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

ACTIVATION DES GRANULOCYTES PAR LE SULFITE DE SODIUM ET LE DIELDRINE

Par
Martin Pelletier

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Alain Fournier INRS-Institut Armand-Frappier Centre de recherche en santé humaine
Examinateur externe	Philippe A. Tessier Centre hospitalier de l'Université Laval Centre de recherche en infectiologie
Directeur de recherche	Denis Girard INRS-Institut Armand-Frappier Centre de recherche en santé humaine

© droits réservés de *Martin Pelletier* 2000

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le docteur Denis Girard, pour sa confiance, son support, son dynamisme et son éternelle bonne humeur. Il a su rendre mes recherches passionnantes à un point tel qu'il m'a été aisé de poursuivre mes études graduées au niveau du doctorat dans son laboratoire.

Merci aux organismes subventionnaires de la Fondation Armand-Frappier et du FCAR-FRSQ-Santé pour les bourses de niveau maîtrise qu'elles m'ont accordées.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire qui ont partagé mes journées. Merci à Anik Savoie, Marc Gauthier et Valérie Lavastre pour l'aide précieuse en laboratoire.

Merci également à Pierrette Labbé, l'assistante de recherche qui m'a aidé lors de ma première année de maîtrise, et à Annie Couture, la technicienne qui a pris la relève.

Merci beaucoup aux stagiaires, Claude Ratthé et Thiphavone Oudanonh, qui ont su m'accompagner dans cette merveilleuse aventure.

Merci à mes parents, Robert et Isabel, et à ma sœur, Annick, qui m'ont appuyé durant ces deux années.

Finalement, merci à Céline Dufour pour sa présence, son amour et sa patience pour mes longues journées passées au laboratoire.

Table des matières

Remerciements ..... *iii*

Liste des abréviations ..... *viii*

Liste des figures et des tableaux ..... *ix*

Résumé ..... *xi*

Introduction ..... *xiii*

Première partie *1*

1. Rappel sur le système immunitaire *3*

1.1 La fonction du système immunitaire 3
1.2 Les médiateurs solubles du système immunitaire 3
1.2.1 Les anticorps 4
1.2.2 Les cytokines 4
1.2.3 Le complément 5
1.3 Les composantes cellulaires du système immunitaire 5
1.3.1 Les leucocytes polymorphonucléaires 5
1.3.2 Les phagocytes mononucléaires 6
1.3.3 Les lymphocytes 7
1.4 Le système lymphoïde 9
1.4.1 Les organes lymphoïdes primaires 9
1.4.2 Les organes et tissus lymphoïdes secondaires 9
1.5 Les deux types d'immunité 10
1.5.1 L'immunité innée 10
1.5.2 L'immunité acquise 10

2. Les neutrophiles *11*

2.1 Le développement des neutrophiles 11
2.1.1 Les myéloblastes 13
2.1.2 Les promyélocytes 13
2.1.3 Les myélocytes 14
2.1.4 Les métamyélocytes et les neutrophiles « band » 15
2.2 La structure des neutrophiles 15
2.3 Les fonctions du neutrophile 16
Récepteurs 17
Effets majeurs du ligand 17
2.3.1 La chimiotaxie 18

2.3.2 La phagocytose 21
2.3.3 La flambée oxydative 22
2.3.3.1 La NADPH oxydase 23
2.3.3.2 La formation de réactifs dérivés de l'oxygène 25
2.3.3.3 La formation de réactifs dérivés de l'azote 27
2.3.4 La dégranulation 28
2.3.5 La synthèse protéique 29
2.3.5.1 La synthèse des récepteurs de surface 30
2.3.5.2 La synthèse de cytokines 31
2.3.5.3 La production de chimiokines 33
2.4 L'activation et la signalisation intracellulaire 34
2.4.1 Les protéines G 35
2.4.1.1 Les protéines G hétérotrimériques 35
2.4.1.2 Les petites protéines G 37
2.4.2 Les phospholipases 37
2.4.2.1 Les phospholipases A_2 (PLA_2) 38
2.4.2.2 Les phospholipases C (PLC) 39
2.4.2.3 Les phospholipases D (PLD) 41
2.4.3 Les protéines kinases 41
2.5 L'élimination des neutrophiles 43
2.5.1 L'apoptose des neutrophiles 44
2.5.2 La reconnaissance du neutrophile par le macrophage 46
2.6 Pathologies associées aux neutrophiles 46
2.6.1 Pathologies associées aux déficiences du neutrophile 47
2.6.1.1 La neutropénie 47
2.6.1.2 La granulomatose chronique (GCD) 48
2.6.1.3 Déficience au niveau de l'adhésion leucocytaire (LAD) 48
2.6.2 Pathologies associées à l'hyperactivité des neutrophiles 49
2.6.2.1 L'arthrite rhumatoïde 50
2.6.2.2 La goutte 51
2.6.2.3 Le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (ARDS) 51

3. Interaction entre les neutrophiles et les contaminants environnementaux 51

3.1 Le sulfite de sodium (Na_2SO_3) 53
3.1.1 Effet du Na_2SO_3 sur les composantes cellulaires du système respiratoire 54
3.1.2 Effet du Na_2SO_3 sur les neutrophiles 55
3.2 Le dieldrine 56
3.2.1 Effet du dieldrine sur le système immunitaire 57
3.2.2 Effet du dieldrine sur le neutrophile 58

Seconde partie 59

1. Article # 1 : Functional responses of human neutrophils to sodium sulfite (Na_2SO_3) in vitro 61

1.1 Résumé français de l'article #1 61

1.2 Article #1 61

2. Article # 2 : Activation of human neutrophils by the air pollutant sodium sulfite (Na_2SO_3) : Comparison with immature promyelocytic HL-60 and DMSO-differentiated HL-60 cells reveals that Na_2SO_3 is a neutrophil but not a HL-60 cell agonist *69*

2.1 Résumé français de l'article #2 69
2.2 Article #2 70

3. Article # 3 : Activation of human neutrophils in vitro and induction of neutrophilic inflammation in vivo by dieldrin *81*

3.1 Résumé français de l'article #3 81
3.2 Article #3 82

Troisième partie *129*

Conclusion *131*

Bibliographie *137*

Annexe *149*

Liste des abréviations

Ac	Anticorps	K	Killer
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	LGL	Grand lymphocyte à granules
ARDS	Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte	LTB_4	Leucotriène B_4
ATP	Adénosine triphosphate	MAP	Mitogen-activated protein kinase
BPC	Biphényles polychlorés	MCP	Monocyte chemotactic protein
CD	Cluster of differentiation	MIP	Macrophage inflammatory protein
CINC	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant	Na_2SO_3	Sulfite de sodium
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	NK	Natural killer
CPA	Cellule présentatrice d'antigène	NO	Oxyde nitrique
DAG	Diacylglycérol	O_2^-	Anion superoxyde
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	PAF	Facteur activant les plaquettes
fMLP	Formyl-méthionine-leucine-phénylalanine	PI	Phosphatidylinositol
GCD	Granulomateuse chronique	PI_3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	PIP	Phosphatidylinositol 4-phosphate
GTP	Guanosine triphosphate	PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène	PKC	Protéine kinase C
HOCl	Acide hypochloreux	PL	Phospholipase
Ig	Immunoglobuline	PMA	Phorbol myristate acétate
IL	Interleukine	RANTES	Regulated upon activation, normal T expressed and presumably secreted
INF	Interféron	Tc	Lymphocyte T cytotoxique
IP_3	Inositol 1,4,5-triphosphate	Th	Lymphocyte T auxiliaire
JAK	Janus kinase	TNF	Facteur nécrosant les tumeurs
JNK	c-Jun amino-terminal kinase		

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Schématisation de la réponse immunitaire spécifique 8
Figure 2 : Les grandes étapes du développement des cellules sanguines 12
Figure 3 : Illustration des étapes de développement du neutrophile 13
Figure 4 : Morphologie du neutrophile 16
Figure 5 : Les étapes de la migration des neutrophiles dans les tissus 19
Figure 6 : Formation d'un phagosome et activation de l'arsenal bactéricide contre un microorganisme 23
Figure 7 : Représentation de la NADPH oxydase des neutrophiles 24
Figure 8 : Schéma général des différentes molécules dérivées de l'oxygène générées par les neutrophiles 25
Figure 9 : Mécanisme d'action des protéines G hétérotrimériques 36
Figure 10 : Molécules produites par les phospholipases 38
Figure 11 : Représentation d'un calciosiome 40

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des différents récepteurs de surface et des ligands des neutrophiles 17
Tableau 2 : Les composantes majeures des granules des neutrophiles 29
Tableau 3 : Cytokines et chimiokines exprimées par les neutrophiles 31
Tableau 4 : Certaines protéines kinases retrouvées chez les neutrophiles 43
Tableau 5 : Maladies associées à certaines déficiences génétiques des neutrophiles 47
Tableau 6 : Désordres inflammatoires humains dans lesquels le neutrophile est impliqué comme un médiateur de la destruction tissulaire 49

Résumé

Dans le but de mieux comprendre le rôle et l'implication des neutrophiles au niveau de l'inflammation induite par des contaminants environnementaux ainsi que l'effet de ces mêmes contaminants sur des cellules immatures du système immunitaire, les réponses physiologiques des neutrophiles humains suite à l'exposition au sulfite de sodium (Na_2SO_3) et au dieldrine *in vitro* ont été étudiées, de même que les mécanismes d'action par lesquels ces xénobiotiques interagissent avec les neutrophiles. Un autre objectif de cette étude était de déterminer si les résultats *in vitro* obtenus avec le dieldrine sont similaires à ceux obtenus dans un organisme vivant en utilisant le modèle inflammatoire murin de la poche d'air. Le dernier objectif de la présente étude était de déterminer si les cellules HL-60 peuvent remplacer les neutrophiles dans des tests de criblage de toxicité des xénobiotiques en vérifiant si leurs réponses au Na_2SO_3 sont similaires à celles obtenus avec les neutrophiles.

Afin de répondre à ces objectifs, les neutrophiles ont été isolés de donneurs sains, avant de les stimuler *in vitro* avec le Na_2SO_3 ou le dieldrine, selon le cas. Certaines réponses physiologiques des neutrophiles et des HL-60 ont par la suite été examinées, soient la production d'anions superoxydes, la phagocytose, la synthèse d'ARN, la synthèse protéique *de novo*, la phosphorylation des résidus tyrosine, la production de cytokines pro-inflammatoires et le niveau d'apoptose. Dans tous les cas, les réponses des neutrophiles aux contaminants environnementaux ont été comparées à celles obtenues avec des cytokines afin de déterminer si les neutrophiles répondent de façon similaire ou différente à une cytokine et à un xénobiotique. Afin d'étudier les mécanismes d'action, l'effet d'inhibiteurs de voies de signalisation a été analysé sur certaines fonctions des neutrophiles. Finalement, des souris ont été stimulées avec du dieldrine en utilisant le modèle inflammatoire de la poche d'air et les cellules ont été récoltées puis identifiées afin d'établir les effets pro-inflammatoires du dieldrine *in vivo*.

Nos recherches ont permis de conclure que le potentiel toxique du Na_2SO_3 durant l'inflammation pulmonaire ou les maladies pulmonaires pourrait être relié à la capacité d'induire la production de superoxyde et la production d'interleukine-8 (IL-8) et ce, sans moduler le taux d'apoptose des neutrophiles. Le Na_2SO_3 agit également comme un inhibiteur de la synthèse protéique *de novo* des neutrophiles, en plus d'induire des événements de phosphorylation des résidus tyrosine de protéines, dont certaines bandes co-migrent avec celles phosphorylées par le GM-CSF, un agoniste classique des neutrophiles. Ceci suggère qu'un contaminant de l'environnement pourrait utiliser une voie semblable à une cytokine connue pour induire ces effets par un récepteur de surface. De plus, nos résultats indiquent clairement que les réponses physiologiques des HL-60 envers le Na_2SO_3 sont différentes des neutrophiles. Il faut donc être prudent lors de l'extrapolation des données obtenues avec les HL-60 aux neutrophiles, une pratique encore courante.

Le dieldrine possède également des propriétés pro-inflammatoires en stimulant la production de superoxyde et la production d'IL-8. Tout comme le Na_2SO_3, ce dernier ne module pas l'apoptose des neutrophiles. Le mécanisme d'action du dieldrine a été partiellement élucidé par l'utilisation d'inhibiteurs : le dieldrine activerait la NADPH oxydase des neutrophiles par les protéines kinases C et la phosphorylation de résidus tyrosine. De plus, les résultats *in vitro* sont en accord avec les résultats *in vivo*. En ce sens, le dieldrine induit l'accumulation rapide de neutrophiles dans le modèle inflammatoire de la poche d'air et ceci peut expliquer, en partie, que ces cellules soient responsables des effets toxiques du dieldrine, de par l'hyperactivité des neutrophiles engendrée par le dieldrine.

Nos résultats ont permis de mieux caractériser les réponses cellulaires des granulocytes aux contaminants environnementaux et ont montré l'importance d'étudier davantage ces cellules dans le domaine de l'immunotoxicologie ou autres domaines connexes.

Introduction

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus nombreux de la circulation sanguine. Ce sont également les premières cellules à se rendre au foyer inflammatoire. Suite à leur activation, les neutrophiles exercent différentes fonctions dans le but d'éliminer les corps étrangers : ils peuvent générer des radicaux libres, effectuer la phagocytose, libérer des enzymes protéolytiques via la dégranulation, synthétiser diverses protéines incluant des cytokines, etc. Toutefois, lors d'une dérégulation de ces fonctions, les effets bénéfiques des neutrophiles peuvent devenir néfastes à l'organisme puisque les radicaux libres et les enzymes protéolytiques libérés dans leur environnement immédiat peuvent réagir avec les protéines, les lipides et les acides nucléiques des cellules voisines. Cette hyperactivité des neutrophiles peut survenir lors de certaines maladies ou peut être induite par des agents extérieurs. En effet, les contaminants de l'environnement sont de plus en plus reconnus comme étant liées à certains désordres inflammatoires, plus particulièrement dans le cas de l'inflammation pulmonaire.

Des études ont donc été entreprises afin de mieux comprendre le rôle et l'implication des granulocytes au niveau de l'inflammation induite par des contaminants environnementaux. L'effet de ces mêmes contaminants sur des cellules immatures du système immunitaire, la lignée cellulaire promyélocytique HL-60, a également été étudié sur certaines fonctions dans le but de déterminer l'implication de cellules immatures sur la toxicité de quelques contaminants de l'environnement. Ainsi, certaines réponses physiologiques des neutrophiles humains suite à l'exposition au sulfite de sodium (Na_2SO_3) et au dieldrine *in vitro* ont été étudiées, soit la production d'anions superoxydes, la phagocytose, la synthèse d'ARN, la synthèse protéique *de novo*, la phosphorylation des résidus tyrosine, la production de cytokines pro-inflammatoires et le niveau d'apoptose. Les mécanismes d'action par lesquels ces xénobiotiques interagissent avec les neutrophiles ont également été étudiés par l'utilisation d'inhibiteurs de certaines voies de signalisation. Un autre objectif de cette étude était de déterminer si les résultats *in vitro* obtenus avec le dieldrine étaient en accord avec les résultats obtenus dans un organisme

vivant en utilisant le modèle inflammatoire murin de la poche d'air. Le dernier objectif de la présente étude était de déterminer si les cellules HL-60 pouvaient remplacer les neutrophiles dans des tests de criblage de toxicité des xénobiotiques en vérifiant si leurs réponses au Na_2SO_3 sont similaires à celles obtenus avec les neutrophiles. Ici, l'intérêt d'utiliser la lignée cellulaire HL-60 est d'autant plus grand, puisque ces cellules ont la capacité de se différencier en cellules matures au phénotype « neutrophile » (ressemblant aux véritables neutrophiles). Ainsi, les résultats obtenus permettront de déterminer si la maturation de la cellule influence ses réponses cellulaires aux toxiques de l'environnement.

