. Geffner. 2001. "Promotion of neutrophil apoptosis by TNF-alpha". Journal of Immunology, vol. 166, p. 3476-83.
- SANGHAVI, D. M., M. Thelen, N. A. Thornberry, L. Casciola-Rosen et A. Rosen. 1998. "Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils". FEBS Letters, vol. 422, p. 179-84.
- SANTOS-BENEIT, A. M. et F. Mollinedo. 2000. "Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells". Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 712-24.
- SATOH, H. 2000. "Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds". Industrial Health, vol. 38, p. 153-64.
- SAVILL, J. et V. Fadok. 2000. "Corpse clearance defines the meaning of cell death". Nature, vol. 407, p. 784-8.
- SAVILL, J. et C. Haslett. 1995. "Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation". Seminars in Cell Biology, vol. 6, p. 385-93.
- SAVILL, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson et C. Haslett. 1989. "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages". Journal of Clinical Investigation, vol. 83, p. 865-75.
- SAVOIE, A., V. Lavastre, M. Pelletier, T. Hajto, K. Hostanska et D. Girard. 2000. "Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 845-53.
- SCOTT, R. B., J. M. Collins, S. Matin, F. White et P. S. Swerdlow. 1990. "Simultaneous measurement of neutrophil, lymphocyte, and monocyte glutathione by flow cytometry". Journal of Clinical Laboratory Analysis, vol. 4, p. 324-7.
- SENDO, F., T. Kato et H. Yazawa. 1997. "Modulation of neutrophil apoptosis by psychological stress and glucocorticoid". International Journal of Immunopharmacology, vol. 19, p. 511-6.
- SERHAN, C. N. et P. A. Ward. 1999. Molecular and Cellular Basis of Inflammation. New-Jersey : Humana Press, 338 p.
- SHENKER, B. J., P. Berthold, S. Decker, J. Mayro, C. Rooney, L. Vitale et I. M. Shapiro. 1992b. "Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 14, p. 555-77.

- SHENKER, B. J., P. Berthold, C. Rooney, L. Vitale, K. DeBolt et I. M. Shapiro. 1993a. "Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 15, p. 87-112.
- SHENKER, B. J., S. Datar, K. Mansfield et I. M. Shapiro. 1997. "Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 143, p. 397-406.
- SHENKER, B. J., T. L. Guo, I. O et I. M. Shapiro. 1999. "Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 157, p. 23-35.
- SHENKER, B. J., T. L. Guo et I. M. Shapiro. 1998. "Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction". Environmental Research, vol. 77, p. 149-59.
- SHENKER, B. J., J. S. Mayro, C. Rooney, L. Vitale et I. M. Shapiro. 1993b. "Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. IV. Alterations in cellular glutathione content". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 15, p. 273-90.
- SHENKER, B. J., C. Rooney, L. Vitale et I. M. Shapiro. 1992a. "Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 14, p. 539-53.
- SINGHAL, P. C., P. Patel, N. Nahar, N. Franki, A. Kapasi, K. Reddy, N. Shah, I. E. Nwakoby et B. Mehrotra. 1999. "Ethanol-induced neutrophil apoptosis is mediated through nitric oxide". Journal of Leukocyte Biology, vol. 66, p. 930-6.
- SMITH, C. W. 2000. "Possible steps involved in the transition to stationary adhesion of rolling neutrophils: a brief review". Microcirculation, vol. 7, p. 385-94.
- SUDA, I., S. Totoki, T. Uchida et H. Takahashi. 1992. "Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by various phagocytic cells". Archives of Toxicology, vol. 66, p. 40-4.
- SUZUKI, K., M. Hino, F. Hato, N. Tatsumi et S. Kitagawa. 1999. "Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha". Blood, vol. 93, p. 341-9.
- SWEENEY, J. F., P. K. Nguyen, G. M. Omann et D. B. Hinshaw. 1998. "Lipopolysaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways". Journal of Surgical Research, vol. 74, p. 64-70.

