Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

# EFFETS PRO-INFLAMMATOIRES DE L'INTERLEUKINE-4 SUR LES NEUTROPHILES HUMAINS ET DANS UN MODÈLE D'INFLAMMATION *IN VIVO*

Par
Claude Ratthé

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

## JURY D'ÉVALUATION

| | |
|---|---|
| Président du jury<br>et examinateur interne | M. Jacques Bernier, PhD<br>INRS-Institut Armand-Frappier |
| Examinateur externe | M. Martin Olivier, PhD<br>Université McGill |
| Examinateur externe | M. Marc Pouliot<br>Université Laval |
| Directeur de recherche | M. Denis Girard, PhD<br>INRS-Institut Armand-Frappier |

© Droits réservés de Claude Ratthé, 2008

## Avant-Propos et remerciements

Les résultats de recherche présentés dans ce document sont le fruit de quatre années d'expérimentation et de nombreuses heures de travail passées au laboratoire. Ils marquent aussi la fin de mon aventure universitaire. Je ne peux passer sous silence la précieuse collaboration et le soutien de plusieurs personnes dont j'ai pu bénéficier tout au long de mes études. Je tiens à souligner l'importance de leur contribution dans l'aboutissement de ce projet et je tiens à les remercier sincèrement.

Tout d'abord, je désire remercier le Dr. Denis Girard, mon directeur de recherche, qui depuis le début de ma maîtrise a su m'épauler, me guider, me conseiller et parfois remettre mon projet sur les rails, afin que ces nombreuses années d'études se terminent par le succès. Ensuite, viennent mes collègues de laboratoire actuels ou passés, Valérie, Éliane, François, Sonia, Hélène, Martin et Amélie, avec qui j'ai pu développer de réelles amitiés. Ils m'ont grandement aidée à résoudre plusieurs problèmes, à assimiler différentes techniques de laboratoire et à pratiquer mes présentations. Merci pour votre belle complicité. Je tiens aussi à remercier les membres du personnel de l'INRS, Josée, Francine, Jocelyne, Louis, Daniel et Jacques, qui par leur travail quotidien nous facilitent souvent grandement la tâche et qui ont toujours été disponibles pour m'aider. Merci aussi aux membres des autres laboratoires, qui sont toujours prêts à donner leurs conseils ou à partager leurs équipements et leur savoir. Ils ont répondu à plusieurs de mes questions, solutionné certains de mes problèmes et créé une ambiance agréable au sein de l'institut.

Finalement, je remercie ma famille, mes parents et beaux-parents, mon frère, ma soeur et mes amis qui m'ont toujours encouragée à atteindre mes rêves, à continuer mes efforts et à qui je dois la ténacité qui m'a menée où je suis. Un merci inestimable aussi à mon conjoint Bruce, il n'y a pas de mots pour décrire à quel point ton support me permet de m'accomplir, tu es exceptionnel. Je me dirige maintenant vers de nouveaux défis, au plaisir de les partager avec vous!

## Table des matières

**Avant-Propos et remerciements** ..... iii

**Liste des abréviations** ..... vii

**Liste des figures et tableaux** ..... xi

**Sommaire** ..... xiii

**Introduction** ..... xv

SECTION I : SYNTHÈSE ..... 1

Chapitre 1: L'interleukine-4 ..... 3
1.1. Les cytokines et leurs récepteurs ..... 3
1.1.1. Les familles de cytokines ..... 3
1.1.2. Les récepteurs de cytokines ..... 4
1.2. L'IL-4 et ses récepteurs ..... 5
1.2.1. Les sources d'IL-4 ..... 6
1.2.2. Les récepteurs de l'IL-4 ..... 6
1.3. Les effets de l'IL-4 ..... 7
1.3.1. Effets anti-inflammatoires ..... 8
1.3.2. Effets pro-inflammatoires ..... 8
1.3.3. Similitudes et différences entre les fonctions de l'IL-4 et de l'IL-13 ..... 9
1.4. La signalisation intracellulaire de l'IL-4 ..... 10
1.4.1. Cascades activatrices ..... 10
1.4.2. Cascades inhibitrices ..... 13

Chapitre 2: Les neutrophiles ..... 18
2.1. Fonctions des neutrophiles ..... 18
2.1.1. Physiologie du neutrophile ..... 18
2.1.2. Activation et recrutement des neutrophiles au site inflammatoire ..... 20
2.1.3. Fonctions des neutrophiles ..... 22
2.2. Effet de l'IL-4 sur les fonctions des neutrophiles ..... 24
2.2.1. Effets anti-inflammatoires ..... 26
2.2.2. Effets pro-inflammatoires ..... 26
2.3. Cascades de signalisation chez les neutrophiles ..... 27
2.3.1. Cascades induites par l'IL-4 chez les neutrophiles ..... 30

Chapitre 3: L'inflammation ..... 31
3.1. Mécanismes d'inflammation ..... 31
3.1.1. Développement de la réponse inflammatoire et immunité ..... 31
3.1.2. Résolution de l'inflammation ..... 33

3.2. Participation potentielle de l'IL-4 et des neutrophiles dans certaines maladies inflammatoires ..... 36
3.2.1. L'asthme ..... 37
3.2.2. La colite ulcéreuse et la maladie de Crohn ..... 38
3.2.3. Le lupus ..... 39
3.2.4. La maladie de Behcet et la granulomatose de Wegener ..... 40
3.2.5. L'arthrite ..... 41
3.2.6. La fibrose kystique ..... 42

SECTION 2 : RÉSULTATS ..... 43

**Objectifs du projet de recherche** ..... 45

Article 1 ..... 47
1.1 Résumé en français de l'article 1 ..... 49
1.2 Article 1, tel que publié ..... 51

Article 2 ..... 61
2.1 Résumé en français de l'article 2 ..... 63
2.2 Article 2, tel que publié ..... 65

Article 3 ..... 77
3.1 Résumé en français de l'article 3 ..... 79
3.2 Texte original de l'article 3 ..... 81

**Conclusion** ..... 114

**Appendice A** ..... 127

**Références** ..... 131

## Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| ADCC | cytotoxycité cellulaire dépendante des anticorps ou « antibody-dependent cellular toxicity » |
| ANCA | autoanticorps dirigés contre des éléments cytoplasmiques des neutrophiles ou « antineutrophil cytoplasmic autoantibodies » |
| ARN | acide ribonucléique |
| cAMP | adénosine monophosphate cyclique |
| CD(…) | amas de différenciation ou « cluster of differentiation » |
| CD(…)L | ligand du CD(…) |
| Cellule B | lymphocyte dérivé de la moelle osseuse ou « bone-marrow-derived lymphocyte » |
| Cellule T | lymphocyte dérivé du thymus ou « thymus-derived lymphocyte » |
| CIS | protéine contenant un domaine SH2 inductible par les cytokines ou « cytokine-inducible SH2 containing protein » |
| CMH | complexe majeur d'histocompatibilité |
| CNTF | facteur neurotrophique ciliaire ou « ciliary neurotrophic factor » |
| DMSO | diméthylsulfoxide |
| EGF | facteur de croissance des cellules épithéliales ou « epithelial growth factor » |
| ENA-78 | protéine épithéliale-78 activatrice des neutrophiles ou « epithelial-neutrophil activating protein-78 » |
| Erk | kinase régulée extracellulairement par un signal ou « extracellular signal-regulated kinase » |
| FasL | ligand de Fas |
| Fc | fragment cristallisable |
| Fc(…)R | récepteur reconnaissant le Fc(…) |
| FGF | facteur de croissance des fibroblastes ou « fibroblast growth factor » |
| fMLP | peptide formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine |

| | |
|---|---|
| G-CSF | facteur stimulant des colonies de granulocytes ou « granulocyte colony-stimulating factor » |
| GM-CSF | facteur stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages ou « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » |
| Gp130 | glycoprotéine 130 |
| GRO(…) | oncogène régulé par la croissance (…) ou « growth regulated oncogene » |
| Hck | kinase des cellules hématopoïétique ou « hematopoietic cell kinase » |
| ICAM-1 | molécule d'adhésion intercellulaire-1 ou « intercellular adhesion molecule-1 » |
| IFN(…) | interféron(…) |
| Ig | immunoglobuline |
| IGF | facteur de croissance semblable à l'insuline ou « insulin-like growth factor » |
| IL-(…) | interleukine-(…) |
| IL-(…)R | récepteur de l'interleukine-(…) |
| IL-1Ra | antagoniste du récepteur de l'IL-1 |
| INRS | Institut National de la Recherche Scientifique |
| IP-10 | protéine-10 induite par l'interféron ou « interferon-inducible protein-10 » |
| IRS(…) | récepteur du substrat des insulines (…) ou « insulin receptor substrate (…) » |
| ITIM | motif d'inhibition de l'immunorécepteur dépendant de la tyrosine ou «immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif » |
| Jak | janus kinase |
| JNK | kinases de type c-jun se terminant par un domaine $NH_2$ ou « c-jun $NH_2$-terminal kinases » |
| KDa | kilodalton |
| LES | lupus érythémateux systémique |
| LIX/CXCL5 | CXC chimiokine induite par le LPS ou « LPS induced CXC chemokine » |
| LPS | lipopolysaccharide |
| $LTB_4$ | leucotriène $B_4$ |
| MAP | protéine activée mitogénique ou « mitogen-activated protein » |

| | |
|---|---|
| MCP-1 | protéine chimioattractante des monocytes-1 ou « monocyte chemotactic protein-1 » |
| M-CSF | facteur stimulant des colonies de macrophages ou « macrophage colony-stimulating factor » |
| MEK | kinase des MAP ou des ERK ou « mitogen-activated/extracellular signal regulated kinase » |
| MIP | protéine inflammatoire des macrophages ou « macrophage inflammatory protein » |
| NADPH | forme réduite du nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| NAP-2 | protéine antiproliférative neurale-2 ou « neural antiproliferative protein-2 » |
| NGF | facteur de croissance des nerfs ou « nerve growth factor » |
| NK | cellule « natural killer » |
| PDGF | facteur de croissance derivé des plaquettes ou « platelet-derived growth factor » |
| PI3 kinase | kinase phosphatidylinositol-3 ou « phosphatidylinositol 3-kinase » |
| PIAS | Protéine inhibant les STAT ou « protein inhibitors of signal transducer and activator of transcription (STAT) » |
| PIBF | facteur bloquant induit par la progesterone ou « progesterone-induced blocking factor » |
| PKC | protéine kinase C |
| PMA | phorbol 12-myristate 13-acetate |
| RANTES | « regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted » |
| SDF | facteur derivé des cellules stromales ou « stromal cell-derived factor» |
| SH2 | domaine d'homologie à la famille Src 2 ou « Src-homology domain 2 » |
| SHP-1 | tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2-1 ou « SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase-1 » |
| SOCS | suppresseur de la signalisation des cytokines ou « suppressor of cytokine signalling » |
| STAT | transducteur de signal et activateur de la transcription ou « signal transducer and activator of transcription » |

| | |
|---|---|
| Syk | tyrosine kinase de la rate ou « spleen tyrosine kinase » |
| TGF-(…) | facteur de croissance induisant la transformation ou « transforming growth factor-(…) » |
| Th1 | lymphocyte T « helper » de type 1 |
| Th2 | lymphocyte T « helper » de type 2 |
| TNF | facteur nécrosant des tumeurs ou « tumor necrosis factor » |
| TRAIL | ligand induisant l'apoptose relié au TNF ou « TNF-related apoptosis inducing ligand » |
| TWEAK | faible inducteur d'apoptose ressemblant au TNF ou « TNF-like weak inducer of apoptosis » |
| TYK | tyrosine kinase |
| VCAM-1 | molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 ou « vascular cellular adhesion molecule-1 » |

## Liste des figures et tableaux

### Figures

Figure 1: Cascades de signalisation des récepteurs de l'IL-4 ..... 11

Figure 2: L'IL-4Rα lie SHP-1 ..... 15

Figure 3: Production et mécanisme d'action des SOCS ..... 16

Figure 4: Cellules immunitaires ..... 19

Figure 5: Recrutement des neutrophiles au site inflammatoire et fonctions des neutrophiles ..... 21

Figure 6: Résolution de l'inflammation ..... 35

### Tableaux

Tableau 1: Les familles de cytokines ..... 4

Tableau 2: Principales cytokines sécrétées par les neutrophiles activés ayant des effets sur d'autres cellules immunitaires ..... 25

Tableau 3: Éléments des cascades de signalisation associés à l'activation ou aux fonctions des neutrophiles ..... 28

## Sommaire

L'interleukine-4 est un membre de la famille des cytokines utilisant la chaîne de récepteur CD132, qui comprend les interleukines -2, -4, -7, -9, -15 et -21. L'IL-4 possède des propriétés anti-inflammatoires, ainsi que pro-inflammatoires. Cette dualité amène parfois une certaine confusion quant au potentiel bénéfique ou néfaste de cette cytokine dans diverses situations ou maladies inflammatoires. Les neutrophiles expriment le récepteur de type I de l'IL-4 composé de la chaîne IL-4Rα et de la chaîne γc. Chez ces cellules, l'IL-4 possède aussi une dualité anti- et pro-inflammatoires et si certains effets d'IL-4 sur les neutrophiles ont fait l'objet d'études antérieures, les cascades de signalisations qui sont induites par cette cytokine, chez les neutrophiles, sont encore peu connues. De plus, aucune étude n'a vérifié le potentiel chimioattractant de l'IL-4 sur les neutrophiles que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Les travaux présentés dans ce document démontrent tout d'abord que l'IL-4 induit l'activation des cascades de signalisations Jak/STAT, des MAP Kinases et la phosphorylation de Syk chez les neutrophiles humains. L'IL-4 induit aussi l'augmentation de l'expression ainsi que l'ubiquitinylation de SOCS3, ce qui constituerait une voie de régulation négative activée par cette cytokine. Ensuite, des expériences effectuées à l'aide de cellules promyélocytes PLB-985 différenciées en cellules semblables aux neutrophiles, à l'aide de DMSO, nous ont permis d'observer que la présence IL-4Rα était, à elle seule, suffisante pour induire la plupart des cascades de signalisation observées et que l'augmentation de la protéine SOCS3 serait dépendante de la présence de l'enzyme NADPH oxydase. La troisième partie de nos expériences nous a permis de démontrer que l'IL-4 induit la chimioattraction et la chimiokinèse des neutrophiles *in vitro* et qu'elle augmente leur adhésion sur les cellules épithéliales A549. Finalement, l'IL-4 pourrait aussi permettre l'attraction des neutrophiles in vivo, puisque des études utilisant le modèle inflammatoire de la poche d'air murine nous ont permis de voir un recrutement de neutrophiles et de monocytes/macrophages au site d'inflammation après 9h de traitement avec l'IL-4. Nous avons détecté la présence de plusieurs analytes

inflammatoires dans les fluides récoltés des poches des souris dont des chimioattractants connus des neutrophiles comme LIX (CXCL5) ou des monocytes/macrophages comme MCP-1. L'augmentation de l'expression des médiateurs inflammatoires précédait l'arrivée des leucocytes, laissant croire une implication d'autres types cellulaires. Nous avons démontré que les cellules tapissant la poche d'air exprimaient la chaîne de récepteur IL-4Rα et qu'elles seraient probablement responsables de l'augmentation d'expression de LIX et de MCP-1, puisqu'on pouvait observer une augmentation de leur ARN messager, dans ces cellules, lors du traitement à l'IL-4. L'IL-4 induirait donc le recrutement de neutrophiles et de monocytes/macrophages dans le modèle de la poche d'air murine de façon indirecte, probablement par le biais des cellules tapissant la poche.

Étudiante

Directeur de recherche

# Introduction

Les cytokines sont impliquées dans le développement et l'orientation de la réponse inflammatoire dû à leurs effets sur les cellules du système immunitaire. Elles peuvent généralement être classées comme pro- ou d'anti-inflammatoire selon les effets qu'elles exercent sur les cellules avec lesquelles elles sont en contact. L'interleukine-4 (IL-4) est une cytokine qui est traditionnellement classée comme anti-inflammatoire dû à ses effets anti-inflammatoires sur les monocytes et les macrophages ainsi qu'à son induction de la polarisation des cellules T vers le sous-type Th2 , qui oriente la réponse immunitaire vers la voie humorale. Toutefois, certains effets de l'IL-4 sont aussi considérés comme pro-inflammatoires. En effet, la production de cellules Th2 induite par l'IL-4 est aussi associée à certaines maladies inflammatoires et l'IL-4 a des effets pro-iflammatoires chez les cellules B, les éosinophiles et les cellules endothéliales. Plusieurs travaux ont été effectués afin d'étudier le rôle de l'IL-4 dans différentes maladies inflammatoires dans lesquelles une polarisation Th1 ou Th2 est observée. Ces études ont permis de démontrer que l'IL-4 a un rôle à jouer dans l'asthme, dans les maladies inflammatoires de l'intestin, dans le lupus ainsi que dans les cas de vasculite.

L'IL-4 possède deux types de récepteurs différents, soit celui de type I et celui de type II comprenant une chaîne de récepteur qu'elle partage avec l'IL-13, soit l'IL-13Rα1. Sa signalisation intracellulaire est reconnue pour comprendre les membres de la famille Jak/STAT, de la famille des IRS, des MAP kinases ainsi que les régulateurs négatifs SHP-1 et de la famille des SOCS. Les neutrophiles possèdent le récepteur de type I de l'IL-4 et répondent donc à cette cytokine. Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées au site d'inflammation. Elles ont un rôle primordial à jouer dans le développement de la réponse inflammatoire et leur élimination efficace, impliquant leur apoptose et la phagocytose par les macrophages, est une étape importante de la résolution de l'inflammation. Leurs fonctions comprennent la phagocytose, la dégranulation ainsi que la flambée oxydative, qui sont des mécanismes d'élimination de microorganismes appartenant plutôt à l'immunité innée non-spécifique de l'organisme.

L'IL-4 produit différents effets tant pro- qu'anti-inflammatoires chez les neutrophiles. En effet, certaines équipes ont rapporté que l'IL-4 diminuait la production de cytokines pro-inflammatoires des neutrophiles et qu'elle augmentait leur production de la cytokine anti-inflammatoire IL-1Ra. Toutefois, l'IL-4 activerait aussi les neutrophiles, puisqu'elle augmente leur activité de phagocytose, leur synthèse d'ARN et de protéines, leur production d'IL-8 et qu'elle retarde leur apoptose spontanée. Si plusieurs effets de l'IL-4 sur les neutrophiles sont connus, les cascades de signalisation activées par l'IL-4 chez les neutrophiles sont encore peu connues. Les neutrophiles sont impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires comme l'asthme, les maladies inflammatoires de l'intestin, l'arthrite, le lupus, les cas de vasculite et la fibrose kystique. Certaines de ces maladies sont aussi associées à la présence et aux effets de l'IL-4, qui pourrait entre autres induire la production d'autoanticorps. Jusqu'à maintenant, peu d'études ont été effectuées concernant les interactions entre l'IL-4 et les neutrophiles dans les maladies inflammatoires ou dans des modèles d'inflammation *in vivo*. De plus, aucune étude jusqu'à maintenant n'a vérifié le potentiel chimioattractant de l'IL-4 chez les neutrophiles.

Le but de la présente étude était donc de caractériser plus précisément les effets de l'IL-4 sur les neutrophiles humains. Tout d'abord, des expériences ont été effectuées afin de déterminer quelles sont les cascades de signalisation impliquées dans la l'action de l'IL-4 sur les neutrophiles, par le biais de neutrophiles isolés de donneurs sains, mais aussi à l'aide d'un modèle de lignée cellulaire pouvant être différencié en cellules semblables aux neutrophiles. Ces cellules promyélocytiques appelées PLB-985, nous permettent entre autres de vérifier si les cascades de signalisation de l'IL-4 sont perturbées, comme c'est parfois le cas pour la signalisation intracellulaire associée à différentes cytokines dans certains types de cancer. Ensuite, le potentiel chimioattractant de cette cytokine sur les neutrophiles et sa capacité à augmenter leur adhésion cellulaire ont été étudiés *in vitro*. Finalement, l'importance du rôle pro-inflammatoire de l'IL-4 a été vérifiée à l'aide du modèle inflammatoire de la poche d'air murine.

Ce document présente tout d'abord une revue de littérature détaillée comprenant trois chapitres, qui concernent respectivement l'interleukine-4, les neutrophiles et l'inflammation. Ensuite, les résultats des expériences effectuées sont présentés dans trois articles scientifiques publiés ou acceptés pour publication. La dernière section contient les conclusions globales du projet de recherche ainsi que les perspectives futures.

# SECTION I : SYNTHÈSE

# Chapitre 1: L'interleukine-4

## 1.1. Les cytokines et leurs récepteurs

Les cytokines permettent la communication entre les cellules. Ce sont de petites molécules (généralement < 15kDa), qui ont une action spécifique sur les cellules possédant les récepteurs appropriés à leur surface. Les cytokines sont produites pratiquement par toutes les cellules de l'organisme, mais chaque cellule, selon ses fonctions, produit un certain éventail de cytokines en quantité variable. C'est la combinaison des actions des cytokines qui détermine l'effet qui sera obtenu sur la ou les cellule(s) cible(s) et une même cytokine peut avoir des effets différents chez des types cellulaires distincts. (Janeway et al., 1999)

### 1.1.1. Les familles de cytokines

Les cytokines sont classifiées selon différentes familles dont les principales sont la famille des interleukines, celle des interférons et des « tumor necrosis factor » (TNF), celle des chimiokines et celle des facteurs de croissance (Tableau 1). Les interleukines sont responsables de la communication entre les leucocytes. Cette famille comprend plus d'une trentaine de membres (IL-1 à IL-35) et tend à s'agrandir, puisque le nombre d'interleukines répertoriées augmente d'année en année (Janeway et al., 1999 ; Collison et al., 2007). Les interférons et les TNF sont impliquées dans la défense de l'hôte et ont des actions proliférative, de type anti-virales et d'induction de l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Janeway et al., 1999; Goetz et al., 2004; Borden et al., 2007; Samuel, 2007). Les chimiokines permettent l'attraction, principalement de leucocytes, aux sites d'inflammation. Cette famille est subdivisée en quatre sous-groupes (CXC, CC, C et $CX_3C$) selon le nombre de cystéines (C) présentes dans leur séquence d'acides aminés, séparés ou non par d'autres acides aminés (X). Chaque chimiokine attire spécifiquement

différents types de cellules, ce qui permet à l'organisme d'avoir un certain contrôle sur le recrutement cellulaire. De façon générale, les chimiokines de la famille des CC attirent les cellules de type monocyte et macrophage alors que les chimiokines de la famille des CXC, sont celles qui attirent plus spécifiquement les neutrophiles (Janeway et al., 1999; Rossi et Zlotnik, 2000; Coelholo et al., 2005). Finalement, les facteurs de croissance favorisent la multiplication et la maturation des cellules et ils peuvent agir sur différentes cellules de l'organisme (Nemunaitis, 1997; Trneny et Klener, 1992; Vose et Armitage, 1995). Il existe plusieurs autres classifications possibles des cytokines, dont il ne sera pas discuté, selon leurs caractéristiques ou encore selon leurs fonctions.

| Familles | | Membres |
|---|---|---|
| Interleukines | | IL-1α, IL-1β, IL-1RA, IL-2 à IL-35 |
| Interférons et TNF | Interférons | IFN-α, IFN-β, IFN-γ |
| | Famille TNF | TNFα, TNFβ, LT-β, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, TRAIL, TWEAK |
| Chimiokines | C | ATAC, Lymphotactine |
| | CC | MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, Éotaxine, RANTES |
| | CXC | IL-8, IP-10, SDF-1, NAP-2, GROα, GROβ, GROγ |
| | $CX_3C$ | Neurotactine, Fractalkine |
| Facteurs de croissance | | EGF, PDGF, TGF-α, TGF-β, FGF, NGF, Érythropoïétine, IGF-1, IGF-2, G-CSF, GM-CSF, M-CSF |

**Tableau 1: <u>Les familles de cytokines</u> (selon Janeway et al, 1999 et l'encyclopédie en ligne COPE de Horst Ibelgaufts', avril 2007).**

### 1.1.2. <u>Les récepteurs de cytokines</u>

Chaque cytokine possède un récepteur qui lui est spécifique auquel elle se lie afin d'exercer ses effets sur une cellule donnée. Les récepteurs de cytokines sont composés d'une ou de plusieurs chaînes protéiques, qui peuvent avoir un ou plusieurs passages

transmembranaires et qui sont généralement exprimées à la surface des cellules. Les récepteurs des cytokines, s'ils comportent plusieurs chaînes de récepteur, peuvent constituer des homodimères ou des hétérodimères (Janeway et al., 1999). Certains récepteurs peuvent comporter plus de deux chaînes tel le récepteur de l'IL-15, qui est composé de trois chaînes (Cosman et al., 1995; Giri et al., 1994; Giri et al., 1995). Plusieurs types de classifications existent pour les récepteurs de cytokines. Une généralement acceptée divise les récepteurs de cytokines en deux grandes familles, soit la famille des récepteurs de cytokines de type I, comprenant entre autres les récepteurs des IL-2 (sous-unité beta), 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, de l'érythropoïétine, du GM-CSF, du G-CSF, de la lymphotactine, etc., et la famille des récepteurs de cytokines de type II, comprenant entre autres les récepteurs de l'IFN-α, IFN-β, IFN-γ et de l'IL-10 (Gadina et al., 2001). Les membres de la famille des récepteurs de cytokines de type I peuvent se subdiviser en différents groupes selon leur habileté à se lier à des chaînes de récepteur commune et la classification des cytokines peut aussi s'effectuer selon l'appartenance de leurs récepteurs à l'un de ces groupes. Par exemple, la famille des cytokines utilisant le CD132 comprend l'IL-2, l'IL-4, l'IIL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21 et ces dernières se lient toutes à un récepteur formé de leurs chaînes de récepteur spécifiques et de la protéine CD132 appelée aussi γc. La famille des cytokines utilisant le gp130 comprend des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-11, la lymphotactine, l'oncostatin M, le « ciliary neurotrophic factor » (CNTF), la cardiotrophine, la neuropoïetine, et l'IL-27. Finalement, la famille des cytokines utilisant la chaîne commune beta comprend l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF. La classification complète des récepteurs de cytokines est complexe et variée. Elle ne fera pas l'objet du présent ouvrage.

## 1.2. L'IL-4 et ses récepteurs

L'IL-4 est une glycoprotéine faisant partie de la famille des interleukines, qui possède une structure composée de quatre hélices alpha (Powers et al., 1992; Wlodawer et al., 1992). Elle possède deux types de récepteurs dimériques distincts, mais requièrt la présence de sa chaîne de récepteur spécifique dans chacun des cas. Elle fut initialement découverte

comme étant un facteur de croissance des cellules B et classée comme une cytokine anti-inflammatoire (Oliver et al., 1985). Par la suite, certaines fonctions pro-inflammatoires lui ont été attribuées.

### 1.2.1. Les sources d'IL-4

Plusieurs cellules peuvent produire de l'IL-4 dans différentes conditions. L'IL-4 est produite par les cellules T de sous-types Th2, $\gamma/\delta$ et NK1.1+T en réponse à une stimulation via le récepteur de surface des cellules T (Paul, 1991). Elle est aussi produite par les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles en réponse à une stimulation via le récepteur des IgE (Woerly et al, 1999). Une stimulation conjointe avec du PMA et de l'ionophore de calcium permet aussi la production d'IL-4 par ces cellules sans l'engagement des récepteurs mentionnés. Finalement, il a été suggéré que les neutrophiles possèdent un stock intracellulaire d'IL-4 et qu'ils pourraient constituer une source d'IL-4 (Brandt et al., 2000), cette dernière étant libérée des neutrophiles suite à une stimulation avec le brefeldin A ainsi qu'avec l'ionophore de calcium.

### 1.2.2. Les récepteurs de l'IL-4

L'interleukine-4 s'associe à une chaîne de récepteur spécifique, soit l'IL-4R$\alpha$ qui fait partie de la superfamille des récepteurs des hématopoïétines (Banchereau et al., 1990). Cette chaîne de récepteur se retrouve à la surface des cellules ou sous forme soluble dans le milieu extracellulaire et lie l'IL-4 avec une haute affinité (Kd=20-300pM) (Lowenthal et al., 1988; Ohara et Paul, 1987). Certaines études ont démontré que l'IL-4R$\alpha$ pouvait former des homodimères et que la seule présence de l'IL-4R$\alpha$ permettait certains évènements de signalisation intracellulaire, ainsi que l'observation de certains des effets de l'IL-4 (Fujiwara et al., 1997; Kammer et al., 1996; Reichel et al., 1997). Toutefois, la majorité des études reconnaissent deux types de récepteurs différents pour l'IL-4. Le récepteur de type I se compose de la chaîne IL-4R$\alpha$ ainsi que de la chaîne $\gamma$c et lie l'IL-4

avec une affinité environ 3 fois plus grande que l'IL-4Rα seule (Russell et al., 1993 ). Le récepteur de type II comprend la chaîne IL-4Rα et l'IL-13Rα1 et lie l'IL-4 avec une affinité entre 5 et 10 fois plus grande que l'IL-4Rα seule (Hilton et al., 1996). Le récepteur de type II de l'IL-4 peut aussi lier l'IL-13 et ce partage de récepteur explique en partie la similitude d'effets de ces deux cytokines (Nelms et al., 1999). Il est important de noter que ni la chaîne γc, ni l'IL-13Rα1 ne possèdent la capacité de lier l'IL-4 en l'absence de la chaîne IL-4Rα. Finalement, deux équipes ont orienté leurs recherches vers d'autres éléments qui pourraient s'associer aux récepteurs de l'IL-4. Tout d'abord, il a été démontré que l'IL-4Rα s'associait à la sous-unité $p47^{phox}$ de la NADPH oxydase chez les cellules B (Izuhara et al., 1999). Aussi, plus récemment, certains travaux ont soulevé la possibilité de l'existence d'un autre type de récepteur de l'IL-4 en constatant que le « progesterone-induced blocking factor » (PIBF) se liait à un récepteur composé du récepteur du PIBR (PIBFR) et de la chaîne IL-4Rα (Kozma et al., 2006). Toutefois, l'association de cette protéine et de l'IL-4Rα lors de la liaison de l'IL-4 n'a pas encore été démontrée.

La chaîne IL-4Rα se retrouve à la surface de la majorité des cellules hématopoïétiques, ainsi que sur plusieurs autres types cellulaires différents telles les fibroblastes, les cellules épithéliales, endothéliales, musculaires, les hépatocytes, etc (Nelms et al., 1999). Plusieurs cellules hématopoïétiques expriment aussi la chaîne γc ou encore la chaîne IL-13Rα1, ce qui permet à l'IL-4 de disposer de récepteurs fonctionnels sur presque toutes les cellules. Toutefois, l'IL-4 ne possède pas les mêmes effets sur chaque type cellulaire.

### 1.3. Les effets de l'IL-4

La nature des effets de l'IL-4 est un sujet qui suscite des opinions partagées dans la littérature. Originalement, l'IL-4 a plutôt été décrite comme une cytokine ayant des propriétés anti-inflammatoires et plusieurs articles décrivent ces effets. Toutefois, d'autres études mettent à jour certains aspects plutôt pro-inflammatoires de cette

cytokine, ce qui soulève un questionnement quant sa classification traditionnelle et apporte un regard différent sur ses effets.