Première partie
Revue de littérature

1. Rappel sur le système immunitaire

L'environnement est peuplé d'une foule de microorganismes qui peuvent provoquer des maladies. Ces dernières conduiraient à la mort si les microorganismes se multipliaient de façon incontrôlée. En général, les infections reliées à ces envahisseurs guérissent rapidement et laissent peu de séquelles et ce, grâce à l'action du système immunitaire.

1.1 La fonction du système immunitaire

Le système immunitaire a pour fonction de protéger l'organisme des lésions causées par l'invasion de microorganismes (bactéries, virus, champignons et parasites). Deux types de réponses sont traditionnellement utilisés pour décrire les différents mécanismes employés : la réponse à médiation humorale, comprenant les anticorps, le complément et autres facteurs solubles, et la réponse à médiation cellulaire, assurée par les leucocytes (globules blancs) et certaines cellules accessoires. Ces cellules interagissent entre elles et avec les différents facteurs solubles afin d'éliminer le plus rapidement possible l'agent pathogène tout en limitant les dommages qu'il puisse induire (Male, 1999).

1.2 Les médiateurs solubles du système immunitaire

Un grand nombre de molécules sont impliquées dans le développement de la réponse immunitaire. Il s'agit des anticorps, des cytokines, du complément et d'un ensemble d'autres molécules sériques. Ces protéines sont également appelées protéines de la phase aiguë, car leur concentration augmente rapidement lors de l'infection, à un point tel qu'elles sont utilisées comme marqueurs d'événements inflammatoires. Parmi celles-ci, on retrouve la protéine C-réactive qui se lie à la protéine de type C de la bactérie *Pneumococcus sp.* et facilite ainsi sa capture par les phagocytes (Mold *et al.*, 1982) et la protéine sérique amyloïde A, dont les niveaux sont très élevés chez les gens atteints de la maladie d'Alzheimer (Urieli-Shoval, Linke et Matzner, 2000).

1.2.1 Les anticorps

Les anticorps (Acs), ou immunoglobulines (Igs), sont des molécules produites par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes. Ces Acs sont les formes solubles des récepteurs d'antigènes des cellules B. Les anticorps ont tous la même structure de base, mais diffèrent au niveau de la région se liant à l'antigène. Dans la plupart des cas, chaque anticorps est spécifique à un seul antigène, c'est-à-dire une molécule reconnue par le système immunitaire. Il existe cinq formes d'anticorps : les IgA, les IgD, les IgE, les IgG et les IgM. Chacune de ces formes d'anticorps possède une partie variable appelée Fab et une partie constante appelée Fc. C'est au niveau d'une région de la zone Fab que l'anticorps se lie à l'antigène alors que la partie Fc interagit avec d'autres éléments du système immunitaire, tels les phagocytes et certaines composantes du complément. Les anticorps agissent donc comme des adapteurs flexibles permettant aux éléments du système immunitaire de reconnaître de façon spécifique des corps étrangers, c'est-à-dire les antigènes (Roitt, Brostoff et Male, 1994).

1.2.2 Les cytokines

Le terme de cytokine désigne un ensemble de molécules impliquées dans la signalisation intercellulaire lors de la réponse immunitaire. En général, ce sont des protéines de faible poids moléculaire contrôlant un grand nombre de processus biologiques, tels que la croissance cellulaire, l'inflammation, la réponse immunitaire, la réparation tissulaire, etc. Les cytokines sont considérées comme les hormones du système immunitaire et elles exercent des effets paracrines (sur les autres cellules) et autocrines (sur la cellule même ayant sécrétée la cytokine). La capacité de répondre à une cytokine particulière dépend de l'expression d'un récepteur spécifique à la surface. Les cytokines regroupent, entre autres, les interférons (protéines ayant des activités antivirales), les interleukines (IL), les facteurs stimulant les colonies (CSF) et les facteurs de nécrose des tumeurs (TNF) (Révillard, 1998).

1.2.3 Le complément

Le système du complément est constitué d'une vingtaine de protéines plasmatiques dont la fonction principale est le contrôle de la réaction inflammatoire. Les composantes du complément interagissent entre elles et avec d'autres éléments du système immunitaire. Le système du complément peut être activé spontanément par des microorganismes (voie alternative) ou par des anticorps fixés à la surface de ceux-ci (voie classique). L'activation du complément est une réaction en cascade où chaque composante agit de façon séquentielle sur les autres. L'activation par l'une ou l'autre des deux voies produit des peptides qui ont des effets : i) d'opsonisation (recouvrement) des microorganismes en vue de leur capture par les phagocytes; ii) d'attraction des phagocytes au site inflammatoire (chimiotactisme); iii) d'augmentation du flux sanguin et de la perméabilité capillaire aux molécules plasmatiques; iv) de lésions des membranes cytoplasmiques des cellules et de certaines bactéries (Benjamini, Sunshine et Leskowitz, 1996).

1.3 Les composantes cellulaires du système immunitaire

Les composantes cellulaires du système immunitaire sont constituées des leucocytes polymorphonucléaires, des phagocytes mononucléaires et des lymphocytes, et chacune de ces composantes possède des fonctions particulières qui aident l'organisme à se défendre contre les pathogènes. Les composantes cellulaires du système immunitaire incluent également les globules rouges, dont le rôle dans la réponse immunitaire est plus limité, et les plaquettes, qui peuvent présenter l'antigène et produire des médiateurs de l'inflammation.

1.3.1 Les leucocytes polymorphonucléaires

Ce groupe est formé des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles, noms attribués par la couleur du contenu cytoplasmique suite à certaines techniques de colorations cellulaires. Le rôle principal des neutrophiles est de capturer les agents pathogènes, surtout les bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etc.), ainsi que les débris

cellulaires et de les dégrader via la phagocytose. Les éosinophiles ont plutôt un rôle à jouer dans la réponse aux parasites, comme par exemple lors de l'élimination des larves du parasite *Haemonchus contortus* (Rainbird, Macmillan et Meeusen, 1998) et dans le contrôle de l'inflammation. Les basophiles jouent un rôle important dans l'inflammation, plus particulièrement dans les réponses allergiques. En effet, l'histamine et la sérotonine relâchées lors de l'activation de la cellule sont responsables de la contraction des muscles lisses bronchiaux et gastro-intestinaux chez les patients asthmatiques et les personnes allergiques (Trowbridge et Emling, 1997).

1.3.2 Les phagocytes mononucléaires

Dans ce groupe, on distingue deux types cellulaires ayant des fonctions différentes : les macrophages, phagocytes dits « professionnels » dont le rôle primordial est d'éliminer les antigènes particulaires par phagocytose, et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont le rôle est de présenter l'antigène aux lymphocytes. Les phagocytes mononucléaires se retrouvent dans plusieurs organes et forment ainsi un réseau. Ils possèdent un nom différent selon la localisation dans un organe ou tissu particulier. Ainsi, le précurseur du macrophage se nomme le monocyte sanguin et représente une réserve circulante ou un « pool » qui peut migrer vers les différents organes et tissus pour se différencier en macrophage mature. Les cellules de Kupffer du foie, les cellules du mésangium intraglomérulaire du rein, les macrophages alvéolaires du poumon, les macrophages des séreuses, des sinus spléniques et des sinus ganglionnaires constituent des exemples de macrophages migrants. Les cellules microgliales, par contre, sont des macrophages fixes ayant pénétré au moment de la naissance. Les monocytes/macrophages peuvent également présenter l'antigène aux lymphocytes T, dont les fonctions seront décrites en détails plus tard. Les CPA, quant à eux, se trouvent principalement dans la peau, les ganglions, la rate et le thymus. Dans ce type cellulaire, on distingue les cellules de Langerhans de la peau, les cellules dendritiques folliculaires des ganglions et de la pulpe blanche de la rate et les cellules interdigitales de la médullaire du thymus. Ces dernières pourraient intervenir dans la sélection négative des lymphocytes T lors de leur développement. Toutes les CPA expriment fortement les molécules de classe II du

complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et jouent un rôle important dans la présentation de l'antigène aux cellules T $CD4^+$ dont le rôle est décrit plus loin (Roitt, Brostoff et Male, 1994).

1.3.3 Les lymphocytes

Ce groupe comprend les lymphocytes B et T, ainsi que les grands lymphocytes à granules (LGL, « large granular lymphocytes »). Les lymphocytes, contrairement aux leucocytes polymorphonucléaires et aux phagocytes mononucléaires qui sont impliqués dans la réponse immunitaire dite « naturelle », sont plutôt impliqués dans la réponse immunitaire dite « acquise ». De façon abrégée, les cellules B possèdent à leur surface des récepteurs pour un antigène spécifique. Lorsqu'une CPA présente l'antigène vers l'immunoglobuline de surface, la cellule B répond en se divisant et en se différenciant en plasmocyte, cellule sécrétrice d'anticorps, ou en cellule mémoire. Les lymphocytes T ont pour rôles essentiels des fonctions régulatrices et cytotoxiques et sont divisés en trois grands types cellulaires : les cellules T cytotoxiques $CD8^+$ (Tc), les cellules T auxiliaires $CD4^+$ (Th, « T helper ») et les T suppressives. Les Tc sont capables de détruire les cellules cibles infectées alors que les Th aident les cellules B à se diviser, à se différencier et à produire des anticorps et peuvent produire différentes cytokines afin d'interagir avec d'autres cellules du système immunitaire. Les Ts sont caractérisées par leur capacité de réguler négativement les fonctions des cellules B et les autres cellules T. Les lymphocytes T, tout comme les cellules B, ont la capacité de devenir des cellules à mémoire, c'est-à-dire des cellules à longue durée de vie qui ont été préalablement stimulées par l'antigène et qui sont capables de répondre plus rapidement à ce dernier suite à une seconde stimulation. La **figure 1** présente un schéma de la réponse immunitaire spécifique et résume les fonctions des différentes populations lymphocytaires. Les LGL comprennent deux populations distinctes, les cellules K (« killer », tueuse) et les cellules NK (« natural killer », tueuse naturelle). Les cellules K sont des cellules qui tuent les cellules cibles sensibilisées par un anticorps alors que les cellules NK sont capables de tuer des cellules, soit infectées par un virus, soit transformées (comme dans le cas de cellules cancéreuses) et ce, sans sensibilisation préalable par le phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante des

anticorps, couramment appelé l'ADCC (« antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity »). Les cellules NK sont les cellules majoritaires pouvant effectuer l'ADCC. Dans cette forme de cytotoxicité, la portion Fab des IgGs se fixe sur la cellule cible (microorganisme ou cellule tumorale) alors que la portion Fc se fixent aux récepteurs Fcγ sur les cellules tueuses. Brièvement, lors de ce phénomène, les IgGs « dirigent » les cellules tueuses sur leur cible qui peuvent alors la détruire, non pas par phagocytose, mais par la libération de diverses substances. Ces substances dépendent du type de cellule effectrice : les macrophages libèrent des enzymes et des intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène, alors que les cellules NK utilisent les perforines ou des cytokines (Abbas, Lichtman et Pober, 1997).

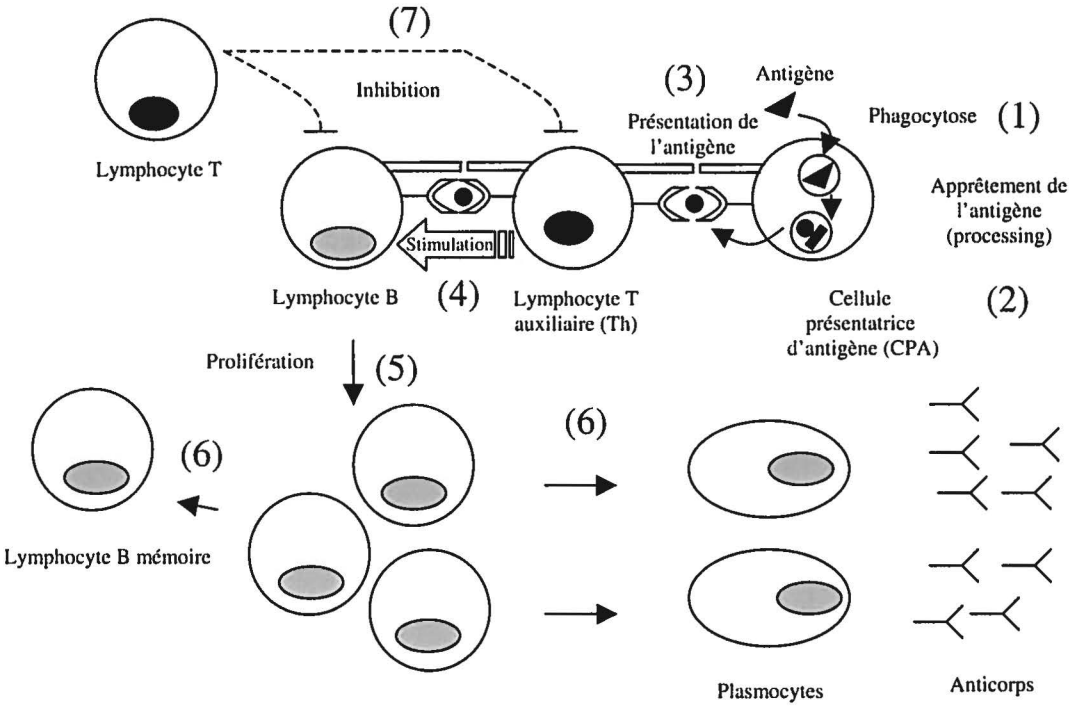


Figure 1 : Schématisation de la réponse immunitaire spécifique

(1) L'antigène (Ag) est reconnu puis phagocyté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA). **(2)** Apprêtement de l'Ag par la CPA. **(3)** Présentation de l'Ag au lymphocyte T auxiliaire (Th) qui le présentera lui-même au lymphocyte B. L'Ag peut également être présenté directement au lymphocyte B. **(4)** Stimulation du lymphocyte B par le lymphocyte Th à l'aide de cytokines et autres facteurs solubles. **(5)** Prolifération du lymphocyte B. **(6)** Différenciation du lymphocyte B en plasmocyte (cellule sécrétrice d'anticorps) et en cellule mémoire. Le lymphocyte T peut également se différencier en cellule mémoire. **(7)** Une fois la réponse immunitaire terminée, le lymphocyte T suppressif peut inhiber les fonctions des lymphocytes (inspiré de Roitt, Brostoff et Male, 1994).