- SWEENEY, J. F., P. K. Nguyen, G. M. Omann et D. B. Hinshaw. 1997. "Ultraviolet irradiation accelerates apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes: protection by LPS and GM-CSF". Journal of Leukocyte Biology, vol. 62, p. 517-23.
- THOMPSON, S. A., K. L. Roellich, A. Grossmann, S. G. Gilbert et T. J. Kavanagh. 1998. "Alterations in immune parameters associated with low level methylmercury exposure in mice". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 20, p. 299-314.
- THORNBERRY, N. A. et Y. Lazebnik. 1998. "Caspases: enemies within". Science, vol. 281, p. 1312-6.
- TREVANI, A. S., G. Andonegui, M. Giordano, D. H. Lopez, R. Gamberale, F. Minucci et J. R. Geffner. 1999. "Extracellular acidification induces human neutrophil activation". Journal of Immunology, vol. 162, p. 4849-57.
- TROWBRIDGE, H. O. et R. C. Emling. 1997. Inflammation : A Review of the Process. Illinois : Quintessence Publishing Co Inc., 236 p.
- TRUMP, B. F. et I. K. Berezsky. 1995. "Calcium-mediated cell injury and cell death". FASEB Journal, vol. 9, p. 219-28.
- VAN DEN BERG, J. M., S. Weyer, J. J. Weening, D. Roos et T. W. Kuijpers. 2001. "Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 69, p. 467-73.
- VAN DER VLIET, H. J., P. C. Wever, F. N. Van Diepen, S. L. Yong et I. J. Ten Berge. 1997. "Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes and their relation to susceptibility to anti- Fas (anti-CD95)-induced apoptosis". Clinical and Experimental Immunology, vol. 110, p. 324-8.
- VAN ENGELAND, M., H. J. Kuijpers, F. C. Ramaekers, C. P. Reutelingsperger et B. Schutte. 1997. "Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis". Experimental Cell Research, vol. 235, p. 421-30.
- VILLUNGER, A., L. A. O'Reilly, N. Holler, J. Adams et A. Strasser. 2000. "Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes". Journal of Experimental Medicine, vol. 192, p. 647-58.
- VIMERCATI, L., L. Santarelli, G. Pesola, I. Drago, G. Lasorsa, M. Valentino, A. Vacca et L. Soleo. 2001. "Monocyte-macrophage system and polymorphonuclear leukocytes in workers exposed to low levels of metallic mercury". Science of the Total Environment, vol. 270, p. 157-63.
- WAGNER, J. G. et R. A. Roth. 2000. "Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature". Pharmacological Reviews, vol. 52, p. 349-74.

- WALLACH, D., E. E. Varfolomeev, N. L. Malinin, Y. V. Goltsev, A. V. Kovalenko et M. P. Boldin. 1999. "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms". Annual Review of Immunology, vol. 17, p. 331-67.
- WARD, I., I. Dransfield, E. R. Chilvers, I. Haslett et A. G. Rossi. 1999. "Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 20, p. 503-9.
- WATSON, R. W., H. P. Redmond, J. H. Wang et D. Bouchier-Hayes. 1996a. "Bacterial ingestion, tumor necrosis factor-alpha, and heat induce programmed cell death in activated neutrophils". Shock, vol. 5, p. 47-51.
- WATSON, R. W., H. P. Redmond, J. H. Wang et D. Bouchier-Hayes. 1996b. "Mechanisms involved in sodium arsenite-induced apoptosis of human neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 60, p. 625-32.
- WATSON, R. W., O. D. Rotstein, A. B. Nathens, A. P. Dackiw et J. C. Marshall. 1996c. "Thiol-mediated redox regulation of neutrophil apoptosis". Surgery, vol. 120, p. 150-7; discussion 157-8.
- WEI, S., J. H. Liu, P. K. Epling-Burnette, A. M. Gamero, D. Ussery, E. W. Pearson, M. E. Elkabani, J. I. Diaz et J. Y. Djeu. 1996. "Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Journal of Immunology, vol. 157, p. 5155-62.
- WEINMANN, P., P. Gaetgens et B. Walzog. 1999. "Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3". Blood, vol. 93, p. 3106-15.
- WHITE, E. 1993. "Death-defying acts: a meeting review on apoptosis". Genes and Development, vol. 7, p. 2277-84.
- WHITEKUS, M. J., R. P. Santini, A. J. Rosenspire et M. J. McCabe Jr. 1999. "Protection against CD95-mediated apoptosis by inorganic mercury in Jurkat T cells". Journal of Immunology, vol. 162, p. 7162-70.
- WHYTE, M., S. Renshaw, R. Lawson et C. Bingle. 1999. "Apoptosis and the regulation of neutrophil lifespan". Biochemical Society Transactions, vol. 27, p. 802-7.
- WHYTE, M. K., S. J. Hardwick, L. C. Meagher, J. S. Savill et C. Haslett. 1993. "Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro". Journal of Clinical Investigation, vol. 92, p. 446-55.
- WILLIAMS, D. P., M. Pirmohamed, D. J. Naisbitt, J. P. Uetrecht et B. K. Park. 2000. "Induction of metabolism-dependent and -independent neutrophil apoptosis by clozapine". Molecular Pharmacology, vol. 58, p. 207-16.

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

WONG, K., X. B. Li et N. Hunchuk. 1995. "N-acetylsphingosine (C2-ceramide) inhibited neutrophil superoxide formation and calcium influx". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 3056-62.

WORTH, R. G., R. M. Esper, N. S. Warra, A. L. Kindzelskii, A. L. Rosenspire, R. F. Todd 3rd et H. R. Petty. 2001. "Mercury inhibition of neutrophil activity: evidence of aberrant cellular signalling and incoherent cellular metabolism". Scandinavian Journal of Immunology, vol. 53, p. 49-55.

ZALUPS, R. K. 1998. "Basolateral uptake of inorganic mercury in the kidney". Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 151, p. 192-9.

ZALUPS, R. K. 2000. "Molecular interactions with mercury in the kidney". Pharmacological Reviews, vol. 52, p. 113-43.

ZAMZAMI, N., S. A. Susin, P. Marchetti, T. Hirsch, I. Gomez-Monterrey, M. Castedo et G. Kroemer. 1996. "Mitochondrial control of nuclear apoptosis". Journal of Experimental Medicine, vol. 183, p. 1533-44.