### 1.3.1. Effets anti-inflammatoires

L'interleukine-4 possède certains effets que l'on peut qualifier d'anti-inflammatoires. Tout d'abord, elle diminue les fonctions inflammatoires des monocytes et des macrophages. Les effets qu'elle induit chez ces cellules incluent une diminution de leur production de superoxide et une augmentation de leur production d'IL-1Ra, qui est une cytokine anti-inflammatoire. Aussi, elle diminue la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNFα, l'IL-6, et l'IL-8. (Abramson et Gallin, 1990; Essner et al., 1989; Hartet al., 1989; Hartet al., 1991; Wong et al., 1992). Elle induit aussi la différenciation des cellules CD4+ naïves en cellules Th2, capables de produire de l'IL-4, favorisant une immunité de type humorale (Seder et al., 1992; Swain, 1993). Son effet sur la balance Th2 est augmenté par son inhibition de la production d'IL-12, qui est essentielle pour la génération de cellules Th1 (Hsieh et al., 1992; Seder et al., 1992). De plus, elle induit l'apoptose des éosinophiles (Wedi et al., 1998). Finalement, l'IL-4 augmente la production d'IL-1Ra par les neutrophiles et cet effet est augmenté par l'IL-10. (Re et al., 1993; Crepaldi et al., 2002). L'IL-4 aurait aussi un effet anti-inflammatoire sur les neutrophiles stimulés avec le fMLP en inhibant leur production d'IL-8 et de TNF-α (Lee et al., 2002).

### 1.3.2. Effets pro-inflammatoires

Si elle a des effets anti-inflammatoires sur les monocytes et les macrophages, l'IL-4 augmente aussi certaines de leurs fonctions. Entre autres, elle augmente l'expression des complexes d'histocompatibilité majeurs (CMH) de classe II à leur surface et augmente leur capacité à agir comme cellules présentatrices d'antigènes (Te Velde et al., 1988; Zlotnik et al., 1987). De plus, l'IL-4 est associée à une augmentation des allergies et de

l'asthme dû à son effet sur la production de cellules Th2 (de Vries et Aversa, 1999) et à son effet sur les cellules B. Cette cytokine induit la commutation de classe d'anticorps des cellules B et entraîne la production d'IgE et d'IgG4 (Gascan et al., 1991) chez l'humain et d'IgE et d'IgG1 chez la souris (Coffman et al., 1986). De plus, puisque l'IL-4 augmente sa propre production par les cellules Th2, l'effet de cette cytokine s'en trouve amplifié. L'IL-4 a aussi un effet pro-inflammatoire chez les éosinophiles, puisqu'il a été démontré que cette cytokine augmente leur chimiotaxisme (Dubois et al., 1994). L'IL-4 augmente aussi l'expression de VCAM-1 sur les cellules endothéliales, favorisant le recrutement cellulaire (Masinovsky et al., 1990). L'IL-4 active aussi les neutrophiles, en retardant leur apoptose, tout en augmentant leur fonction phagocytaire et la production d'IL-8, un puissant agent chimioattractant (Boey et al., 1989; Girardet al., 1996; Girard et al., 1997). Finalement, nos récents travaux de recherche ont permis de démontrer que l'IL-4 induirait la chimioattraction ainsi que la chimiokinèse des neutrophiles *in vitro* et qu'elle serait aussi pro-inflammatoire *in vivo*, puisqu'elle permet le recrutement de cellules dans le modèle de la poche d'air murine ainsi que la production de différents chimioattractants (Ratthé, soumis à la revue Clinical and Experimental Immunology).

### 1.3.3. Similitudes et différences entre les fonctions de l'IL-4 et de l'IL-13

L'IL-13 se lie à deux chaînes de récepteur différentes avec des affinités plus ou moins grandes. L'IL-13Rα1 lie la cytokine de façon modérée et on observe la formation d'un récepteur de haute affinité lorsqu'il y a liaison avec une autre chaîne de récepteur, soit l'IL-4Rα. Cependant, l'IL-13 ne se lie pas à la chaîne IL-4Rα seule. Une autre chaîne de récepteur lie l'IL-13 avec une haute affinité, soit l'IL-13Rα2. Cette chaîne, qui possède une courte partie intracellulaire, constitue plutôt un régulateur négatif de l'IL-13 puisqu'elle peut séquestrer la cytokine et l'empêcher d'interagir avec l'IL-13Rα1 (Kelly-Welch et al., 2003). L'interleukine-4 et l'interleukine-13 partagent donc le même récepteur, ce qui a pour effet d'entraîner une certaine redondance de fonctions. En effet, ces deux cytokines induisent la production d'IgE et d'IgG4, elles augmentent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) chez les cellules B et les

monocytes et induisent l'expression de VCAM-1 sur l'endothélium vasculaire. De plus, ces deux cytokines induisent la chimioattraction des éosinophiles. Toutefois, contrairement à l'IL-4, l'IL-13 n'a aucun effet sur les cellules T. Il semblerait que l'IL-4 soit plus impliquée dans l'induction de la réponse allergique alors que l'IL-13 aurait des effets plutôt au niveau de la phase effectrice. Leurs rôles à ce niveau seraient donc plus complémentaires que redondants (Kelly-Welch et al., 2003).

### 1.4. La signalisation intracellulaire de l'IL-4

L'IL-4Rα est une protéine transmembranaire qui est composée d'une partie extracellulaire d'environ 220 acides aminés ainsi que d'un domaine intracellulaire comprenant environ 550 acides aminés. La portion intracellulaire de la protéine ne possède pas d'activité kinase intrinsèque, mais certaines kinases s'y associent et permettent l'activation de plusieurs cascades de signalisation dont trois principales (Nelms et al., 1999). L'inhibition des signaux induits par l'IL-4 s'effectue quant à elle par le biais des protéines appartenant à deux familles différentes. (Figure 1)

#### 1.4.1. Cascades activatrices

Trois différents types de cascades de signalisation, reliés jusqu'à un certain point, peuvent être distingués lorsque l'IL-4 se lie à l'un de ces récepteurs (Nelmset al., 1999; Jiang, 2000; Kelly-Welch, 2003). Tout d'abord, la cascade des « Janus family tyrosine kinases » (Jak) / «signal transducers and activators of transcription » (STAT) constitue un élément important de la signalisation de l'IL-4. La famille des Jak comprend 4 protéines kinases (Jak1-3 et Tyk2), qui sont phosphorylées lors de l'activation de différents récepteurs de cytokines, comme les récepteurs des cytokines de type II (interférons) et récepteurs de cytokine de type I (IL-2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, GM-CSF, hormone de croissance, etc.) (Leonard et O'Shea, 1998).

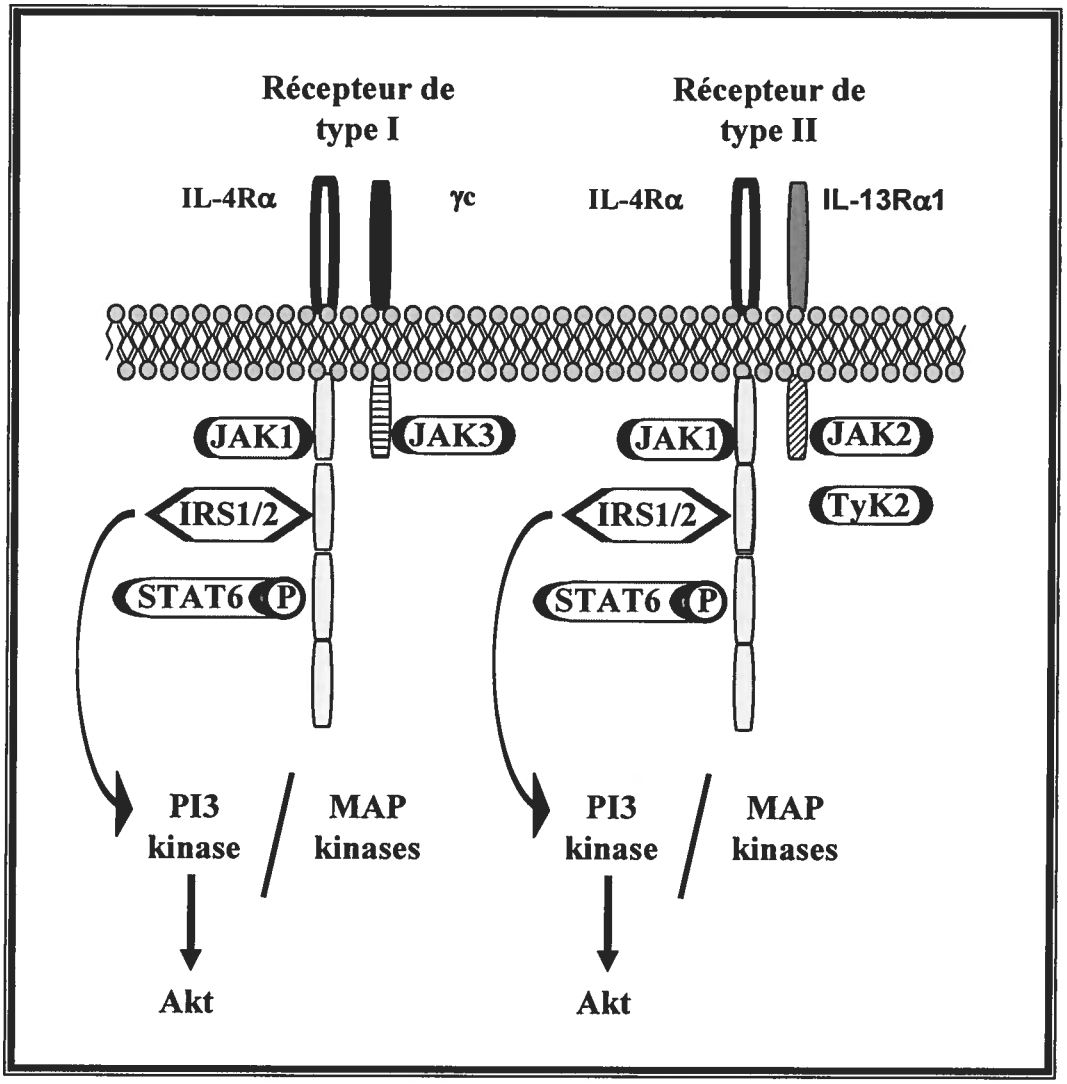



**Figure 1:** **<u>Cascades de signalisation des récepteurs de l'IL-4</u> (selon Kelly-Welch et al, 2003 et l'article de Keegan obtenu par Cytokine Reference Online, 2000).** L'IL-4 induit l'activation de différentes cascades de signalisation, soit la cascade Jak/STAT, la cascade des IRS et la cascade des MAP kinases.

Dans la cascade Jak/STAT, ces kinases lient et activent ensuite les membres de la famille des STAT (STAT1-4, 5a, 5b, 6). Ces protéines, une fois phosphorylées peuvent former des homodimères ou des hétérodimères et sont transloquées au noyau où elles modulent

l'expression des gènes qui possèdent un site de liaison pour les STAT (Leonard et O'Shea, 1998). La liaison de l'IL-4 à ses différents récepteurs entraîne l'activation de différents membres de la famille des Jaks. En effet, l'IL-4Rα permet la phosphorylation de Jak-1 alors que les chaînes γc et IL-13Rα1 permettent la phosphorylation respective de Jak3, comme c'est le cas pour tous les membres de la famille des cytokines dépendantes du CD132, et de Jak2 et Tyk2 (Chatila, 2004). De plus, le facteur de transcription le plus important pour la signalisation de l'IL-4 semble être STAT6. Ce dernier est activé à la fois par le récepteur de type I et celui de type II, puisqu'il est recruté par la chaîne IL-4Rα. Il est impliqué dans les fonctions de différenciation des cellules Th2 ainsi que dans la production des IgE. STAT3 pourrait aussi être phosphorylé suite à une stimulation avec l'IL-4 (Chatila, 2004; Nelms et al., 1999).

L'IL-4Rα recrute aussi des kinases de la famille des « Insulin receptor substrate » (IRS) soit IRS-2 et, de façon moindre, IRS-1 (Nelms et al., 1999). Les premiers membres de cette famille, comprennant au moins 4 protéines et possiblement 6 (IRS1-6), furent d'abord associées au récepteur de l'insuline (Giovannone et al., 2000). Il a été démontré par la suite que les protéines de la famille des IRS étaient exprimées dans plusieurs types cellulaires différents et qu'elles pouvaient activer différentes molécules contenant un domaine SH2, impliquées dans des cascades de signalisation. Entre autres, IRS-1 et IRS-2 mènent ultimement à l'activation des cascades des MAP kinases et les IRS1-4 permettant l'activation de la PI3 kinase (Giovannone et al., 2000). Les IRS-1 et 2 sont les membres de cette famille qui sont importants pour la cascade de signalisation induite par l'IL-4. En effet, le recrutement des IRS-1 et 2 par l'IL-4Rα permet l'activation de l'activité PI3 kinase, suivie de la phosphorylation de la kinase Akt et de l'activation des protéines kinases C (Chatila, 2004; Nelms et al., 1999). Une autre étude a aussi démontré que l'IL-4 induisait l'activation de PI3 kinase chez les éosinophiles humains (Dubois, 1998).

Les « mitogen activated protein kinases » (MAPK) constituent la troisième famille de kinases activées par l'IL-4. Elle comprend les « extracellular signal-regulated protein kinases » (ERK), la protéine p38 et les protéines « c-jun $NH_2$-terminal kinases » (JNK). Ces protéines sont activées par une série de MAPK kinases et de MAPK kinase kinase

qui permettent la phosphorylation de résidus tyrosines et thréonines. Les MAP kinases phosphorylent quant à elles les résidus de type sérine ou thréonine de plusieurs facteurs de transcription et certaines kinases. (Chen et al., 2001; Dong et al., 2002; Johnson et al., 2005) L'activation de la cascade des MAP kinases par l'IL-4 a été plus récemment découverte et peu d'articles encore en présentent une étude complète. Il a été démontré que l'IL-4 induisait une phosphorylation rapide de p38 MAPK dans des cellules B, ainsi qu'une activation ATF-2 et de Elk-1 qui sont des facteurs de transcription activés par p38 MAPK (Canfield et al, 2005). Une autre étude a aussi identifié ERK1/2 comme étant une kinase phosphorylée suite à une stimulation des mastocytes par l'IL-4 (Lorentz et al, 2005). De plus, d'autres travaux récents ont permis d'associer l'IL-4 avec la phosphorylation de la protéine Erk, membre de la famille des MAP kinases (So et al, 2007).

Tel que mentionné précédemment, certaines études ont démontré que l'IL-4Rα peut former des homodimères. Il a été démontré que ces derniers induisent une signalisation intracellulaire impliquant Jak1 et STAT6. De plus, il a aussi été démontré que la présence seule de l'IL-4Rα peut mener à la production d'IgE et à l'activation des la cascades des IRS. (Fujiwara, 1997; Kammer, 1996; Reichel, 1997) La chaîne de récepteur IL-4Rα serait donc capable d'activer à elle seule certaines des cascades de signalisation.

### 1.4.2. Cascades inhibitrices

Il existe trois types différents de protéines inhibitrices des cascades de signalisation intracellulaire, soit les phosphatases, les « suppressors of cytokine signalling » (SOCS) et les « protein inhibitors of activated STATS » (PIAS) (Greenhalgh et Hilton, 2001). Jusqu'à maintenant, les études qui ont été effectuées ont découvert que les deux premières familles de protéines étaient impliquées dans les cascades d'inhibition de l'IL-4. Toutefois, aucune étude n'a été effectuée concernant l'effet des PIAS sur la signalisation de l'IL-4 et aucune donnée n'est disponible quant aux PIAS qui pourraient bloquer l'effet

de STAT6. Il est donc impossible d'affirmer ou de nier l'implication de cette famille de protéines dans la signalisation de l'IL-4.

Tout d'abord, la chaîne de récepteur IL-4Rα contient un motif « immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif» (ITIM) dans sa portion C-terminale intracellulaire (Kashiwada, 2001) (Figure 2). Ce motif, lorsque phosphorylé par l'activation du récepteur, suite à l'interaction avec le ligand, permet la liaison et l'activation de phosphotyrosines phosphatases. La superfamille des phosphatases comprend une quarantaine de membres provenant de familles de protéines différentes. Elles peuvent être transmembranaires ou intracellulaires et plus de vingt phosphatases sont exprimées dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes. Ces protéines déphosphorylent les résidus sérine thréonine ou tyrosine phosphorylées et ont des rôles cruciaux pour le système immunitaire. (Dolton, Sathish et Matthews, 2006)

Les phosphatases ont des rôles différents dépendent de la cellule dans laquelle elles sont exprimées, par exemple, la phosphotyrosine phosphatase CD45 est importante pour la prolifération des cellules B, alors qu'elle joue un rôle à la fois de régulateur négatif et de régulateur positif des kinases de la famille Src dans les cellules T (Dolton, Sathish et Matthews, 2006; Tonks, 2006). La phosphatase « SH2-containing phosphatase-1 » (SHP-1) est celle qui est principalement associée à la signalisation de l'IL-4. Il a été démontré, dans une lignée de cellules B, que la protéine SHP-1 pouvait se lier au motif ITIM de l'IL-4Rα et induire la déphosphorylation de la sous-unité p85 de la PI3 kinase. Aussi, la surexpression de SHP-1 permettait d'inhiber la phosphorylation de STAT6 (Haque et al., 1998) et son inhibition empêchait la disparition de STAT6 (Hanson et al., 2003). Une dernière étude a démontré que l'effet de SHP-1 sur STAT6 pouvait varier selon le sous-type des cellules T (Huang et al., 2005). Pour l'instant, aucune étude ne démontre qu'une autre phosphatase serait impliquée dans la signalisation de l'IL-4.

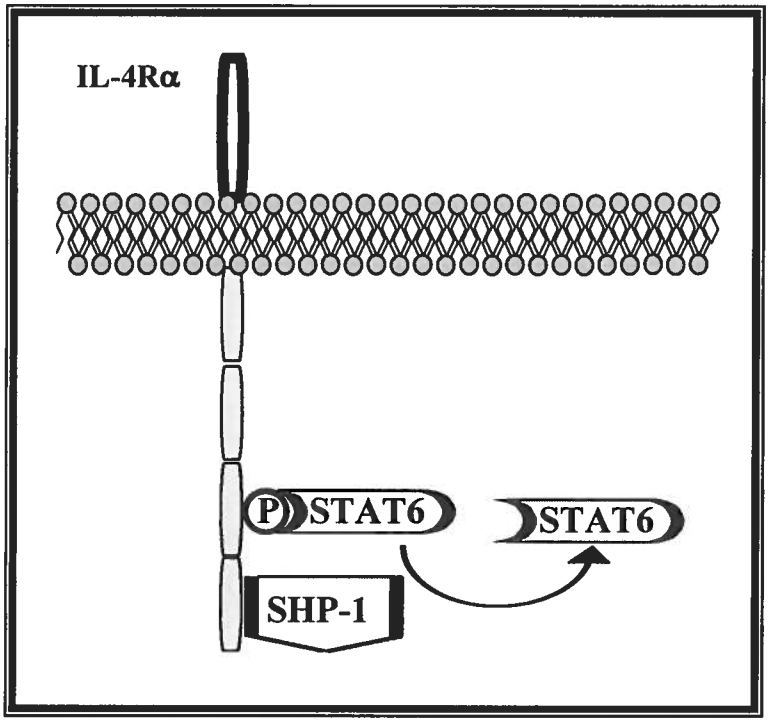



**Figure 2: <u>L'IL-4Rα lie SHP-1</u> (selon Kelly-Welch et al, 2003).** La phosphatase SHP-1 se lie au motif ITIM de l'IL-4Ra situé dans sa portion C-terminale, permettant la déphosphorylation de STAT-6.

La deuxième famille de protéine régulant les cascades de signalisations induites par l'IL-4 est la famille des SOCS (Alexander, 2002). Cette famille de protéine, comprenant à ce jour 8 membres (CIS et SOCS1-7), a récemment été découverte et comprend des régulateurs des cascades Jak/STAT. Ces protéines comprennent un domaine SH2 leur permettant une liaison avec des tyrosines phosphorylées situées sur les Jaks ou les récepteurs de cytokine. Elles contiennent aussi une région dans la partie C-terminale appelée « boîte SOCS » (Kile et al., 2002). Initialement identifiée chez les protéines SOCS, cette région se retrouve aussi dans plus de 40 protéines différentes. Elle permet la liaison aux protéines de la famille des élongines, qui se lient ensuite aux complexes E3 ubiquitine ligases, impliqués dans l'ubiquitination des protéines, ainsi que dans leur subséquente dégradation par le protéasome. Les SOCS jouent donc un rôle d'inhibition de la cascade Jak/STAT en bloquant la signalisation par leur liaison aux récepteurs et aux

Jaks, mais aussi en permettant la dégradation de ces protéines par le protéasome (Figure 3) (Johnston, 2004; Krebs et Hilton, 2000; Starr et Hilton, 1999).

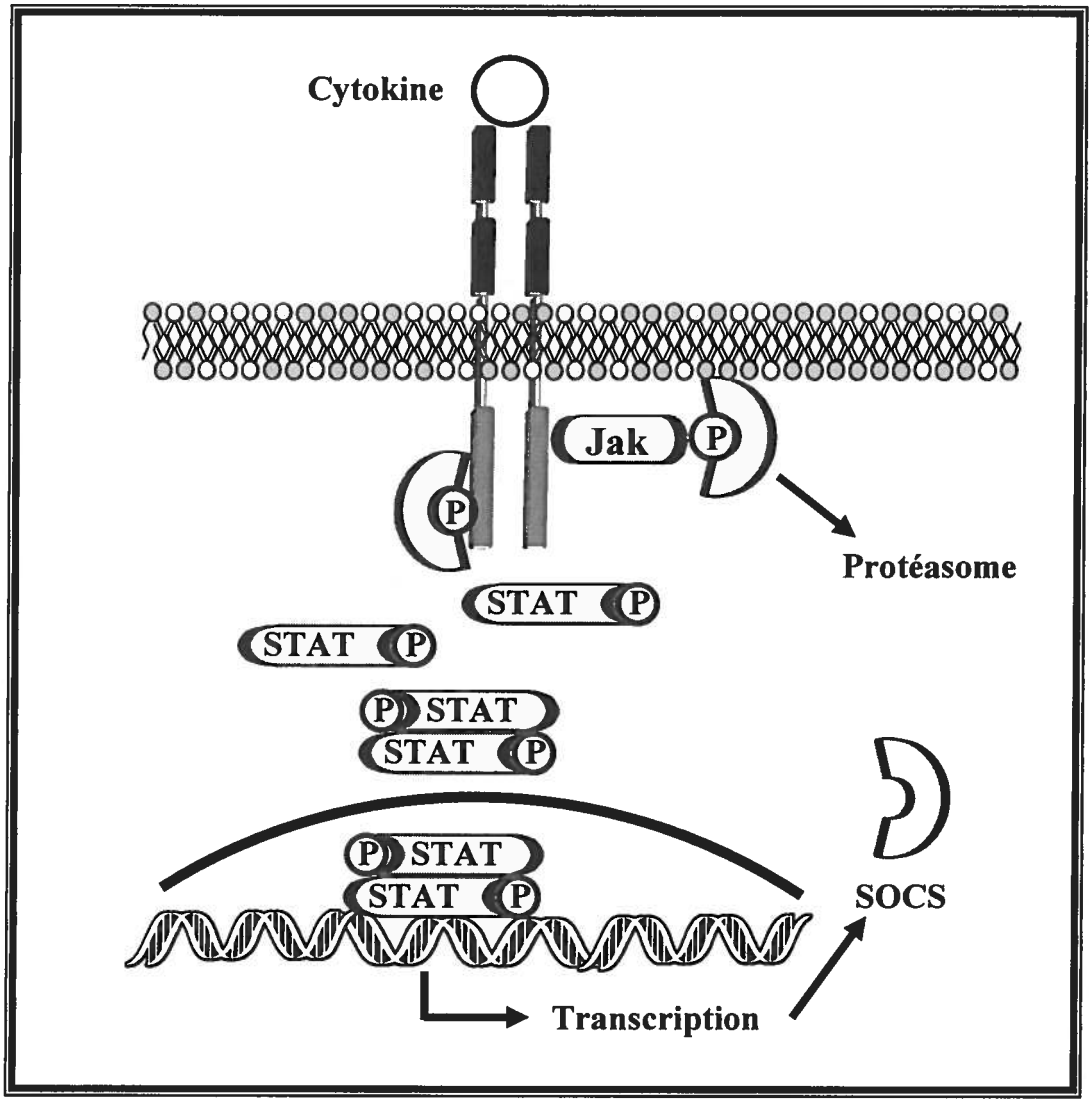



**Figure 3: <u>Production et mécanisme d'action des SOCS</u> (selon Fujimoto and Naka, 2003 et Johnston, 2004).** L'expression des régulateurs négatifs de la famille des SOCS est induite suite à l'activation de la cascade Jak/Stat. Les SOCS bloquent les cascades de signalisation en liant les Jak phosphorylés et en induisant leur dégradation subséquente par le protéasome.

La littérature concernant les SOCS est assez récente et il semblerait que SOCS1 et SOCS3 soient les SOCS les plus importants dans la signalisation de l'IL-4. Toutefois, il est difficile d'évaluer la contribution des autres membres de cette famille à la régulation négative de la signalisation intracellulaire associée au récepteur de l'IL-4, puisque peu d'études portent actuellement sur les SOCS4-7. Jusqu'à maintenant, il a été démontré que SOCS-1 était un inhibiteur de la signalisation de l'IL-4, plus précisément de Jak1 et de STAT6 (Losman et al., 1999). De plus, SOCS-3 serait aussi susceptible d'inhiber la signalisation de l'IL-4, mais uniquement dans des systèmes impliquant la transfection et la surexpression de la protéine (Losman et al., 1999; Hebenstreit et al., 2005). Finalement il est intéressant de noter que l'expression du gène de SOCS1 et à la fois du gène et de la protéine SOCS3 peuvent être augmentés par l'IL-4 (Albanesi et al., 2007; Canfield et al., 2005; Dickensheets et al., 2007; Hebenstreit et al., 2003; Ratthé et al., 2007).

# Chapitre 2: Les neutrophiles

## 2.1. Fonctions des neutrophiles

Les neutrophiles sont impliqués dans l'immunité innée et dans la première ligne de défense de l'organisme. Ce sont les leucocytes les plus abondants de la circulation sanguine et leur production constante par la moelle osseuse assure la libération dans l'organisme d'environ $10^{11}$ neutrophiles chaque jour. Ces cellules possèdent généralement une demi-vie courte, d'environ 12h, et les cellules qui ne sont pas stimulées et recrutées à un site d'inflammation meurent spontanément par apoptose, permettant ainsi à l'organisme de maintenir un nombre relativement constant de neutrophiles dans le sang (Edwards, 1994; Savill et Haslett, 1995; Witko-Sarsat et al., 2000).

### 2.1.1. Physiologie du neutrophile

Les neutrophiles sont des cellules différenciées, issues de la lignée myéloïde, qui donne aussi naissance d'une part aux granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et d'autre part aux plaquettes et aux érythrocytes (Figure 4) (Janeway et al., 1999; Edwards, 1994). Les neutrophiles ou cellules polynucléaires, possèdent un noyau polylobé, composé de trois lobes reliés. Une autre caractéristique de ces cellules est qu'elles contiennent des granules intracellulaires renfermant des substances microbicides qui sont libérées, dans le lysosome ou le milieu extracellulaire, lors de leur activation, et qui permettent l'élimination de certains microorganismes.

Les neutrophiles possèdent quatre types de granules différentes, soit les granules azurophiliques (primaires), les granules spécifiques (secondaires), les granules de gélatinase (tertiaires) et les vésicules sécrétrices, générées par endocytose (Borregaard et Cowland, 1997). L'activité antimicrobienne des neutrophiles provient d'une part de la

libération des enzymes hydrolytiques, des peptides et des protéines cytotoxiques des granules, mais aussi de l'activation de l'enzyme NADPH oxydase. Cet enzyme est assemblé à la membrane cellulaire des neutrophiles ou sur les membranes des granules intracellulaires lors de leur activation, et permet la production de réactifs oxygénés à l'extérieur de la cellule et/ou à l'intérieur de la cellule lors de la formation du phagolysosome (Edwards, 1994; Witko-Sarsat et al., 2000).

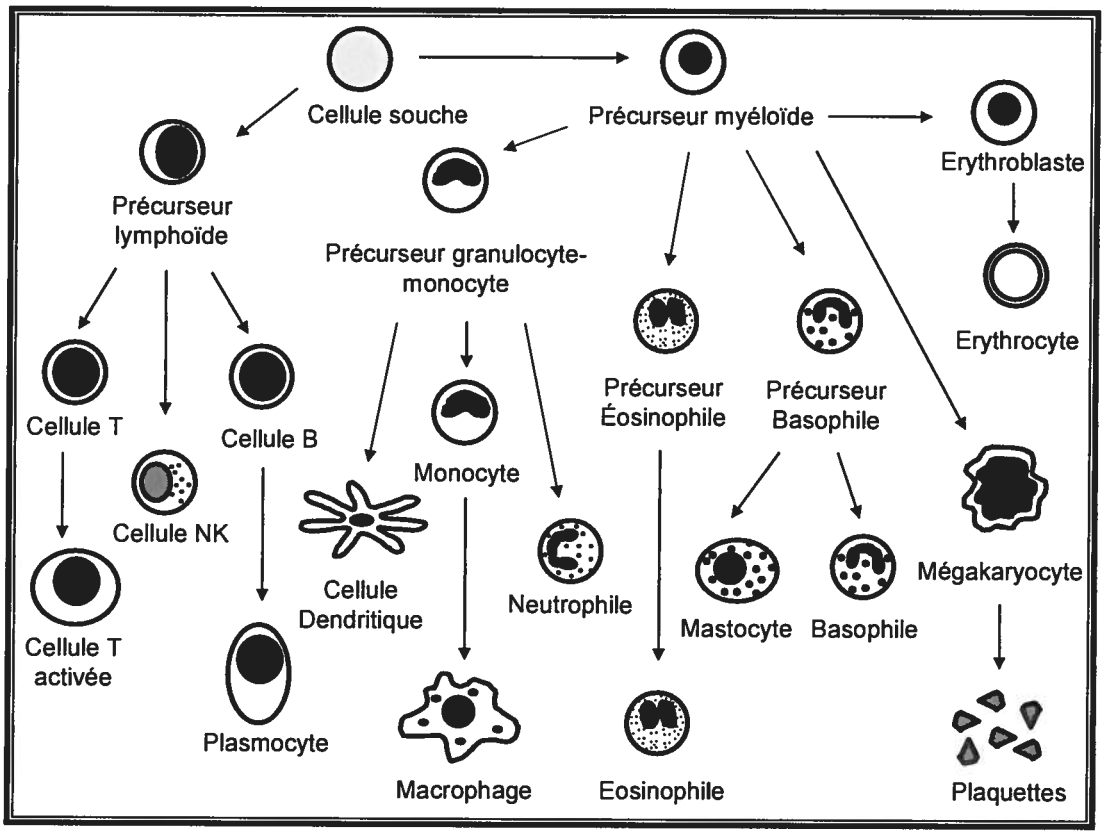



**Figure 4: <u>Cellules immunitaires</u> (inspiré de Janeway et al., 1999 et de Edwards, 1994).** Les cellules immunitaires proviennent toutes du même précurseur, soit les cellules souches et elles sont divisées en deux lignées distinctes soit la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. Les neutrophiles font partie des granulocytes, qui comprennent aussi les éosinophiles et les basophiles.