1.4 Le système lymphoïde

Les cellules du système immunitaire sont organisées en tissus et organes afin de favoriser les interactions cellulaires et d'accomplir efficacement leurs fonctions. L'ensemble des organes et tissus constituent le système lymphoïde. Celui-ci comprend les lymphocytes, les cellules accessoires (macrophages et CPA) et des cellules épithéliales de certains tissus. Les organes et tissus lymphoïdes sont séparés en organes et tissus lymphoïdes primaires et secondaires.

1.4.1 Les organes lymphoïdes primaires

Les organes lymphoïdes primaires sont les sites majeurs de la lymphopoïèse. Ceux-ci sont constitués du thymus et de la moelle osseuse. Les lymphocytes s'y différencient à partir des cellules souches, prolifèrent et se développent en cellules effectrices. Ils « apprennent » également à distinguer les antigènes du soi et du non-soi par le phénomène de tolérance. La tolérance est l'acquisition d'un état de non-réponse vis-à-vis d'une molécule reconnue par le système immunitaire. Les animaux sont normalement tolérants à leurs propres tissus, sans quoi ils développeraient des maladies auto-immunes, c'est-à-dire des réactions immunitaires contre leurs propres tissus. Cette tolérance est due essentiellement à la délétion clonale des cellules autoréactives pendant la période néonatale et lors du développement des lymphocytes, puisque ces cellules sont continuellement produites. Chez les mammifères, les lymphocytes T matures sont produits dans le thymus (d'où le nom de cellules T), alors que les lymphocytes B matures sont produits dans le foie fœtal et la moelle osseuse. Chez les oiseaux, il existe un organe spécialisé dans la production des lymphocytes B, la bourse de Fabricius (d'où le nom de cellules B) (Roitt, Brostoff et Male, 1994).

1.4.2 Les organes et tissus lymphoïdes secondaires

Après leur différenciation dans les organes primaires, les lymphocytes migrent par le sang et la lymphe dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces organes constituent

l'environnement dans lequel les lymphocytes, les phagocytes et les CPA interagissent entre eux ou avec l'antigène afin d'amplifier la réponse immunitaire. Les organes secondaires comprennent la rate, les ganglions lymphatiques et les formations lymphoïdes associées aux muqueuses (les plaques de Payer et amygdales palatines, entre autres) (Roitt, Brostoff et Male, 1994).

1.5 Les deux types d'immunité

1.5.1 L'immunité innée

L'immunité innée ou naturelle est la réponse qui survient en réponse à l'invasion de microorganismes dont les mécanismes effecteurs ne sont ni spécifiques à l'agent infectieux en question, ni plus efficaces après plusieurs rencontres avec ce même agent, expliquant que la résistance n'augmente pas après réinfection. Les cellules impliquées dans l'immunité innée sont principalement les phagocytes ainsi que les cellules NK. Ces cellules représentent la première ligne de défense contre l'infection après la peau et les phanères. Les facteurs solubles quant à eux sont principalement le lysozyme, le complément et les protéines de la phase aiguë (par exemple, la protéine C-réactive et les interférons) (Male, 1999).

1.5.2 L'immunité acquise

L'immunité acquise ou adaptée, contrairement à l'immunité innée, est spécifique à l'agent inducteur. Elle se caractérise par une augmentation de la réponse et de la résistance à chaque rencontre avec cet agent ou suite à une réinfection. Les caractéristiques majeures de cette réponse immunitaire sont donc la spécificité et la mémoire. Les facteurs solubles impliqués sont principalement les anticorps et les cytokines alors que les cellules impliquées sont les lymphocytes B et T. Toutefois, il y a beaucoup d'interactions entre les cellules impliquées au niveau de l'immunité naturelle et adaptée. Par exemple, certains phagocytes peuvent présenter l'antigène aux cellules T alors que de leur côté, les lymphocytes T sécrètent certains facteurs solubles qui stimulent les phagocytes, tout comme ces derniers utilisent les anticorps produits par les

lymphocytes B pour reconnaître les microorganismes. Ainsi, ces deux concepts de l'immunité interagissent entre eux et ce, dans le but d'éliminer le plus rapidement l'infection (Male, 1999).

2. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les phagocytes professionnels les plus abondants du sang. Ils se développent dans la moelle osseuse avant de se rendre dans la circulation sanguine pour une courte période de temps. Ils vont alors spontanément se diriger vers la mort programmée appelée apoptose, à moins de migrer vers les tissus sous l'influence de facteurs attractants. De là, ils pourront effectuer leurs fonctions dans le but d'éliminer les microorganismes en répondant à divers stimuli de leur environnement. Ils seront éventuellement éliminés par les macrophages, puisque le contenu histotoxique des neutrophiles peut grandement endommager les cellules et tissus environnants et conduire à des désordres inflammatoires.

2.1 Le développement des neutrophiles

Le processus responsable de la production des cellules sanguines est l'hématopoïèse, phénomène survenant dans la moelle osseuse. La **figure 2** montre les grandes étapes du développement des cellules sanguines. Il existe trois types majeurs de cellules dans la moelle osseuse : les cellules souches pluripotentes ou multipotentes ayant la capacité de se diviser et de se différencier en cellules sanguines de toutes les lignées différentes, les cellules progénitrices qui peuvent proliférer et se différencier en une lignée spécifique et les cellules matures. La régulation de l'hématopoïèse est assurée par les facteurs stimulant les colonies (CSF, « colony-stimulating factors), tel le GM-CSF (facteur stimulant les granulocytes et les macrophages), le G-CSF et le M-CSF. L'interleukine-3 (IL-3), également appelé le multi-CSF ou hématopoïétine multi-spécifique, l'IL-5, l'IL-7, l'IL-11 et l'érythropoïétine sont des membres fonctionnels de ce groupe de facteurs (Roitt, Brostoff et Male, 1994).

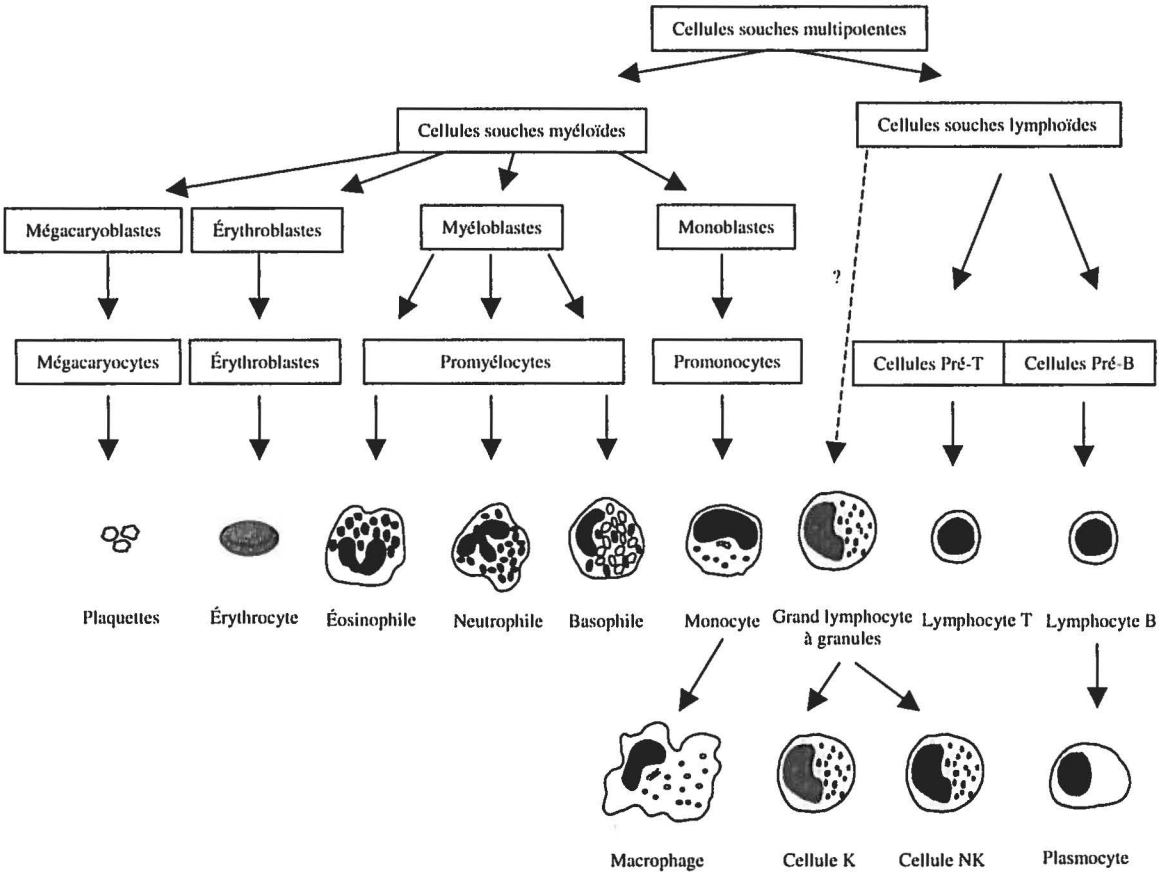


Figure 2 : Les grandes étapes du développement des cellules sanguines

(Inspiré de Edwards, 1994)

La majorité des cellules provenant de la moelle osseuse sont des neutrophiles. En effet, environ 55-60% des cellules qui y sont produites sont des neutrophiles. Le développement des neutrophiles matures survient par la différenciation des cellules souches multipotentes en cellules progénitrices de la lignée neutrophilique. Les stades de développement de la lignée neutrophilique sont dans l'ordre les myéloblastes, les promyélocytes, les myélocytes, les métamyélocytes, les neutrophiles immatures dits « band » et les neutrophiles matures ou segmentés (Edwards, 1994). La **figure 3** montre les stades de développement du neutrophile.

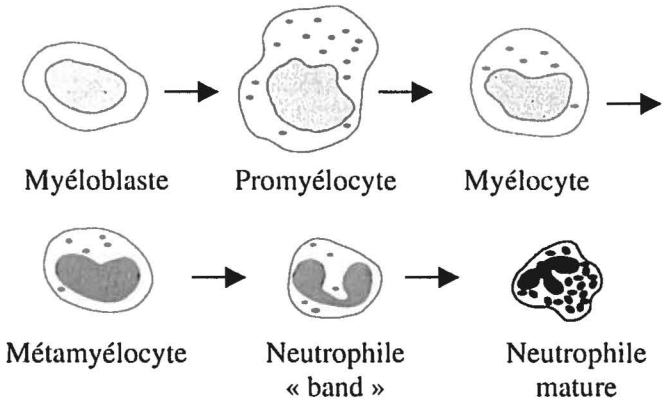


Figure 3 : Illustration des étapes de développement du neutrophile

(Inspiré de Edwards, 1994)

2.1.1 Les myéloblastes

Les myéloblastes sont des cellules très peu différenciées qui ont la capacité de proliférer et qui possèdent un gros noyau et peu ou pas de granules. Le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi sont positifs pour la myéloperoxydase, démontrant que cette enzyme commence à être synthétisée (Edwards, 1994).

2.1.2 Les promyélocytes

Les promyélocytes sont caractérisés par l'acquisition d'un grand nombre de granules appelés azurophiles ou primaires et contenants la myéloperoxydase. Cette enzyme est présente dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vésicules sécrétrices. Des récepteurs spécifiques commencent à être détectables à la surface de la cellule, comme le CR3 (récepteur pour le complément) et le FcγRIII (récepteur pour la portion Fc des IgGs) (Glasser et Fiederlein, 1987). Ces cellules sont également capables de proliférer, tout comme la lignée cellulaire HL-60, une lignée largement utilisée afin d'étudier les mécanismes de régulation de la maturation des neutrophiles (Edwards, 1994).

La lignée cellulaire promyélocytique HL-60 provient d'un individu atteint de leucémie promyélocytique. Ces cellules répondent à différents stimuli chimiques en acquérant un phénotype ressemblant aux granulocytes (Collins *et al.*, 1980) ou aux monocytes/macrophages (Murao *et al.*, 1983). Par exemple, le diméthyle sulfoxyde (DMSO) et l'acide rétinoïque permettent aux cellules HL-60 d'acquérir un phénotype de neutrophile alors que le phorbol myristate acétate (PMA) permet à ces mêmes cellules d'acquérir le type macrophage. L'acquisition de ces phénotypes matures est démontrée par une variété de marqueurs de différenciation. Ces derniers incluent des marqueurs enzymatiques (augmentation de l'activité de la NADPH oxydase ou des caspases, par exemple), des changements morphologiques (apparition d'un noyau segmenté pour le type granulocyte et attachement sur des cellules en culture pour le type macrophage), la modulation de récepteurs de surface (apparition de CD11b chez le HL-60 différencié en granulocyte (Watson *et al.*, 1997)) et l'apparition ou la disparition de certaines protéines (diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 chez le HL-60 différencié en « neutrophile » et apparition de la sensibilité à la voie de signalisation apoptotique Fas (Watson *et al.*, 1997)). L'un des tests de différenciation des HL-60 le plus couramment utilisé est le test de réduction du nitrobleu de tétrazolium. En effet, lorsque le HL-60 se différencie en « neutrophile », il acquiert la NADPH oxydase et peut réduire le bleu de tétrazolium grâce à la génération de superoxyde, transformant le composé jaune en noir (Collins *et al.*, 1980). Cette lignée cellulaire représente donc un outil intéressant afin de déterminer la toxicité et les effets de différents composés sur des cellules immatures du système immunitaire et, jusqu'à un certain point, une alternative pour remplacer les neutrophiles et leur isolation journalière.

2.1.3 Les myélocytes

Les myélocytes sont caractérisés par la synthèse et l'accumulation des granules spécifiques ou secondaires. La mitose est encore possible pour ces cellules, mais les granules primaires sont répartis également entre les cellules-filles issues de cette division. La synthèse des granules primaires cesse lors de ce stade de différenciation, mais de

nouveaux récepteurs apparaissent à la surface des myélocytes et à la surface des granules (Edwards, 1994).

2.1.4 Les métamyélocytes et les neutrophiles « band »

Les métamyélocytes et les « neutrophiles band » sont incapables de se diviser. Ils sont identifiables par la forme du noyau, leur contenu en granules, la très faible présence de mitochondries et par la présence de glycogène. Ce dernier est essentiel afin d'assurer les fonctions cellulaires via la glycolyse, un processus indépendant de l'oxygène. Les cellules matures contiennent entre 200 et 300 granules, comprenant deux fois plus de granules spécifiques que de granules azurophiles. Finalement, la plupart des récepteurs de surface des neutrophiles matures sont maintenant présents (Edwards, 1994).

2.2 La structure des neutrophiles

Les neutrophiles matures sont des cellules abondantes dans le système immunitaire. Ils sont produits dans la moelle osseuse à un taux de 80 x 10^6 cellules par minute et possèdent une durée de vie courte (1-2 jours). Leur demi-vie est d'environ 12h dans la circulation sanguine, mais peut augmenter de quelques jours si la cellule quitte la circulation et colonise les tissus. Les neutrophiles représentent jusqu'à 90% des polynucléaires circulants et 70% des leucocytes totaux. La concentration sanguine se situe entre 3 et 5 x 10^6 cellules/mL pour un adulte normal, mais peut augmenter dramatiquement (jusqu'à 10 fois) dans le cas d'infection et d'inflammation. Leur noyau est multilobé avec deux à quatre segments, tel que le démontre la **figure 4**, et le diamètre de la cellule varie de 10 à 20 μm. Ces cellules sont également grandement motiles et contiennent un arsenal important de mécanismes cytotoxiques, particulièrement les granules, qui permettent de tuer et d'éliminer les pathogènes microbiens. Les neutrophiles sont également d'importantes cellules du système immunitaire, puisque les sujets ayant un faible nombre de polynucléaires ou dont les processus-clés sont défectueux (déficit génétique d'une chaîne d'un récepteur, d'une molécule d'adhésion, etc.) sont grandement susceptibles aux infections (Roitt, Brostoff et Male, 1994). Les maladies associées aux neutrophiles seront décrites en détail dans la section 2.6.

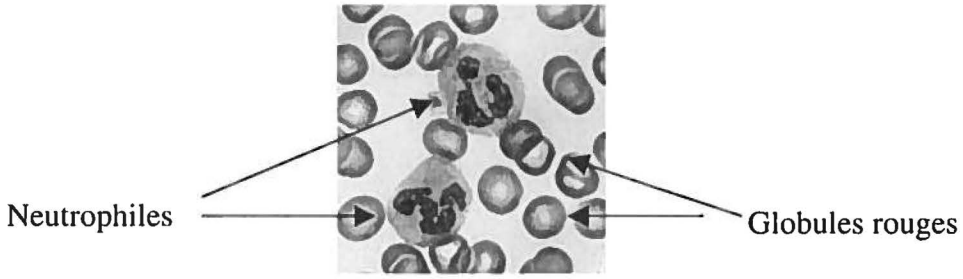


Figure 4 : Morphologie du neutrophile

Les neutrophiles ont la capacité de répondre à certains signaux de leur environnement grâce, en grande partie, aux protéines à leur surface. Certaines de ces protéines se présentent comme des récepteurs (une ou plusieurs chaînes) de certaines cytokines particulières alors que d'autres sont nécessaires afin de permettre l'adhésion des neutrophiles aux sites inflammatoires. Le **tableau 1** présente quelques-uns des récepteurs à la surface des neutrophiles et les effets majeurs de leurs ligands.

2.3 Les fonctions du neutrophile

À ce jour, aucune étude n'a montré que le neutrophile possède une certaine spécificité vis-à-vis l'antigène. Cette cellule est donc impliquée principalement dans l'immunité innée. La fonction principale du neutrophile est de tuer les pathogènes par le processus appelé la phagocytose. L'efficacité de cette fonction est toutefois régulée à différents niveaux. Tout d'abord, le neutrophile quitte la circulation sanguine et atteint le foyer inflammatoire par chimiotaxie. Ensuite, le neutrophile reconnaît le pathogène ou corps étranger, soit naturellement, soit par l'entremise d'opsonines. Suite à la fixation du pathogène à la surface du neutrophile, la cellule répond en activant son arsenal bactéricide : la flambée respiratoire générant des radicaux libres et la dégranulation d'enzymes protéolytiques à fort pouvoir dégradant. Le neutrophile peut également synthétiser de nouvelles protéines suite à son activation, tels des récepteurs de surfaces, des cytokines et chimiokines, afin d'augmenter la réponse inflammatoire. Cette activation du neutrophile dépend de récepteurs à sa surface, qui engendrent par la suite la

Tableau 1 : Description des différents récepteurs de surface et des ligands des neutrophiles

Récepteurs	Effets majeurs du ligand
Leucotriène B_4 (LTB_4)	Puissant chimioattractant, induit l'adhésion aux cellules endothéliales, la dégranulation et l'agrégation (Edwards, 1994)
Fragment C5a du complément (CD88)	Induit la dégranulation, la flambée oxydative et l'adhésion (Edwards, 1994)
Facteur activant les plaquettes (PAF)	Induit la chimiotaxie, la chimiokinésie, l'agrégation, l'adhésion, la dégranulation, la flambée oxydative et sensibilise la cellule à la flambée oxydative (priming) (Edwards, 1994)
Histamine	Augmente ou inhibe, selon la concentration, la chimiokinésie induite par différents agonistes (Edwards, 1994)
IL-1	Recrutement des neutrophiles à partir de la moelle osseuse et régulation de leurs fonctions (Edwards, 1994)
IL-4	Induit des réarrangements du cytosquelette, la synthèse protéique *de novo*, la phagocytose, la production d'IL-8 et retarde l'apoptose (Girard, Paquin et Beaulieu, 1997)
IL-8	Induit la chimiotaxie, l'adhésion, la dégranulation et la flambée oxydative (Edwards, 1994)
IL-13	Induit la synthèse protéique *de novo* et la production d'IL-8 (Girard *et al.*, 1996a)
IL-15	Retarde l'apoptose, induit des réarrangements du cytosquelette et la production d'IL-8, augmente la phagocytose et la synthèse protéique *de novo* (Girard *et al.*, 1996b et McDonald *et al.*, 1998)
INF-γ	Induit l'expression de FcγRI, l'ADCC, la sensibilisation et la synthèse protéique (Edwards, 1994)
GM-CSF	Sensibilise la cellule à la flambée oxydative, induit la synthèse protéique *de novo*, la synthèse des gènes et retarde l'apoptose (Edwards, 1994 et Colotta *et al.*, 1992)
G-CSF	Prépare la cellule à la flambée oxydative, augmente la phagocytose et l'ADCC (Edwards, 1994)
TNF-α	Induit la chimiotaxie, augmente l'adhésion, la phagocytose, et sensibilise la cellule à la dégranulation et à la flambée oxydative (Edwards, 1994). Peut accélérer l'apoptose (Takeda *et al.*, 1993)
Fas (CD95)	Engendre l'apoptose par la liaison de Fas ligand (FasL) (Iwai *et al.*, 1994)
FMet-Leu-Phe (fMLP)	Active la chimiotaxie, l'agrégation, la production de radicaux libres, des changements du cytosquelette et la dégranulation (Edwards, 1994)

FcγRI (CD64)	Lie les IgGs et augmente la phagocytose des particules opsonisées (exprimé seulement lorsque le NT est exposé à l'INF-γ) (Edwards, 1994)
FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16)	Lie les IgGs et augmente la phagocytose des particules opsonisées (Edwards, 1994)
L-sélectine (CD62L)	Se lie à des hydrates de carbone sur l'endothélium et engage l'adhésion des neutrophiles (roulement). Inversement, les P-sélectines (CD62P) et les E-sélectines (CD62E) de l'endothélium se fixent aux hydrates de carbone à la surface des neutrophiles (comme par le CD15 ou syalyl-Lewis x) (Edwards, 1994).
Intégrines	Permet l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium. Se lient fortement à des molécules d'adhésion cellulaire et à des composantes de la matrice extra-cellulaire des cellules endothéliales (fibronectine, collagène, etc.) (Edwards, 1994)
$\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18, LFA-1)	Se lie à ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) et ICAM-3 (CD50)
$\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, CR3)	Se lie à ICAM-1, -2, -3 et iC3b
$\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18, CR4)	Se lie à iC3b
$\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29, VLA-4)	Se lie à VCAM-1 (CD106)
Adhésines	Lient certains composants du complément et activent le neutrophile (phagocytose, chimiotaxie, adhésion, etc.) (Edwards, 1994)
CR1 (CD35)	Se lie à C3b et C4b, médiateur de la phagocytose

formation de seconds messagers. Ces derniers activent alors les systèmes enzymatiques spécifiques par des réactions de phosphorylation. Lors de la résolution de l'inflammation, le neutrophile devient apoptotique, puis il est reconnu et phagocyté par le macrophage. Cependant, une dérégulation quelconque de ces étapes peut conduire à des pathologies et à des maladies graves que nous verrons à la section 2.6.

2.3.1 La chimiotaxie

Le mouvement d'une cellule peut être défini par le terme chimiokinésie, ce qui représente l'accentuation des mouvements au hasard par des médiateurs tels que l'histamine, ou par le terme chimiotaxie, c'est-à-dire la migration orientée en réponse à un gradient de concentration d'un médiateur soluble inflammatoire (Edwards, 1994).

Lors de l'inflammation, les neutrophiles sont attirés au foyer inflammatoire par des substances chimiotactiques ou chimioattractantes. Ces dernières comprennent certaines composantes du complément (C3a et C5a), le système des kinines, les dérivés du système de lyse de la fibrine ou encore des substances libérées par les leucocytes, principalement des chimiokines, les plaquettes et certaines espèces bactériennes. Ces chimioattractants peuvent également affecter les cellules endothéliales des capillaires qui vont sécréter certains facteurs activant les neutrophiles circulants. Différents facteurs de l'inflammation, comme les prostaglandines, peuvent également affecter la perméabilité vasculaire, permettant d'améliorer le passage des protéines sériques au site inflammatoire. Les chimioattractants vont permettre aux neutrophiles d'adhérer aux cellules endothéliales et de transmigrer par le phénomène de diapédèse (Trowbridge et Emling, 1997). Ces événements se déroulent en quatre étapes, comme le montre la **figure 5** :

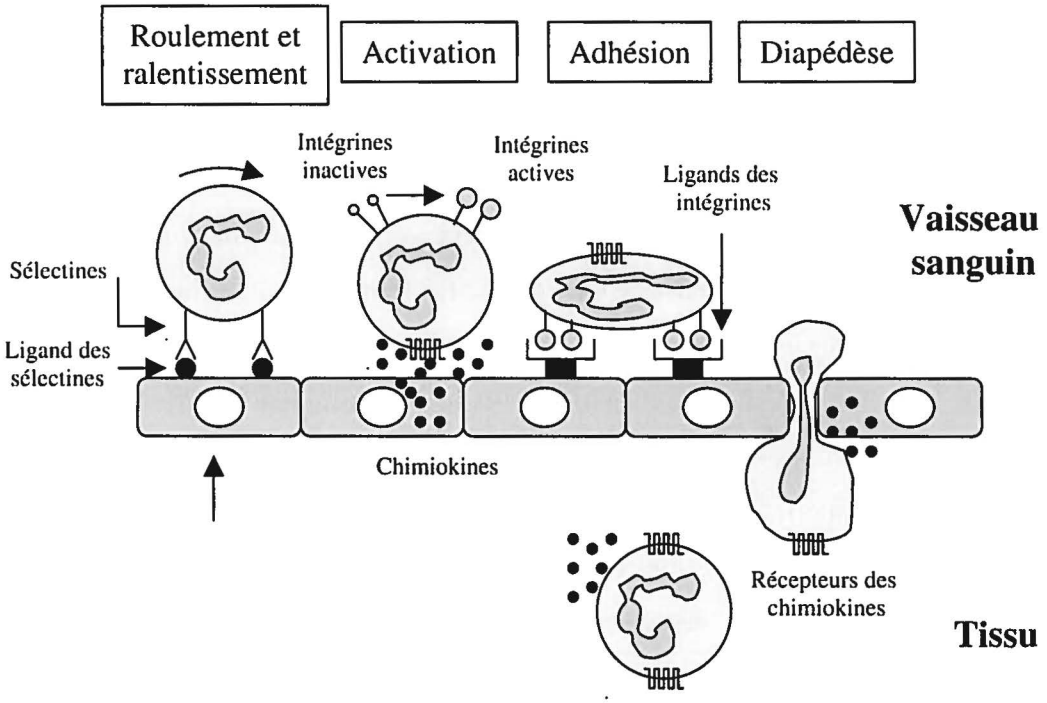


Figure 5 : Les étapes de la migration des neutrophiles dans les tissus

(Inspiré de Male, 1999)

- **Le ralentissement et le roulement**, sous l'interaction des sélectines/hydrates de carbone à la surface des neutrophiles et des cellules endothéliales. Par exemple, les L-sélectines des neutrophiles se lient faiblement aux hydrates de carbone de l'endothélium et, inversement, les P-sélectines et les E-sélectines des cellules endothéliales se fixent à certains hydrates de carbone des neutrophiles comme le sialyl-Lewis x.
- **L'activation ou le déclenchement** induite par des cytokines (comme l'IL-8) libérées par les cellules environnantes. Cette activation permet la régulation des intégrines qui sont indispensables à une liaison solide à l'endothélium.
- **L'adhésion**, sous l'interaction des intégrines leucocytaires avec leurs ligands sur les cellules endothéliales. Par exemple, le CR4 et le VLA-4 des neutrophiles se fixent respectivement à iC3b et VCAM-1 sur les cellules endothéliales.
- **La diapédèse**, où il y a émission de pseudopodes par le neutrophile dans les jonctions intercellulaires entre les cellules endothéliales avant que la cellule se glisse dans l'ouverture en se déformant. Ce processus requiert un réarrangement majeur des protéines du cytosquelette.

Une fois dans les tissus, les neutrophiles vont migrer vers le gradient chimioattractant jusqu'à ce qu'ils atteignent les microorganismes. Entre temps, les neutrophiles peuvent être « sensibilisés », c'est-à-dire préparés à répondre au corps étranger (en anglais, on utilise le terme « priming »). Les neutrophiles attirés par chimiotaxie entreprennent de rapides changements morphologiques, passant d'une forme ronde à une forme allongée présentant des pseudopodes. Ces changements morphologiques dépendent de la modulation des protéines du cytosquelette, telles l'actine et la gelsoline, de l'ATP, du calcium, etc. Afin de se diriger vers leur cible, les neutrophiles deviennent polarisés, c'est-à-dire que la cellule se présente avec un pseudopode antérieur dépourvu d'organelles appelé lamellipode et une queue postérieure possédant des fibres rétractiles. Le mouvement résulte de la combinaison des contractions de la queue et de la progression du lamellipode en direction du gradient. En réponse à des chimioattractants, les neutrophiles peuvent atteindre une vitesse de 20 μm/min. Une fois en présence des

microorganismes, les neutrophiles vont répondre en activant leur arsenal bactéricide (Edwards, 1994).

2.3.2 La phagocytose

La phagocytose est un important mécanisme de défense de l'hôte contre les microenvahisseurs une fois que ces derniers ont pénétré à l'intérieur de l'organisme. Ce processus par lequel les particules sont éliminées du milieu extracellulaire est effectué par plusieurs types cellulaires, tel l'épithélium pigmenté de l'œil, les cellules dendritiques de la peau et les cellules de Kupffer du foie. Il existe toutefois des phagocytes dits « professionnels », c'est-à-dire dont la phagocytose est la principale fonction : les neutrophiles et les macrophages. Cette habileté à reconnaître et à éliminer des organismes étrangers est essentielle à l'homéostasie et à la survie (Lennartz, 1999).