### 2.1.2. Activation et recrutement des neutrophiles au site inflammatoire

Les neutrophiles circulent dans le sang dans un état non-activé. Lors d'une infection, ces cellules sont rapidement activées, deviennent adhérentes et sont mobilisées au site d'inflammation, où elles peuvent effectuer leurs fonctions (Figure 5). Le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire peut être divisé en quatre étapes différentes, soit le roulement, l'activation, l'adhésion ferme et la diapédèse (Janeway et al., 1999; Witko-Sarsat et al., 2000).

Tout d'abord, lorsqu'il y a présence d'antigène, les tissus endommagés libèrent des médiateurs inflammatoires qui servent de signaux pour les cellules de l'endothélium des vaisseaux sanguins adjacents. Ces derniers vont subir certaines modifications, afin de permettre le recrutement des neutrophiles. En premier lieu, le débit sanguin des vaisseaux affectés est diminué dû à la dilatation des veinules postcapillaires des sites inflammatoires. Ce ralentissement de la circulation permet aux neutrophiles d'entrer en contact avec les cellules endothéliales. Ensuite, les cellules endothéliales expriment de nouvelles molécules d'adhésion à leur surface soit la P- et la E-sélectine, qui lient la L-sélectine, constitutivement présente à la surface des neutrophiles. Ces liaisons sont transitoires et, durant cette étape, les neutrophiles semblent rouler le long de la paroi endothéliale et c'est pourquoi on appelle cette première étape le roulement (Witko-Sarsat et al., 2000).

La deuxième étape vise à activer les cellules qui sont en roulement le long de la paroi endothéliale. Les cellules endothéliales expriment des molécules chimioattractantes, par exemple l'IL-8, à leur surface, soit par internalisation et sécrétion des chimiokines présentes dans les tissus ou par sécrétion de chimiokines intracellulaires. Le roulement permet au neutrophile d'être en contact avec ces chimiokines et de devenir activé. Lors de l'activation, le potentiel de liaison de la L-sélectine augmente, ce qui augmente l'adhésion entre les neutrophiles et les cellules endothéliales. Par la suite, les molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules en contact continuent de se modifier et l'adhésion ferme s'effectue grâce à l'expression des β2 intégrines (CD11a, CD11b, CD11c, CD18),

par les neutrophiles de la molécule ICAM-1, par les cellules endothéliales. C'est à ce moment que survient l'adhésion ferme des neutrophiles sur les cellules endothéliales, qui permettra aux polynucléaires de passer de la circulation sanguine aux tissus inflammés (Witko-Sarsat et al., 2000).

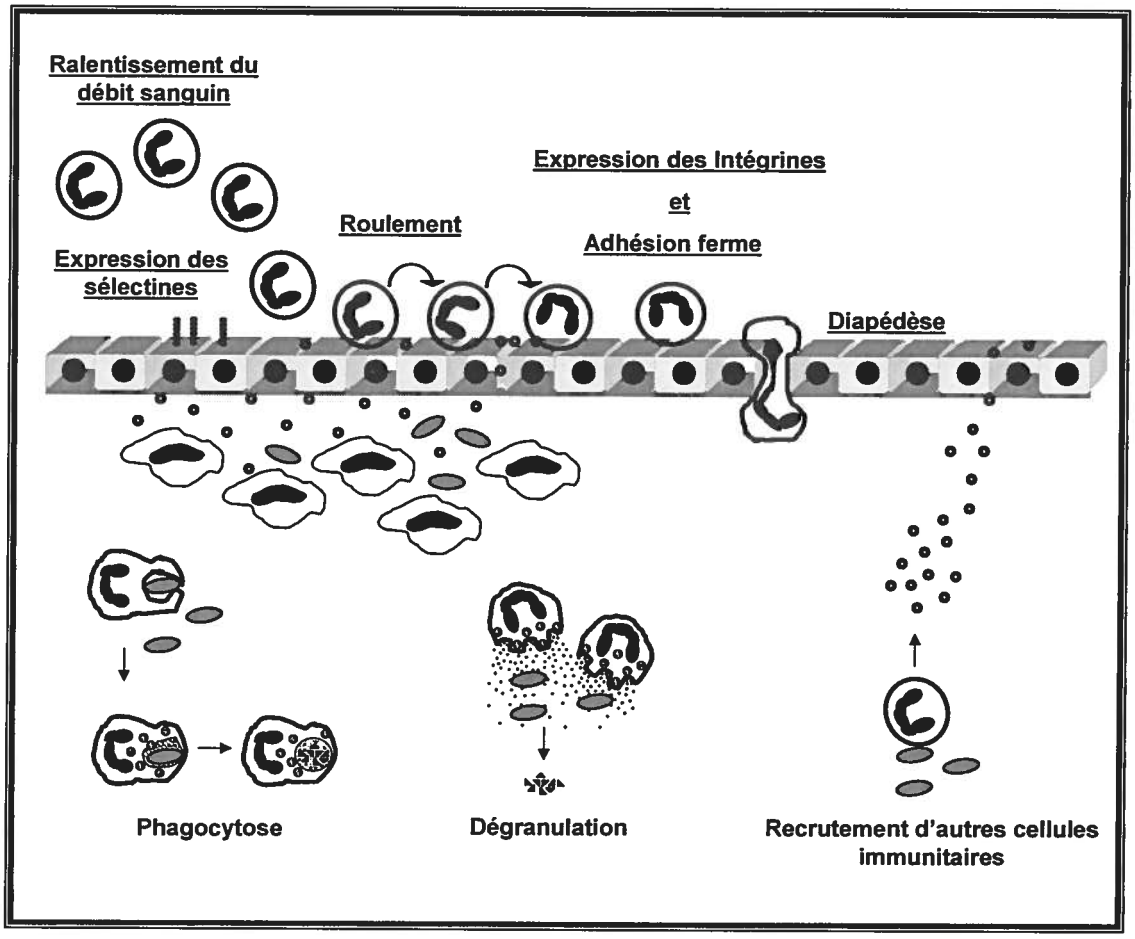



**Figure 5: <u>Recrutement des neutrophiles au site inflammatoire et fonctions des neutrophiles</u> (inspiré de Janeway et al., 1999).** En présence d'antigènes, les cellules des tissus libèrent des médiateurs inflammatoires qui induisent des modifications des cellules endothéliales, permettant l'activation et le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire. Par le biais des sélectines et des intégrines, les neutrophiles migrent vers les lieux d'inflammation ou ils pourront effectuer leurs fonctions et recruter d'autres cellules immunitaires.

Finalement, la diapédèse, soit la migration à travers l'endothélium, est permise grâce à la désorganisation des jonctions intercellulaires entre cellules endothéliales et la formation de nouveaux sites d'adhésion entre ces dernières et les neutrophiles. Les neutrophiles traversent la couche endothéliale, qui se referme après leur passage. À l'intérieur des tissus, les neutrophiles migrent par chimiokinèse selon les gradients de chimioattractants présents, le plus élevé étant concentré au site d'inflammation (Witko-Sarsat et al., 2000).

### 2.1.3. Fonctions des neutrophiles

Les neutrophiles effectuent principalement la destruction des microorganismes par le biais de la phagocytose, de la dégranulation et de la production de réactifs oxygénés (ou flambée oxydative). Cependant, une de leurs fonctions importantes consiste aussi à recruter d'autres types de leucocytes au site inflammatoire par le biais de la synthèse ou de la libération de cytokines au lieu d'inflammation (Figure 5) (Witko-Sarsat et al., 2000). Tel que mentionné précédemment, les neutrophiles activés sécrètent le contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire ou dans les lysosomes ayant engouffré des microorganismes.

La phagocytose par les neutrophiles s'effectue par le biais des récepteurs de type Fcγ ou des récepteurs du complément qui sont présents à leur surface (Ravetch et Clynes, 1998; Ravetch et Bolland, 2001). Il existe trois types de récepteurs Fcγ soit les FcγRI, les FcγRII et les FcγRIII (Ravetch et Bolland, 2001). Les neutrophiles possèdent constitutivement à leur surface les récepteurs FcγRIIa (CD32) et FcγRIIIb (CD16) et certains agonistes tel l'IFN-γ peuvent induire l'expression du FcγRI (CD64) (Chuang, Sassaroli et Unkeless, 2000; Cooney et al., 2001; Durand et al., 2001). Les récepteurs du complément CR1 et CR3 sont aussi exprimés à la surface des neutrophiles (Edwards, 1994). L'engagement d'un récepteur Fcγ ou d'un récepteur du complément par son ligand correspondant permet la réorganisation du cytosquelette du neutrophile, afin que la membrane cellulaire puisse englober le microorganisme et former une vésicule interne appelée phagosome (Edwards, 1994; Witko-Sarsat et al. 2000). Les granules du

neutrophile (azurophiliques et spécifiques) fusionnent ensuite avec le phagosome pour former le phagolysosome et assurer la destruction du microorganisme (Witko-Sarsat et al. 2000).

La dégranulation dans le milieu extracellulaire a lieu lorsque le neutrophile est incapable d'effectuer la phagocytose de l'antigène ou lorsqu'il reçoit le stimulus approprié. Lorsqu'il y a dégranulation, les granules de type spécifique et de type gélatinase fusionnent avec la membrane cellulaire afin de libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire. C'est à ce moment que des composantes de l'enzyme NADPH-oxydase peuvent se retrouver sur la surface externe de la membrane cellulaire et permettre la production de réactifs oxygénés à l'extérieur de la cellule. La NADPH-oxydase permet de transformer l'oxygène en $O_2$- et en $H_2O_2$. Cet enzyme est composé de sous-unités membranaires, soit la p22phox et la gp91phox et de trois sous-unités cytosoliques, soit la p40phox, la p47phox et la p67phox. Lors de l'activation de l'enzyme par le biais de la phosphorylation, les sous-unités cytosoliques migrent vers la membrane pour former le complexe enzymatique.

Les réactifs oxygénés sont toxiques pour les cellules et s'attaquent à plusieurs éléments cellulaires comme l'ADN, les protéines ainsi que les lipides. Leur potentiel toxique peut même être amplifié par certaines composantes des granules des neutrophiles comme par exemple la myéloperoxydase, qui amplifie la toxicité du $H_2O_2$ (Edwards, 1994; Witko-Sarsat et al. 2000). De plus, il a aussi été démontré que les réactifs oxygénés augmentent la signalisation des récepteurs Fcγ et permettent d'amplifier la phagocytose (Pricop et al., 1999). Les réactifs oxygénés n'ont donc pas seulement un rôle microbicide en soi, ils agissent aussi de concert avec les composés des granules et augmentent l'activité des récepteurs impliqués dans la phagocytose afin d'assurer une élimination efficace des antigènes, ce qui démontre une relation importante entre ces différents éléments.

Un autre aspect des fonctions du neutrophile concerne le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires, dont d'autres neutrophiles, au site inflammatoire. Lorsqu'ils sont activés, les neutrophiles peuvent libérer certaines chimiokines ou cytokines qui peuvent activer et recruter d'autres populations de leucocytes. Certains agents induisent aussi la synthèse protéique chez les neutrophiles, ce qui leur permet de produire de nouveaux médiateurs inflammatoires. Selon l'antigène présent, différentes cytokines seront produites par les tissus et les cellules endothéliales (Witko-Sarsat et al. 2000). Ces différentes cytokines entraîneront des réponses spécifiques de la part des neutrophiles et la production de certains types précis de médiateurs inflammatoires. Cette spécificité permettra aux neutrophiles de recruter et d'activer différents types cellulaires selon d'antigène à éliminer. Le tableau 2 présente différentes cytokines pouvant être sécrétées par les neutrophiles activés, ainsi que leurs effets potentiels sur différents types cellulaires.

### 2.2. Effet de l'IL-4 sur les fonctions des neutrophiles

L'interleukine-4 peut moduler certaines fonctions des neutrophiles par le biais de son récepteur exprimé à leur surface. La dualité pro- et anti-inflammatoire de l'IL-4 se retrouve aussi dans ses effets sur les neutrophiles, démontrant l'importance de bien comprendre les différents contextes et types d'actions de l'IL-4 sur les neutrophiles. Il apparaît que l'IL-4 peut parfois diminuer la capacité des neutrophiles à engendrer une réponse inflammatoire ou à répondre à certains médiateurs inflammatoires. Toutefois, l'effet direct de l'IL-4 sur les neutrophiles semble plutôt pro-inflammatoire, quoi que dans certains cas, l'effet direct de l'IL-4 et son effet sur la réponse à d'autres cytokines soient contradictoires.

| Cytokines | Effets |
|---|---|
| TNF-α | Inflammation locale, activation des neutrophiles, cytolyse de lignées cellulaires tumorales. Destruction cellulaire, activation des cellules endothéliales, angiogénèse. Prolifération des cellules T et astrogliales. |
| IL-1 α et IL-1 β | Fièvre, activation des Th et des macrophages. Prolifération des B et synthèse des immunoglobulines. Prolifération et activation des NK, fibroblastes, astrocytes et cellules microgliales. Augmente les intégrines de surface des neutrophiles, cellules B, T et des monocytes. |
| IL-3 | Rôle dans l'hématopoïèse, prolifération des macrophages et des mastocytes, production d'histamine. |
| IL-8 | Activation et chimioattraction des neutrophiles et des granulocytes, inhibition de la production d'IgE par les B, chimioattraction des cellules T naïves. |
| IL-12 | Polarisation des Th1, prolifération des T naïves et des NK. Synthèse d'IFN-γ, d'IL-2 et de TNF. |
| IL-18 | Chimioattraction des lymphocytes, différenciation des Th1. Augmentation des activités cytotoxiques des NK, Production d'IFN-γ par les cellules B et inhibition de la production des IgE. |
| Gro-α et Gro-β | Chimioattraction des cellules T naïves, des neutrophiles et des fibroblastes. Activation des neutrophiles, angiogénèse. |
| MIP-1α | Chimioattractant des monocytes, cellules dendritiques, NK et T et des basophiles, promotion des Th1. |
| MIP-1β | Chimioattraction des Monocytes, cellules dendritiques, NK et T. |
| IFN-α et IFN-β | Anti-viraux, augmentation des CMH de classe 1. |
| G-CSF | Prolifération et différenciation des granulocytes/neutrophiles, augmentation de l'ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity). |
| M-CSF | Prolifération des macrophages et des granulocytes. Survie et différenciation des monocytes. Induction de l'ADCC par les macrophages production de cytokines. |
| FasL | Apoptose, cytotoxicité. |
| CD30L | Prolifération des cellules B et T. |

**Tableau 2: <u>Principales cytokines sécrétées par les neutrophiles activés ayant des effets sur d'autres cellules immunitaires</u> (selon Witko-Sarsat et al., 2000, Cytokine Reference online, 2000 et l'encyclopédie en ligne Horst Ibelgaufts' des cytokines, 2002).**

### 2.2.1. Effets anti-inflammatoires

Une étude a démontré que l'IL-4 avait des effets anti-inflammatoires lorsque des neutrophiles étaient prétraités avec la cytokine et ensuite stimulés avec un agoniste connu des neutrophiles, soit le peptide formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) (Lee et al, 2001). Ce chimioattractant traditionnel permet la production de $H_2O_2$ par les neutrophiles et leur sécrétion d'IL-8 et de TNFα. Ces travaux ont démontré que la production d'IL-8 et de TNFα était diminuée lorsque les neutrophiles étaient prétraités avec l'IL-4. D'autre études ont aussi permis de démontrer que l'IL-4 réduit la production de certaines cytokines pro-inflammatoires par les neutrophiles comme l'IL-8 (Wertheim et al., 1993), les TNFα et β, l'IL-1β et l'IFN-γ (Lee et al., 1995). De plus, il a été démontré que l'interleukine-4 induit la production d'IL-1Ra par les neutrophiles et que cette augmentation est amplifiée par l'IL-10 (Crepaldi et al., 2002) ou par le TNFα (Marie et al., 1996). L'IL-1Ra est un récepteur antagoniste de l'IL-1, une cytokine pro-inflammatoire, donc l'IL-1Ra est considéré comme une cytokine anti-inflammatoire. Finalement, des expériences *in vivo* chez le rat souffrant d'arthrite en injectant l'IL-4 de façon intra-péritonéale ont démontré que cette cytokine possédait un potentiel anti-inflammatoire par le biais de l'inhibition de l'activation des neutrophiles (Bober et al., 2000).

### 2.2.2. Effets pro-inflammatoires

Les effets pro-inflammatoires de l'IL-4 sur les neutrophiles ont été démontrés par des études *in vitro.* Les résultats des travaux de Bohey ont permis de constater que l'IL-4 augmente le potentiel des neutrophiles à éliminer les bactéries opsonisées et qu'elle augmente aussi la phagocytose par les neutrophiles des globules rouges de mouton opsonisés. Ces expériences ont aussi pu démontrer que l'IL-4 augmente la flambée oxydative induite par le fMLP (Boey et al., 1989). Ensuite, il a été démontré que l'IL-4 a des effets pro-inflammatoires sur beaucoup d'autres éléments fonctionnels du neutrophile (Girard et al. 1997). En effet, il a été démontré que l'IL-4 induit la synthèse d'ARN chez

les neutrophiles ainsi que la synthèse protéique, plus spécifiquement la production d'IL-8. Il a aussi été observé dans cette étude que l'IL-4 induit des changements morphologiques chez les neutrophiles, ce qui signifie une réorganisation du cytosquelette, ainsi qu'une augmentation de l'étalement sur le verre. Finalement, ces travaux ont aussi permis de démontrer que l'IL-4 retarde l'apoptose des neutrophiles.

### 2.3. Cascades de signalisation chez les neutrophiles

Les cascades de signalisation, tant activatrices qu'inhibitrices, sont très importantes pour la régulation des fonctions des neutrophiles. Certaines cascades de signalisation sont associées à des intégrines ou à des récepteurs permettant la phagocytose, alors que d'autres sont enclenchées suite à l'activation de récepteurs de cytokines. Si l'activation des neutrophiles est importante pour la défense de l'organisme contre les pathogènes, la régulation négative permettant le retour des neutrophiles à un profil non-activé ou encore l'apoptose de ces cellules l'est tout autant. En effet, c'est la régulation négative qui permet d'éviter des situations d'inflammation persistante ou des dommages trop importants aux tissus de l'organisme, qui pourraient survenir lors de la dégranulation.

La signalisation intracellulaire est importante pour toutes les étapes de l'activation des neutrophiles, tant au niveau de la migration de la circulation sanguine à travers l'endothélium, qu'au niveau des fonctions d'élimination des pathogènes (Tableau 3). Plusieurs études ont été effectuées dans le but de déterminer quelles protéines étaient importantes pour chacune des étapes de la diapédèse et de la migration des neutrophiles. Tout d'abord, il a été démontré que l'enzyme PI3 kinase était activée par le chimioattractant fMLP et permettait la liaison des intégrines β3 (Bruyninckx et al., 2001). Dans cette étude, l'inhibiteur wortmanine, spécifique pour la PI3 kinase, inhibait la migration et la chimioattraction des neutrophiles. Toutefois, elle comportait des résultats contradictoires, puisque l'inhibition de la PI3 kinase par la wortmanine pouvait aussi augmenter la transmigration des neutrophiles lorsque la matrice utilisée n'était pas l'agarose ou qu'elle était constituée de cellules endothéliales. Ces résultats démontrent

l'importance de la PI3 kinase dans la migration des neutrophiles sans clarifier son effet exact. Ces expériences ont aussi pu démontrer que la kinase Syk serait aussi impliquée dans la migration transmatricielle des neutrophiles.

| Fonctions des neutrophiles | Cascades de signalisation importantes |
|---|---|
| Adhésion aux cellules endothéliales | Ras<br>Syk<br>JNK |
| Expression des intégrines | PI3 kinase<br>Syk |
| Transmigration | PI3 kinase (plus précisément PI3K d)<br>Syk |
| Phagocytose par le FcγRIIa | Cascade impliquant des tyrosines kinases de la famille des Src (Fgr et Hck), Syk et PI3 kinase. |
| Phagocytose par les récepteurs Fcγ | la cascade Raf, Mek, ERK1/2. |
| Dégranulation | Tyrosines phosphorylées en général, PKC, Fgr, Hgr, P38 Map Kinase, Syk |
| Dégranulation dépendante de l'adhésion | Tyrosines kinases dde la famille des Src (Fgr et Hgr) |
| Dégranulation induite par le fMLP | P38 Map kinase<br>Syk |

**Tableau 3: <u>Éléments des cascades de signalisation associés à l'activation ou aux fonctions des neutrophiles</u> (selon Witko-Sarsat et al., 2000).**

D'autres travaux ont confirmé l'implication des PI3 kinases et plus particulièrement de la PI3 kinase δ dans la migration directionnelle des neutrophiles, mais non dans la migration aléatoire (Sadhu et al. 2003). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la PI3 kinase δ bloquait aussi la chimioattraction des neutrophiles induite par le fMLP, mais non l'adhésion des neutrophiles. L'implication de Syk a quant à elle été confirmée par une étude qui a démontré son importance pour la migration des neutrophiles dépendante des intégrines dans des études in vivo et in vitro (Mócsai et al., 2002). De plus, cette étude indique que Syk ne serait pas impliqué dans la migration chimiotactique des neutrophiles.

L'adhésion des neutrophils aux cellules endothéliales a aussi été associées à l'activation de Ras, de Syk et de JNK, démontrant l'importance de la cascade des MAP kinases dans cette étape de l'activation des neutrophiles (Kasper et al., 2006).

La fonction de phagocytose des neutrophiles est aussi dépendante de l'activation de plusieurs cascades intracellulaires. Le récepteur FcγRIIA, qui permet en partie la phagocytose par les récepteurs Fcγ, comporte un domaine ITAM dans sa portion cytoplasmique permettant le recrutement des kinase de la famille des Src (Fgr et Hck), ainsi que l'activation subséquente de Syk et des PI3 kinases (Witko-Sarsat et al., 2000; Kiefer et al., 1998). La cascade des Map kinases serait aussi impliquée dans la phagocytose médiée par les récepteurs Fcγ, puisque les travaux de Raeder ont démontré l'activation de la cascade de Raf-1, MEK et ERK-1/2 lors de cette dernière (Raeder et al., 1999). La dégranulation nécessiterait quant à elle la phosphorylation de résidus tyrosines, puisque les expériences de Nauclér ont démontré que la génistéine, un inhibiteur de la phosphorylation des tyrosines, pouvait bloquer la libération des granules azurophiliques induit par des complexes immuns (Nauclér et al., 2002). Leurs travaux ont aussi permis de cibler la PKC comme étant un joueur clé dans la dégranulation à l'aide d'un inhibiteur spécifique. Une autre étude a permis d'associer la dégranulation dépendante de l'adhésion, par la mesure du relâchement de la lactoférine, une composante des granules spécifiques, aux kinases Fgr et Hck qui font partie de la famille des Scr (Mócsai et al., 1999). Il aussi été démontré que la p38 MAP kinase et la kinase Syk étaient impliquées dans la dégranulation induite par le chimioattractant fMLP (Mócsai et al., 2000).

Les fonctions des neutrophiles sont aussi contrôlées par certains régulateurs négatifs. Tout d'abord, certaines phosphatases sont exprimées par les neutrophiles comme le CD45 et la SHP-1. Une étude a démontré la présence du CD45 sur la membrane plasmique des neutrophiles, ainsi que l'augmentation de son expression suite à une exposition des produits bactériens (Cui et al., 1994). D'autres travaux ont établi que l'augmentation du CD45 à la membrane des neutrophiles permet de bloquer la réponse des neutrophiles au fMLP (Brumell et al., 1997). Ils ont aussi permis de déterminer que les neutrophiles expriment la phosphatase SHP-1 α dans le cytosol, et qu'elle est associée au

cytosquelette. La phosphatase SHP-1 peut phosphoryler les domaines ITIM de certains substrats et ainsi inhiber la signalisation induite par les récepteurs correspondants (Zhang et al., 2000).

La cascade des MAP kinases, la signalisation Jak/STAT, les SOCS, inhibiteurs de cette cascade, ainsi que d'autres cascades sont activées chez les neutrophiles par une variété de cytokines qui ne font pas l'objet du présent ouvrage. Nous limiterons le contenu de cette revue de littérature aux cascades de signalisation induites par l'IL-4 chez les neutrophiles.

### 2.3.1. Cascades induites par l'IL-4 chez les neutrophiles

Malgré qu'il soit connu que les neutrophiles possèdent, de façon constitutive, le récepteur de type I de l'IL-4, composé de la chaîne IL-4Rα et de la chaîne CD132, et que l'IL-4 puisse activer les neutrophiles et moduler plusieurs de leurs fonctions, la signalisation intracellulaire de l'IL-4 chez les neutrophiles n'a pas encore beaucoup été étudiée. Il est possible de suspecter que la cascade des MAP kinases, celle des Jak/STAT ainsi que les SOCS soient impliqués puisqu'ils sont activés par cette cytokine dans d'autres types cellulaires (voir section sur l'IL-4).

# Chapitre 3: L'inflammation

## 3.1. Mécanismes d'inflammation

L'inflammation est un processus nécessaire à la survie de l'organisme. Non seulement permet-elle de défendre l'organisme contre de multiples pathogènes, mais elle constitue aussi un phénomène par lequel les tissus peuvent se régénérer en cas de blessure. L'inflammation peut donc s'avérer très bénéfique pour l'organisme. Toutefois, il est important que la réponse inflammatoire soit étroitement contrôlée, car une réponse inadéquate ou exagérée peut aussi causer des dommages considérables aux cellules et aux tissus environnants. La résolution de l'inflammation suite à la réponse inflammatoire est donc une étape capitale dans le processus de retour à la normale des tissus. (Haslett et al., 1994; Savill et Haslett, 1995; Savill, 1997)

### 3.1.1. Développement de la réponse inflammatoire et immunité

Lors de l'invasion de l'organisme par un microorganisme ou lors d'un dommage tissulaire, la réponse inflammatoire est mise en place afin de protéger l'organisme. Tout d'abord, des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires, telles les prostaglandines et les leukotriènes, sont libérées par les cellules endommagées et permettent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité des capillaires. Tel que mentionné précédemment, les neutrophiles constituent les premières cellules à arriver à un site d'inflammation et sont recrutés par le biais de cytokines libérées par les cellules des tissus endommagés et exprimées à la surface des cellules endothéliales (figure 5). Par la suite, les monocytes migrent aussi vers le site d'inflammation et deviennent des macrophages qui se divisent et prolifèrent suite à leur activation. De plus, les macrophages tissulaires et les cellules dendritiques deviennent aussi activés. Les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles peuvent effectuer la phagocytose et font partie de l'immunité innée, qui est à

la base de la majorité des réponses inflammatoires. Elle est efficace pour éliminer certains pathogènes ayant des éléments de surface conservés à travers l'évolution et présents sur plusieurs microorganismes. Ce mécanisme d'élimination peu spécifique permet de détruire un bon nombre de pathogènes toutefois, si les microorganismes présents dans les tissus nécessitent une reconnaissance plus spécifique, l'intervention de l'immunité acquise est nécessaire et d'autres cellules seront recrutées au site d'inflammation (Janeway et al., 1999; Janeway et Medzithov, 2002).

Les macrophages et les cellules dendritiques ont la capacité d'exposer des antigènes qu'ils ont ingérés à leur surface par le biais des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Ces cellules voyagent vers les ganglions par le système lymphatique pour présenter ces antigènes aux cellules responsables de l'immunité acquise. Les lymphocytes B et les lymphocytes T évoluent de façon à reconnaître spécifiquement les antigènes. Ils deviennent activés lorsqu'ils sont stimulés de façon adéquate par l'antigène qu'ils reconnaissent, ainsi que par certaines co-stimulations provenant de molécules spécifiques situées à la surface des cellules avec lesquelles ils interagissent (Janeway et al., 1999). L'activation des lymphocytes B et T dans les tissus lymphoïdes entraîne leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices qui migrent vers les lieux d'inflammation. Les lymphocytes B sont responsables de la production d'anticorps. Les cellules T CD4+ aident à l'activation ou l'inhibition d'autres cellules effectrices, alors que les cellules T cytotoxiques peuvent détruire les microorganismes ou les cellules exprimant l'antigènes qu'elles reconnaissent (Janeway et al., 1999).

Lors d'une réaction inflammatoire, les cytokines pro-inflammatoires vont stimuler l'immunité adaptive en augmentant les fonctions des cellules effectrices au site d'inflammation (Medzhitov et Janeway, 1997). De plus, la génération d'anticorps par les cellules B aura aussi un effet sur la réponse inflammatoire puisque la phagocytose peut être induite par le biais des récepteurs Fc, reconnaissant les anticorps, à la surface des phagocytes (Casadevall et Pirofski, 2003).

### 3.1.2. Résolution de l'inflammation

Lorsque la réponse immunitaire est terminée, c'est-à-dire lorsque les microorganismes présents dans les tissus ont été détruits adéquatement ou lorsque les cellules endommagées ont été éliminées, il est important que l'inflammation se résorbe. Se phénomène, connu sous le nom de résolution de l'inflammation, débute quelques heures à peine après l'initiation de la réponse inflammatoire (Serhan et Savill, 2005). Plusieurs éléments endogènes permettent la résolution de l'inflammation. Tout d'abord, l'adrénaline et la noradrénaline permettent de diminuer la perméabilité des vaisseaux sanguins (Lawrence, 2002). Ensuite, l'augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) intracellulaire est associé à une diminution des mécanismes inflammatoires. Entre autres, ce médiateur permet de diminuer la réponse des neutrophiles, des monocytes, des mastocytes et des macrophages (Lawrence, 2002). Les glucocorticoides constituent aussi un élément important de la résolution de l'inflammation, puisqu'ils empêchent la transcription de gènes pro-inflammatoires et induisent la production de protéines anti-inflammatoires comme l'anexine-1 qui agit sur les neutrophiles et les monocytes. Finalement, le recrutement de neutrophiles au site d'inflammation diminue suite à la libération de molécules lipidiques comme les lipoxines, les résolvines et les protectines par les cellules environnantes. Les lipides constituent un élément important de la résolution de l'inflammation et la modification de leur sécrétion, qui passe des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (prostaglandines et leukotriènes) aux médiateurs lipidiques anti-inflammatoires, entraîne une diminution de la perméabilité vasculaire et conséquemment, du recrutement de neutrophile au site inflammatoire. De plus, la présence de ces nouveaux médiateurs lipidiques permet le recrutement des monocytes et l'activation et macrophages (Serhan et Savill, 2005).

La seconde étape de la résolution de l'inflammation est l'apoptose. Cette mort cellulaire programmée constitue un des éléments les plus importants de l'élimination des cellules immunitaire suite à la réponse inflammatoire. (Haslett et al., 1994; Savill et Haslett, 1995; Savill, 1997) La majorité des lymphocytes recrutés au site d'inflammation se dirigeront vers l'apoptose une fois leurs fonctions effectuées. L'élimination adéquate des

neutrophiles constitue une étape très importante de la résolution de l'inflammation, puisque ces derniers sont à la base du développement de la réponse immunitaire. Les macrophages et les cellules dendritiques sont les principales cellules responsables de l'élimination des neutrophiles apoptotiques (Savill et al., 2002). Ces cellules sont aussi connues sous le nom de phagocytes professionnels et contrairement au neutrophile, qui effectue la phagocytose par le biais de récepteurs plus généraux, comme ceux du complément et des récepteurs Fc, elles utilisent des récepteurs spécifiques pour reconnaître les éléments qu'elles doivent éliminer. Les neutrophiles apoptotiques subissent plusieurs modifications intracellulaires caractéristiques, comme la condensation et la fragmentation de l'ADN, le compactage de organelles, la réorganisation du cytosquelette et la dilatation du réticulum endoplasmiques. Les cellules deviennent plus petites et leur noyau devient rond. De plus, un autre élément caractéristique de l'apoptose est l'expression, à la surface, de la phosphatidylsérine, qui est un lipide membranaire généralement retrouvé sur la surface intracellulaire de la membrane plasmique. L'expression de ce lipide spécifique permet la reconnaissance spécifique et la phagocytose subséquente des neutrophiles apoptotiques par les macrophages activés (Edwards, 1994; Homburg et Roos, 1996; Witko-Sarsat et al., 2000).