La première étape dans le processus de phagocytose est la reconnaissance et l'attachement de la particule ou du microorganisme à la surface de la cellule. Souvent, la surface des pathogènes est tellement inhabituelle que la reconnaissance du corps étranger se fait automatiquement, sans facteur supplémentaire. Cette reconnaissance et l'attachement subséquent sont particulièrement augmentés par le recouvrement de la particule étrangère par des opsonines, protéines sériques (immunoglobulines, fragments du complément, fibronectine, protéines de la phase aiguë, etc.) qui se lient d'un côté aux particules à phagocyter et de l'autre côté aux récepteurs des cellules phagocytaires, réalisant ainsi un pont entre les deux (Male, 1999). Ce processus d'opsonisation permet ainsi au pathogène de devenir une cible pour le neutrophile. Les neutrophiles et les monocytes/macrophages possèdent à leur surface une variété de récepteurs utiles pour la phagocytose, tels le récepteur du mannose, les récepteurs pour les fragments C3b et iC3b du complément et les récepteurs pour le fragment Fc des IgGs (FcγRI, FcγRII et FcγRIII) (Lennartz, 1999).

Après la fixation du pathogène à la surface de la cellule, des pseudopodes (expansions cytoplasmiques) sont formés autour de la particule grâce à une réorganisation du

cytosquelette afin d'internaliser le corps étranger. Éventuellement, le pathogène est entièrement englouti dans une vésicule phagocytaire appelée phagosome dont la membrane est en fait dérivée de la membrane cellulaire. Les granules cytoplasmiques (les lysosomes) vont alors fusionner avec cette vésicule afin de former un phagolysosome. Il y a alors activation des mécanismes bactéricides par une cascade de signalisation complexe, incluant les protéines tyrosine kinases, les protéines G, les protéines kinases C, les phospholipases et la polymérisation de l'actine (Lennartz, 1999). Suite à l'activation de ces différents mécanismes, le contenu des granules est relâché à l'intérieur de la vésicule afin d'éliminer la particule étrangère. Ces granules contiennent des enzymes capables de générer des métabolites réactifs dérivés de l'oxygène et de l'azote et qui possèdent des propriétés anti-microbiennes. Elles contiennent également des enzymes protéolytiques, tel des protéases, des enzymes hydrolytiques et des peroxydases, qui attaquent les membranes, les protéines et les acides nucléiques des microorganismes. Ce sont ces enzymes qui sont responsables de la destruction des pathogènes. La **figure 6** représente l'activation de l'arsenal bactéricide du neutrophile contre une bactérie à l'intérieur d'un phagosome. Certaines molécules générées lors de l'activation des cellules seront décrites dans la section 2.3.3. Cependant, lorsque le pathogène est trop gros pour être entièrement internalisé dans une vésicule, le neutrophile peut relâcher ses produits cytotoxiques directement dans le milieu extracellulaire par le phénomène de dégranulation. On parle alors de phagocytose « frustrée » (Edwards, 1994).

2.3.3 La flambée oxydative

Immédiatement après la phagocytose, le neutrophile entre dans une phase d'hyperactivité caractérisée par une augmentation de la consommation en oxygène. Ce phénomène est associé à une augmentation de l'activité de la voie des hexoses monophosphates et de la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'anion superoxyde (O_2^-), des molécules très réactives qui peuvent interagir avec des protéines, des lipides et même des acides nucléiques des bactéries et les rendre non fonctionnels (Male, 1999).

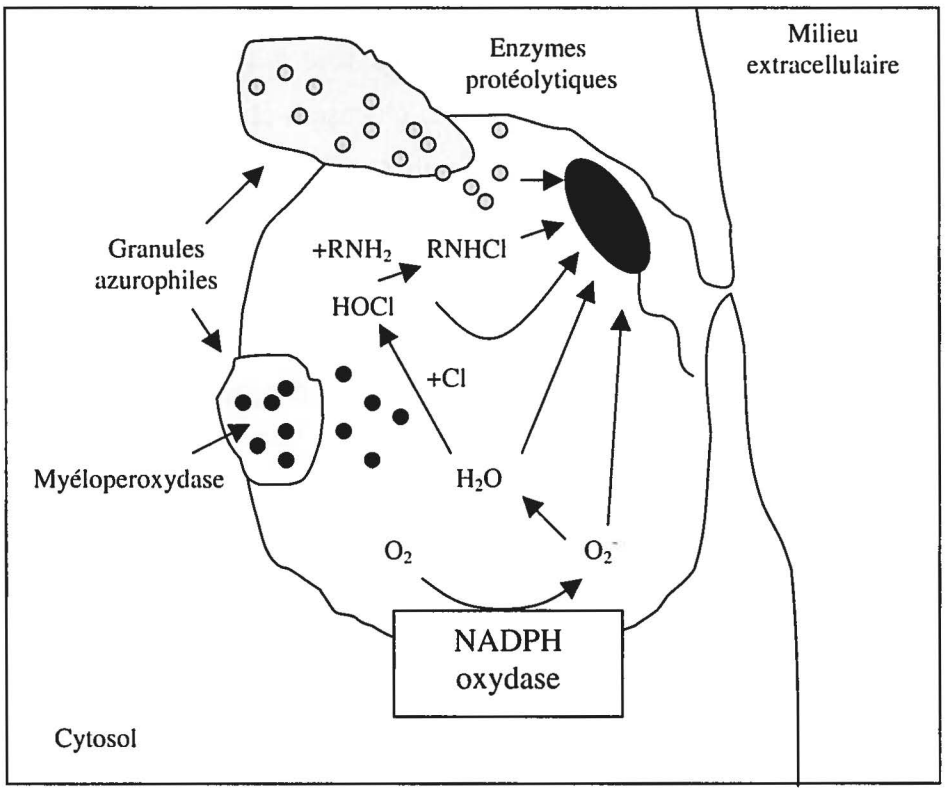


Figure 6 : Formation d'un phagosome et activation de l'arsenal bactéricide contre un microorganisme

(Inspiré de Edwards, 1994)

2.3.3.1 La NADPH oxydase

La NADPH oxydase est le complexe enzymatique responsable de la flambée oxydative qui catalyse la réaction suivante :

$$NADPH + 2O_2 \rightarrow 2O_2^- + H^+ + NADP^+$$

La NADPH oxydase est majoritairement localisée dans la membrane plasmique, même si certaines composantes sont localisées dans le cytosol et sur les membranes des granules secondaires, des granules tertiaires et des vésicules sécrétrices. Cette enzyme est inactive dans les cellules au repos. Suite à la phagocytose ou autre forme de stimulation, l'oxydase devient active par une série de processus intracellulaires complexes et peut alors transformer l'oxygène en oxygène radicalaire. Le NADPH est le substrat utilisé par la

cellule *in vivo*, même si l'enzyme peut également utiliser le NADH *in vitro*. Le NADPH est disponible par l'augmentation de l'activité de la voie des hexoses monophosphates, qui génère ce co-facteur réduit par l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (Heyworth, Curnutte et Badwey, 1999).

Le complexe enzymatique est composé de plusieurs protéines, comme le démontre la **figure 7**. Un flavocytochrome et certains facteurs solubles participent à la formation d'anions superoxydes par le transport de l'électron du NADPH à l'oxygène: le flavocytochrome *b* composé de la gp22 (glycoprotéine de 22 kDa) et de la gp91, les composantes cytoplasmiques p47-*phox* (« phagocyte oxidase ») et p67-*phox*, deux petites protéines G ($p21^{rac1}$ de la famille *rho* et Rap1a) et un constituant p40. Toutes ces composantes semblent essentielles au bon fonctionnement de la NADPH oxydase puisqu'une déficience dans l'une de ces composantes peut mener à la granulomatose chronique, maladie héréditaire polymorphe caractérisée par des infections récurrentes multiples dues à une déficience de la NADPH oxydase. Une conséquence de cette maladie est le développement continuel d'infections bactériennes profondes et graves, qui sont généralement fatales dès l'enfance (Heyworth, Curnutte et Badwey, 1999).

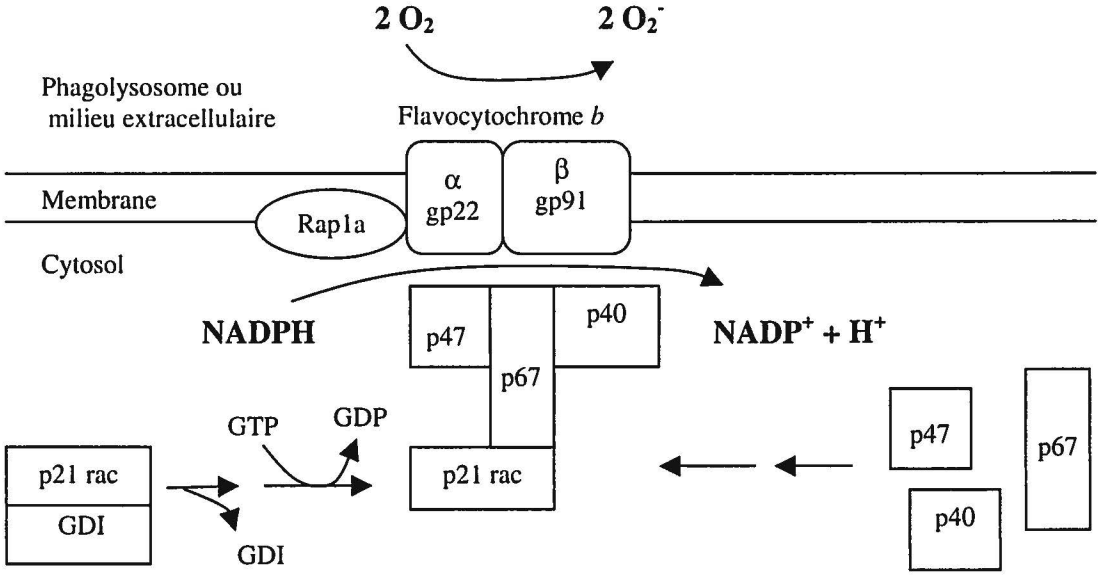


Figure 7 : Représentation de la NADPH oxydase des neutrophiles

(Inspiré de Heinecke, 1999)

2.3.3.2 La formation de réactifs dérivés de l'oxygène

Outre la production de l'anion superoxyde (O_2^-), le neutrophile peut générer différentes molécules dérivées de l'oxygène ayant des propriétés antimicrobiennes. La **figure 8** présente un résumé des différentes molécules dérivées de l'oxygène générées par les neutrophiles.

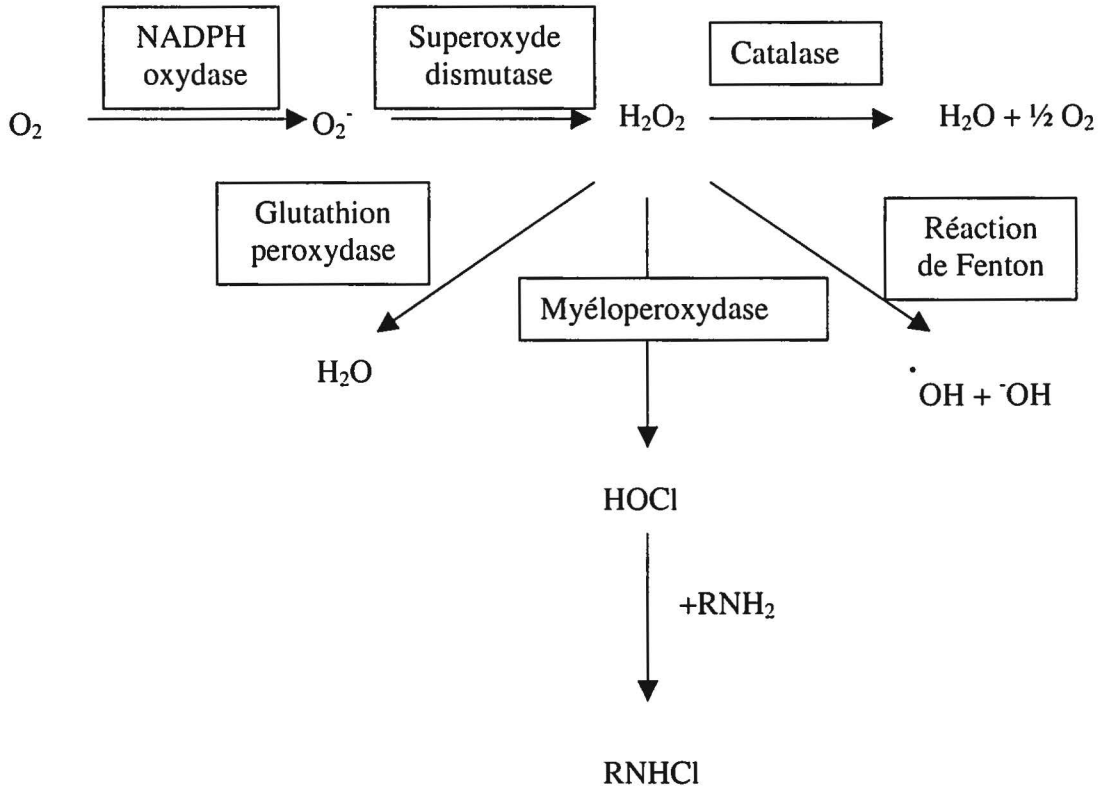


Figure 8 : Schéma général des différentes molécules dérivées de l'oxygène générées par les neutrophiles

La superoxyde dismutase est l'enzyme qui limite la concentration d'O_2^- à l'intérieur des cellules en transformant l'oxygène radicalaire en H_2O_2, un agent oxydant ayant des propriétés antimicrobiennes (Heinecke, 1999). La superoxyde dismutase catalyse la réaction suivante :

$$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène, à forte concentration, est un agent bactéricide puisqu'il peut oxyder les groupements –SH, inactivant ainsi les protéines. Toutefois, la cellule possède des mécanismes de protection contre le H_2O_2, soit les peroxydases (la glutathione peroxydase et la myéloperoxydase, entre autres) et la catalase, qui catalysent la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Le H_2O_2 peut cependant être transformé en radical hydroxyl (•OH), une molécule hautement réactive. Cette dernière peut être générée par la chaleur, par une exposition accidentelle ou thérapeutique (thérapie anticancéreuse) à des radiations ou en présence de métaux via la réaction de Fenton (Edwards, 1994). Cette dernière se présente comme suit :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + -OH$$

Le peroxyde d'hydrogène peut également être transformé par la myéloperoxydase en une molécule beaucoup plus réactive, l'acide hypochloreux (HOCl), une molécule contenue dans les agents javellisants. La myéloperoxydase représente 2 à 5% du contenu protéique total des neutrophiles. Elle est donc très abondante chez le neutrophile, contrairement aux monocytes qui en possède peu et aux macrophages qui sont déficients en cette enzyme. La myéloperoxydase est glycosylée et possède une masse moléculaire de 150 kDa. Elle est composée de deux paires de chaînes polypeptidiques, deux sous-unités α de 59 kDa et deux sous-unités β de 13,5 kDa. Un atome de fer est également présent dans l'enzyme et est essentiel au fonctionnement de celle-ci (Edwards, 1994). La myéloperoxydase catalyse une réaction complexe qui dépend surtout de la concentration de H_2O_2. La réaction simplifiée catalysée par la myéloperoxydase se présente comme suit :

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$$

D'autres produits peuvent également être générés par la myéloperoxydase, selon les molécules dans l'environnement. Par exemple, le HOCl peut réagir avec des composés contenants de l'azote (des amines biologiques, par exemple) afin de former des chloramines :

$HOCl + R\text{-}NH_2 \rightarrow R\text{-}NHCl + H_2O$

Ces chloramines sont moins réactifs que le HOCl, mais possèdent une durée de vie plus longue. Les chloramines formés à partir d'amines lipophiles sont particulièrement toxiques puisqu'ils peuvent pénétrer les membranes biologiques (Heinecke, 1999).