Enfin, l'ingestion de neutrophiles apoptotiques par les macrophages et les cellules dentritiques entraîne la libération, par ces cellules, de cytokines anti-inflammatoires qui vont aussi contribuer à diminuer le recrutement de cellules au site d'inflammation et à atténuer la réponse inflammatoire (Savill et al, 1989; Savill, 1992; Savill et al., 2002). Ces médiateurs vont agir soit sur les cellules endothéliales, afin de limiter la transmigration des cellules, ou peuvent aussi se retrouver dans la circulation sanguine, afin d'inhiber l'activation des cellules. La phagocytose de neutrophiles apoptotiques entraîne aussi l'inhibition de la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 et le GM-CSF (Figure 6) (Savill et al., 2002).

Lorsque la résolution de l'inflammation ne s'effectue pas correctement et que les neutrophiles ne sont pas éliminés efficacement, il y a persistance de l'inflammation. Entre autres, l'élimination inadéquate des neutrophiles apoptotiques peut mener ces cellules

vers un état de nécrose secondaire, durant lequel le contenu intracellulaire du neutrophile est libéré dans le milieu extracellulaire (Savill, 1997). Tel que mentionné précédemment, les neutrophiles contiennent une panoplie de molécules toxiques permettant de détruire les microorganismes, qui sont non-spécifiques et qui peuvent donc aussi détruire les cellules de l'hôte. Ces situations peuvent entraîner de graves dommages tissulaires pouvant mener à une perte de fonction des tissus et organes ainsi qu'au développement de maladies inflammatoires.

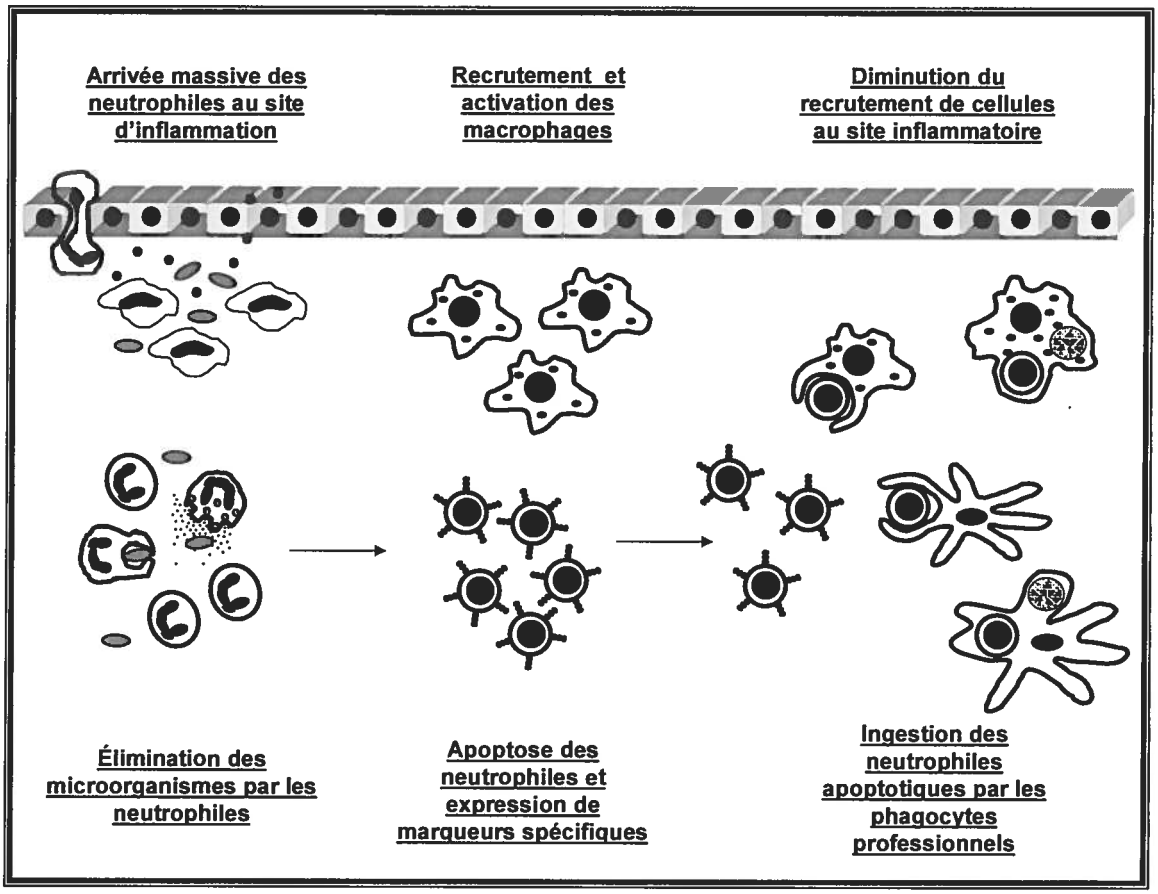



**Figure 6:** **Résolution de l'inflammation.** Après avoir effectué leurs fonctions, les neutrophiles se dirigent vers l'apoptose et seront ingérés par les phagocytes professionnels qui permettront leur élimination.

### 3.2. Participation potentielle de l'IL-4 et des neutrophiles dans certaines maladies inflammatoires

Les maladies inflammatoires sont le résultat d'une réponse exagérée ou inadéquate du système immunitaire. Elles sont souvent le résultat de l'action simultanée de plusieurs cytokines et cellules. De ce fait, il est souvent difficile de d'identifier un responsable unique de la maladie. Cependant, certaines cytokines ou cellules peuvent avoir un impact considérable sur le développement ou la sévérité de la maladie. Il s'avère donc important de bien comprendre l'implication de l'interleukine-4, vu son rôle majeur dans la polarisation Th2 de la réponse inflammatoire, et des neutrophiles, importants dans le développement de la réponse immunitaire, dans les différentes maladies inflammatoires. Certaines de ces maladies seront présentées à titre d'exemples.

L'interleukine-4 est associée principalement aux maladies inflammatoires impliquant une réponse immunitaire de type Th2. Toutefois, tel que mentionné précédemment, elle peut aussi avoir des effets sur les cellules épithéliales, les cellules B, les neutrophiles, et sur la sécrétion de cytokines dans le milieu extracellulaire. Elle peut donc avoir plusieurs effets dans le développement de maladies inflammatoires. Les neutrophiles, vu leur importance dans la circulation sanguine ainsi que sur les lieux d'inflammation, sont impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires. Aussi, quoi qu'ils aient généralement un rôle bénéfique pour l'hôte, les neutrophiles sont une source potentielle de molécules toxiques, tant pour les microorganismes invasifs, que pour les cellules de l'organisme. Finalement, tel que mentionné précédemment, leur activation exagérée ou leur élimination inadéquate suite à une réponse inflammatoire, peut mener à la perpétuation de l'inflammation, c'est pourquoi ils peuvent avoir un rôle clé dans certaines maladies inflammatoires ou encore contribuer à l'aggravation de certaines maladies.

### 3.2.1. L'asthme

Tout d'abord, l'IL-4 constitue un joueur clé dans l'inflammation allergique et plus particulièrement dans l'asthme, une maladie chronique caractérisée par une bronchoconstriction et une hyperréactivité des voies respiratoires. Parmi les effets de l'IL-4 favorisant la maladie, notons que l'induction de la différenciation des cellules Th0 en cellules Th2 combinée à l'inhibition de l'apoptose des cellules Th2 permet aux cellules Th2 de persister au lieu d'inflammation. L'interleukine-4, tel que mentionné précédemment, augmente aussi l'expression de l'intégrine VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales et elle induit la production d'anticorps de type IgE, ce qui favorise l'état pathologique (Steinke et Borish, 2001). L'interleukine-13, puisqu'elle partage plusieurs fonctions avec l'IL-4, est aussi une cytokine importante dans le développement de l'asthme (Chatila, 2004). Il y a quelques années, il a été suggéré que le blocage des effets de l'interleukine-4, soit par inhalation de son récepteur spécifique, soit par l'utilisation d'anticorps bloquants, pouvait s'avérer une voie prometteuse de guérison pour les patients (Steinke et Borish, 2001). Toutefois, les études ultérieures ont démontré que malgré qu'elle puisse améliorer l'état de certaines catégories de patients, l'inhibition seule des effets de l'IL-4 ne suffisait pas à éradiquer complètement la maladie, qui serait causée par l'action simultanée de plusieurs facteurs (O'Byrne, Inman et Adelroth, 2004).

Les neutrophiles sont présents en grande quantité dans les tissus respiratoires des patients atteints d'asthme. Il semblerait qu'ils soient remplacés par les éosinophiles dans les stades plus avancés de la maladie (Zaitsu et al., 2000). Les neutrophiles contribuent à amplifier l'inflammation allergique en produisant la leukotriène $B_4$ ($LTB_4$). La $LTB_4$ est un médiateur lipidique, qui induit la chimioattraction des neutrophiles et des éosinophiles. Il a aussi été démontré que l'IL-4, qui est une cytokine importante dans l'asthme, augmentait la production de $LTB_4$ par les neutrophiles *in vitro* (Zaitsu et al., 2000). Elle augmenterait l'activité et la synthèse de l'enzyme $LTA_4$ hydrolase chez les neutrophiles, qui constitue l'étape finale de la production de la $LTB_4$. L'interleukine-4 aurait donc un effet modulateur sur les fonctions des neutrophiles dans les voies respiratoires en plus de ces autres effets qui lui ont été attribués précédemment. Les neutrophiles auraient aussi un

double rôle dans la pathologie de l'asthme puisqu'ils endommagent l'épithélium des voies respiratoires tout en recrutant plus de cellules inflammatoires.

### 3.2.2. La colite ulcéreuse et la maladie de Crohn

Une autre maladie inflammatoire dans laquelle l'IL-4 est impliquée est la colite ulcéreuse. Cette maladie chronique fait partie, comme la maladie de Crohn, des maladies inflammatoires de l'intestin et elle affecte plus particulièrement le gros intestin. Toutefois, contrairement à la maladie de Crohn, qui est caractérisée par la présence de cellules de type Th1, la colite ulcéreuse se caractérise par une polarisation Th2. Encore une fois, l'interleukine-13, qui serait dans ce cas produite par les cellules NK présentes au site d'inflammation, est aussi impliquée dans cette maladie (Targan et Karp, 2005). Une étude a démontré que les souris déficientes en IL-4 développaient moins ou ne développaient pas de colite ulcéreuse comparativement à des souris témoin (Stevceva et al.,, 2001), alors que le traitement avec des anticorps reconnaissant l'IL-4 diminuait considérablement la sévérité de la maladie (Boirivant et al., 1998; Iijima et al., 1999).

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont caractérisées par une inflammation persistante des intestins due à une migration constante de lymphocytes de macrophages et de granulocytes dans la muqueuse intestinale. Cette dernière contient de nombreux chimioattractants tel l'IL-8, ENA-78 (CXCL5, chimioattractant des neutrophiles) et MCP-1, qui contribuent au recrutement des neutrophiles et des macrophages (MacDermott, 1999). Dans ces maladies, on note une accumulation des neutrophiles dans les cryptes de l'épithélium intestinal et dans la lumière de l'intestin, causant des dommages aux cellules épithéliales. Cette accumulation serait due à une augmentation de la transmigration des neutrophiles (Targan et Karp, 2005; Chin et Pakos, 2006). Il a aussi été remarqué que l'apoptose des neutrophiles était retardée dans ces maladies, ce qui pourrait contribuer à leur présence persistante. (Brannigan et al., 2000).

### 3.2.3. Le lupus

L'interleukine-4 aurait possiblement un rôle à jouer dans le lupus érythémateux systémique (LES), toutefois, la littérature à ce sujet reste controversée. Le lupus est le nom d'un groupe de maladies auto-immunes chroniques desquelles fait partie le LES et qui sont caractérisées par une inflammation de plusieurs organes entraînant la douleur. Cette maladie prend sa source dans une production incontrôlée d'anticorps reconnaissant des antigènes de l'hôte et entraînant une inflammation persistante (Singh, 2003). Certaines études concluent à une implication de l'IL-4 dans le LES et l'expliquent en partie par le fait que l'IL-4 stimule la production d'anticorps par les cellules B ou encore qu'elle affecte la balance Th1/Th2, alors que d'autres équipes ne voient aucun effet. (Singh, 2003) Une autre équipe a démontré que l'effet de l'IL-4 dans la pathologie du LES pouvait varier d'un individu à l'autre selon l'expression de différents isoformes de la chaîne IL-4Rα du récepteur de l'IL-4 (Shiroiwa et al., 2006). Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus jusqu'à maintenant ne permettent pas de définir de façon exacte le rôle de l'IL-4 dans le LES.

Dans le lupus, on observe aussi une infiltration de neutrophiles due à la présence de complexe immuns formés d'anticorps reconnaissant l'hôte, qui sont produits par les cellules B. Toutefois, les patients atteints de LES présentent aussi une diminution du nombre de neutrophiles ainsi que de leurs fonctions, conduisant à une augmentation de la susceptibilité aux infections bactériennes (Hsieh et al., 2003). Il apparaît que les patients atteints de LES auraient un dysfonctionnement au niveau des fonctions des neutrophiles, de leur apoptose, ainsi que de leur élimination par les macrophages. En effet, il a été démontré que les patients atteints de lupus présentaient un taux de neutrophiles apoptotiques plus élevé que les individus non atteints (Courtney et al., 1999). De plus, on observait, chez ces patients, une accumulation de neutrophiles en phase de nécrose secondaire due à une incapacité des macrophages d'effectuer leur phagocytose de façon efficace (Ren et al., 2003). Le sérum des patients atteints de lupus augmentait les taux d'apoptose et de nécrose secondaire des neutrophiles de patients sains. Finalement, certains patients atteints de lupus ont aussi des anticorps reconnaissant les neutrophiles

dans leur sérum, ce qui pourrait aussi contribuer à leur disparition (Hsieh et al., 2003). Comme la nécrose secondaire entraîne le relâchement des molécules toxiques des neutrophiles dans leur environnement, il peut en résulter des dommages tissulaires et une augmentation de l'inflammation. Les neutrophiles seraient donc impliqués à la fois dans la persistance de l'inflammation et dans la susceptibilité aux bactéries dans le lupus.

### 3.2.4. La maladie de Behcet et la granulomatose de Wegener

Les vasculites sont un groupe de maladies inflammatoires qui affectent les vaisseaux sanguins. La maladie de Behcet est une forme de vasculite caractérisée par une inflammation chronique des vaisseaux sanguins. Les patients en phase inflammatoire de la maladie présente un taux d'IL-4 plus élevé que les patients en phase de rémission (Aridogan et al., 2003). Les patients présentent des marqueurs à la fois de réponse Th1 et de réponse Th2, ce qui indiquerait plus une désorganisation qu'une polarisation spécifique de la réponse (Al-Mutawa et Hegab, 2004). Cependant, ces observations demeurent toujours controversées et une autre étude démontre une diminution des cellules produisant l'IL-4 chez les patients atteints de cette maladie (Houman et al., 2004). L'IL-4 aurait donc potentiellement un rôle à jouer dans ce type de vasculite.

Les neutrophiles seraient aussi impliqués dans la maladie de Behcet. Dans cette inflammation, les neutrophiles présentent une hyperréactivité, ainsi qu'une augmentation de la production de superoxide, de la phagocytose et du relâchement de leurs enzymes protéolytiques (Houman et al., 2004). Donc, les neutrophiles seraient impliqués dans les vasculites, car ils causeraient des dommages aux vaisseaux sanguins et pourraient contribuer à la persistance de l'inflammation.

Les vasculites sont classifiées selon la grosseur du vaisseau sanguin affecté, les symptômes et l'histopathologie observée. Les vasculites de type pauci-immunes, dont fait partie la granulomatose de Wegener, sont caractérisées par la présence d'anticorps de type ANCA pour « antineutrophil cytoplasmic autoantibodies », reconnaissant des

constituants cytoplasmiques des neutrophils (Kallenberg, Heeringa et Stegeman, 2006). Il a été démontré que les neutrophiles pouvaient être activés par les ANCA et que leur activation entraînait la production de radicaux libres ainsi que le relâchement d'enzymes des granules lorsque les neutrophiles avaient été activés par certaines cytokines (Falk et al., 1990). Selon le modèle proposé, les neutrophiles seraient activés suite à une infection locale ou systémique, ils se rendraient au site d'inflammation et les ANCA stimuleraient leur dégranulation par le biais des récepteurs de type Fc. Le relâchement du contenu des granules des neutrophiles serait responsable de la vasculite résultante (Witko-Sarsat et al., 2000; Kallenberg, Heeringa et Stegeman, 2006).

### 3.2.5. L'arthrite

Les neutrophiles sont présents en grande quantité dans les articulations des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Cette maladie systémique est initiée par l'accumulation de complexes immuns dans les articulations et elle conduit à la destruction des cartilages et des os (Weissmann, 2006). Les chondrocytes des articulations affectées relâchent des quantités importantes d'IL-8, qui contribue à recruter des neutrophiles. Sur les lieux de l'inflammation, les neutrophiles sont stimulés par les complexes immuns par le biais de leurs récepteurs Fc et ils causent des dommages aux cartilages en relâchant leurs molécules toxiques (Witko-Sarsat et al., 2000).

Les neutrophiles ont aussi un rôle à jouer dans la pathologie de la maladie de la goutte. Cette forme d'arthrite est caractérisée par des taux élevés d'acide urique dans l'organisme des patients atteints entraînant une accumulation de cristaux d'urate monosodique dans les articulations. Ces cristaux sont responsables de l'inflammation observée. Les neutrophiles ingèrent les cristaux par phagocytose et ces derniers induisent leur dégranulation ou perforent les membranes des neutrophiles. Conséquemment, le contenu des toxique des granules des neutrophiles est libébé, causant des dommages considérables aux cellules des articulations (Witko-Sarsat et al., 2000; Cronstein et Terkeltaub, 2006).

### 3.2.6. La fibrose kystique

Les neutrophiles sont présents en grande quantité dans les voies respiratoires des patients atteints de fibrose kystique. Les neutrophiles seraient responsables de la destruction des tissus et leur ADN, relâché dans les fluides des voies respiratoires, mènerait à l'épaississement du mucus ainsi qu'à l'obstruction des bronches. (Witko-Sarsat et al., 1999; Witko-Sarsat et al., 2000). L'arrivée massive et incontrôlée des neutrophiles serait causée par la production de chimioattractants, comme l'IL-8, par les cellules des voies respiratoires, mais le mécanisme exact de leur activation demeure encore inconnu (Conese et al., 2003). De plus, ces neutrophiles présenteraient souvent une capacité de flambée oxydative accrue ainsi qu'une plus grande capacité à libérer le contenu de leurs granules, ce qui indiquerait que les neutrophiles seraient déjà activés lors de leur arrivée dans les voies respiratoires.

# SECTION 2 : RÉSULTATS

## Objectifs du projet de recherche

Les expériences que nous avons effectuées dans le câdre de mon projet de doctorat avaient pour but d'acquérir une meilleure connaissance des effets de l'IL-4 sur les neutrophiles. Cette cytokine est connue pour être un agoniste des neutrophiles, mais peu d'études se sont penchées sur les mécanismes d'action de cette cytokine chez ces leucocytes. Nos travaux avaient comme objectifs spécifiques :

1. D'étudier la signalisation intracellulaire associée à l'activation du récepteur de l'IL-4 chez les neutrophiles humains.

    1.1. Déterminer quelles cascades de signalisation activatrices sont enclenchées suite à une stimulation des neutrophiles humains avec l'IL-4 et plus précisément quelles protéines sont phosphorylées.

        1.1.1. Stimuler les neutrophiles avec l'IL-4 et lyser les cellules afin d'effectuer des expériences d'immunobuvardage de type Western.

        1.1.2. Vérifier la perte des effets de l'IL-4 sur les neutrophiles suite à l'utilisation d'inhibiteurs des différentes cascades de signalisation pouvant être impliquées en mesurant les niveaux d'apoptose des neutrophiles.

    1.2. Déterminer quelles cascades de signalisation inhibitrices et plus précisément quels membres de la famille des SOCS sont exprimés lors d'une stimulation avec l'IL-4 chez les neutrophiles humains.

*Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans l'article 1.*

2. D'éclaircir les mécanismes de signalisation intracellulaire induits par l'IL-4 chez les neutrophiles et durant leur différenciation en utilisant la lignée cellulaire PLB-985, pouvant être différenciée en cellules semblables aux neutrophiles, ainsi que les cellules PLB-985 ne possédant pas la composante gp91phox de la NADPH oxydase.

2.1. Vérifier quels types de récepteurs de l'IL-4 sont présents à la surface des cellules différenciées ou non par cytométrie en flux.

2.2. Vérifier si les cascades de signalisations induites par l'IL-4 sont les mêmes que chez les neutrophiles humains dans les cellules différenciées ou non par immunobuvardage de type Western.

2.2.1. Utiliser des inhibiteurs afin de mieux comprendre quels sont les mécanismes essentiels à l'augmentation de l'expression de SOCS3 induite par l'IL-4.

*Les résultats obtenus font l'objet de l'article 2.*

3. De vérifier le potentiel chimiotactique et pro-inflammatoire de l'IL-4 sur les neutrophiles.

3.1. Étudier le potentiel chimioattractant de l'IL-4 *in vitro* sur les neutrophiles humains en utilisant une chambre de Boyden modifiée.

3.2. Utiliser le modèle murin de la poche d'air afin de voir si l'IL-4 peut recruter des cellules *in vivo*.

3.2.1. Vérifier quels types de cellules sont recrutés dans les poches des souris dans lesquelles l'IL-4 est injectée comparativement aux poches dans lesquelles la solution témoin est injectée.

3.2.2. Analyser quelles cytokines sont présentes dans les poches de souris en effectuant des expériences de type « protein array ».

3.2.3. Déterminer quelles cellules pourraient être la source des cytokines présentes dans les poches de souris en récoltant les cellules tapissant les poche d'air des souris, la peau complète ou en stimulant certaines lignées cellulaires avec l'IL-4.

*L'article 3 présente les résultats des expériences effectuées afin d'atteindre ces objectifs.*

Article 1

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

**Titre**

Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling.

**Auteurs**

Claude Ratthé, Martin Pelletier, Sonia Chiasson et Denis Girard.

**Publié dans la revue**

Journal ofLeukococyte Biology. 2007 May;81(5):1287-96. Epub 2007 Jan 30.

**Contribution personnelle**

Cet article contient les résultats de la première partie de mon projet de doctorat. J'en suis l'auteure principale et j'ai effectué toutes les expériences décrites dans l'article à l'exception de celles présentées à la figure 3. J'ai aussi effectué les corrections et les expériences supplémentaires demandées par les arbitres. J'ai participé à l'élaboration du projet, à la planification des expériences, à l'élaboration des protocoles et j'ai rédigé la première version du manuscrit. J'ai aussi participé aux analyses statistiques, aux analyses des résultats, à la mise en forme des figures et à la correction de la version finale du manuscrit.

**Contribution des coauteurs**

Martin Pelletier a effectué les expériences de la figure 3a et Sonia Chiasson a effectué les expériences reliées aux résultats des figures 3b et 3c. Ces expériences portaient sur l'activation de la voie Jak/Stat par l'interleukine-4. Le Dr. Girard a participé à la planification des expériences, à l'élaboration de protocoles et a supervisé toutes les expériences. Il a aussi corrigé et retravaillé le manuscrit, effectué des analyses statistiques, des analyses de résultats et rédigé les documents de réponse aux arbitres.

## 1.1 Résumé en français de l'article 1

L'interleukine-4 (IL-4) est une cytokine dépendante du CD132 connue pour activer la cascade de signalisation Jak/STAT dans différentes cellules et lignées cellulaires. Même s'il a été démontré que l'IL-4 est un agoniste des neutrophiles humains, sa capacité à activer différentes cascades de signalisation dans ces cellules n'a jamais été étudiée. Il existe deux types de récepteurs de l'IL-4 (IL-4R) : le type I (l'hétérodimère CD132/IL-4Rα) et le type II (l'hétérodimère IL-4Rα/IL-13Rα1). Nous avons démontré précédemment que les neutrophiles expriment le récepteur de type I de l'IL-4. Dans cette étude, en utilisant la cytométrie en flux, nous démontrons que les neutrophiles, contrairement aux cellules U-937, n'expriment ni l'IL-13Rα1, ni l'IL-13Rα2 et confirmons l'expression du CD132 et de l'IL-4Rα à leur surface. Nous démontrons aussi que l'IL-4 induit la phosphorylation de Syk, p38, Erk-1/2, JNK, Jak-1, Jak-2, STAT6 et STAT1 et que le traitement des cellules avec les inhibiteurs picéatannol, SB203580, PD98059 ou AG490 renverse la capacité de l'IL-4 à retarder l'apoptose des neutrophiles. En utilisant la technique de RT-PCR, nous démontrons pour la première fois que les neutrophiles expriment l'ARN messager de tous les membres de la famille des « suppressor of cytokine signalling » (SOCS), soit SOCS1-7 et CIS (cytokine inducible Src homology 2 protein). Il est intéressant de noter que l'IL-4 augmente l'expression de SOCS3 au niveau de l'ARN messager et de la protéine. L'effet de l'IL-4 sur l'expression protéique de SOCS3 augmente de façon marquée lorsque l'inhibiteur de protéasome MG132 est ajouté aux cultures, mais cet effet était inhibé par la cycloheximide, suggérant que SOCS3 serait synthétisé *de novo* en réponse à l'IL-4. Nous concluons que les neutrophiles expriment seulement le récepteur de type I de l'IL-4 à leur surface et que l'IL-4 induit différentes cascades de signalisation incluant la cascade Jak/STAT/SOCS.

Article 2

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

**Titre**

Investigation of the interleukin (IL)-4/IL-4 receptor system in promyelocytic leukemia PLB-985 cells during differentiation toward neutrophil-like phenotype: mechanism involved in IL-4-induced SOCS3 protein expression.

**Auteurs**

Claude Ratthé et Denis Girard.

**Publié dans la revue**

British Journal ofHaematology. 2008 Jan;l40(1):59-70.

**Contribution personnelle**

Cet article contient les résultats de la deuxième partie de mon projet de doctorat. J'en suis l'auteure principale et j'ai effectué toutes les expériences décrites. J'ai participé à l'élaboration du projet, à la planification des expériences, à l'élaboration des protocoles et j'ai rédigé la première version du manuscrit. J'ai aussi participé aux analyses statistiques, aux analyses des résultats, à la mise en fonne des figures et à la correction de la version finale du manuscrit.

**Contribution des coauteurs**

Le Dr. Girard a participé à la planification des expériences, à l'élaboration de protocoles et a supervisé toutes les expériences. Il a aussi corrigé et retravaillé le manuscrit, effectué des analyses statistiques et des analyses de résultats.

## 2.1 Résumé en français de l'article 2

Le système IL-4/IL-4R chez les promyélocytes n'est pas bien documenté. Dans cette étude, nous avons différencié les cellules promyélocytaires leucémiques PLB-985 vers un phénotype semblable à celui des neutrophiles (PLB-985D) avec le dimethylsulfoxide afin d'étudier le système IL-4/IL-4R. Nous avons démontré que les cellules PLB-985 n'expriment pas le CD132 (γc), mais qu'elles expriment le récepteur complet de type II de l'IL-4 (IL-4Rα et IL-13Rα1). De plus, les cellules PLB-985 perdent leur expression de surface de l'IL-13Rα1 durant la différentiation, menant à des cellules PLB-985D exprimant seulement l'IL-4Rα, mais répondant parfaitement à l'IL-4, tel que mesuré par l'activation des MAP kinases et de Jak-1. L'IL-4 a aussi augmenté l'expression de la protéine SOCS3 en présence de l'inhibiteur de protéasome MG132 exclusivement dans les cellules PLB-985D. Puisqu'il a été démontré que l'IL-4Ra pouvait s'associer avec une composante de la NADPH oxydase, nous avons utilisé les cellules PLP-985 déficientes en gp91phox (mimant la granulomateuse chronique ou X-CGD), afin d'étudier le système IL-4/IL-4R dans les cellules X-CGD-D. Nous avons démontré que l'IL-4 active les MAP kinases dans les cellules X-CGD-D, mais qu'elle n'induit pas d'augmentation de l'expression de la protéine SOCS3, contrairement au G-CSF, au GM-CSF et à l'IL-6. L'utilisation des inhibiteurs catalase, cycloheximide et génistéine, nous a permis de démontrer que l'IL-4 induit l'expression de SOCS3 par un mécanisme dépendant de la présence d'un complexe NADPH oxydase intact, de la synthèse protéique et de la phosphorylation des résidus tyrosine, mais indépendant de la production de réactifs oxygénés. Nous concluons que l'IL-4 induit la signalisation intracellulaire dans les promyélocytes qui expriment seulement l'IL-4Rα.

Article 3

**Titre**

Interleukin (IL)-4 attracts neutrophil and monocytic cell populations in vivo by a mechanism involving the production of several analytes by murine air pouch resident cells expressing the IL-4 receptor.

**Auteurs**

Claude Ratthé et Denis Girard.

**Soumis à la revue**

Clinical and Experimental Immunology

**Contribution personnelle**

Cet article contient les résultats de la deuxième partie de mon projet de doctorat. J'en suis l'auteure principale et j'ai effectué toutes les expériences décrites. J'ai participé à l'élaboration du projet, à la planification des expériences, à l'élaboration des protocoles et j'ai rédigé la première version du manuscrit. J'ai aussi participé aux analyses statistiques, aux analyses des résultats et à la mise en forme des figures.

**Contribution des coauteurs**

Le Dr. Girard a participé à la planification des expériences, à l'élaboration de protocoles et a supervisé toutes les expériences. Il a aussi corrigé et retravaillé le manuscrit, effectué des analyses statistiques et des analyses de résultats.

## 3.1 Résumé en français de l'article 3

Les neutrophiles sont impliqués dans l'inflammation et sont des cibles de l'interleukine-4 (IL-4). Par ailleurs, l'IL-4 est considérée principalement comme une cytokine anti-inflammatoire. Dans cette étude, nous démontrons que l'IL-4 augmente la migration et l'adhésion des neutrophiles humains, deux étapes importantes du recrutement cellulaire. Des expériences de cinétique utilisant le modèle de la poche d'air murine révèlent que l'IL-4 augmente significativement le nombre de leucocytes après 9h de traitement, soit principalement des neutrophiles (65%) et des monocytes, tel qu'identifié par cytométrie en flux. À l'aide d'une expérience de type « antibody array » reconnaissant des cytokines reliées à l'inflammation, nous avons démontré que l'IL-4 augmente l'expression de plusieurs chimiokines dont principalement MCP-1 et LIX, qui étaient les plus augmentés après 6h, soit avant l'arrivée de leucocytes. Lorsque nous avons récolté les leucocytes attirés après 6h, nous avons observé une augmentation de l'ARN messager de MCP-1, mais non de LIX suite au traitement à l'IL-4, suggérant que d'autres cellules seraient impliquées dans la production des cytokines. Nous avons récolté les cellules tapissant la poche d'air des souris et démontré qu'elles expriment l'IL-4Rα. Nous avons vérifié les niveaux d'expression de l'ARN messager de MCP-1 et de LIX dans les cellules tapissant la poche d'air des souris, dans la lignée cellulaire de macrophage murins RAW264.7 et dans la lignée cellulaire épithéliale Mode-K suite à un traitement à l'IL-4. L'ARN messager de MCP-1 était augmenté par l'IL-4 dans toutes les cas, alors que LIX était seulement légèrement augmenté dans les cellules tapissant la poche d'air. Nous concluons que l'IL-4 est une cytokine pro-inflamatoire qui attire les neutrophiles et les monocytes *in vivo*, selon un mécanisme indirect impliquant plusieurs facteurs solubles, incluant MCP-1, qui serait produit par les cellules tapissant la poche d'air exprimant l'IL-4Rα.

3.2 Texte original de l'article 3

Interleukin (IL)-4 attracts neutrophil and monocytic cell populations in vivo by a mechanism involving the production of several analytes by murine air pouch resident cells expressing the IL-4 receptor.

**Claude Ratthé and Denis Girard*†**

From INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Québec, Canada

Corresponding author: Denis Girard, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier
245 boul. Hymus, Pointe-Claire (Qué)
Canada, H9R 1G6
Tel/Fax: (514) 630-8847/8850
**E-mail: denis.girard@ iaf.inrs.ca**

**Running title: IL-4 induces inflammation in vivo**

†This study was partly supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-89534) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CR holds a PhD Canada Graduate Scholarships Doctoral Award and DG is a Scholar from FRSQ.

## ABSTRACT

Neutrophils are implicated in inflammation and are targets of interleukin (IL)-4. However, IL-4 is considered predominantly as an anti-inflammatory cytokine. Here, we show that IL-4 increases human neutrophil migration in vitro, an important step for cell recruitment in vivo. Using the murine air pouch model, kinetic experiments revealed that IL-4 significantly increased the number of leukocytes after 9h of treatment, consisting mainly of neutrophil (60%) and monocytic (40%) populations. Using an antibody array assay related to inflammation, we found that the expression of several analytes was increased by IL-4, some of which included MCP-1 and LIX, the two predominant analytes, were increased after 6h, thus before the arrival of leukocytes. When the attracted leukocytes were harvested after 6h, the level of expression of MCP-1 mRNA, but not that of LIX, was increased by IL-4, suggesting that other cells are involved in the production of analytes. Air pouch resident lining cells were harvested and were found to express IL-4Rα. The level of expression of MCP-1 and LIX mRNA was monitored in response to IL-4 in lining cells, cells isolated from the air pouch skin (inner layer), in murine RAW264.7 macrophage and in epithelial Mode-K cells. MCP-1 mRNA expression was increased by IL-4 in all conditions while LIX was only minimally increased in skin cells. We conclude that IL-4 is a pro-inflammatory cytokine attracting neutrophil and monocytic cell populations in vivo by an indirect mechanism involving several soluble factors, including MCP-1, produced by resident cells expressing the IL-4 receptor.

## INTRODUCTION

Neutrophils are the first blood leukocytes to arrive to an inflammatory site. The process of transendothelial migration from the blood to the tissue is complex and involves response to chemotactic factors and binding to adhesion molecules at the endothelium surface (1,2). These events permit the extravasation of blood neutrophils to the tissue where they can perform different functions (3). Major roles of neutrophils include phagocytosis, production of reactive oxygen species and production of chemoattractants such as IL-8, which recruit further competent cells (4). Neutrophil response usually terminates when neutrophils undergo apoptosis and are phagocytosed by arising macrophages (5). However, in certain inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis or inflammatory bowel diseases, neutrophils persist at the inflammatory site, and perpetuating the inflammation (6-10).

Interleukin-4 (IL-4) is a member of the CD132-dependent cytokines which also comprises IL-2, -7, -9, -15 and -21 (11,12). There are two distinct IL-4 receptors: type I, which is composed of IL-4Rα and CD132 (or γc), and type II receptor, composed of IL-4Rα and IL13Rα1 chains (13,14). IL-4 has largely been associated with anti-inflammatory functions since it decreases monocyte and macrophage functions (15-18) and induces a $Th_2$ type response (19,20). However, IL-4 can also be considered as pro-inflammatory, since its expression and a $Th_2$ type response are associated with allergies and asthma (21), but it is still regarded mainly as an anti-inflammatory cytokine. IL-4 was also found to possess other pro-inflammatory functions, such as the recruitment of inflammatory cells by increasing the expression of VCAM-1 on the endothelial surface (22) and increasing eosinophils, macrophages and B cells chemoattraction (23-26). This dual role can be of great importance for ameliorating or developing alternative therapies. For instance, IL-4 has been considered as a candidate for the treatment of rheumatoid arthritis, since it induces a $Th_2$ biased response (27,28). Paradoxically, other studies show that IL-4 is implicated in the development of inflammatory arthritis (29,30), demonstrating the need for a better understanding of IL-4 pro-inflammatory functions.

Neutrophils are known to express the type I IL-4R (IL-4Rα/CD132) but not the type II IL-4R (IL-4Rα/IL-13Rα1) (31-33). Interestingly, IL-4 may possess both pro- and anti-inflammatory

roles in neutrophils. For example, IL-4 induces production of an IL-1R antagonist considered to be an anti-inflammatory cytokine that blocks IL-1 effects (34,35). The pro-inflammatory activity of IL-4 includes its ability to delay neutrophil apoptosis and the fact that it increases neutrophil IL-8 production (31), contributing to the recruitment of other leukocytes to site of inflammation. Studies have shown that the presence of neutrophils in asthma conjugated with increased IL-4 concentrations contribute to the severity of the disease (36,37). Even if many aspects of IL-4 effects on neutrophils have been studied, the direct chemotactic potential of IL-4 in neutrophils in vitro and in vivo is not clear.

In this study, we demonstrate that IL-4 increases human neutrophil chemotaxis and chemokinesis in vitro. In addition, we show that IL-4 enhances cell adhesion of neutrophils. Using the murine air pouch model of inflammation, we show that IL-4 induces the recruitment of neutrophils and monocytes-macrophages into the air pouch and that MCP-1 was the major chemokine found in exudates prior to the appearance of new leukocytes in IL-4-treated pouches as compared to controls. Finally, we demonstrate that the air pouch lining cells express IL-4Rα and that IL-4 induces MCP-1 mRNA in these cells. We conclude that IL-4 is a pro-inflammatory cytokine attracting leukocytes in vivo acting indirectly, at least partially, via the local production of cytokines/chemokines by the air pouch resident cells.

## MATHERIALS AND METHODS

**Chemicals and agonists.** Recombinant murine IL-4 was purchased from R&D systems Inc (Minneapolis, MN). Lipopolysaccharide (LPS; from *Escherichia coli* 0111.B4) was purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO), Isofurane was purchased from Pharmaceuticals Partners of Canada Inc (Richmond Hill, Ontario).

**Neutrophils isolation** Neutrophils were isolated from the venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Quebec, Canada) as previously described (33,38). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion, and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations coloured by Hema-stain.

**In vitro chemoattraction and chemokinesis assays.** In vitro chemotaxis was performed in a 48-well microchemotaxis chamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD) using a 3-μM polycarbonate membrane filter as previously published (39). The bottom wells were loaded with buffer or agonists (final volume of 25 μl), the membrane was placed over the wells, and the top layer of the chamber was added over the membrane. Cells [50 μl from a suspension of 1 x $10^6$ cells/ml in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Inc, St-Louis, MO)] were then added to the top chamber wells. The chamber was incubated at 37°C for 60 min in a humidified incubator in the presence of 5% $CO_2$. After incubation, the top of the chamber was removed and the upper side of the membrane was carefully wiped with the rubber scraper furnished by the manufacturer. The membrane was then fixed in methanol, coloured with the Hema-staining kit, mounted on a glass slide, and examined under oil immersion at 400X. The number of cells in five representative fields was counted and the results were expressed as ratios (number of cells from tested group/number of cells from the corresponding control). IL-8 was used as a positive control (39).

**Murine Air Pouch Model.** C57BL/6 mice, 6 to 8 week of age, were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, Canada). On day 0 and 3, mice were anaesthetized with isofurane and 3 ml of sterile air was injected subcutaneously, in the back, with a 26-gauge needle to form an air

pouch as published previously (40,41). On day 6, 1 ml of the following was injected into the air pouch: sterile HBSS, the positive control LPS (1 μg/ml) or murine IL-4 (250 ng/ml). Mice were killed by $CO_2$ asphyxiation 3, 6, 9, 12 or 24h after the treatment and the pouches were washed once with 1 ml and then twice with 2 ml of HBSS containing 10mM EDTA. Exudates were centrifuged at 100 X g for 10 min at room temperature and supernatants were collected and stored at -80°C for further analysis. Cells were resuspended at 0.5 x $10^6$ cells, centrifuged, spread onto microscope slides and stained with Hema-Stain for quantification of leukocyte subpopulations. To further characterize the leukocyte subpopulations, the cells were suspended in PBS containing 5μg/ml human IgG for 30 min at 4°C to block FcRs and then stained for 30 min at 4°C with purified rat anti-mouse 7/4 mAb directed against murine neutrophils or rat anti-mouse F4/80 Ag Ab directed against murine monocytes-macrophages. Experiments were performed under protocols approved by Animal Use and Care Committees at INRS-Insitut Armand-Frappier.

**Cytokine/chemokine protein array.** Mouse inflammation antibody array I kit was purchased from Chemicon International (Temecula, CA) and all the steps for the simultaneous detection of 40 analytes were performed as per the manufacturer's recommendation. Pooled exudates ($n \geq 13$ mice) harvested from HBSS-treated (control), IL-4- or LPS-induced murine air pouches were used to probe the membranes no more than two weeks after the in vivo experiments. The chemiluminescent signal from the bound cytokines/chemokines present in the exudates was detected on Kodak film X OMAT-RA. The signal intensity (each analyte in duplicate) of each spot was normalized to the membrane's positive control (four spots). Results are expressed as ratios (tested group/control). Protein array membranes were scanned and densitometry analysis was performed using the Multi-Analyst program (Bio-Rad, Hercules, CA).

**Air pouch resident cells.** Air pouches were created on the back of C57BL/6 mice as previously described and cells lining the air pouch were harvested and stimulated using two different methods. First, 1ml of trypsin-EDTA was injected in the pouches. After 5 min, cells were collected (hereafter referred to as lining cells) and the pouches were washed twice with 2 ml of HBSS-EDTA. Cells were centrifuged and incubated (10 x $10^6$ cells/ml) with HBSS or 250 ng/ml IL-4 for 6h. Cells were harvested and lysis and RNA extraction were performed as previously

described. Second, 1ml of HBSS or IL-4 was injected in the pouches. After 6h, the skin of the pouch was cut and the first layer of cells lining the cells was manually removed and snap-frozen in liquid nitrogen (hereafter referred as skin cells). Tissues were mechanically crushed in liquid nitrogen using a pestle and mortar. Lysis and RNA extraction were performed as described (33).

**Reverse Transcription and Polymerase Chain reaction (PCR).** Cells (10 x $10^6$ cells/ml in RPMI-Hepes-P/S containing 10% fetal calf serum) were stimulated or not for 6h at 37°C with HBSS, or 250 ng/ml IL-4. Cells were harvested, washed three times with HBSS and RNA extraction was performed using the Absolutely RNA® Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's protocol. The reverse transcription reaction was performed using 0.5 μg of RNA and 200U of the M-MLV enzyme in the following PCR buffer reaction: 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP (dATP. dCTP, dGTP, dTTP), 40U Rnase inhibitor, 0.03U hexamer. PCR reactions were performed using the newly made cDNA, 0.5U Taq Polymerase and the following primers: upstream: 5'-TCC ATG CAG GTC CCT GTC ATG CTT-3', downstream: 5'-CTA GTT CAC TGT CAC ACT GGT C-3' for MCP-1; upstream: 5'- GGT CCA CAG TGC CCT ACG-3' downstream 5'-GCG AGT GCA TTC CGC TTA-3' for LIX; upstream: 5'-CTG GCA CCT GGA GTG AGT GG-3' downstream 5'- ACA GCG CAC CAC ACT GAC ACT-3' for IL-4Rα; upstream: 5'-TCC GAT AAC GAA CGA GAC TC-3', downstream: 5'-CAG GGA CTT AAT CAA CGC AA-3' for the 18S control. Samples were loaded onto a 1.5% agarose gel containing 0.006% ethidium bromide. The bands were visualized using the Biorad Bioscan with a UV lamp and the results were analyzed using the Multi-Analyst program (Biorad, Hercules, CA).

**Cell culture.** Raw 264.7 and Mode-K cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2.5% 1M Hepes, 50U/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin. Cells were grown at 37°C, in a 5% $CO_2$ incubator at concentrations ranging from 0.2 X $10^6$ cells/ml to 1 X $10^6$ cells/ml. Cells were grown to confluence in 6 well microplates and stimulated with HBSS or IL-4 for 6h at 37°C. Cells were scraped and washed twice with HBSS before performing lysis and RNA extraction as previously described (33).

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows Version 3.00 (Copyright© 1992-2003 SPSS Inc.) using a one-was analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was established at $p<0.05$.

## RESULTS

*IL-4 induces human neutrophil chemotaxis and chemokinesis in vitro.* Previous studies demonstrated that IL-4 induces chemoattraction of different cell types such as eosinophils, macrophages, fibroblasts and B cells (42). Here, we decided to investigate the ability of IL-4 to induce chemotaxis in neutrophils. As shown in **Fig. 1**, IL-4 induces neutrophil chemotaxis in a concentration-dependent manner. The effect of IL-4 was significantly different from controls at concentrations of 100 and 250 ng/ml IL-4 but not at a concentration of 10 ng/ml. Next, in order to answer whether or not IL-4 induces only chemotaxis, we performed a checkerboard analysis by adding increased concentrations of IL-4 (10, 100 or 250 ng/ml) to the upper chamber as well as to the bottom chamber. As shown in **Table I**, IL-4 induces both chemotaxis and chimokinesis in human neutrophils.

*Pro-inflammatory effects of IL-4 in vivo.* Because of the above results indicating that IL-4 induces migration (chemotaxis and chimokinesis) of neutrophils in vitro, we next investigated the potential effects of IL-4 in vivo by attracting leukocytes into the murine air pouch. In preliminary experiments, we verified the effect of IL-4 at different concentrations (0, 10, 100 or 250 ng/ml) for treatment of 6h, since two other CD132 cytokines, IL-15 (40) and IL-21 (41), are known to attract leukocytes in vivo in this model. We found that IL-4 did not significantly increase the number of leukocytes when compared with controls, but the percentage of neutrophils was slightly increased in mice treated with 250 ng/ml IL-4, suggesting that an influx of neutrophils may occur later in time or, in contrast, occurs very rapidly (*data not shown*). Therefore, we performed kinetic experiments from 3h to 24h, using LPS as a positive control known to induce a potent acute inflammation between 6-9h, consisting mainly in the recruitment of neutrophils (>75%) disappearing after 12h (40,41). As shown in **Fig. 2**, after 3h, the basal level of total leukocytes observed in control mice receiving the buffer was $0.56 \pm 0.07 \times 10^6$ cells/pouch (mean ± SEM) and was not increased by IL-4, eliminating the possibility that a rapid leukocyte influx occurs at earlier time points. For comparison, as illustrated in the inset of **Fig. 2**, LPS had already attracted ~$2 \times 10^6$ cells/pouch during the sane time period. As expected, the number of leukocytes was similar in control and in IL-4-induced air pouch groups ($0.63 \pm 0.04 \times 10^6$ cells/pouch for control vs $0.64 \pm 0.03 \times 10^6$ for IL-4). However, after 9h of treatment, the number of leukocytes

attracted by IL-4 was significantly increased ($1.5 \pm 0.07 \times 10^6$ for IL-4 vs $0.67 \pm 0.03 \times 10^6$ cells/pouch for control. Thus IL-4 induces migration of leukocytes in vivo, but to a lesser degree less than LPS ($\geq 8 \times 10^6$ cells/pouch). As expected for LPS, the leukocyte infiltration induced by IL-4 disappears rapidly, since less then ~$0.3 \times 10^6$ cells/pouch were observed in control or IL-4-treated pouch animals after 12h. The responses were the same range after 24h.

Because the two main leukocyte populations present in the exudates of the acute inflammation induced in the murine air pouch model by two other CD132-dependent cytokines, IL-15 and IL-21, are neutrophil and monocytic populations, we performed flow cytometry experiments with specific antibodies recognizing these two subpopulations. As shown in **Fig. 3A**, about 60% of cells attracted by IL-4 are neutrophils and 40% are monocytes-macrophages. These results were confirmed by cytology (**Fig. 3B**). As expected, more than 80% of cells attracted by LPS were neutrophils. Interestingly, we found that the percentage of neutrophils started to increase in the exudates 6h after IL-4 administration and continued after 9h. These results indicate that the neutrophil population begins to be modified before the total number of cells in the pouches increases significantly, suggesting the presence of increased soluble factors prior to attraction of neutrophils and/or monocytic cells.

*IL-4 induces the local production of several cytokines/chemokines in vivo; predominance of MCP-1 and LIX.* Because of the above results we performed an antibody array in order to monitor simultaneously 40 different analytes associated with inflammation in kinetic experiments. However, because we treated the mice with IL-4, and since this cytokine is among the tested analytes, we deliberately eliminated the corresponding data. Therefore, the total number of analytes is 39. As illustrated in **Table II**, the levels of cytokine and chemokine expression detected after 3h of treatment with IL-4 were equivalent or even inferior to those obtained from control animals. However, after 6h of treatment with IL-4 the ratios of 14 of 39 analytes were above the level of control set to 1 (**Fig. 4**). Among these, 4 of 14 (MCP-1, LIX, MIG and sTNFRI) exhibited a ratio greater than 1.2. MCP-1 is the most predominant chemokine detected in the exudates of IL-4-induced air pouches with a ratio of 7.25, followed by LIX, MIG and sTNFRI, with a ratio of 1.65, 1.46 and 1.46, respectively. After 9h of treatment, 22 of 39 analytes presented a ratio greater than controls (**Fig. 4**). Among these, 17 of 22 analytes presented

a ratio ≥ 1.2. In contrast to the 6h time point, there were no analytes detected with a ratio greater than 4. In fact, it appears rather that there are more analytes present in the exudates with a ratio ranging from 1.2-2.0. IL-12p70 and IL-13 are the two cytokines detected in greater concentrations with ratios of 2.1 and 2.0, respectively. After 12h, only 5 of 39 analytes exhibited a ratio above 1 and only three, KC, leptin and MIP-1α, had a ratio greater than 1.2, each at 1.44.

For comparison, we investigated the same analytes in parallel experiments with the potent pro-inflammatory agent LPS, known to attract almost exclusively neutrophils in this model. As illustrated in **Fig. 4**, several analytes (6/39) with a ratio greater than 1 are already detected after 3h of treatment with LPS, peaking at 6h (instead of 9h for IL-4) with 30 of 39 analytes with a ratio above 1. Remarkably, the number of analytes with a ratio greater than 1 was weaker than that detected with IL-4 after 9h of treatment (7/39 for LPS vs 22/39 for IL-4), indicating that the response induced by IL-4 is delayed when compared with LPS. When we analyzed the number of analytes with a ratio ≥ 1.2, we observed that LPS not only induced more cytokines/chemokines than IL-4, but also that it produces these factors in larger amounts, according to the detected intensities. The list of the analytes with the corresponding ratios obtained for LPS-induced air pouch is illustrated in **Table III**.

*Expression of IL-4R in murine air pouch lining cells and production of cytokines in response to IL-4.* Because several analytes detected in the exudates of IL-4-induced air pouch were present before the emigration of leukocytes, and since most of them are not necessarily typical neutrophil or monocyte chemoattractants, it is highly plausible that the lining or resident cells from the pouch are the first to interact with IL-4. Therefore, we isolated the lining cells from air pouches and investigated the expression of IL-4R. As illustrated in **Fig. 5** the lining cells expressed both CD132 and IL-4Rα, as assessed by RT-PCR. We confirmed the expression of IL-4Rα at the cell surface of lining cells by flow cytometry. Of note, expression of this component alone is sufficient to induce a signal in response to IL-4. Knowing that the harvested lining cells express the IL-4R, we next stimulated them in vitro (pool of n=9) with IL-4 for 6h and investigated the expression of the same analytes. As illustrated in **Table IV**, 21 of 39 analytes were detected with a ratio greater than 1. Among these, 5 (Eotaxin-2, G-CSF, MIG, SDF-1 and sTNFR-I), exhibited a ratio ≥ 1.2. Of note, MCP-1 and LIX were only detected at a ratio of 1.12 and 0.99,

respectively. This suggests that the high level expression of several analytes observed in vivo in IL-4-induced air pouch necessitates other factors and/or players. Thus, the profile of analytes detected after 6h in response to IL-4 differs in terms of expression level and in terms of specificity in vivo and in vitro, suggesting that other cells are involved. Because MCP-1 and LIX are the two predominant analytes detected in the exudates in response to IL-4, and in order to better elucidate the participation of different cell populations for such production, we first verified the possibility that the attracted leukocytes themselves participate in the increased production of MCP-1 and LIX. As illustrated in **Fig. 6A**, leukocytes attracted by IL-4 can produce MCP-1, whereas LIX was only minimally increased by IL-4 treatment. We next collected the lining cells and the skin cells from the inside part of the air pouch treated with buffer or IL-4 and monitored the gene expression of MCP-1 and LIX. In addition, we investigated the gene expression of these two agents in murine RAW 264.7 macrophages and epithelial Mode-K cells. As illustrated in **Fig. 6B**, IL-4 increased the MCP-1 mRNA expression in all conditions when compared to controls. Although LIX mRNA was detected in all conditions except in macrophages, its expression was increased only in IL-4-induced skin cells. Thus, according to the results obtained for MCP-1, the production of the different analytes induced by IL-4 could originate from resident cells expressing IL-4R, as well as from leukocytes attracted by IL-4.

## DISCUSSION

Several members of the CD132-dependent cytokines, including IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 and IL-21, are involved in diverse inflammatory disorders (32). Among these, IL-4 is best known for its anti-inflammatory activity. For example, IL-4 was found to induce production of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in neutrophils (34,43,44) and to antagonize the biological action of IL-1 by inducing the expression and release of IL-1 type II decoy receptor (45). In addition, IL-4 was found to inhibit LPS-induced prostaglandin $E_2$ ($PGE_2$) as well as LPS-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression in neutrophils (46). Consistent with its anti-inflammatory properties, Wertheim and colleagues (1993) reported that IL-4 inhibited IL-8 production, but this was observed in LPS-primed neutrophils (47). In contrast, we have demonstrated that IL-4 can directly increase IL-8 production in human neutrophils (31). The identification of IL-4 as a neutrophil agonist is not recent. For example, more than 18 years ago, Boey et al. (1989) reported that IL-4 enhanced neutrophil-mediated killing of opsonized bacteria (48). It is clear that the biological activity of IL-4 in neutrophils reported in the literature is far from complete. In addition, its pro-inflammatory activity remains to be better elucidated.

In the present study, we demonstrate for the first time that IL-4 can induce human neutrophil chemotaxis and chemokinesis in vitro. Because of this, we next investigate the possibility that IL-4 will attract leukocytes in vivo expecting to identify at least neutrophils. Using the murine air pouch model, we demonstrate that IL-4 possesses pro-inflammatory activity in vivo based on its ability to attract leukocytes, including neutrophils. It is important to mention that very few studies have investigated the ability of IL-4 to promote an inflammatory response in vivo. However, in one study, IL-4 was found to induce leukocyte recruitment in vivo using the cremasteric postcapillary venule model. Interestingly, although IL-4 was found to attract eosinophils, monocytes and lymphocytes in this model, no neutrophils were attracted. Thus, to the best of our knowledge, our results are the first to demonstrate that administration of IL-4 can attract neutrophils (as well as monocytes) in vivo. Interestingly, other CD132-dependent cytokines, including IL-15 and IL-21, were previously found to attract leukocytes in vivo in this model (40,41). As for IL-4, IL-15 is known as a neutrophil agonist but, unlike these two cytokines, we recently documented that IL-21 does not modulate a panel of neutrophil functions and this was

correlated with the absence of the IL-21Rα subunit in these cells (41). Interestingly, even if IL-21 is not a direct neutrophil agonist, this cytokine was found to attract neutrophil and monocytic cell populations in vivo (41). While IL-15 was found to increase the local production of IL-6 and MIP-2 (CXCL2) into the cell-free air pouch exudates, IL-21 did not. Moreover, IL-21 did not increase CCL3 (MIP-1α) and CCL5 (RANTES) production. This suggests that different cytokines and chemokines are involved in the neutrophil recruitment and that resident cells, in the case of IL-21, play an important role. Here, using an antibody array assay, we found that administration of IL-4 into air pouch increased local production of several analytes. Interestingly, the production of MCP-1, LIX, MIG and sTNFR I were detected in higher concentrations in IL-4-treated pouches before the total leukocyte counts were significantly increased vs controls. Thus, IL-4 can not only directly attract neutrophil in vitro; it can also act indirectly in vivo. Results from Wan et al. (2003) are in agreement with this latter point (49). They found that MCP-1, a C-C chemokine previously thought to attract leukocytes other than neutrophils, could enhance leukocyte rolling, adhesion and recruitment in vivo using intravital microscopy of the mouse cremaster microcirculation system where about 85% of cells attracted were neutrophils. As stated by the authors, endothelial cells were probably not involved, based on the inability of MCP-1 to increase P-selectin expression in these cells. They propose an indirect effect involving activation of an intermediary tissue cell. The role of LIX in neutrophil attraction is well established. LIX (CXCL5) is the murine equivalent of human ENA-78, a potent activator of neutrophil function known to possess neutrophil-activating properties similar to those of IL-8 (50). MIG is a CXC chemokine (CXCL9) induced in different cells, including parenchymal cells, endothelial cells and macrophages, primarily in response to Interferon-γ (INF-γ) explaining why this chemokine was named MIG for monokine-induced by Interferon-γ. Curiously, in our present study, the IL-4-induced MIG production was transitory and not accompanied by a significantly increased expression of IFN-γ (Table II). The IL-4-induced production of sTNFR I suggests that IL-4 may also induce anti-inflammatory signals in parallel. Interestingly, we have previously demonstrated that the pro-inflammatory cytokine IL-15 induced, in parallel, an anti-inflammatory response based on the production of IL-1Ra (51).

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) is the analyte that has the highest expression after 6h of injection of IL-4 in the pouches. It has been demonstrated that MCP-1 mRNA and

protein expression could be increased under certain conditions in neutrophils (52,53). In contrast, production of MCP-1 was also reported to be decreased under other circumstances (54). MCP-1 is known to be produced by endothelial cells (55,56) in response to IL-4 and these cells could be the main source of this chemokine in our experiments. MCP-1 mostly attracts macrophages and monocytes (57). Another cytokine which is also increased, but to a lesser extent, is LPS-induced CXC chemokines (LIX), which is a known neutrophil chemoattractant (58). This could explain the slightly increased percentage of neutrophils seen 6h after IL-4 injection in the pouches.

Interestingly, a distinct set of analytes was detected in the supernatants of IL-4-induced lining cells. However, the increased signals of some analytes, including IFN-γ, IL-3, I-TAC, leptin, MCP-1, MIP-1γ and sTNFR I were common to both conditions (IL-4-induced air pouches and IL-4-induced lining cells) when compared with their respective controls. Of note, IL-4 was found to markedly increase the production of eotaxin-2, MIG and SDF-1 by these lining cells, indicating that production of these analytes could be under the control of a selective mechanism in vivo that is lost in vitro when these cells are isolated from their natural environment. This is a good example illustrating the complexity of the regulation of cytokines and chemokines in vivo in response to a unique cytokine like IL-4.

The results obtained regarding the expression of MCP-1 and LIX mRNA in IL-4-induced Mode-K, RAW-264.7, lining and skin cells, demonstrate further the complexity of the response occurring after IL-4 treatment and support the role of cells of different origins for attracting neutrophil and monocytic cell populations in vivo. IL-4 was found to markedly increase MCP-1 mRNA in all tested conditions, whereas LIX mRNA was slightly to moderately increased by IL-4 in lining, skin and epithelial cells, or undetectable in macrophages.

Since the production of analytes in response to IL-4 is different from that of LPS, one can imagine that the leukocyte recruitment occurring in vivo is a process involving a different cytokine/chemokine network that is specific for a particular agonist. Curiously, the significantly increased number of leukocytes observed after 9h of treatment with IL-4 correlates with the increased expression of several (22/39) analytes, some of which are neutrophil and/or monocyte chemoattractants known to be produced by leukocytes and other cells.

The decreased production of MCP-1 observed after 9h (vs 6h) could be explained in part by the increased expression of IL-13 which is known to down-regulate the MCP family member's production (54). We also observed that some factors known to activate or recruit neutrophils are present in the extracts of pouches that were stimulated with IL-4. For example, there was an increased expression of keratinocyte cytokine (KC), a known neutrophil chemoattractant and activator (58), and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1$\alpha$), which induces superoxide production in neutrophils in vitro (59), and leptin, known to delay neutrophil apoptosis (60). These three analytes are still detected in greater amounts 12h after IL-4 administration, but the ratio of the signal intensity is less than 1.5.

In conclusion, this study aimed at determining the chemotactic potential of IL-4 towards neutrophils and we provide the first evidence that IL-4 induces neutrophil chemoattraction and chemokinesis *in vitro* and that IL-4 allows the recruitment of neutrophils and monocytic cells *in vivo*. We propose that the IL-4R positive murine air pouch resident cells (including lining + skin cells), are the first cells to be activated by IL-4 and that these cells will induce the production of different analytes in the exudates, some of which will attract neutrophils that will participate, as do monocytes, in the local production of analytes leading to the attraction of other neutrophils and/or monocytes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

## REFERENCES


1. Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-14.

2. Watson, R.W., O.D. Rotstein, A.B. Nathens, J. Parodo, and J.C. Marshall. 1997. Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *J Immunol* 158:945-53.

3. Smith, J.A. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56:672-86.

4. Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-53.

5. Savill, J.S. , A.H. Wyllie, J.E. Henson, M.J. Walport, P.M. Henson, and C. Haslett. 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83:865-75.

6. Hodgson, H.J. 1998. Pathogenesis of Crohn's disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 12:1-17.

7. Elmgreen, J. 1986. Complement and function of neutrophils in chronic inflammatory bowel disease. *Dan Med Bull* 33:222-8.

8. Pillinger, M.H. and S.B. Abramson. 1995. The neutrophil in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 21:691-714.

9. Kitsis, E. and G. Weissmann. 1991. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res*63-72.

10. Haydek, J.M. and A. Keshavarzian. 1995. Circulating neutrophils from patients with ulcerative colitis have a normal respiratory burst. *Inflammation* 19:701-15.

11. Kawahara, A., Y. Minami, and T. Taniguchi. 1994. Evidence for a critical role for the

cytoplasmic region of the interleukin 2 (IL-2) receptor gamma chain in IL-2, IL-4, and IL-7 signalling. *Mol Cell Biol* 14:5433-40.

12. Kovanen, P.E. and W.J. Leonard. 2004. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev* 202:67-83.

13. Mueller, T. D., J.L. Zhang, W. Sebald, and A. Duschl. 2002. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim Biophys Acta* 1592:237-50.

14. Chomarat, P. and J. Banchereau. 1997. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 8:333-44.

15. Hart, P.H., G.F. Vitti, D.R. Burgess, G.A. Whitty, D.S. Piccoli, and J.A. Hamilton. 1989. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3803-7.

16. Essner, R., K. Rhoades, W.H. McBride, D.L. Morton, and J.S. Economou. 1989. IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J Immunol* 142:3857-61.