La myéloperoxydase a donc la capacité d'inactiver différentes molécules biologiques, certaines sur les bactéries, les protozoaires et les cellules de mammifères, ainsi que les substances humorales (toxines, fMLP, C5a, etc.) et les enzymes contenues dans les granules des neutrophiles. De plus, le système de la myéloperoxydase peut stimuler la sécrétion de sérotonine par les plaquettes sanguines, l'histamine par les mastocytes et l'activation de la collagénase et de la gélatinase des neutrophiles.

Afin de fonctionner adéquatement, la myéloperoxydase doit être transportée des granules azurophiles au site d'activité de la NADPH oxydase, soit la membrane plasmique ou les phagosomes. Durant la phagocytose, les granules migrent aux phagosomes et fusionnent. Le contenu des granules, incluant la myéloperoxydase, est relâché dans la vacuole. Le système myéloperoxydase-H_2O_2 est alors formé et peut attaquer la cible. Dans le cas où la cible serait trop grosse pour être phagocytée ou lorsque le neutrophile est activé par des facteurs solubles lors de l'inflammation, la myéloperoxydase peut être relâchée directement dans le milieu. Cette activation extracellulaire de la myéloperoxydase peut être bénéfique, mais également très néfaste si les produits de réaction s'attaquent aux cellules et tissus environnants (Edwards, 1994).

2.3.3.3 La formation de réactifs dérivés de l'azote

Comme mentionné plus haut, les neutrophiles peuvent former des molécules réactives dérivées de l'azote, comme les chloramines. De plus, les neutrophiles possèdent la NO synthétase, une enzyme responsable de la production de l'oxyde nitrique (NO). Toutefois, il est très difficile de détecter cette molécule chez le neutrophile puisque l'anion superoxyde produit lors de la flambée oxydative peut dégrader le NO produit. L'oxyde nitrique des neutrophiles est impliqué dans la contraction du muscle vasculaire lisse et

dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Le NO est également important dans la destruction de la bactérie *Staphylococcus aureus*. La production de NO peut être stimulée par différents agents, tel le fMLP, le PAF (platelet-activated factor) et la leucotriène B_4 (LTB_4) (Edwards, 1994).

2.3.4 La dégranulation

Les granules peuvent être libérés lors de la phagocytose d'un agent pathogène ou peuvent être libérés directement dans le milieu extracellulaire, comme c'est le cas lors de la phagocytose « frustrée ». Le mouvement des granules ainsi que le relâchement de ceux-ci est appelé la dégranulation. L'attaque des microorganismes par la dégranulation est également appelée le système antimicrobial indépendant de l'oxygène (Edwards, 1994).

Les protéines antimicrobiennes des neutrophiles sont situées à l'intérieur des granules. Il existe quatre types de granules : azurophiles ou primaires, spécifiques ou secondaires, contenant la gélatinase ou tertiaires et les vésicules sécrétrices. Les granules azurophiles sont les premiers à être synthétisés dans la maturation du neutrophile, au stade promyélocytique, et constituent environ 30% des granules totales. Il y a environ 1500 granules azurophiles par neutrophile mature et ces derniers contiennent essentiellement des composantes antimicrobiennes et des hydrolases. Les autres types de granules contiennent très peu ou pas de composantes antimicrobiennes et d'hydrolases. Ils contiennent plutôt des récepteurs et des enzymes nécessaires à la cellule. Les granules secondaires sont deux fois plus abondants que les granules azurophiles et contiennent la majorité du lysozyme. Les vésicules sécrétrices possèdent la caractéristique d'être aisément mobilisées (stimulation et translocation) lors de l'activation de la cellule (Edwards, 1994). Le **tableau 2** résume les principales protéines contenues dans les granules des neutrophiles. Il est à noter que certaines protéines se retrouvent dans différents granules, tels que la gp150,95, le CR3, la gélatinase, etc.

Tableau 2 : Les composantes majeures des granules des neutrophiles

Azurophiles	Spécifiques	Tertiaires	Vésicules sécrétrices
Myéloperoxydase	Lysozyme	β-glucoronidase (peu)	Récepteur au fMLP
Défensines	Récepteur au fMLP	Récepteur au fMLP	CR3
BPI	CR3	CR3	gp150,95
Cathepsine G	gp150,95	gp150,95	CR1
Élastase	Laminine	CD45	Cytochrome b
Protéinase 3	Cytochrome b	Laminine	Albumine
Azurocidine	Gélatinase	Cytochrome b	
Lysozyme	Collagénase	β_2-microglobuline	
β-glucoronidase	Protéine liant la vit. B_{12}	Gélatinase	
α-mannosidase		Diamine oxydase	
α-fucosidase		H^+-ATPase	
β-glucosamidase		Tétranectine	
Phospholipases A_2		DAG lipase	
Phospholipase C		Phosphatase alcaline	
Phospholipase D		Acétyl CoA transférase	
Alcaline phosphatase			

(Inspiré de Edwards, 1994)

2.3.5 La synthèse protéique

Pendant plusieurs années, les neutrophiles matures ont été décrits comme étant des cellules terminales n'ayant peu ou pas la capacité de synthétiser des macromolécules biologiques suite à une stimulation. Cette conclusion provenait des observations microscopiques puisque les neutrophiles possèdent peu de réticulum endoplasmique et de ribosome. De plus, la nature condensée de la chromatine ne suggérait pas que le noyau était actif transcriptionnellement et comme la durée de vie du neutrophile est relativement courte, la synthèse *de novo* a été négligée par les chercheurs (Edwards, 1994).

Aujourd'hui, il est maintenant reconnu que les neutrophiles matures sont capables d'effectuer la biosynthèse des protéines et que cette biosynthèse peut être rapidement augmentée dans le cadre d'une réponse inflammatoire. Plusieurs protéines sont activement synthétisées dans les neutrophiles au repos, comme les récepteurs à la surface de la cellule et les composants des oxydases. Ces protéines sont donc sujettes à des renouvellements rapides. L'expression de ces protéines peut également augmenter suite à une stimulation (synthèse *de novo*). Certaines protéines sont peu ou pas exprimées par les neutrophiles (certaines cytokines, par exemple), mais leur synthèse augmente suite à une stimulation par différents agonistes. C'est le cas de certaines cytokines et chimiokines. Finalement, certaines protéines sont exprimées à un taux constant et cette expression n'est pas modulée dans un état inflammatoire. Ces protéines sont appelées « house keeping protein », tel l'actine et la GADPH (Edwards, 1994).

2.3.5.1 La synthèse des récepteurs de surface

Le neutrophile exprime à sa surface plusieurs protéines nécessaires à la fixation de ligands et à la transmission de signaux à l'intérieur de la cellule. Des expériences d'immunoprécipitation ont indiqué que les neutrophiles expriment plusieurs récepteurs de surface, comme le FcγRIII (CD16), le CR1 et le CMH de classe I. La synthèse de ces récepteurs peut être bloquée lors d'une incubation avec de l'actinomycine D (inhibiteur de transcription) et de la cycloheximide (inhibiteur de la traduction), indiquant qu'une transcription et une traduction active sont nécessaires pour l'expression de ces récepteurs. Dans le but d'un bon fonctionnement, les récepteurs sont continuellement retirés de la surface de la cellule par internalisation ou par coupure (shedding) et sont continuellement renouvelés. Ainsi, afin de maintenir un taux constant des protéines à sa surface, la cellule doit transporter la protéine d'une réserve préformée ou doit effectuer une synthèse *de novo* de cette protéine (Edwards, 1994).

2.3.5.2 La synthèse de cytokines

Les neutrophiles expriment peu de cytokines à un niveau basal. Par contre, suite à une stimulation appropriée, le neutrophile exprime fortement certaines cytokines, tels l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le TNF-α, le G-CSF, le M-CSF et l'INF-α. Cependant, la production de certaines cytokines ne représente que 10 à 20% du niveau de production par les cellules monocytaires périphériques (pour un même nombre de cellules). Toutefois, comme le neutrophile est la première cellule à migrer vers un site d'inflammation et, généralement, en nombre élevé, cette production peut être suffisante pour perpétuer la réponse inflammatoire et initier une cascade d'événements. Le **tableau 3** présente une liste de toutes les cytokines et chimiokines connues à ce jour qui sont produites par les neutrophiles dans des conditions *in vitro* et *in vivo*. La sécrétion de certaines cytokines citées (identifiées par un point d'interrogation) n'a été rapportée qu'une seule fois et devra être confirmée. Cette section présentera quelques-unes des cytokines produites par les neutrophiles.

Tableau 3 : Cytokines et chimiokines exprimées par les neutrophiles

in vitro	*in vivo*
IL-1α/-1β	IL-1α/-1β
IL-1ra	IL-1ra
IL-4	IL-6
IL-8	IL-8
IL-12	IL-10
TNF-α	IL-12
INF-α	MIP-2
CD30L	KC/GROα
GROα/β (ARN seulement)	CINC
CINC-1/-2α/3	MIP-1α/-1β
IP-10	MCP-1
MIG	TNF-α
MIP-1α/-1β	$TGF\beta_1$
TGFα/β	
IL-3, G-CSF, M-CSF	
GM-CSF (?), IL-6 (?)	
MCP-1 (?), SCF (?)	

(Inspiré de Cassatella, 1999)

Les travaux de Tiku et collègues ont montré que lors d'une stimulation avec du PMA ou du zymosan opsonisé, le neutrophile sécrétait de l'IL-1. L'IL-1 induit plusieurs effets durant l'inflammation, tels l'augmentation de la production de collagénase dans les joints arthritiques, la régulation des fibroblastes et des cellules synoviales, le recrutement et la régulation des fonctions des leucocytes ainsi que la sensibilisation du neutrophile (« priming ») à la flambée oxydative, la phagocytose, la dégranulation et la synthèse de thromboxanes (Tiku, Tiku et Skosey, 1986).

L'expression de l'IL-6 peut être activée par une stimulation au GM-CSF et au TNF. L'IL-6 induit la maturation des cellules B, la synthèse de protéines de la phase aiguë, la prolifération des cellules T et agit en synergie avec l'IL-1 et l'IL-3 sur les cellules souches hématopoïétiques. Toutefois, comme c'est le cas pour l'IL-1, le neutrophile produit 10 fois moins d'IL-6 que le monocyte (Edwards, 1994).

Le TNF-α n'est pas sécrété par les neutrophiles au repos, mais est sécrété suite à une stimulation par le LPS. Le TNF exerce divers effets paracrines, comme par exemple l'induction de la fièvre, l'augmentation de la collagénase des fibroblastes, la stimulation de la production d'IL-1 par les macrophages, etc. Le TNF exerce également des effets autocrines, puisqu'il augmente l'adhésion, la phagocytose, et prépare la cellule à la dégranulation et à la flambée oxydative. À fortes concentrations, cette cytokine peut induire la flambée oxydative des neutrophiles (Edwards, 1994).

Le GM-CSF induit la production de G-CSF et de M-CSF par les neutrophiles. Ces deux cytokines jouent un rôle important dans l'hématopoïèse, alors que le G-CSF sensibilise les neutrophiles matures à une réponse ultérieure. Le G-CSF induit également la production d'INF-α par les neutrophiles, une cytokine inhibant la formation des colonies de neutrophiles. Encore une fois, les niveaux de production des CSF sont environ 5 à 10 fois inférieures aux niveaux de production des monocytes (Edwards, 1994).

2.3.5.3 La production de chimiokines

Les chimiokines sont généralement des petites cytokines (8-12 kDa) impliquées dans l'activation des leucocytes au moment de la migration endothéliale et lors des processus chimiotactiques dans les tissus. Elles sont spécifiques pour certains types cellulaires et contrôlent l'arrivée séquentielle des différentes populations cellulaires au site d'inflammation. Les chimiokines sont regroupées à l'intérieur de quatre groupes majeurs, selon la position des premières cystéines dans la séquence primaire : les familles C-X-C, C-C, C-X_3-C et C où X représente n'importe quel acide aminé. La famille C-X-C possède majoritairement des activités stimulatrices et chimiotactiques envers les neutrophiles et regroupe entre autres l'IL-8, MIP-2, IP-10 (interferon-γ inducible protein-10), MIG, GRO (growth related gene product)-α, -β, -γ, NAP et CINC. La famille C-C inclut MCP, RANTES et MIP-1α, -1β, -1γ et possède des activités chimiotactiques pour les éosinophiles, les basophiles, les monocytes et les lymphocytes T. Il est maintenant établi que les neutrophiles sécrètent des chimiokines C-X-C et C-C. Les familles C-X_3-C et C ont récemment été identifiées et possèdent peu de membres. Entre autres, la lymphotactine appartient à la famille C alors que la fractaline appartient à la famille C-X_3-C (Cassatella, 1999).

L'IL-8 est sécrétée par le neutrophile suite à une stimulation par différents agents, dont le LPS, le PAF, le GM-CSF et certains xénobiotiques. Cette chimiokine est un puissant chimioattractant des neutrophiles et augmente la dégranulation et la flambée oxydative. De plus, l'IL-8 possède des activités chimiotactiques envers les lymphocytes T et les basophiles, à un niveau moindre que pour les neutrophiles, en plus d'être un facteur angiogénique (Baggiolini, Dewald et Moser, 1997). À ce jour, il n'est pas encore déterminé si la cellule sécrète l'IL-8 à partir d'une réserve préformée, si elle doit effectuer une synthèse *de novo* de cette protéine ou si une combinaison des deux est nécessaire à la sécrétion d'IL-8. En effet, les cellules non stimulées possèdent très peu d'ARN messager de l'IL-8 (<100 pg/mL), mais suite à leur stimulation, les neutrophiles sécrètent des niveaux élevés d'IL-8 (>2000 pg/mL). Les neutrophiles de rat, toutefois, ne sécrète pas

l'IL-8. Suite à leur stimulation, les neutrophiles libèrent plutôt CINC-1, CINC-2α et CINC-3 qui possèdent des propriétés similaires à l'IL-8 (Edamatsu *et al.*, 1997).