17. Hart, P.H., R.L. Cooper, and J.J. Finlay-Jones. 1991. IL-4 suppresses IL-1 beta, TNF-alpha and PGE2 production by human peritoneal macrophages. *Immunology* 72:344-9.

18. Abramson, S. L. and J. I. Gallin. 1990. IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 144:625-30.

19. Hsieh, C.S., A.B. Heimberger, J.S. Gold, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6065-9.

20. Seder, R.A., W.E. Paul, M.M. Davis, and B. Fazekas de St Groth. 1992. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 176:1091-8.

21. de Vries, J.E., J.M. Carballido, and G. Aversa. 1999. Receptors and cytokines involved in allergic TH2 cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 103:S492-6.

22. Masinovsky, B., D. Urdal, and W.M. Gallatin. 1990. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol* 145:2886-95.

23. Wedi, B., U. Raap, H. Lewrick, and A. Kapp. 1998. IL-4-induced apoptosis in peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 102:1013-20.

24. Dubois, G.R. and P.L. Bruijnzeel. 1994. IL-4-induced migration of eosinophils in allergic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 725:268-73.

25. Hiester, A.A., D.R. Metcalf, and P.A. Campbell. 1992. Interleukin-4 is chemotactic for mouse macrophages. *Cell Immunol* 139:72-80.

26. Clinchy, B., C. Elenstrom, E. Severinson, and G. Moller. 1991. T and B cell collaboration: induction of motility in small, resting B cells by interleukin 4. *Eur J Immunol* 21:1445-51.

27. Burstein, H. 2001. Gene therapy for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Mol Ther* 3:362-74.

28. Taylor, P.C. 2003. Anti-cytokines and cytokines in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 9:1095-106.

29. Kidd, P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8:223-46.

30. Ohmura, K., L.T. Nguyen, R.M. Locksley, D. Mathis, and C. Benoist. 2005. Interleukin-4 can be a key positive regulator of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 52:1866-75.

31. Girard, D., R. Paquin, and A.D. Beaulieu. 1997. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 325 ( Pt 1):147-53.

32. Girard, D. 2003. Phenotypic and functional change of neutrophils activated by cytokines utilizing the common cytokine receptor gamma chain. *Chem Immunol Allergy* 83:64-80.

33. Ratthe, C., M. Pelletier, S. Chiasson, and D. Girard. 2007. Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling. *J Leukoc Biol* 81:1287-96.

34. Re, F., M. Mengozzi, M. Muzio, C.A. Dinarello, A. Mantovani, and F. Colotta. 1993. Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells. *Eur J Immunol* 23:570-3.

35. Crepaldi, L., L. Silveri, F. Calzetti, C. Pinardi, and M.A. Cassatella. 2002. Molecular basis of the synergistic production of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils stimulated with IL-4 and IL-10. *Int Immunol* 14:1145-53.

36. Jatakanon, A., C. Uasuf, W. Maziak, S. Lim, K.F. Chung, and P.J. Barnes. 1999. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1532-9.

37. Watt, A.P., B.C. Schock, and M. Ennis. 2005. Neutrophils and eosinophils: clinical implications of their appearance, presence and disappearance in asthma and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:415-23.

38. Ratthe, C. and D. Girard. 2004. Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15Ralpha chain. *J Leukoc Biol* 76:162-8.

39. Ratthe, C., M. Pelletier, C.J. Roberge, and D. Girard. 2002. Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin Immunol* 105:169-75.

40. Pelletier, M. and D. Girard. 2005. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol* 141:315-25.

41. Pelletier, M., A. Bouchard, and D. Girard. 2004. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* 173:7521-30.

42. Hickey, M.J., D.N. Granger, and P. Kubes. 1999. Molecular mechanisms underlying IL-4-induced leukocyte recruitment in vivo: a critical role for the alpha 4 integrin. *J Immunol* 163:3441-8.

43. Malyak, M., M.F. Smith Jr, A.A. Abel, and W.P. Arend. 1994. Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol* 14 :20-30.

44. Marie, C., C. Pitton, C. Fitting, and J.M. Cavaillon. 1996. IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine* 8:147-51.

45. Colotta, F., F. Re, M. Muzio, R. Bertini, N. Polentarutti, M. Sironi, J.G. Giri, S.K. Dower, J.E. Sims, and A. Mantovani. 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261:472-5.

46. Niiro, H., T. Otsuka, K. Izuhara, K. Yamaoka, K. Ohshima, T. Tanabe, S. Hara, Y. Nemoto, Y. Tanaka, H. Nakashima, and Y. Niho. 1997. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 89:1621-8.

47. Wertheim, W.A., S.L. Kunkel, T.J. Standiford, M.D. Burdick, F.S. Becker, C.A. Wilke, A.R. Gilbert, and R. M. Strieter. 1993. Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol* 151:2166-75.

48. Boey, H., R. Rosenbaum, J. Castracane, and L. Borish. 1989. Interleukin-4 is a neutrophil activator. *J Allergy Clin Immunol* 83:978-84.

49. Wan, M. X., Y. Wang, Q. Liu, R. Schramm, and H. Thorlacius. 2003. CC chemokines induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and recruitment in vivo: intermediary role of mast cells. *Br J Pharmacol* 138:698-706.

50. Tester, A. M., J.H. Cox, A.R. Connor, A.E. Starr, R.A. Dean, X.S. Puente, C. Lopez-Otin, and C.M. Overall. 2007. LPS Responsiveness and Neutrophil Chemotaxis In Vivo Require PMN MMP-8 Activity. *PLoS ONE* 2:e312.

51. Bouchard, A., C. Ratthe, and D. Girard. 2004. Interleukin-15 delays human neutrophil

apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J Leukoc Biol* 75:893-900.

52. Burn, T.C., M.S. Petrovick, S. Hohaus, B.J. Rollins, and D.G. Tenen. 1994. Monocyte chemoattractant protein-1 gene is expressed in activated neutrophils and retinoic acid-induced human myeloid cell lines. *Blood* 84:2776-83.

53. Bian, Z.M., S.G. Elner, R.M. Strieter, S.L. Kunkel, N.W. Lukacs, and V.M. Elner. 1999. IL-4 potentiates IL-1beta- and TNF-alpha-stimulated IL-8 and MCP-1 protein production in human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 18:349-57.

54. Kucharzik, T., N. Lugering, H.G. Pauels, W. Domschke, and R. Stoll. 1998. IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 111:152-7.

55. Rollins, B.J. and J.S. Pober. 1991. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* 138:1315-9.

56. Coxon, A., T. Tang, and T.N. Mayadas. 1999. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 190:923-34.

57. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-8.

58. Van Damme, J., A. Wuyts, G. Froyen, E. Van Coillie, S. Struyf, A. Billiau, P. Proost, J. M. Wang, and G. Opdenakker. 1997. Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. *J Leukoc Biol* 62:563-9.

59. Wolpe, S.D., G. Davatelis, B. Sherry, B. Beutler, D.G. Hesse, H.T. Nguyen, L.L. Moldawer, C.F. Nathan, S.F. Lowry, and A. Cerami. 1988. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 167:570-81.

60. Bruno, A., S. Conus, I. Schmid, and H.U. Simon. 2005. Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J Immunol* 174:8090-6.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** *IL-4 induces human neutrophil migration in vitro.* Freshly isolated human neutrophil cells (1 x $10^6$ cells/ml) were stimulated with buffer (Ctrl), the indicated concentration of IL-4 or IL-8 (200 ng/ml) for 1h and *in vitro* chemotaxis was performed in a 48-well microchemotaxis chamber as described in Materials and Methods. Results are means ± SEM (n=7). *, $P \leq 0.05$ vs control by ANOVA.

**Figure 2.** *IL-4 induces inflammation in vivo.* Murine air pouches were raised before injection of buffer (Ctrl), 250 ng/ml IL-4 or 1 μg/ml LPS (inset), exudates were harvested at the indicated periods of time and the number of leukocytes was calculated. Results are means ± SEM (n ≥6). *P < 0.05 versus Ctrl.

**Figure 3.** *IL-4 induces the recruitment of neutrophil and monocytic cells in vivo.* Murine air pouches were created as described in Materials and Methods. A, cell populations were identified by flow cytometry (n ≥6) after staining with purified rat anti-mouse 7/4 mAb directed against murine neutrophils (neutron, open curve) or rat anti-mouse F4/80 Ag Ab recognizing murine monocyte/macrophages (mono, open curve) as described in Materials and Methods. Inset, representative data plotted in the bar graph, where the grey curves illustrate the appropriate isotypic controls. B, cell identification was confirmed by cytology. Results are from one representative experiment out of at least 6.

**Figure 4.** *IL-4 increases the expression of several analytes in the murine air pouch cell-free exudates.* Murine air pouches were created and the cell-free exudates were collected and used to perform the antibody array assay as described in Materials and Methods. The number of analytes with a ratio >1 or >1.2 after IL-4 or LPS treatment were plotted over time. The complete lists of all analytes are in Tables II and III. Note that LPS increases a larger spectrum of analytes with a higher ratio than IL-4. Also, unlike LPS, IL-4 increases the expression of some analytes only after 6h of treatment.

**Figure 5**. *The murine air pouch resident lining cells express the IL-4 receptor.* Air pouches were created and lining cells were harvested as described in Materials and Methods. IL-4Rα chain was detected by RT-PCR (A) and by flow cytometry (B) using a specific antibody directed against murine IL-4Rα. Note that IL-4Rα chain mRNA was detected at variable levels in all tested animals (n=4). The receptor was detected on the cell surface of the lining cells. Results are from one representative experiment out of 4.

**Figure 6.** *Expression of MCP-1 and LIX mRNA in different cell populations.* A, air pouches were created and IL-4 or buffer was administered for 6h. Cells were harvested, pooled (n=6) and MCP-1 and LIX mRNA were detected as described in Materials and Methods. B, Murine air pouches were created and the lining cells and skin cells were harvested as described in Materials and Methods. Lining cells, skin cells, murine macrophages (RAW) and epithelial Mode-K cells were stimulated for 6h with buffer (Ctrl) or 250 ng/ml IL-4 and the expression of MCP-1 and LIX mRNA was performed by RT-PCR. Results are from one representative experiment out of at least 3.

## Tableau 1

| IL-4 in bottom well [ng/ml] | IL-4 in upper well [ng/ml] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 10 | 100 | 250 |
| 0 | 1.00 | | | |
| 10 | 1.4 ± 0.06 | 3.8 ± 0.18 | | |
| 100 | 2.2 ± 0.10 | | 6 ± 0,28 | |
| 250 | 2.6 ± 0.10 | 2.5 ± 0.25 | 2.4 ± 0.10 | 4.9 ± 0.50 |

**Table I. Checkerboard analysis.** A checkerboard analysis was performed by modifying the concentration of IL-4 in bottom and upper wells of the Boyden chamber. Migration of neutrophils was evaluated as described in Materials and Methods. Results are means ± SEM (n=7).

## Tableau 2

| Analyte | 3h | 6h | 9h | 12h |
|---|---|---|---|---|
| BLC | 0,23 | 1,10* | 0,86 | 0,00 |
| CD30L | 0,47 | 0,00 | **1,71*** | 0,00 |
| Eotaxin | 0,70 | 1,10* | **1,29*** | 0,00 |
| Eotaxin-2 | 0,70 | 0,85 | **1,36*** | 0,72 |
| Fas Ligand | 0,23 | 0,55 | 0,43 | 0,00 |
| Fractalkine | 0,16 | 0,55 | 1,00 | 0,00 |
| G-CSF | 0,31 | 0,00 | **1,20*** | 0,00 |
| GM-CSF | 0,93 | 1,10* | 0,43 | 0,36 |
| IFNγ | 0,47 | 1,10* | 0,64 | 0,00 |
| IL-1α | 0,00 | 1,10* | 0,96 | 0,72 |
| IL-1β | 0,00 | 0,00 | 0,86 | 0,00 |
| IL-2 | 0,00 | 0,00 | 0,86 | 0,00 |
| IL-3 | 0,00 | 1,10* | **1,71*** | 0,00 |
| IL-6 | 0,00 | 0,00 | **1,71*** | 0,00 |
| IL-9 | 0,00 | 0,55 | **1,71*** | 0,00 |
| IL-10 | 0,00 | 0,00 | **1,71*** | 0,00 |
| IL-12 p40/p70 | 0,35 | 0,55 | 1,03* | 0,00 |
| IL-12p70 | 0,23 | 0,00 | **2,00*** | 0,72 |
| IL-13 | 0,93 | 1,10* | **2,14*** | 0,72 |
| IL-17 | 0,47 | 0,55 | 0,86 | 0,00 |
| I-TAC | 0,00 | 1,10* | **1,20*** | 0,72 |
| KC | 0,00 | 0,55 | **1,71*** | **1,44*** |
| Leptin | 0,00 | 1,10* | **1,50*** | **1,44*** |
| LIX | 0,93 | **1,65*** | 0,95 | 0,72 |
| Lymphotactin | 0,00 | 0,70 | 1,19* | 0,72 |
| MCP-1 | 0,47 | **7,25*** | **1,54*** | 0,00 |
| M-CSF | 0,00 | 0,00 | **1,29** | 0,72 |
| MIG | 0,00 | **1,46*** | 0,94 | 0,00 |
| MIP-1α | 0,47 | 0,37 | **1,71*** | **1,44*** |
| MIP-1γ | 0,58 | 1,17* | 1,05* | 1,15* |
| RANTES | 0,78 | 0,55 | 1,16* | 0,12 |
| SDF-1 | 0,47 | 0,00 | 0,86 | 0,36 |
| TCA-3 | 0,70 | 0,55 | 0,86 | 0,72 |
| TECK | 0,00 | 0,00 | 0,86 | 0,00 |
| TIMP-1 | 0,23 | 0,78 | 1,04* | 0,00 |
| TIMP-2 | 0,47 | 0,00 | **1,29*** | 0,00 |
| TNF-α | 0,00 | 0,55 | 0,86 | 0,72 |
| sTNFR I | 0,45 | **1,46*** | 0,97 | 1,08* |
| sTNFR II | 0,00 | 0,55 | 0,86 | 0,00 |

**Table II.** *Analysis of the different analytes detected in the cell free exudates harvested from IL-4-induced air pouch.* Air pouches were created and 250 ng/ml IL-4 or buffer was administered into the pouch for the indicated periods of time. Pooled exudates (n≥13 mice) were used to probe the membranes (Mouse inflammation antibody array I) no more than two weeks after the in vivo experiments. Results are calculated as ratios, as described in Materials and Methods. *, ratio above 1; numbers in bold characters, ratio ≥1.2.

**Tableau 3**

| Analyte | 3h | 6h | 9h | 12h |
|---|---|---|---|---|
| BLC | 0,12 | **11,0*** | 0,83 | 0,22 |
| CD30L | 0,00 | 0,00 | **2,50*** | 0,22 |
| Eotaxin | 0,31 | **5,51*** | 0,31 | 0,43 |
| Eotaxin-2 | 0,16 | 0,92 | 0,22 | 0,43 |
| Fas Ligand | 0,06 | **1,38*** | 0,31 | 0,22 |
| Fractalkine | 0,08 | **2,76*** | 0,83 | 0,43 |
| G-CSF | 0,25 | **9,65*** | **1,50*** | 0,43 |
| GM-CSF | 0,25 | **4,14*** | 0,63 | 0,22 |
| IFNγ | 0,00 | **2,76*** | 0,31 | 0,00 |
| IL-1-α | 0,75 | **1,84*** | 0,47 | 0,43 |
| IL-1 β | 0,00 | **2,76*** | 0,63 | 0,00 |
| IL-2 | 0,25 | **5,51*** | 0,63 | 0,00 |
| IL-3 | 0,00 | **2,76*** | **1,25*** | 0,00 |
| IL-6 | **4,85*** | **30,3*** | 0,00 | **2,16*** |
| IL-9 | 0,12 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| IL-10 | 0,25 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| IL-12 p40/p70 | 0,68 | **27,6*** | 0,88 | 0,43 |
| IL-12p70 | 0,06 | **4,14*** | **2,08*** | 0,43 |
| IL-13 | 0,25 | **2,76*** | 0,00 | 0,00 |
| IL-17 | 0,00 | **2,76*** | 0,42 | 0,00 |
| I-TAC | 0,00 | **2,76*** | 0,50 | 0,00 |
| KC | **5,97*** | **2,76*** | 0,00 | 0,22 |
| Leptin | 0,00 | **2,76*** | 0,31 | 0,00 |
| LIX | **5,97*** | **3,22*** | 0,49 | 0,54 |
| Lymphotactin | 0,00 | 0,25 | 0,28 | 0,00 |
| MCP-1 | **4,29*** | **14,3*** | **1,75*** | **2,16*** |
| M-CSF | 0,19 | 0,00 | 0,00 | 0,22 |
| MIG | 0,08 | 0,92 | 0,25 | 0,00 |
| MIP-1α | 0,06 | 0,00 | 0,83 | 0,43 |
| MIP-1γ | 0,36 | **2,15*** | 0,85 | 1,17* |
| RANTES | **1,41*** | **6,89*** | 0,80 | 0,36 |
| SDF-1 | 0,12 | **5,51*** | 0,50 | 0,00 |
| TCA-3 | 0,37 | **4,14*** | 0,21 | 0,11 |
| TECK | 0,12 | **5,51*** | 0,42 | 0,00 |
| TIMP-1 | 1,18* | **1,67*** | 0,61 | **1,51*** |
| TIMP-2 | 0,00 | **5,51*** | **1,25*** | 0,00 |
| TNF-α | 0,00 | **1,38*** | 0,42 | 0,00 |
| sTNFR I | 0,25 | **6,13*** | 0,58 | 0,76 |
| sTNFR II | 0,25 | 0,00 | **1,25*** | 0,43 |

**Table III.** *Analysis of the different analytes detected in the cell free exudates harvested from LPS-induced air pouch.* Air pouches were created and 1 μg/ml LPS or buffer was administered into the pouch for the indicated periods of time. Pooled exudates (n≥13 mice) were used to probe the membranes (Mouse inflammation antibody array I) no more than two weeks after the in vivo experiments. Results are calculated as ratios, as described in Materials and Methods. *, ratio above 1; numbers in bold characters, ratio ≥1.2.

**Tableau 4**

| Analyte | 6h |
|---|---|
| BLC | 0,36 |
| CD30L | 0,54 |
| Eotaxin | 0,54 |
| Eotaxin-2 | **2,92*** |
| Fas Ligand | 0,36 |
| Fractalkine | 1,08* |
| G-CSF | 1,20* |
| GM-CSF | 0,72 |
| IFNγ | 1,08* |
| IL-1α | 0,98 |
| IL-1β | 1,08* |
| IL-2 | 1,08* |
| IL-3 | 1,08* |
| IL-6 | 0,85 |
| IL-9 | 1,08* |
| IL-10 | 1,08* |
| IL-12 p40/p70 | 0,81 |
| IL-12p70 | 0,81 |
| IL-13 | 0,72 |
| IL-17 | 0,54 |
| I-TAC | 1,08* |
| KC | 1,14* |
| Leptin | 1,08* |
| LIX | 0,99 |
| Lymphotactin | 0,54 |
| MCP-1 | 1,12* |
| M-CSF | 0,54 |
| MIG | **2,16*** |
| MIP-1α | 1,08* |
| MIP-1γ | 1,03* |
| RANTES | 0,52 |
| SDF-1 | **2,16*** |
| TCA-3 | 0,75 |
| TECK | 0,54 |
| TIMP-1 | 0,65 |
| TIMP-2 | 1,08* |
| TNF-α | 0,54 |
| sTNFR I | 1,24* |
| sTNFR II | 1,08* |

**Table IV**. *Analysis of the different analytes detected in the supernatant harvested from IL-4-induced lining cells*. Air pouches were created and lining cells were harvested, pooled and incubated in vitro with 250 ng/ml IL-4 for 6h. The supernatant was used to probe the membranes (Mouse inflammation antibody array I) no more than two weeks after the in vivo experiments. Results are calculated as ratios, as described in Materials and Methods. *, ratio above 1; numbers in bold characters, ratio ≥1.2.

**Figure 1**

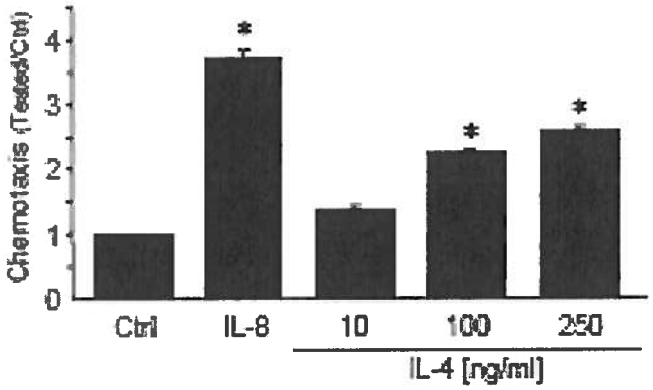



**Figure 2**

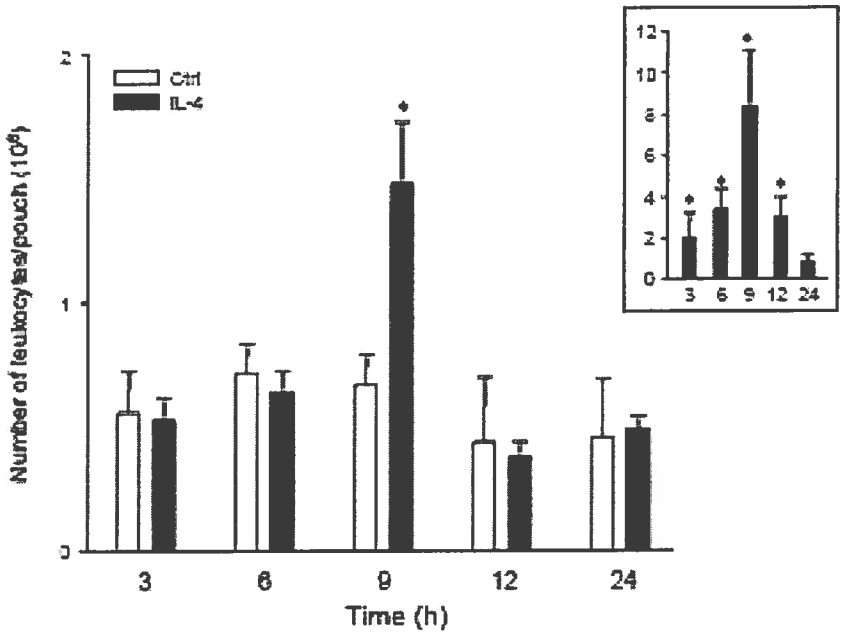


**Figure 3**

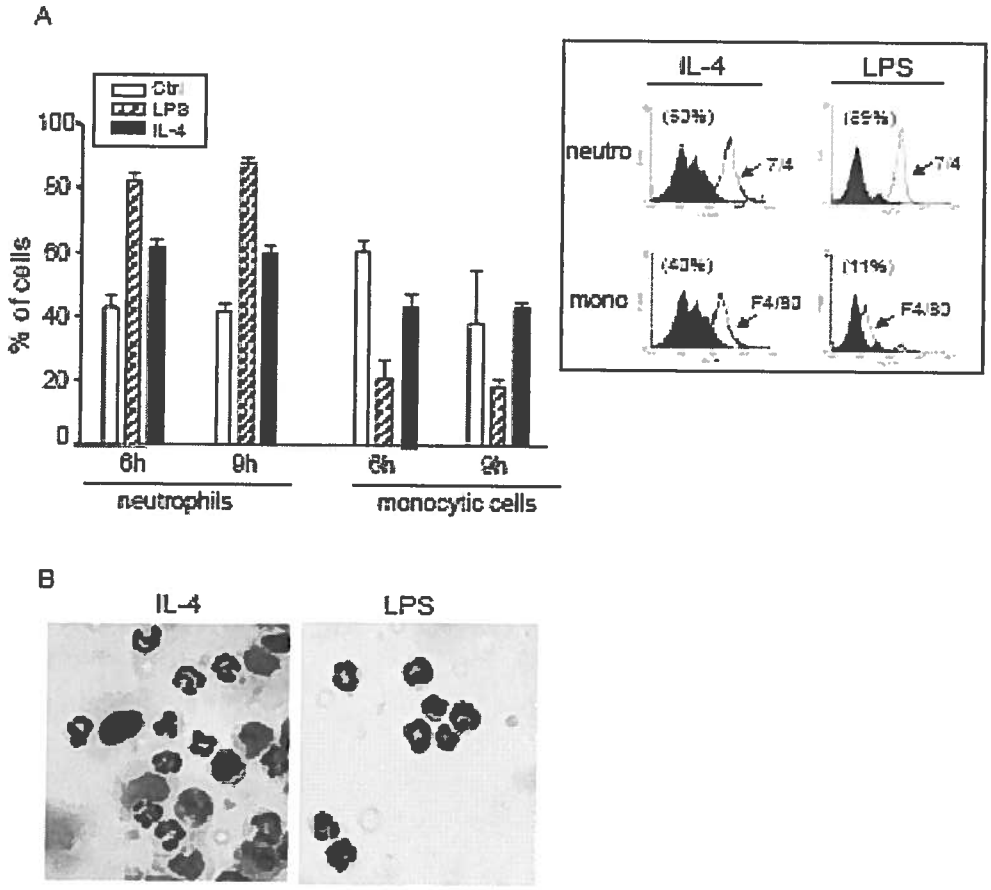

A
Ctrl
LPS
IL-4
100
80
60
40
20
0
% of cells
6h
9h
6h
9h
neutrophils
monocytic cells
IL-4
LPS
neutro
mono
7/4
F4/80
B
IL-4
LPS

**Figure 4**

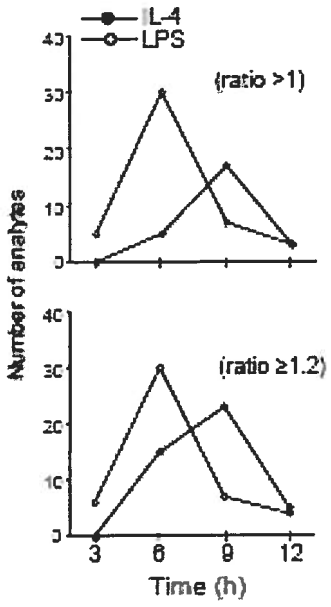



**Figure 5**

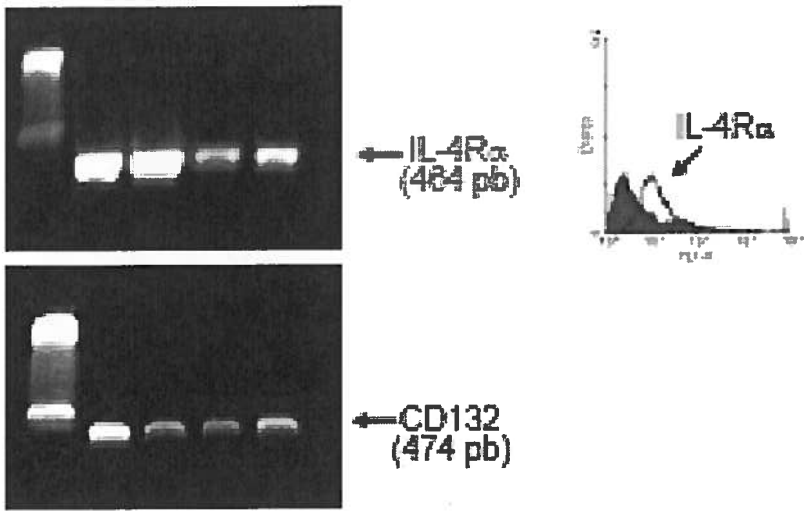
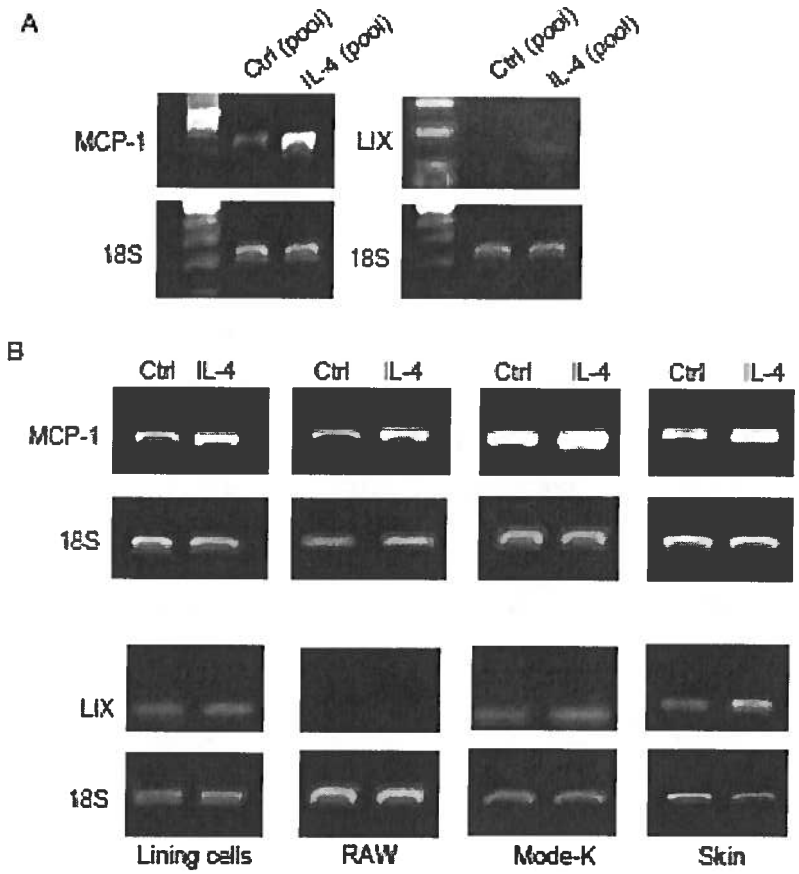


**Figure 6**


A
Ctrl (pool)
IL-4 (pool)
Ctrl (pool)
IL-4 (pool)
MCP-1
LIX
18S
18S
B
Ctrl
IL-4
Ctrl
IL-4
Ctrl
IL-4
Ctrl
IL-4
MCP-1
18S
LIX
18S
Lining cells
RAW
Mode-K
Skin

## Conclusion

L'interleukine-4 est une cytokine ayant été traditionnellement reconnue comme anti-inflammatoire. Elle fait partie de la famille des cytokines utilisant le CD132, tout comme l'IL-2, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. L'IL-4 a des effets sur les cellules qui expriment un de ses deux récepteurs à leur surface, soit le récepteur de type I (IL-4Rα et CD132) ou le récepteur de type II (IL-4Rα et IL-13Rα1). Chez les neutrophiles, l'IL-4 possède aussi une dualité anti- et pro-inflammatoire, toutefois, plusieurs éléments de ses effets, ou des mécanismes impliqués dans son action sur les neutrophiles, n'ont pas encore été élucidés. En effet, les mécanismes intracellulaires de signalisation responsables de l'action de l'IL-4 sur les neutrophiles sont peu connus. De plus, avant la présente étude, l'effet de l'IL-4 sur la chimioattraction des neutrophiles n'avait pas encore été analysé. Finalement, le potentiel pro-inflammatoire de l'IL-4 n'a pas été directement évalué *in vivo*. L'IL-4 et les neutrophiles sont tous deux des éléments importants dans le développement de maladies inflammatoires. Dans certaines maladies, comme l'asthme et les maladies inflammatoires de l'intestin, on retrouve à la fois une implication de l'IL-4 et des neutrophiles, ce qui démontre l'importance de bien comprendre les effets, tant pro- qu'anti-inflammatoires et les mécanismes d'action de l'IL-4 sur les neutrophiles. Ces travaux visaient donc à mieux comprendre les effets de l'IL-4 chez les neutrophiles, par l'étude des différentes cascades de signalisation impliquées dans son action, ainsi qu'en étudiant ses effets sur la chimioattraction et l'adhésion des neutrophiles *in vitro* et en vérifiant la capacité de l'IL-4 à recruter des leucocytes *in vivo* dans un modèle inflammatoire.

Durant la première partie de nos expériences, nous avons utilisé des neutrophiles humains, provenant de sang de donneurs sains, afin de déterminer quelles cascades de signalisation étaient activées par l'IL-4 chez les neutrophiles. Traditionnellement, l'IL-4 est reconnue pour activer la cascade Jak/Stat, la cascade des IRS, ainsi que celle des MAP kinases, en plus d'impliquer les régulateurs négatifs SHP-1 et les SOCS1 et 3. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression du récepteur de type II à la surface des neutrophiles, puisqu'il était connu qu'ils expriment le récepteur de type I de l'IL-4. Nous

avons observé que les neutrophiles n'expriment pas la chaîne de récepteur IL-13Rα1, mais avons pu confirmer la présence des chaînes IL-4Rα et CD132 à leur surface. Nous concluons donc que les neutrophiles possèdent seulement le récepteur de type II de l'IL-4. Nous avons ensuite étudié la phosphorylation de différents membres des cascades de signalisation, afin de vérifier lesquelles étaient activées par l'IL-4. Nous avons démontré que l'IL-4 induisait une augmentation générale de la phosphorylation des résidus tyrosines chez les neutrophiles stimulés. Plus particulièrement, nous avons observé la phosphorylation de Jak-1, de Jak-2, de STAT1, de STAT6, de Syk et des MAP kinases P-38, ERK1/2 et JNK. L'IL-4 induirait donc l'activation de la cascade Jak/STAT, de Syk ainsi que des MAP kinases chez les neutrophiles.

Les résultats obtenus pour les membres de la cascade Jak/STAT sont partiellement comparables avec ce qui avait été observé dans d'autres types cellulaires. La phosphorylation de Jak-1 et STAT6 observée est en accord avec ce qui a généralement été reporté dans la littérature. Par contre, la phosphorylation de Jak-2 a été traditionnellement associée à la chaîne IL-13Rα1, qui est, comme nous l'avons démontré, absente chez les neutrophiles. Toutefois, ce n'est pas la première fois que nous observons une phosphorylation de Jak-2 qui serait spécifique aux neutrophiles. En effet, nous avons démontré que l'interleukine-15, qui est traditionnellement reconnue pour activer Jak-1 et Jak-3, induit la phosphorylation de Jak-2 chez les neutrophiles (Pelletier et al., 2002). De plus, une étude a démontré que l'IL-4 pouvait induire la phosphorylation de Jak-2 dans des fibroblastes murins (McGaha et al., 2003). Finalement, l'activation de STAT-1 suite à une stimulation avec l'IL-4 a déjà été observée dans des lignées de cellules issues des voies respiratoires (Wang et al., 2004), ce qui ouvre la possibilité vers l'étude de l'activation de STATs non classiques par l'IL-4.

Nous avons observé une phosphorylation très rapide des MAP kinases p-38, ERK1/2 et JNK, induite suite à une stimulation des neutrophiles avec l'IL-4, soit dès 15 secondes. Ce délai est plutôt court comparativement à ce que nous avons observé précédemment avec l'IL-15, une autre cytokine de la famille utilisant le CD132, qui induisait aussi la phosphorylation de p-38 et de ERK1/ 2 chez les neutrophiles (Pelletier et al., 2002). Il a

aussi déjà été démontré, dans d'autres types cellulaires, que l'interleukine-4 peut induire une phosphorylation des MAP kinases, toutefois ces phosphorylations peuvent varier d'un type cellulaire à un autre (Hunt et al., 2002). En effet, une étude a récemment démontré que l'IL-4 pouvait induire la phosphorylation de p-38, ERK1/2 dans une lignée de cellules épithéliales (IP, Wong et Lam, 2006), alors qu'une autre étude utilisant une lignée de fibroblastes a observé une phosphorylation de ERK1/2 et de JNK (Hashimoto et al., 2001). De plus, une étude effectuée dans des cellules B démontrait une implication de la p38 MAP kinase (Canfield et al., 2005).

Notre étude est la première qui associe la phosphorylation de Syk à l'IL-4. Toutefois, nous avons déjà observé une phosphorylation de Syk par l'IL-15 (Pelletier et al., 2002) et l'IL-4 est reconnue pour augmenter la phagocytose des neutrophiles, pour laquelle la signalisation de la voie de Syk est importante. Afin de vérifier l'importance de ces cascades de signalisation dans les effets de l'IL-4 sur les neutrophiles, nous avons utilisé des inhibiteurs de différentes voies de signalisation et vérifié si le retard d'apoptose induit par l'IL-4 pouvait être renversé. Ces inhibiteurs nous ont permis de confirmer l'importance des cascades de Jak/STAT, des MAP kinases, de Syk et de la PI3 kinase dans le retard d'apoptose des neutrophiles associée à l'IL-4. La phosphorylation de Syk, est traditionnellement reconnue pour être associée à la phagocytose des neutrophiles, toutefois, nos travaux antérieurs, utilisant l'inhibiteur piceatannol, nous ont permis de suggérer que cette kinase était aussi associée à l'apoptose des neutrophiles (Ratthé et Girard, 2004). Il a aussi été démontré que Syk pouvait induire la phosphorylation de ERK1/2 et être associé à la phosphorylation de PI3 kinase et conséquemment d'AKT (Turner, 2000; Berton et al, 2005). Ces observations pourraient constituer des pistes intéressantes pour expliquer les différentes phosphorylations que nous avons observées.

Finalement, nous avons analysé l'expression des régulateurs négatifs de la famille des SOCS. Nous avons démontré que SOCS3 était augmenté suite à des stimulations de 4h à 12h avec l'IL-4, à la fois au niveau protéique et de l'ARN messager, chez les neutrophiles. Ces résultats sont en accord avec des résultats précédents ayant démontré que l'IL-4 induisait une augmentation de SOCS3 dans les cellules B (Canfield et al.,

2005). Afin de bien visualiser l'augmentation protéique de SOCS3 induite par l'IL-4, nous avons pré-traité les cellules avec l'inhibiteur de protéasome MG132 et nous avons démontré que SOCS3 était ubiquitinylé suite au traitement avec l'IL-4. L'augmentation de SOCS3 en réponse à l'IL-4 serait aussi dépendante de la synthèse protéique *de novo*, puisqu'un pré-traitement des cellules avec la cycloheximide empêche la synthèse de SOCS3. Nous concluons que SOCS3 est synthétisé suite à une stimulation des neutrophiles avec l'IL-4 et qu'il est rapidement dégradé par le protéasome. Ces résultats sont en accord avec certaines études ayant démontré que SOCS3 était rapidement dégradé puisqu'il contenait des sites d'ubiquitinylation et des séquences PEST (Babon et al., 2006; Sasake et al., 2003). Nous n'avons pas observé d'augmentation protéique de SOCS1 par l'IL-4 chez les neutrophiles, même, si l'ARN messager était augmenté. Ces résultats sont en accord avec une étude ayant associé une augmentation de l'ARN messager de SOCS1 à une stimulation avec l'IL-4 dans des cellules A549 (Hebenstreit et al., 2003). La première partie de nos travaux a donc permis d'élucider une partie des mécanismes de signalisation de l'IL-4 chez les neutrophiles et nous concluons que l'IL-4 induit l'activation de la cascade JAK/STAT, des MAP kinases, de Syk ainsi que la production de SOCS3 dans ces cellules.

Certaines études ont vérifié l'expression des protéines faisant partie de cascades de signalisation dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Il a été démontré que les patients atteints de la maladie de Crohn présentaient des niveaux élevés STAT-1 ainsi qu'une plus grande phosphorylation de cette protéine dans la lamina propria de la paroie intestinale (Schreiber et al., 2002). De plus, les patients atteints de la colite ulcéreuse présentaient un taux élevé de STAT-1 ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de cette protéine spécifiquement dans les neutrophiles et dans les monocytes de la paroi intestinale. De plus, les biopsies des patients atteints de colite ulcéreuse contenaient une plus faible expression de SOCS3 (Schreiber et al., 2002). Ces travaux ont permis de démontrer une dérégulation de l'expression de STAT-1 et de SOCS3 dans les neutrophiles et les monocytes de la muqueuse intestinale des patients atteints de certaines maladies inflammatoires de l'intestin. Il a aussi été démontré que les niveaux de phosphorylation de p38α, de JNK 1/2 et de ERK 1/2 étaient augmentés dans les biopsies

de muqueuse intestinale des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Waetzig et al., 2002). Tel que mentionné précédemment, l'IL-4 et les neutrophiles sont des joueurs importants dans ces maladies, mais aucune étude jusqu'à maintenant n'a pu montrer que l'activation des neutrophiles par l'IL-4 pourrait favoriser le développement ou la perpétuation de maladies inflammatoires. Il est tout de même intéressant de comparer nos résultats avec ces observations, puisque nous pouvons remarquer que l'expression ou le niveau d'activation de certains éléments, dont nous avons démontré l'impliquation dans la signalisation de l'IL-4 chez les neutrophiles, sont différents chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin. Peu d'information est disponible présentement dans la littérature concernant l'implication conjointe de l'IL-4 et des neutrophiles dans les autres maladies inflammatoires dans lesquelles l'IL-4 et les neutrophiles jouent un rôle.

La deuxième partie des expériences de ce projet visait à étudier de façon plus détaillée l'évolution des mécanismes de signalisation de l'IL-4 au cours de la différenciation des neutrophiles à l'aide d'une lignée de leucémie promyélocitaire. Nous avons aussi analysé plus en détail les mécanismes de production de SOCS3. Nous avons utilisé les cellules PLB-985, qui peuvent être différenciées en cellules semblables aux neutrophiles par l'ajout de DMSO au milieu de culture (PLB-985D). Nous avons tout d'abord vérifié la présence des récepteurs de type I et de type II à la surface des PLB-985 ou des PLB-985 différenciées et démontré que ces cellules n'expriment pas la chaîne CD132, mais expriment la chaîne IL-4Rα. Les cellules non-différenciées expriment aussi les chaînes de récepteur IL-13Rα1 et IL-13Rα2, mais cette expression n'est pas observée chez les cellules différenciées. Les cellules PLB-985 expriment donc le récepteur de type II de l'IL-4 alors que les PLB-985D n'expriment que la chaîne IL-4Rα. Cependant, lorsque nous avons vérifié la phosphorylation des tyrosines et des kinases impliquées dans la signalisation de l'IL-4, nous avons observé que la présence seule de la chaîne de récepteur IL-4Rα était suffisante pour permettre la phosphorylation de Jak-1, de p-38, ERK1/2 et JNK. De plus, les cellules PLB-985 non-différenciées présentaient une réponse faible à l'IL-4, qui pourrait s'expliquer soit par la présence de l'IL-13Rα2 à leur surface, reconnu comme étant un récepteur de forte affinité empêchant la liaison de l'IL-4

à son récepteur, ou par le fait que les PLB-985 sont des cellules immatures cancéreuses. Ces résultats seraient en accord avec des études démontrant que la présence seule de l'IL-4Rα peut permettre à l'IL-4 d'induire une signalisation intracellulaire et que l'IL-4Rα peut former des homodimères (Fujiwara et al., 1997; Kammer et al., 1996; Reichel et al., 1997). De plus, un autre récepteur potentiel de l'IL-4, le « progesterone-induced blocking factor » (PIBFR) a récemment été découvert (Kozma, et al., 2006), ce qui démontre l'intérêt de poursuivre la recherche de récepteurs potentiels de l'IL-4.

Nous avons pu observer que l'IL-4 augmentait l'expression de SOCS3, au niveau de l'ARN messager, ainsi que de la protéine chez les PLB-985D, mais non chez les cellules non-différenciées, ce qui serait en accord avec les évènements de signalisation intracellulaire ayant lieu dans des deux types de cellules respectifs. Nous avons utilisé les cellules PLB-985D afin de mieux comprendre la régulation de l'expression de SOCS3 puisque, contrairement aux neutrophiles, ces cellules n'expriment pas de niveau basal de la protéine SOCS3. Nous avons démontré que la production de SOCS3 était controlée par la phosphorylation de résidus tyrosines en utilisant un inhibiteur spécifique, la génistéine. Lorsque les cellules étaient pré-traîtées avec la génistéine, le niveau basal de la protéine SOCS3 était augmenté. Cette observation serait en accord avec des études qui démontrent que la phosphorylation de SOCS3 dans la région de la boîte SOCS serait très importante pour sa stabilité. (Haan et al., 2003). Nous avons aussi confirmé que la production de SOCS3 était dépendante de la synthèse protéique à l'aide de l'inhibiteur cycloheximide. Nous avons aussi démontré que l'augmentation de la production de SOCS3 induite par l'IL-4 dépendait de la présence de la forme complète de l'enzyme NADPH oxidase. Cette conclusion provient d'expériences effectuées avec des cellules PLB-985D déficientes en une composante de la NADPH oxidase, soit la gp91 phox. Elles ont été effectuées, puisqu'il a été récemment démontré que l'IL-4 Rα s'associait la NADPH oxidase dans les cellules B. Nous avons observé que malgré que ces cellules aient une signalisation intracellulaire normale en réponse à l'IL-4, aucune production de SOCS3 n'est induite. Finalement, puisqu'une étude avait démontré l'existence de deux isoformes de SOCS3, soit la forme complète et la forme tronquée, nous avons utilisé un anticorps spécifique, reconnaissant uniquement la portion N-terminale de la protéine et nous avons déterminé

que l'isoforme de SOCS3 qui était augmentée par l'IL-4 était la forme complète de la protéine. Ce résultat préliminaire ouvre la porte à une nouvelle avenue pour la continuation du projet de recherche. Cette observation serait aussi en accord avec l'étude de Sasaki et al., datant de 2003, puisque la forme complète de SOCS3 serait ubiquitinylée et dégradée rapidement par le protéasome.

La deuxième partie des expériences du projet de recherche nous a donc permis de mieux comprendre l'importance de l'IL-4Rα dans la signalisation de l'IL-4 et nous concluons que la présence de cette chaîne de récepteur est suffisante pour la signalisation de l'IL-4 soit induite, ce qui pourrait élargir le spectre d'action de cette cytokine, puisque cette chaîne de récepteur est présente à la surface de la majorité des cellules. Toutefois, les expériences qui démontrent que cette chaîne de récepteur peut former des dimères ont été effectuées dans des lignées de cellules transfectées et nous ne savons pas si ce phénomène peut avoir lieu dans la réalité ou encore dans quel contexte. Nous ne savons pas non plus si la liaison de la cytokine à son récepteur pourrait favoriser sa dimérisation. De plus, nous ne pouvons mettre de côté l'idée qu'une autre chaîne de récepteur encore inconnue pourrait s'associer avec l'IL-4Rα. Cette portion des expériences a aussi éclairci les mécanismes de régulation de la production de SOCS3 induite par l'IL-4 et nous concluons que l'expression de la forme complète de SOCS3 dépend de la synthèse protéique de novo, de la phosphorylation des résidus tyrosines et de la présence de la NADPH oxidase par un mécanisme inconnu. Nous pensons que le récepteur de l'IL-4 aurait peut-être besoin de la NADPH oxydase pour induire la production de novo de SOCS3 suite à l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire impliquant la phosphorylation de résidus tyrosines.

Le troisième et dernier volet de notre étude portait sur le potentiel chimioattractant de l'IL-4 *in vitro* et sur l'effet pro-inflammatoire de l'IL-4 *in vivo*. Les cytokines de la famille des cytokines utilisant le CD132 sont reconnues pour être impliquées dans des maladies inflammatoires et s'il est connu que l'IL-4 augmente la production de l'IL-8 chez les neutrophiles, ses effets pro-inflammatoires dans un système *in vivo* demeurent peu étudiés. Nous avons tout d'abord effectué des expériences in vitro avec des

neutrophiles humains et avons observé que l'IL-4 induit la chimioattraction ainsi que la chimiokinèse des neutrophiles humains. De plus l'IL-4 augmente l'adhésion des neutrophiles sur les cellules A549, ce qui nous permet de conclure que l'IL-4 est un activateur des neutrophiles à plus large spectre que ce qui était connu jusqu'à maintenant. Nous avons aussi effectué des expériences *in vivo* à l'aide du modèle inflammatoire de la poche d'air murine. Notre équipe avait déjà pu démontrer à l'aide de ce modèle que l'IL-15 et l'IL-21 pouvaient attirer des leucocytes *in vivo*. Nous avons observé une augmentation du nombre total de leucocytes dans les poches des souris 9h après l'injection d'IL-4 et avons observé une augmentation du pourcentage de neutrophiles dans les poches des souris traitées avec l'IL-4 dès 6h après l'injection. Nous avons aussi analysé le contenu de cytokines inflammatoires présent dans les échantillons de fluides de poches que nous avons recueillis. Nous avons observé une augmentation des cytokines MCP-1, un chimioattractant des monocytes et des macrophages, LIX, un chimioattractant des neutrophiles et de MIG, un autre chimioattractant des monocytes, 6h après l'injection d'IL-4 dans les poches, c'est-à-dire avant l'arrivée des leucocytes.

Ces résultats nous permettent de croire que l'attraction des leucocytes induite par l'IL-4 serait probablement un phénomène indirect, lié à la présence de ces chimiokines qui auraient été libérées par des cellules environnantes, soit peut-être les cellules tapissant la poche des souris. Nous avons aussi observé la présence de plusieurs activateurs des neutrophiles comme KC, qui attire les neutrophiles, MIP-1$\alpha$, qui induit la production de réactifs oxygénés et la leptine, qui diminue leur apoptose, dans les fluides des poches après 9h de traitement avec l'IL-4. Finalement, nous avons observé une augmentation de sTNFRI 6h après l'injection d'IL-4 dans les poches de souris. La présence de cette cytokine de type anti-inflammatoire nous permet de croire que la résolution de l'inflammation serait déjà enclenchée à ce moment. Cette observation est en accord avec le récent article publié par Serhan et Savill en 2005, qui suggère que la résolution de l'inflammation débuterait quelques heures à peine suite à l'initiation de la réponse inflammatoire.

De toutes les cytokines augmentées, MCP-1 était la cytokine qui était la plus augmentée dans les poches des souris traitées à l'IL-4 pour 6h. Sa concentration était grandement diminuée après 9h de traitement avec l'IL-4, même si elle était toujours présente en plus grande quantité que chez les souris témoin. Il a déjà été démontré que les neutrophiles peuvent produire de l'ARN messager codant pour MCP-1 dans certaines conditions. De plus, l'IL-4 peut parfois induire la production de MCP-1 puisqu'il a été démontré que cette cytokine peut être produite par les cellules endothéliales HUVEC (Rollins et Pober, 1991) et les mastocytes (Lin et Boyce, 2005) en réponse à l'IL-4. Nous avons donc recueilli les cellules tapissant la poche des souris traitées avec l'IL-4 et avons observé que ces cellules exprimaient la chaîne de récepteur IL-4Rα et contenaient une plus grande quantité d'ARN messager codant pour MCP-1. De plus, nous avons observé que des l'IL-4 induisait une augmentation de l'ARN messager de MCP-1 dans des lignées de cellules épithéliales (Mode K) ainsi que dans des lignées de cellules de macrophages (cellules RAW), ce qui pourrait expliquer la provenance de ce chimioattractant. Nous avons aussi récolté et incubé *in vitro* avec de l'IL-4 les cellules tapissant les poches des souris. Nous avons pu observer dans ces conditions un éventail de cytokines augmentées qui était différent de ce que nous avions observé *in vivo*, ce qui nous permet de conclure que les réponses *in vivo* et *in vitro* à l'IL-4 sont complexes et peuvent générer différentes réponses cellulaires et appuient la thèse de l'effet indirect de l'IL-4.

Le deuxième chimioattractant en importance augmenté dans les fluides des poches des souris traitées pour 6h à l'IL-4 est LIX. La présence du chimioattractant des neutrophiles LIX, pourrait expliquer l'augmentation du pourcentage de neutrophiles que nous avons observé 6h après l'injection d'IL-4 dans les poches de souris. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a rapporté que l'IL-4 pourrait induire la production de LIX. Dans ce modèle nous pensons donc que les neutrophiles seraient attirés indirectement dans la poche d'air suite à la libération de molécules chimioattractantes pas les cellules environnantes.

La théorie d'une attraction indirecte des neutrophiles a déjà été suggérée pour d'autres cytokines faisant partie de la famille des cytokines dépendantes du CD132 comme l'IL-4. Tout d'abord, des expériences effectuées précédemment dans notre laboratoire, en

utilisant le modèle de la poche d'air murine, ont démontré que l'IL-15, attirait des neutrophiles *in vivo*, possiblement par le biais de la production d'IL-6 et de CXCL2/MIP-2 (Pelletier et Girard, 2005). Ensuite, il a été observé chez la souris que l'IL-15 induirait le recrutement de neutrophiles via la production d'IL-18 (Verri et al., 2007). De plus, des expériences effectuées en utilisant l'IL-21 dans le modèle de la poche d'air murine, ont aussi suggéré un recrutement indirect des neutrophiles, sans toutefois identifier quelle(s) cytokine(s) serai(en)t potentiellement impliquée(s) (Pelletier et al., 2004). Il a aussi été démontré que le GM-CSF, qui retarde l'apoptose des neutrophiles comme l'IL-4, induit la chimioattraction et la chimiokinèse des neutrophiles *in vitro* (Gomez-Cambronero, 2003). Donc, d'autres cytokines ayant des effets activateurs sur les neutrophiles semblables à ceux de l'IL-4 comme l'IL-15 et le GM-CSF qui retardent aussi l'apoptose des neutrophiles, auraient aussi des effets sur l'attraction de ces granulocytes soit *in vivo* ou *in vitro*.

Il a aussi déjà été démontré que l'IL-4 est chimioattractante *in vitro* pour d'autres types cellulaires tels que les éosinophiles humains (Dubois et al., 1994), les macrophages murins (Hiester et al., 1992), les fibroblastes humains (Postlethwaite et Seyer, 1991) et les cellules B murines (Clinchy et al., 1991). Nous suggérons maintenant que cette cytokine pourrait contribuer à l'attraction des neutrophiles. Nous avons pu observer que l'IL-4 induit la chimioattraction ainsi que la chimiokinèse des neutrophiles humains *in vitro*, mais nous croyons que son effet *in vivo* serait indirect ou du moins en partie via la production de chimioattractants par les cellules environnantes. Toutefois, nos études ne permettent pas de discriminer l'effet unique de l'IL-4 sur les neutrophiles *in vivo*. Il serait intéressant de voir quels resultats seraient obtenus en effectuant des expériences avec des souris déficientes en certains chimioattractants que nous avons détecté dans les fluides récoltés des poches de souris comme MCP-1. Des anticorps bloquants ciblant les différentes chimiokines détectées pourraient aussi être utilisés.

Nos expériences avec l'IL-4 nous permettent globalement de conclure que l'IL-4 est un agoniste des neutrophiles à la fois *in vivo* et *in vitro* et que l'effet de cette cytokine *in vivo* dans le modèle de la poche d'air murine est probablement indirect, par le biais des

cellules qui tapissent la poche, ainsi que par l'induction de la production de médiateurs inflammatoires. Les effets de l'IL-4 seraient aussi spécifiques et complexes, puisqu'ils peuvent différer selon que les cellules soient stimulées *in vivo* ou *in vitro* et que les effets que nous avons observés diffèrent des résultats obtenus avec le lipopolysaccharide. Ces conclusions suggèrent qu'il serait important de considérer les effets possibles de l'IL-4 sur les neutrophiles dans les maladies inflammatoires où l'on observe une implication de l'IL-4 et des neutrophiles, comme dans les maladies inflammatoires de l'intestin. De plus, elles démontrent que la classification des cytokines selon un profil pro- ou anti-inflammatoire n'est pas toujours précise et nette et qu'une cytokine ayant des propriétés généralement anti-inflammatoires comme l'IL-4 peut aussi, dans certains cas, avoir des effets pro-inflammatoires et vice-versa.

Certaines études ont visé à déterminer le potentiel de l'IL-4 comme cible thérapeutique dans certaines maladies inflammatoires. Tout d'abord des études ont tenté de bloquer l'action de l'IL-4 afin de guérir certains cas d'inflammations des voies respiratoires. Une forme soluble de l'IL-4Rα permettant de neutraliser l'IL-4 a été produite sous l'appellation de Nuvance® et utilisée dans des essais cliniques pour traiter les patients atteints d'asthme. Les premières expériences semblaient prometteuses (Borish et al., 1999 ; Borish et al., 2001 ; Foser et al., 2002), mais par la suite, les essais cliniques plus élaborés ont échoués (Barnes et al., 2003). Des expériences ont aussi été effectuées en utilisant une forme mutante de l'IL-4 afin de bloquer l'accès de la cytokine au récepteur sur des cellules endothéliales, toutefois cette approche a aussi été abandonnée (Shamafelt et al., 1998; Barnes et al., 2003).

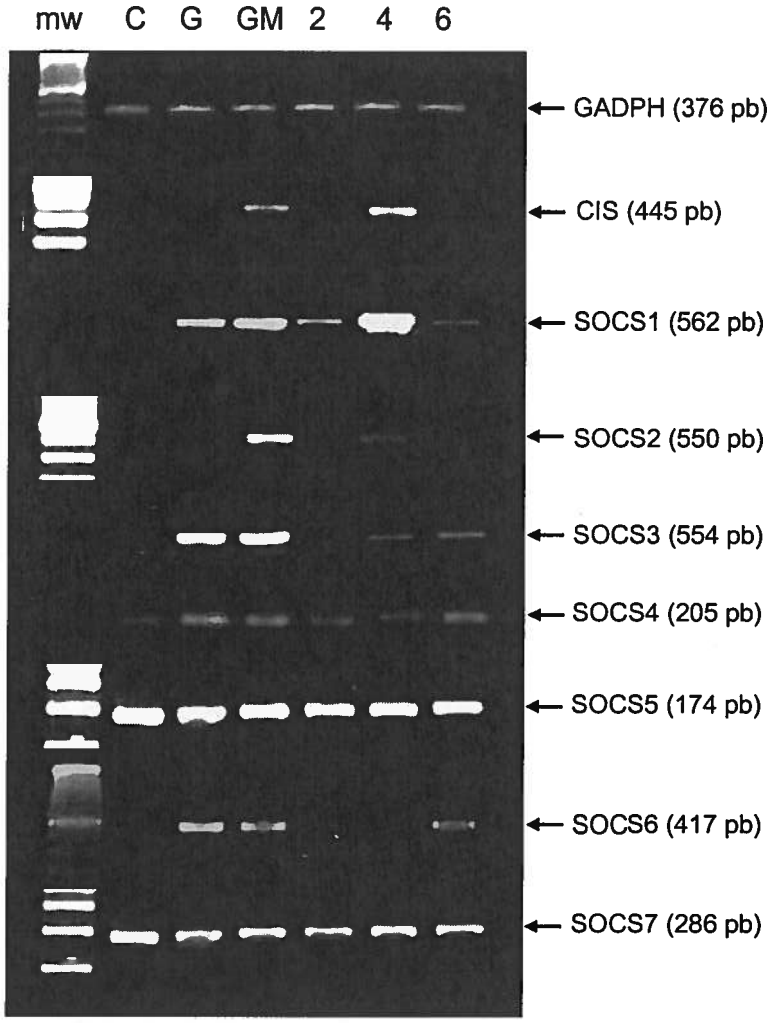
Ensuite, des études ont été effectuées afin de vérifier le potentiel thérapeutique de l'IL-4 dans certains modèles d'arthrite, l'IL-4 n'étant pas présente dans les articulations des patients atteints d'arthrite. Le traitement de rats arthritiques avec l'IL-4 n'a cependant pas été très efficace et la cytokine semblait avoir un effet plus sur les macrophages que sur les neutrophiles (Bober, 2000). Toutefois, l'expression de l'IL-4 comme traitement local par adenovirus dans un modèle d'arthrite induite par le collagène chez la souris et le traitement systémique avec l'IL-4 ont permis de prévenir la destruction des cartilages, les

dommages aux articulations ainsi que l'érosion des os. (Lubberts et al., 1999 ; Lubberts et al., 2000 ; Joosten et al., 1999). Le potentiel de l'IL-4 comme cible thérapeutique dans les maladies inflammatoires réside donc présentement plus au niveau d'une expression de la cytokine dans des maladies où elle n'est pas présente. Les études se sont montrées infructueuses jusqu'à maintenant lorsqu'il s'agissait de bloquer les effets de l'IL-4. Cet aspect demeure donc encore obscur et à la lumière des résultats que nous avons obtenu, il serait intéressant de voir quels seraient les effets d'un bloquage de l'IL-4 sur l'activation ou le recrutement des neutrophiles dans des maladies inflammatoires où ces deux éléments sont présents comme les maladies inflammatoires de l'intestin.

# Appendice A

Version originale de la figure 5 de l'article 1

Figure 5


mw
C
G
GM
2
4
6
GADPH (376 pb)
CIS (445 pb)
SOCS1 (562 pb)
SOCS2 (550 pb)
SOCS3 (554 pb)
SOCS4 (205 pb)
SOCS5 (174 pb)
SOCS6 (417 pb)
SOCS7 (286 pb)

# Références

## Livre


1. EDWARDS, S.W. 1994. Biochemistry and Physiology of the neutrophil. Cambridge : University Press, 319p.

2. JANEWAY, C.A., P. Travers, M. Walport et J.D. Capra. 1999. Immunobiology : The Immune System in Health and disease, Fourth Edition. New York : Garland Publishing, 635p.


## Sites Internet


1. Academic Press: Cytokine Reference. Encyclopédie en ligne. 2000. http://www.academicpress.com/companions/0122526708/

2. Horst Ibelgaufts Cytokines Online Pathfinder Encyclopedia. Encyclopédie en ligne. 2003. http://www.copewithcytokines.de/


## Articles


1. ABRAMSON, S. L. et J. I. Gallin. 1990. "IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes". Journal of Immunology, vol. 144, p. 625-630.

2. AL-MUTAWA, S. A. et S. M. Hegab. 2004. "Behcet's disease". Clinical and Experimental Medicine, vol. 4, p. 103-131.

3. ALBANESI, C., H. R. Fairchild, S. Madonna, C. Scarponi, O. De Pita, D. Y. Leung et M. D. Howell. 2007. "IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3". Journal of Immunology, vol. 179, p. 984-992.

4. ALEXANDER, W. S. 2002. "Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system". Nature Reviews Immunology, vol. 2, p. 410-416.

5. ARIDOGAN, B. C., M. Yildirim, V. Baysal, H. S. Inaloz, K. Baz et S. Kaya. 2003. "Serum Levels of IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 and IFN-gamma in Behcet's disease". Journal of Dermatology, vol. 30, p. 602-607.

6. BANCHEREAU, J. et J. P. Galizzi. 1990. "Receptors for interleukin-4, interleukin-5 and interleukin 6". Annali dell Istituto Superiore di Sanita, vol. 26, p. 453-467.

7. BARNES, P. J. 2003. "Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases". Cytokine and Growth Factors Reviews, vol. 14, p. 511-522.

8. BOBER, L. A., A. Rojas-Triana, J. V. Jackson, M. W. Leach, D. Manfra, S. K. Narula et M. J. Grace. 2000. "Regulatory effects of interleukin-4 and interleukin-10 on human neutrophil function ex vivo and on neutrophil influx in a rat model of arthritis". Arthritis and Rheumatism, vol. 43, p. 2660-2667.