L'IL-8 n'est pas la seule chimiokine de la famille des C-X-C sécrétée par les neutrophiles. Suite à une stimulation adéquate, le neutrophile peut sécréter GROα, un médiateur de l'inflammation ayant des propriétés chimiotactiques et activatrices des neutrophiles dont la dégranulation et l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion (Baggiolini, Dewald et Moser, 1997), et l'IP-10, un puissant chimioattractant des lymphocytes et des cellules NK (Taub *et al.*, 1993). Malgré son homologie structurale à l'IL-8, l'IP-10 n'est pas un chimioattractant des neutrophiles. Une explication possible serait l'absence du motif E-L-R (une séquence d'acides aminés qui précède les cystéines) commun à plusieurs autres membres de la famille des C-X-C. La conservation de ce motif semble essentielle afin de conférer aux chimiokines C-X-C des propriétés chimiotactiques envers les neutrophiles (Baggiolini, Dewald et Moser, 1997). Les neutrophiles peuvent également sécréter MIP-1α et MIP-1β qui agissent comme des activateurs et des chimioattractants pour les monocytes/macrophages et les lymphocytes T (Kasama *et al.*, 1993).

La capacité des neutrophiles à sécréter ces différentes cytokines est d'une importance considérable. Le fait que les neutrophiles produisent l'IL-8, MIP-1α, MIP-1β, GRO-α, CINCs et IP-10 suggère que ces cellules, une fois au foyer inflammatoire, peuvent promouvoir le recrutement de nouveaux neutrophiles, mais également l'accumulation subséquente et l'activation des monocytes/macrophages, des éosinophiles et des lymphocytes (Cassatella, 1999).

2.4 L'activation et la signalisation intracellulaire

Malgré le fait que la fonction principale du neutrophile est de reconnaître et de détruire les microorganismes, plusieurs processus différents, mais interreliés, sont nécessaires pour contrôler cette fonction. Le neutrophile doit d'abord détecter les molécules pro- et anti-inflammatoires par leur fixation aux récepteurs de surface et y répondre correctement

par l'augmentation de la chimiotaxie, la phagocytose, la dégranulation, la génération de cytokines, etc. Ces réponses doivent cependant cesser au bon moment, c'est-à-dire lors de la destruction du pathogène. La désactivation des mécanismes contrôlant les fonctions des neutrophiles est donc aussi importante que leur activation, puisque la prolongation de l'activité des neutrophiles peut conduire à des dommages pour l'hôte.

L'activation du neutrophile peut s'effectuer de deux façons : l'agent physiologique ou pathologique se lie à un récepteur de surface, ce qui engendre une cascade de signalisation à l'intérieur de la cellule, ou encore la cellule répond directement à un agent soluble qui génère, lui aussi, une signalisation intracellulaire. La section suivante traitera donc de la signalisation intracellulaire lors de l'activation du neutrophile en décrivant quelques-unes des plus importantes molécules y jouant un rôle.

2.4.1 Les protéines G

La plupart des fonctions cellulaires reliées à un récepteur de surface utilisent des protéines liants le GTP (les protéines G), ce qui sert de lien entre le récepteur et les enzymes intracellulaires, telles les phospholipases et les kinases. Il existe deux groupes de protéines G : les protéines G hétérotrimériques et les petites protéines G. Plusieurs récepteurs (surtout les récepteurs des chimioattractants) des neutrophiles sont liés à des protéines G : le récepteur du fMLP, du C5a, du PAF, du LTB_4,de l'IL-8, etc.

2.4.1.1 Les protéines G hétérotrimériques

Les protéines G hétérotrimériques sont des structures trimériques comprenant une grosse sous-unité α (39-52 kDa), une sous-unité β (35-36 kDa) et une petite sous-unité γ (<10 kDa). Les sous-unités β et γ sont solidement liées l'une à l'autre et servent à fixer la protéine G à la membrane, alors que la sous-unité α se dissocie lors de la liaison du ligand au récepteur pour réagir avec l'enzyme-cible (l'adénylyl cyclase ou une phospholipase) en l'activant ou en l'inhibant. De plus, la sous-unité α lie le GTP et

possède une activité GTPase (Edwards, 1994). Le mécanisme d'action des protéines G hétérotrimériques est décrit dans la **figure 9**.

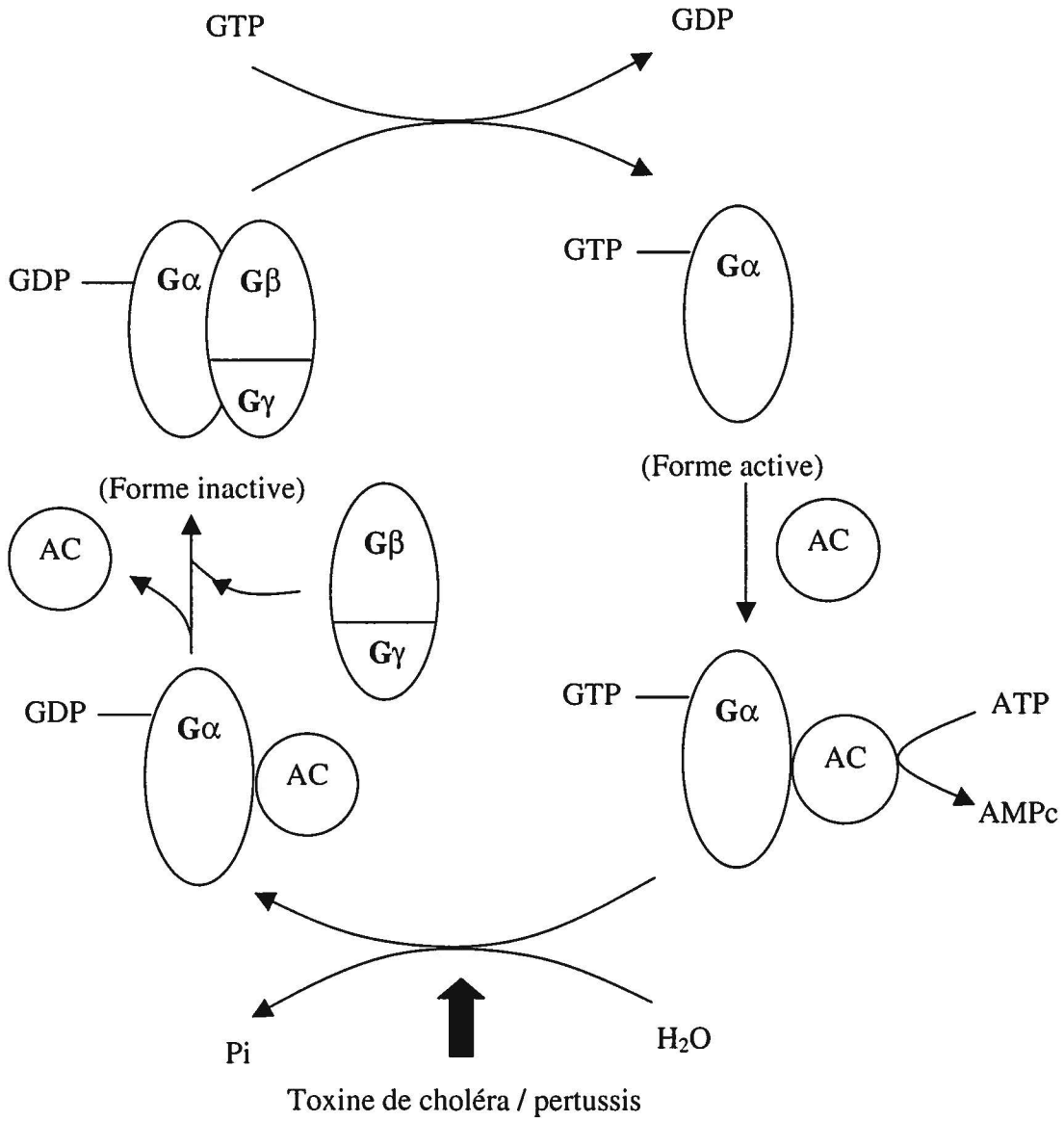


Figure 9 : Mécanisme d'action des protéines G hétérotrimériques

Lors de l'occupation du récepteur, la sous-unité α lie le GTP en échange du GDP, ce qui active la sous-unité. Cette dernière va se dissocier et va retrouver l'enzyme-cible (ici, l'adénylyl cyclase (AC). L'enzyme-cible est alors activée (ou inhibée, selon le cas). Dette dernière va agir sur son substrat afin de générer les molécules de signalisation (ici, l'AMPc). L'activité GTPase de la sous-unité α va alors hydrolyser le GTP lié en GDP, et la sous-unité α va se dissocier de son enzyme-cible pour retrouver les sous-unités β et γ. Le cycle peut alors recommencer. Le site d'action de la toxine de *Vibrio cholera* ou *Bordatella pertussis* est également présenté sur la figure (inspiré de Edwards, 1994).

Expérimentalement, il est possible de déterminer si les protéines G sont activées par un agent physiologique quelconque en utilisant des toxines de certaines bactéries qui agissent comme des inhibiteurs. En effet, les toxines de *Vibrio cholera* ou de *Bordatella pertussis* interagissent avec les protéines G et affectent leur fonctionnement. Il existe toutefois des protéines G hétérotrimériques insensibles à certaines toxines. D'autres approches sont alors possibles afin de déterminer l'implication des protéines G dans l'activation des neutrophiles.

2.4.1.2 Les petites protéines G

Les petites protéines G ont le même rôle à jouer dans les protéines G hétérotrimériques, c'est-à-dire activer l'enzyme-cible afin de générer des molécules de signalisation. Les petites protéines G sont divisées en trois groupes : les protéines *ras*, *rab* et *rho*. Contrairement aux protéines G hétérotrimériques, les petites protéines G ne sont pas associées à des sous-unités, mais possèdent toutefois une activité GTPase et peuvent lier le GTP. Cependant, les petites protéines G peuvent jouer un rôle direct dans l'activation du neutrophile, comme par exemple $p21^{racl}$ dans l'activation de la NADPH oxydase (Edwards, 1994).

2.4.2 Les phospholipases

Il a été démontré que plusieurs enzymes impliquées dans l'activation des fonctions du neutrophile peuvent être modulées par les protéines G. Ces enzymes incluent les phospholipases, dont le rôle est de scinder des phospholipides de la membrane cytoplasmique. Le neutrophile possède trois des quatre phospholipases connues : la phospholipase A_2, C et D. La **figure 10** résume les molécules et seconds messagers produits par les phospholipases. Chacune de ces molécules et leurs rôles respectifs sont décrits dans les sections suivantes.

2.4.2.1 Les phospholipases A_2 (PLA_2)

La fonction principale des PLA_2 est de générer de l'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides de la membrane. Chez le neutrophile, plusieurs phospholipides peuvent servir de sources endogènes d'AA : les phosphatidyléthanolamine (60% de l'AA total), les phosphatidylcholine (18%) et les phosphoinositides (18%). L'activation des PLA_2 peut se faire par l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, l'activité des protéines kinases C ou l'activité des protéines G. Dans les neutrophiles, les PLA_2 sont localisées dans le cytosol et les granules sécréteurs. La forme cytosolique, lors de son activation, s'associe à la membrane plasmique et génère de l'AA alors que la forme sécrétée possède des fonctions extracellulaires, comme dans le cas de l'attaque microbienne lors de la phagocytose. Les agonistes des neutrophiles connus pour activer les PLA_2 et la libération subséquente d'AA incluent le fMLP, le C5a et la LTB_4.

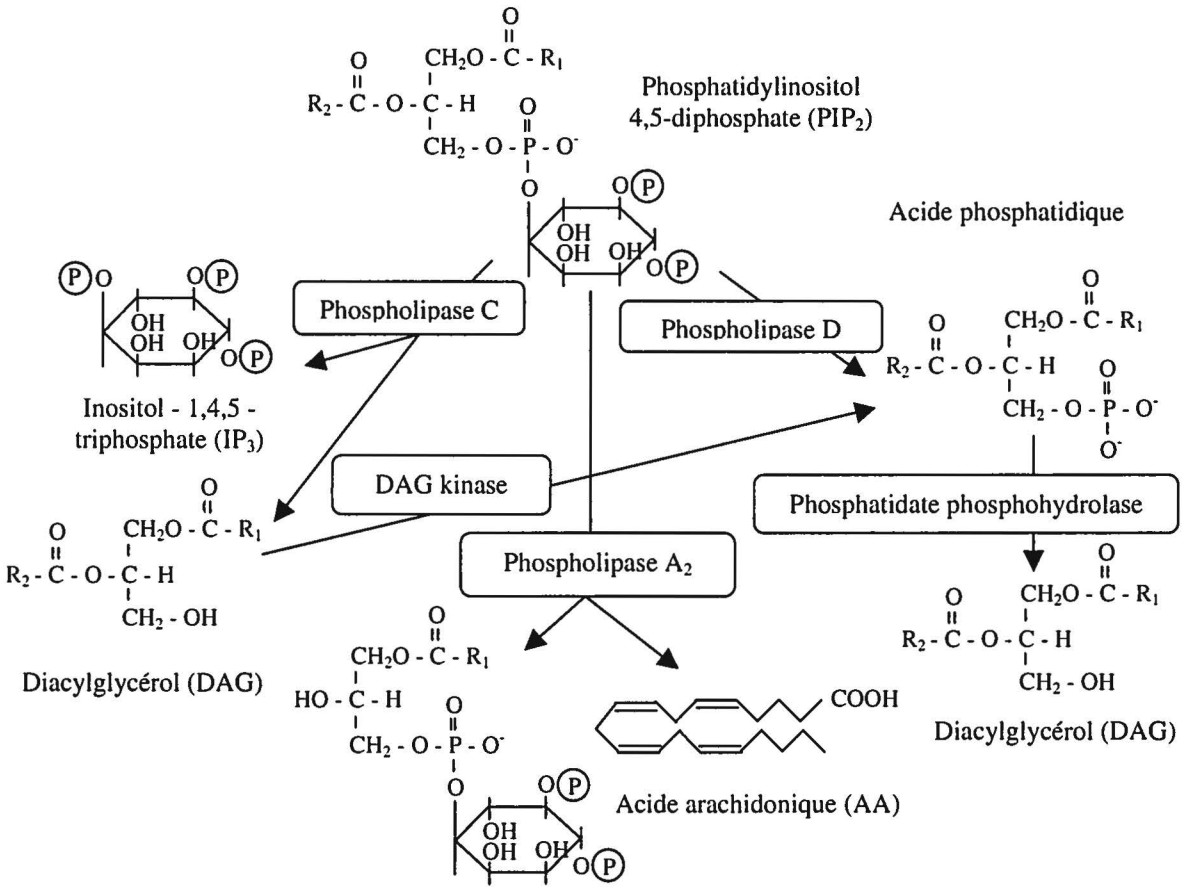


Figure 10 : Molécules produites par les phospholipases

(Inspiré de Edwards, 1994)

L'AA joue plusieurs rôles importants dans les fonctions des neutrophiles. Entre autres, l'AA est un substrat de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase, ce qui permet la génération de prostaglandines et de leucotriènes, respectivement. Ces derniers sont de puissants médiateurs de l'inflammation. Dans le neutrophile, les prostaglandines générées sont les prostaglandines E_2 (PGE_2) et les thromboxanes B_2 alors que la LTB_4 est la leucotriène qui est générée majoritairement. Un autre rôle de l'AA est l'activation de la NADPH oxydase, où il est suggéré que l'AA est requis pour l'assemblage des différentes composantes de la NADPH oxydase. Finalement, certains résultats montrent que l'AA peut activer les protéines kinases C, moduler la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et activer la pompe à hydrogène associée à l'activité de la NADPH oxydase (Edwards, 1994).