9. BOEY, H., R. Rosenbaum, J. Castracane et L. Borish. 1989. "Interleukin-4 is a neutrophil activator". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 83, p. 978-984.

10. BOIRIVANT, M., I. J. Fuss, A. Chu et W. Strober. 1998. "Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin-4". Journal of Experimental Medicine, vol. 188, p. 1929-1939.

11. BORDEN, E. C., G. C. Sen, G. Uze, R. H. Silverman, R. M. Ransohoff, G. R. Foster et G. R. Stark. 2007. "Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine". Nature Reviews, vol. 6, p. 975-990.

12. BORISH, L. C., H. S. Nelson, M. J. Lanz, L. Claussen, J. B. Whitmore, J. M. Agosti et L. Garrison. 1999. "Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 160, p. 1816-1823.

13. BORISH, L. C., H.S. Nelson, J. Corren, G. Bensch, W. W. Busse, J. B. Whitmore et J. M. Agosti; IL-4R Asthma Study Group. 2001. "Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 107, p. 963-970.

14. BORREGAARD, N. et J. B. Cowland. 1997. "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte". Blood, vol. 89, p. 3503-3521.

15. BRANDT, E., G. Woerly, A. B. Younes, S. Loiseau et M. Capron. 2000. "IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 125-130.

16. BRANNIGAN, A. E., P. R. O'Connell, H. Hurley, A. O'Neill, H. R. Brady, J. M. Fitzpatrick et R. W. Watson. 2000. "Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease". SHOCK, vol. 13, p.361-366.

17. BRUMELL, J. H., C. K. Chan, J. Butler, N. Borregaard, K. A. Siminovitch, S. Grinstein et G. P. Downey. 1997. "Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 875-882.

18. BRUYNINCKX, W. J., K. M. Comerford, D. W. Lawrence et S. P. Colgan. 2001. "Phosphoinositide 3-kinase modulation of beta(3)-integrin represents an endogenous "braking" mechanism during neutrophil transmatrix migration". Blood, vol. 97, p. 3251-3258.

19. CANFIELD, S., Y. Lee, A. Schroder et P. Rothman. 2005. "Cutting edge: IL-4 induces suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells by a mechanism dependent on activation of p38 MAPK". Journal of Immunology, vol. 174, p. 2494-2498.

20. CASADEVALL, A. et L. A. Pirofski. 2003. "Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response". Trends in Immunology, vol. 24, p. 474-478.

21. CHATILA, T. A. 2004. "Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis". Trends in Molecular Medicine, vol. 10, p. 493-499.

22. CHEN, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt et M. H. Cobb. 2001. "MAP kinases". Chemical Reviews, vol. 101, p. 2449-2476.

23. CHIN, A. C. et C. A. Parkos. 2006. "Neutrophil transepithelial migration and epithelial barrier function in IBD: potential targets for inhibiting neutrophil trafficking". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1072, p. 276-287.

24. CHUANG, F. Y., M. Sassaroli et J. C. Unkeless. 2000. "Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils". Journal of Immunology, vol. 164, p. 350-360.

25. CLINCHY, B., C. Elenström, E. Severinson, et G. Möller. 1991. "T and B cell collaboration: induction of motility in small, resting B cells by interleukin 4". European Journal of Immunology, vol. 21, p. 1445-1451.

26. COFFMAN, R. L., J. Ohara, M. W. Bond, J. Carty, A. Zlotnik et W. E. Paul. 1986. "B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells". Journal of Immunology, vol. 136, p. 4538-4541.

27. COELHO, A. L., C. M. Hogaboam et S. L. Kunkel. 2005. "Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity". Cytokine and Growth Factors Reviews, vol. 16, p. 553-560.

28. COLLISON, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg et D. A. Vignali. 2007. "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function". Nature, vol. 450, p. 566-569.

29. CONESE, M., E. Copreni, S. Di Gioia, P. De Rinaldis et R. Fumarulo. 2003. "Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease". Journal of Cystic Fibrosis, vol. 2, p. 129-135.

30. COONEY, D. S., H. Phee, A. Jacob et K. M. Coggeshall. 2001. "Signal transduction by

human-restricted Fc gamma RIIa involves three distinct cytoplasmic kinase families leading to phagocytosis". Journal of Immunology, vol. 167, p. 844-854.

31. COSMAN, D., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Eisenman, K. H. Grabstein, R. Paxton, R. DuBose, D. Friend, L. S. Park, D. Anderson et al. 1995. "Interleukin 15 and its receptor". Ciba Foundation Symposium, vol. 195, p. 221-9; discussion 229-233.

32. COURTNEY, P. A., A. D. Crockard, K. Williamson, A. E. Irvine, R. J. Kennedy et A. L. Bell. 1999. "Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 58, p. 309-314.

33. CREPALDI, L., L. Silveri, F. Calzetti, C. Pinardi et M. A. Cassatella. 2002. "Molecular basis of the synergistic production of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils stimulated with IL-4 and IL-10". International Immunology, vol. 14, p. 1145-1153.

34. CRONSTEIN, B. N. et R. Terkeltaub. 2006. "The inflammatory process of gout and its treatment". Arthritis Research and Therapy, vol. 8 Suppl 1, p. S3.

35. CUI, Y., K. Harvey, L. Akard, J. Jansen, C. Hughes, R. A. Siddiqui et D. English. 1994. "Regulation of neutrophil responses by phosphotyrosine phosphatase". Journal of Immunology, vol. 152, p. 5420-5428.

36. DE VRIES, J. E., J. M. Carballido et G. Aversa. 1999. "Receptors and cytokines involved in allergic TH2 cell responses". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 103, p. S492-496.

37. DICKENSHEETS, H., N. Vazquez, F. Sheikh, S. Gingras, P. J. Murray, J. J. Ryan et R. P. Donnelly. 2007. "Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling". Genes and Immunity, vol. 8, p. 21-27.

38. DOLTON, G. M., J. G. Sathish et R. J. Matthews. 2006. "Protein tyrosine phosphatases as negative regulators of the immune response". Biochemical Society Transactions, vol. 34, p. 1041-1045.

39. DONG, C., R. J. Davis et R. A. Flavell. 2002. "MAP kinases in the immune response". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 55-72.

40. DUBOIS, G. R., C. A. Bruijnzeel-Koomen et P. L. Bruijnzeel. 1994. "IL-4 induces chemotaxis of blood eosinophils from atopic dermatitis patients, but not from normal individuals". Journal of Investigative Dermatology, vol. 102, p. 843-846.

41. DUBOIS, G. R., R. C. Schweizer, C. Versluis, C. A. Bruijnzeel-Koomen et P. L. Bruijnzeel. 1998. "Human eosinophils constitutively express a functional interleukin-4 receptor: interleukin-4 -induced priming of chemotactic responses and induction of PI-3 kinase activity". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 19, p. 691-699.

42. DURAND, V., Y. Renaudineau, J. O. Pers, P. Youinou et C. Jamin. 2001. "Cross-linking of human FcgammaRIIIb induces the production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils". Journal of Immunology, vol. 167, p. 3996-4007.

43. ESSNER, R., K. Rhoades, W. H. McBride, D. L. Morton et J. S. Economou. 1989. "IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes". Journal of Immunology, vol. 142, p. 3857-3861.

44. FALK, R. J., R. S. Terrell, L. A. Charles et J. C. Jennette. 1990. "Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, p. 4115-4119.

45. FOSTER, P. S., M. Martinez-Moczygemba, D. P. Huston et D. B. Corry. 2002. "Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease". Pharmacology and Therapy, vol. 94, p. 253-264.

46. FUJIMOTO, M. et T. Naka. 2003. "Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules". Trends in Immunology, vol. 24, p. 659-666.

47. FUJIWARA, H., S. H. Hanissian, A. Tsytsykova et R. S. Geha. 1997. "Homodimerization of the human interleukin 4 receptor alpha chain induces Cepsilon germline transcripts in B cells in the absence of the interleukin-2 receptor gamma chain". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 5866-5871.

48. GADINA, M., D. Hilton, J. A. Johnston, A. Morinobu, A. Lighvani, Y. J. Zhou, R. Visconti et J. J. O'Shea. 2001. "Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after". Current Opinion in Immunology, vol. 13, p. 363-373.

49. GASCAN, H., J. F. Gauchat, M. G. Roncarolo, H. Yssel, H. Spits et J. E. de Vries. 1991. "Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin-4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones". Journal of Experimental Medicine, vol. 173, p. 747-750.

50. GIOVANNONE, B., M. L. Scaldaferri, M. Federici, O. Porzio, D. Lauro, A. Fusco, P. Sbraccia, P. Borboni, R. Lauro et G. Sesti. 2000. "Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential". Diabetes/Metabolism Research and Reviews, vol. 16, p. 434-441.

51. GIRARD, D., M. E. Paquet, R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1996. "Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15". Blood, vol. 88, p. 3176-3184.

52. GIRARD, D., R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1997. "Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay

of apoptosis". Biochemical Journal, vol. 325 ( Pt 1), p. 147-153.

53. GIRI, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman et D. Anderson. 1994. "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15". EMBO Journal, vol. 13, p. 2822-2830.

54. GIRI, J. G., S. Kumaki, M. Ahdieh, D. J. Friend, A. Loomis, K. Shanebeck, R. DuBose, D. Cosman, L. S. Park et D. M. Anderson. 1995. "Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor". EMBO Journal, vol. 14, p. 3654-3663.

55. GOETZ, F. W, J. V. Planas et S. MacKenzie. 2004. "Tumor necrosis factors". Developemental and Comportemental Immunology, vol. 28, p. 487-497.

56. GOMEZ-CAMBRONERO, J., J. Horn, C. C. Paul et M. A. Baumann. 2003. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70S6 kinase signaling pathway". Journal of Immunology, vol. 171, p. 6846-6855.

57. GREENHALGH, C. J. et D. J. Hilton. 2001. "Negative regulation of cytokine signaling". Journal of Leukocyte Biology, vol. 70, p. 348-356.

58. HANSON, E. M., H. Dickensheets, C. K. Qu, R. P. Donnelly et A. D. Keegan. 2003. "Regulation of the dephosphorylation of Stat6. Participation of Tyr-713 in the interleukin-4 receptor alpha, the tyrosine phosphatase SHP-1, and the proteasome". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 3903-3911.

59. HAQUE, S. J., P. Harbor, M. Tabrizi, T. Yi et B. R. Williams. 1998. "Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 33893-33896.

60. HART, P. H., R. L. Cooper et J. J. Finlay-Jones. 1991. "IL-4 suppresses IL-1 beta, TNF-alpha and PGE2 production by human peritoneal macrophages". Immunology, vol. 72, p. 344-349.

61. HART, P. H., G. F. Vitti, D. R. Burgess, G. A. Whitty, D. S. Piccoli et J. A. Hamilton. 1989. "Potential antiinflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin-1, and prostaglandin E2". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 86, p. 3803-3807.

62. HASLETT, C., J. S. Savill, M. K. Whyte, M. Stern, I. Dransfield et L. C. Meagher. 1994. "Granulocyte apoptosis and the control of inflammation". Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, vol. 345, p. 327-333.

63. HEBENSTREIT, D., P. Luft, A. Schmiedlechner, A. Duschl et J. Horejs-Hoeck. 2005. "SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IL-4 and IL-13 induced activation of Eotaxin-3/CCL26 gene expression in HEK293 cells". Molecular Immunology, vol. 42, p. 295-303.

64. HEBENSTREIT, D., P. Luft, A. Schmiedlechner, G. Regl, A. M. Frischauf, F. Aberger, A. Duschl et J. Horejs-Hoeck. 2003. "IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site". Journal of Immunology, vol. 171, p. 5901-5907.

65. HIESTER, A. A., D. R. Metcalf, et P. A. Campbell . 1992. "Interleukin-4 is chemotactic for mouse macrophages". Cellular Immunology, vol. 139. p. 72-80.

66. HILTON, D. J., J. G. Zhang, D. Metcalf, W. S. Alexander, N. A. Nicola et T. A. Willson. 1996. "Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin-4 receptor". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 497-501.

67. HOMBURG, C. H. et D. Roos. 1996. "Apoptosis of neutrophils". Current Opinion in Hematology, vol. 3, p. 94-99.

68. HOUMAN, H., A. Hamzaoui, I. Ben Ghorbal, M. Khanfir, M. Feki et K. Hamzaoui. 2004. "Abnormal expression of chemokine receptors in Behcet's disease: relationship to intracellular Th1/Th2 cytokines and to clinical manifestations". Journal of Autoimmunity, vol. 23, p. 267-273.

69. HSIEH, C. S., A. B. Heimberger, J. S. Gold, A. O'Garra et K. M. Murphy. 1992. "Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins-4 and -10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 89, p. 6065-6069.

70. HSIEH, S. C., H. S. Yu, W. W. Lin, K. H. Sun, C. Y. Tsai, D. F. Huang, Y. Y. Tsai et C. L. Yu. 2003. "Anti-SSB/La is one of the antineutrophil autoantibodies responsible for neutropenia and functional impairment of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus". Clinical and Experimental Immunology, vol. 131, p. 506-516.

71. HUANG, Z., J. M. Coleman, Y. Su, M. Mann, J. Ryan, L. D. Shultz et H. Huang. 2005. "SHP-1 regulates STAT6 phosphorylation and IL-4-mediated function in a cell type-specific manner". Cytokine, vol. 29, p. 118-124.

72. IIJIMA, H., I. Takahashi, D. Kishi, J. K. Kim, S. Kawano, M. Hori et H. Kiyono. 1999. "Alteration of interleukin-4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice". Journal of Experimental Medicine, vol. 190, p. 607-615.

73. IZUHARA, K., Y. Arinobu, H. Sumimoto, H. Nunoi, R. Takeya, K. Higuchi, K. Takeshige, N. Hamasaki et N. Harada. 1999. "Association of the interleukin-4 receptor alpha chain with p47phox, an activator of the phagocyte NADPH oxidase in B cells". Molecular Immunology, vol. 36, p. 45-52.

74. JANEWAY, C. A. Jr et R. Medzhitov. 2002. "Innate immune recognition". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 197-216.

75. JIANG, H., M. B. Harris et P. Rothman. 2000. "IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 105, p. 1063-1070.

76. JOHNSON, G. L., H. G. Dohlman et L. M. Graves. 2005. "MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression". Current Opinion in Chemical Biology, vol. 9, p. 325-331.

77. JOHNSTON, J. A. 2004. "Are SOCS suppressors, regulators, and degraders?". Journal of Leukocyte Biology, vol. 75, p. 743-748.

78. JOOSTEN, L. A., E. Lubberts, M. M. Helsen, T. Saxne, C. J. Coenen-de Roo, D. Heinegard et W. B. van den Berg. 1999. "Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis". Arthritis Research, vol. 1, p. 81-91.

79. KALLENBERG, C. G., P. Heeringa et C. A. Stegeman. 2006. "Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides". Nature Clinical Practice Rheumatology, vol. 2, p. 661-670.

80. KAMMER, W., A. Lischke, R. Moriggl, B. Groner, A. Ziemiecki, C. B. Gurniak, L. J. Berg et K. Friedrich. 1996. "Homodimerization of interleukin-4 receptor alpha chain can induce intracellular signaling". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 23634-23637.

81. KASHIWADA, M., C. C. Giallourakis, P. Y. Pan et P. B. Rothman. 2001. "Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of the IL-4 receptor associates with SH2-containing phosphatases and regulates IL-4-induced proliferation". Journal of Immunology, vol. 167, p. 6382-6387.

82. KASPER, B., E. Brandt, M. Ernst et F. Petersen. 2006. "Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases". Blood, vol. 107, p. 1768-1775.

83. KELLY-WELCH, A. E., E. M. Hanson, M. R. Boothby et A. D. Keegan. 2003. "Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps". Science, vol. 300, p. 1527-1528.

84. KIEFER, F., J. Brumell, N. Al-Alawi, S. Latour, A. Cheng, A. Veillette, S. Grinstein et T. Pawson. 1998. "The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcgamma receptor signaling in macrophages and neutrophils". Molecular and Cellular Biology, vol. 18, p. 4209-4220.

85. KILE, B. T., B. A. Schulman, W. S. Alexander, N. A. Nicola, H. M. Martin et D. J. Hilton. 2002. "The SOCS box: a tale of destruction and degradation". Trends in Biochemical Sciences, vol. 27, p. 235-241.

86. KOZMA, N., M. Halasz, B. Polgar, T. G. Poehlmann, U. R. Markert, T. Palkovics, M. Keszei, G. Par, K. Kiss, J. Szeberenyi, L. Grama et J. Szekeres-Bartho. 2006. "Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4

receptor". Journal of Immunology, vol. 176, p. 819-826.

87. KREBS, D. L. et D. J. Hilton. 2000. "SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling". Journal of Cell Science, vol. 113 ( Pt 16), p. 2813-2819.

88. LAWRENCE, T., D. A. Willoughby et D. W. Gilroy. 2002. "Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation". Nature Review Immunology, vol. 2, p. 787-795.

89. LEE, J. D., K. Rhoades et J. S. Economou. 1995. "Interleukin-4 inhibits the expression of tumour necrosis factors alpha and beta, interleukins-1 beta and -6 and interferon-gamma". Immunology and Cell Biology, vol. 73, p. 57-61.

90. LEE, S. W., Y. S. Hong, C. M. Chun, J. D. Moon, S. J. Kim, I. C. Jung, Y. H. Yoon, B. A. Lee, S. W. Moon, S. H. Choi et C. K. Moon. 2002. "Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes". Journal of Korean Medical Science, vol. 17, p. 7-14.

91. LEONARD, W. J. et J. J. O'Shea. 1998. "Jaks and STATs: biological implications". Annual Review of Immunology, vol. 16, p. 293-322.

92. LORENTZ, A., M. Wilke, G. Sellge, H. Worthmann, J. Klempnauer, M. P. Manns et S. C. Bischoff. 2005. "IL-4-induced priming of human intestinal mast cells for enhanced survival and Th2 cytokine generation is reversible and associated with increased activity of ERK1/2 and c-Fos". Journal of Immunology, vol. 174, p. 6751-6756.

93. LOSMAN, J. A., X. P. Chen, D. Hilton et P. Rothman. 1999. "Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction". Journal of Immunology, vol. 162, p. 3770-3774.

94. LOWENTHAL, J. W., B. E. Castle, J. Christiansen, J. Schreurs, D. Rennick, N. Arai, P. Hoy, Y. Takebe et M. Howard. 1988. "Expression of high affinity receptors for murine interleukin-4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells". Journal of Immunology, vol. 140, p. 456-464.

95. LUBBERTS, E., L. A. Joosten, L. van Den Bersselaar, M. M. Helsen, A.C. Bakker, J. B. van Meurs, F. L. Graham, C. D. Richards et W. B. van Den Berg. 1999. "Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction". Journal of Immunology, vol. 163, p. 4546-4556.

96. LUBBERTS, E., L. A. Joosten, M. Chabaud, L. van Den Bersselaar, B. Oppers, C. J. Coenen-De Roo, C. D. Richards, P. Miossec et W. B. van Den Berg. 2000. "IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion". Journal of Clinical Investigation, vol. 105, p. 1697-1710.

97. MACDERMOTT, R. P. 1999. "Chemokines in the inflammatory bowel diseases". Journal of Clinical Immunology, vol. 19, p. 266-272.

98. MARIE, C., C. Pitton, C. Fitting et J. M. Cavaillon. 1996. "IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils". Cytokine, vol. 8, p. 147-151.

99. MASINOVSKY, B., D. Urdal et W. M. Gallatin. 1990. "IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1". Journal of Immunology, vol. 145, p. 2886-2895.

100. MEDZHITOV, R. et C. A. Janeway Jr. 1997. "Innate immunity: impact on the adaptive immune response". Current Opinion in Immunology, vol. 9, p. 4-9.

101. MOCSAI, A., Z. Jakus, T. Vantus, G. Berton, C. A. Lowell et E. Ligeti. 2000. "Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases". Journal of Immunology, vol. 164, p. 4321-4331.

102. MOCSAI, A., E. Ligeti, C. A. Lowell et G. Berton. 1999. "Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck". Journal of Immunology, vol. 162, p. 1120-1126.

103. MOCSAI, A., M. Zhou, F. Meng, V. L. Tybulewicz et C. A. Lowell. 2002. "Syk is required for integrin signaling in neutrophils". Immunity, vol. 16, p. 547-558.

104. NAUCLER, C., S. Grinstein, R. Sundler et H. Tapper. 2002. "Signaling to localized degranulation in neutrophils adherent to immune complexes". Journal of Leukocyte Biology, vol. 71, p. 701-710.

105. NELMS, K., A. D. Keegan, J. Zamorano, J. J. Ryan et W. E. Paul. 1999. "The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions". Annual Review of Immunology, vol. 17, p. 701-738.

106. NEMUNAITIS, J. 1997. "A comparative review of colony-stimulating factors". Drugs, vol. 54, p. 709-729.

107. O'BYRNE, K. J., N. J. O'Hare, P. J. Freyne, D. A. Luke, L. J. Clancy, J. S. Prichard et D. N. Carney. 1994. "Imaging of bronchial carcinoid tumours with indium-111 pentetreotide". Thorax, vol. 49, p. 284-286.

108. OHARA, J. et W. E. Paul. 1988. "Up-regulation of interleukin-4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, p. 8221-8225.

109. OLIVER, K., R. J. Noelle, J. W. Uhr, P. H. Krammer et E. S. Vitetta. 1985. "B-cell growth factor (B-cell growth factor I or B-cell-stimulating factor, provisional 1) is a differentiation factor for resting B cells and may not induce cell growth". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 82, p. 2465-2467.

110. PAUL, W. E. 1991. "Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine". Blood,

vol. 77, p. 1859-1870.

111. PELLETIRE, M., A. Bouchard et D. Girard. 2004. "*In Vivo* and *in vitro* roles of IL-21 in inflammation". Journal of Immunology, vol.173, p.7521-7530.

112. PELLETIER, M., et D. Girard. 2005. "Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo". Clinical and Experimental Immunology, vol. 141, p. 315-325.

113. POSTLETHWAITE, A. E., et J. M. Seyer. 1991. "Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4. Identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70-88 and 89-122". Journal of Clinical Investigation, vol. 87 p. 2147-2152.

114. POWERS, R., D. S. Garrett, C. J. March, E. A. Frieden, A. M. Gronenborn et G. M. Clore. 1992. "Three-dimensional solution structure of human interleukin-4 by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy". Science, vol. 256, p. 1673-1677.

115. PRICOP, L., J. Gokhale, P. Redecha, S. C. Ng et J. E. Salmon. 1999. "Reactive oxygen intermediates enhance Fc gamma receptor signaling and amplify phagocytic capacity". Journal of Immunology, vol. 162, p. 7041-7048.

116. RAEDER, E. M., P. J. Mansfield, V. Hinkovska-Galcheva, J. A. Shayman et L. A. Boxer. 1999. "Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis". Journal of Immunology, vol. 163, p. 6785-6793.

117. RATTHE, C., M. Pelletier, S. Chiasson et D. Girard. 2007. "Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling". Journal of Leukocyte Biology, vol. 81, p. 1287-1296.

118. RAVETCH, J. V. et S. Bolland. 2001. "IgG Fc receptors". Annual Review of Immunology, vol. 19, p. 275-290.

119. RAVETCH, J. V. et R. A. Clynes. 1998. "Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo". Annual Review of Immunology, vol. 16, p. 421-432.

120. RE, F., M. Mengozzi, M. Muzio, C. A. Dinarello, A. Mantovani et F. Colotta. 1993. "Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells". European Journal of Immunology, vol. 23, p. 570-573.

121. REICHEL, M., B. H. Nelson, P. D. Greenberg et P. B. Rothman. 1997. "The IL-4 receptor alpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction of IL-4-specific gene expression". Journal of Immunology, vol. 158, p. 5860-5867.

122. REN, Y., J. Tang, M. Y. Mok, A. W. Chan, A. Wu et C. S. Lau. 2003. "Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic

neutrophils in systemic lupus erythematosus". Arthritis and Rheumatism, vol. 48, p. 2888-2897.

123. ROSSI, D. et A. Zlotnik. 2000. "The biology of chemokines and their receptors". Annual Review of Immunology, vol. 18, p. 217-242.

124. RUSSELL, S. M., A. D. Keegan, N. Harada, Y. Nakamura, M. Noguchi, P. Leland, M. C. Friedmann, A. Miyajima, R. K. Puri, W. E. Paul et al. 1993. "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor". Science, vol. 262, p. 1880-1883.

125. SADHU, C., B. Masinovsky, K. Dick, C. G. Sowell et D. E. Staunton. 2003. "Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement". Journal of Immunology, vol. 170, p. 2647-2654.

126. SAMUEL, C. E. 2007. "Interferons, Interferon Receptors, Signal Transducer and Transcriptional Activators, and Interferon Regulatory Factors". Journal of Biological Chemistry, vol. 282, p. 20045-20046.

127. SAVILL, J. 1997. "Apoptosis in resolution of inflammation". Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 375-380.

128. SAVILL, J. 1992. "Macrophage recognition of senescent neutrophils". Clinical Science, vol. 83, p. 649-655.

129. SAVILL, J., I. Dransfield, C. Gregory et C. Haslett. 2002. "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses". Nature Reviews Immunology, vol. 2, p. 965-975.

130. SAVILL, J. et C. Haslett. 1995. "Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation". Seminars in Cell Biology, vol. 6, p. 385-393.

131. 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. 865-875.

132. SCHREIBER, S., P. Rosenstiel, J. Hampe, S. Nikolaus, B. Groessner, A. Schottelius, T. Kühbacher, J. Hämling, U. R. Fölsch et D. Seegert. 2002. "Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)1 in human chronic inflammatory bowel disease". Gut, vol. 51, p. 379-385.

133. SEDER, R. A., W. E. Paul, M. M. Davis et B. Fazekas de St Groth. 1992. "The presence of interleukin-4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice". Journal of Experimental Medicine, vol. 176, p. 1091-1098.

134. SERHAN, C. N. et J. Savill. 2005. "Resolution of inflammation: the beginning programs

the end". Nature Immunology, vol. 6, p. 1191-1197.

135. SHANAFELT, A.B., C.P. Forte, J.J. Kasper, L. Sanchez-Pescador, M. Wetzel, R. Gundel et J. M. Greve. 1998. "An immune cell-selective interleukin-4 agonist". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p.9454-9458.

136. SHIROIWA, W., K. Tsukamoto, M. Ohtsuji, Q. Lin, A. Ida, S. Kodera, N. Ohtsuji, K. Nakamura, H. Tsurui, K. Kinoshita, H. Nishimura, T. Shirai et S. Hirose. 2007. "IL-4Ralpha polymorphism in regulation of IL-4 synthesis by T cells: implication in susceptibility to a subset of murine lupus". International Immunology, vol. 19, p. 175-183.

137. SINGH, R. R. 2003. "IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity". Clinical Immunology, vol. 108, p. 73-79.

138. SO, E. Y., J. Oh, J. Y. Jang, J. H. Kim et C. E. Lee. 2007. "Ras/Erk pathway positively regulates Jak1/STAT6 activity and IL-4 gene expression in Jurkat T cells". Molecular Immunology, vol. 44, p. 3416-3426.

139. STARR, R., et D. J. Hilton. 1999. "Negative regulation of the JAK/STAT pathway". Bioessays, vol. 21, p. 47-52.

140. STEINKE, J. W. et L. Borish. 2001. "Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists". Respiratory Research, vol. 2, p. 66-70.

141. STEVCEVA, L., P. Pavli, A. Husband, A. Ramsay et W. F. Doe. 2001. "Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin-4 deficient mice". Genes and Immunity, vol. 2, p. 309-316.

142. SWAIN, S. L. 1993. "IL-4 dictates T-cell differentiation". Research in Immunology, vol. 144, p. 616-620.

143. TARGAN, S. R. et L. C. Karp. 2005. "Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis". Immunological Reviews, vol. 206, p. 296-305.

144. TE VELDE, A. A., J. P. Klomp, B. A. Yard, J. E. de Vries et C. G. Figdor. 1988. "Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4". Journal of Immunology, vol. 140, p. 1548-1554.

145. TONKS, N. K. 2006. "Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease". Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 7, p. 833-846.

146. TRNENY, M. et P. Klener. 1992. "[Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications]". Casopis Lekaru Ceskych, vol. 131, p. 427-433.

147. VERRI, W. A., T. M. Cunha, S. H. Ferreira,X. Wei, B. P. Leung, A. Fraser, I. B. McInnes, F. Y. Liew et F. Q. Cunha. 2007. "IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production".European Journal of Immunology, vol.37, p. 3373-3380.

148. VOSE, J. M., P. J. Bierman, J. R. Anderson, K. A. Harrison, G. V. Dalrymple, K. Byar, A. Kessinger et J. O. Armitage. 1996. "Single-photon emission computed tomography gallium imaging versus computed tomography: predictive value in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma". Journal of Clinical Oncology, vol. 14, p. 2473-2479.

149. WATEZIG, G. H., D. Seegert, P. Rosenstiel, S. Nikolaus et S. Schreiber. 2002. "p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease". Journal of Immunology, vol. 168, p. 5342-5351.

150. WEDI, B., U. Raap, H. Lewrick et A. Kapp. 1998. "IL-4-induced apoptosis in peripheral blood eosinophils". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 102, p. 1013-1020.

151. WEISSMANN, G. 2006. "The pathogenesis of rheumatoid arthritis". Bulletin of the New York Hospital for Joint Diseases, vol. 64, p. 12-15.

152. WERTHEIM, W. A., S. L. Kunkel, T. J. Standiford, M. D. Burdick, F. S. Becker, C. A. Wilke, A. R. Gilbert et R. M. Strieter. 1993. "Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4". Journal of Immunology, vol. 151, p. 2166-2175.

153. WITKO-SARSAT, V., I. Sermet-Gaudelus, G. Lenoir et B. Descamps-Latscha. 1999. "Inflammation and CFTR: might neutrophils be the key in cystic fibrosis". Mediators of Inflammation, vol. 8, p. 7-11.

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

155. WLODAWER, A., A. Pavlovsky et A. Gustchina. 1992. "Crystal structure of human recombinant interleukin-4 at 2.25 A resolution". FEBS Letters, vol. 309, p. 59-64.

156. WOERLY, G., N. Roger, S. Loiseau et M. Capron. 1999. "Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils". International Archives of Allergy and Immunology, vol. 118, p. 95-97.

157. WONG, H. L., M. T. Lotze, L. M. Wahl et S. M. Wahl. 1992. "Administration of recombinant IL-4 to humans regulates gene expression, phenotype, and function in circulating monocytes". Journal of Immunology, vol. 148, p. 2118-2125.

158. ZAITSU, M., Y. Hamasaki, M. Matsuo, A. Kukita, K. Tsuji, M. Miyazaki, R. Hayasaki, E. Muro, S. Yamamoto, I. Kobayashi, T. Ichimaru, O. Kohashi et S. Miyazaki. 2000. "New induction of leukotriene A(4) hydrolase by interleukin-4 and interleukin-13 in human polymorphonuclear leukocytes". Blood, vol. 96, p. 601-609.

159. ZHANG, J., A. K. Somani et K. A. Siminovitch. 2000. "Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling". Seminars in Immunology, vol. 12, p. 361-378.

160. ZLOTNIK, A., M. Fischer, N. Roehm et D. Zipori. 1987. "Evidence for effects of interleukin-4 (B cell stimulatory factor 1) on macrophages: enhancement of antigen presenting ability of bone marrow-derived macrophages". Journal of Immunology, vol. 138, p. 4275-4279.