2.4.2.2 Les phospholipases C (PLC)

Le rôle des phospholipases C est de générer des seconds messagers importants dans la signalisation intracellulaire du neutrophile. Il existe différentes isoformes de PLCs : les PLC-β_1 et β_2, les PLC-δ_{1-3} et les PLC-γ_{1-2}. Chacune de ces enzymes possède des propriétés catalytiques semblables et peut hydrolyser les phosphatidylinositol (PI), les phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP) et les phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP_2). Selon la concentration de Ca^{2+}, certains phospholipides sont préférentiellement hydrolysés. À concentration physiologique de Ca^{2+}, le PIP et le PIP_2 sont les substrats préférés des PLCs. L'hydrolyse de PIP et de PIP_2 génère chacun deux seconds messagers importants : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4-diphosphate sont générés à partir de PIP alors que le DAG et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) sont générés à partir de PIP_2. Les membranes des neutrophiles possèdent surtout les PLC-β_2 et -γ_2 qui génèrent le DAG et l'IP_3 à partir du PIP_2.

Les rôles de l'IP_3 et du DAG comme seconds messagers chez le neutrophile ne sont pas complètement élucidés. L'un des rôles connus de l'IP_3 est de moduler la concentration intracellulaire du Ca^{2+}. Dans les neutrophiles, le Ca^{2+} est emmagasiné dans des calciosomes, des organelles de structure similaire au réticulum endoplasmique (voir

figure 11) . L'entrée de Ca^{2+} est modulée par une pompe Ca^{2+}-ATPase alors que la libération de Ca^{2+} des calciosomes est dépendante de la concentration d'IP_3, puisque les calciosomes possèdent à leur surface des canaux à IP_3. À l'intérieur des calciosomes, le Ca^{2+} se lie à une protéine appelée calréticuline qui peut fixer environ 20 atomes de Ca^{2+}. La concentration de Ca^{2+} à l'intérieur d'un calciosome peut atteindre 1 mM alors que la concentration intracellulaire du neutrophile au repos est d'environ 100 nM. Lors d'une libération de Ca^{2+} des calciosomes par la fixation d'IP_3, la concentration intracellulaire de Ca^{2+} augmente et conduit à la modulation de certaines fonctions du neutrophile. L'augmentation de Ca^{2+} active, entre autres, la NADPH oxydase, augmente l'adhésion, et active la dégranulation et la formation de phagolysosome dans le processus de phagocytose. Le DAG, quant à lui, est impliqué dans l'activation du neutrophile, plus précisément dans l'activation de la NADPH oxydase. Le DAG est le substrat de la protéine kinase C (PKC), qui devient alors activé et peut ainsi phosphoryler des protéines sur leurs résidus sérine et thréonine, les rendant actives ou inactives. Le DAG peut également être converti en acide phosphatidique, une molécule de signalisation importante, par la DAG kinase (Edwards, 1994).

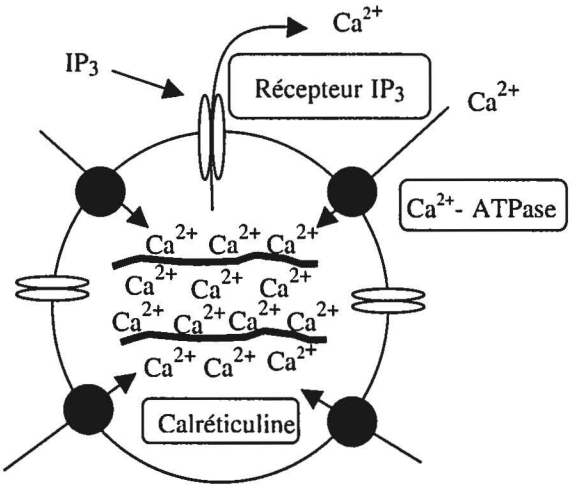


Figure 11 : Représentation d'un calciosiome

(Inspiré de Edwards, 1994)

2.4.2.3 Les phospholipases D (PLD)

La phospholipase D est associée à l'activation des neutrophiles et est responsable de la majorité du DAG formé lors de la stimulation de la cellule. Le substrat le plus important des PLD est la phophatidylcholine, le phospholipide majoritaire retrouvé à la membrane plasmique puisqu'il représente 40% des phospholipides totaux. L'activité de la PLD sur les phosphatidylcholines génère de l'acide phosphatidique qui peut être métabolisé en DAG par la phosphatidate phosphohydrolase. La DAG kinase peut également regénérer de l'acide phosphatidique à partir du DAG (provenant de l'activité de la phosphatidate phosphohydrolase ou des PLCs). Les PLDs requièrent également du Ca^{2+} et semblent être liées aux protéines G. La phosphorylation par les PKCs semble également activer les PLDs (Edwards, 1994).

2.4.3 Les protéines kinases

La modification covalente des protéines cellulaires par la phosphorylation des résidus sérine/thréonine et des résidus tyrosine est un mécanisme d'activation ou d'inhibition des composantes cellulaires utilisée par les cellules. Ces événements de phosphorylation peuvent avoir des effets sur le développement des cellules et leur métabolisme, la division cellulaire et l'apoptose en réponse à différents stimuli, tels les signaux de stress environnementaux. Cette modification réversible est assurée par les protéines kinases, la plus grande famille de protéines connues à ce jour, dont l'identification des fonctions a été rendue possible par le développement d'inhibiteurs spécifiques et la biologie moléculaire. Il existe différentes classes de kinases, mais ces protéines se ressemblent toutes au niveau de l'activité du domaine catalytique. Cette activité est assurée par la liaison et l'orientation de la protéine-cible par la kinase et le donneur de phosphate (ATP ou GTP, selon le cas) complexé à un cation divalent (Mg^{2+} ou Mn^{2+}). Lors de l'activation de la kinase, il y a transfert du phosphate en position γ du donneur vers le résidu hydroxyl (sérine, thréonine ou tyrosine) accepteur du substrat (Hanks et Hunter, 1995). La déphosphorylation est assurée, quant à elle, par une classe de protéines appelées phophatases. Une tyrosine phosphatase très importante chez le neutrophile et d'autres

types cellulaires est le CD45 qui est connu pour jouer un rôle de régulation dans la signalisation des lymphocytes activés (Hunter, 1995).

Les cascades de signalisation intracellulaire présentent des réseaux complexes permettant de relier des systèmes de protéines modulant des fonctions cellulaires spécifiques. Lorsqu'un ligand se fixe à la surface de la cellule, la transmission du signal s'effectue par la phosphorylation et la déphosphorylation de plusieurs protéines intracellulaires. Dans le cas de la régulation de l'expression d'un gène, les signaux vont débuter au récepteur de surface pour se rendre jusqu'au noyau où il y aura transcription du gène. La translocation de protéines activées du cytoplasme au noyau est assurée par les membres des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase) (Karin et Hunter, 1995). Les cibles nucléaires sont traditionnellement connues comme étant les facteurs de transcription, dont, par exemple, les protéines NF-κB. Ces dernières sont inactivées par leur liaison à IκB, mais suite à la phosphorylation de IκB, le complexe NF-κB-IκB se dissocie et les dimères de NF-κB sont transportés au noyau, se fixent à l'ADN et initient la transcription des gènes (Shirakawa et Mizel, 1989). Dans le cas de certaines cytokines, la voie majeure utilisée est la voie JAK-STAT, où les JAKs sont directement phosphorylés par le récepteur de surface avant de phosphoryler à leur tour les STATs, des facteurs de transcription.

Les neutrophiles contiennent une variété de sérine/thréonine kinases et une variété de tyrosine kinases. Plusieurs de ces kinases sont des cibles pour des seconds messagers (tels l'AMP cyclique pour les PKAs, le GMPc pour les protéines kinases G (PKG) et l'acide arachidonique, le Ca^{2+}, le DAG et l'acide phosphatidique pour les PKC) et sont inactives lorsque la concentration cellulaire du second messager est trop faible. Le **tableau 4** présente une liste non exhaustive des kinases des neutrophiles.

Les kinases sont grandement impliquées dans la régulation de fonctions des neutrophiles. Par exemple, il a été démontré que le PMA active la NADPH oxydase par deux voies de signalisation distinctes : l'une dépendante et l'autre indépendante des PI3-kinases (Karlsson, Nixon et McPhail, 2000). Une autre étude a montré que le GM-CSF retarde l'apoptose des neutrophiles par la voie des PI3-kinases et des ERK kinases (Klein *et al.*,

2000) alors qu'une autre équipe a montré que Jak-2 est impliqué dans la stimulation de PI3-kinase (Al-Shami et Naccache, 1999). Les PKCs sont également grandement impliquées dans la production d'O_2^- (Pongracz et Lord, 1998). Outre leur activation par des cytokines, les kinases des neutrophiles sont également activées par des contaminants environnementaux, pouvant entraîner une activation de certaines fonctions (Tithof, Watts et Ganey, 1997). La régulation de la phosphorylation des protéines est donc essentielle pour le fonctionnement adéquat du neutrophile.

Tableau 4 : Certaines protéines kinases retrouvées chez les neutrophiles

Sérine/Thréonine kinases	Tyrosine kinases
Protéine kinase A (PKA)	Lyn
PKG	Hck
PKC	Fgr
Calmoduline dépendante	Src
Histone H4 kinase	Janus kinase (JAK) -1, -2, -3
Myosin Light Chain kinase (MLCK)	Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)
Mos/Raf kinase	Pyk2
MAP kinases (p38, ERK, JNK)	Syk
Ecto-protein kinase	p38MAP kinase
	extracellular signal-regulated kinase (ERK)
	c-Jun amino-terminal kinase (JNK)

(Inspiré de McPhail et Harvath, 1993)

2.5 L'élimination des neutrophiles

Le neutrophile termine généralement son existence au site inflammatoire. Cependant, étant donné la grande production de neutrophiles par la moelle osseuse et le niveau constant de neutrophiles dans la circulation sanguine, ces cellules sont éliminées rapidement du sang afin d'être remplacées par les nouveaux arrivants. Auparavant, il était suggéré que la cellule se désintègre (nécrose) avant que les fragments ne soient éliminés par les macrophages locaux (Hurley, 1983). Toutefois, les tissus sains seraient inévitablement exposés à une large quantité de produits cytotoxiques provenant du neutrophile, ce qui engendrait ou maintiendrait l'inflammation. En fait, il est maintenant admis que le neutrophile se dirige spontanément en apoptose. Cette mort programmée du

neutrophile permet à la cellule d'être reconnue puis phagocytée par le macrophage. La cellule est alors éliminée du site inflammatoire ou de la circulation sanguine sans libérer son contenu toxique (Savill *et al.*, 1989).

2.5.1 L'apoptose des neutrophiles

Les neutrophiles récoltés de la circulation sanguine ou d'un tissu inflammatoire vont conserver leurs granules enzymatiques et vont exclure des colorants de viabilité pour une période de 24 heures et plus en culture. Cependant, plusieurs changements qui sont caractéristiques de l'apoptose vont survenir au niveau de la cellule. Les neutrophiles, contrairement aux autres cellules, ne feront pas de corps apoptotiques caractéristiques. Au lieu de se fragmenter en plusieurs parties, la cellule rapetisse. Ensuite, les neutrophiles vont perdre l'expression de certains récepteurs de surface, tels le CD16, le CD32, le CD15 et le CD120b, en plus de diminuer l'expression de certaines molécules de surface, tels ICAM-3 et PECAM-1 (Hart *et al.*, 2000). Ils vont également acquérir des sites de liaison à l'annexin V, c'est-à-dire qu'il y aura exposition des phosphatidylsérines pour lesquels l'annexine V possède une très grande affinité (Homburg *et al.*, 1995). L'exposition de ces phosphatidylsérines est très importante puisque ce sont ces molécules que les macrophages reconnaissent lors de la phagocytose des neutrophiles apoptotiques (Fadok *et al.*, 1992). Il y aura condensation de la chromatine (visualisée par plusieurs noyaux pyknotiques) et sa fragmentation selon un motif caractéristique internucléosomal de 180 paires de bases (Wyllie, 1985), en plus de la formation de vacuoles cytoplasmiques (Savill *et al.*, 1989). Une autre caractéristique est le clivage par la caspase-3 d'une protéine du cytosquelette, la gelsoline, qui est en partie responsable des changements morphologiques (Kothakota *et al.*, 1997). L'apoptose de la cellule est également associée à une acidification intracellulaire (diminution du pH) (Gottlieb *et al.*, 1995), même si cette dernière n'est pas un événement essentiel à l'enclenchement de l'apoptose (Furlong *et al.*, 1997). Finalement, il y aura perte de certaines fonctions, telles la phagocytose, la dégranulation et l'activation de la flambée respiratoire (Whyte *et al.*, 1993).

Plus récemment, il a été montré que l'apoptose spontanée des neutrophiles peut être accélérée par la liaison de ligands à des récepteurs de mort associés à la famille du TNF. Seulement deux membres de cette famille ont été retrouvés à la surface des neutrophiles : le récepteur-1 du TNF (TNF-R1) (Murray *et al.*, 1997) et Fas (CD95) qui accélère l'apoptose par la liaison de son ligand naturel FasL (également de la famille du TNF) (Liles *et al.*, 1996). La perméabilisation de la mitochondrie a également été montrée comme pouvant activer les caspases par la libération du cytochrome *c* (Apaf-2) (Li *et al.*, 1997). Suite à l'enclenchement de la mort programmée, le processus d'apoptose est majoritairement régulé par les espèces réactives dérivées de l'oxygène (Buttke et Sandstrom, 1994), ainsi que par les différents membres de deux familles de gènes en expansion : la famille de Bcl-2 et la famille des caspases qui compte présentement 14 membres. Certains membres de la famille de Bcl-2 sont reconnus pour inhiber l'apoptose (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1) alors que d'autres sont reconnus pour promouvoir l'apoptose (Bax, Bak, Bik, Bad, Bcl-x_S) (Reed, 1994 et Kroemer, 1997). Les neutrophiles sont reconnus pour ne pas exprimer les gènes de Bcl-2, Bcl-x_L, Bik, Bax et la caspase 2, mais expriment Bak, Bad, Bcl-w, Bfl-1 et les caspases 1, 3, 4, 7, 8, 9 et 10 (Santos-Beneit et Mollinedo, 2000). La génération de plusieurs espèces réactives dérivées de l'oxygène, l'absence de gènes anti-apoptotiques et la présence de plusieurs gènes pro-apoptotiques chez les neutrophiles peuvent expliquer, en partie, leur courte durée de vie ainsi que leur apoptose spontanée.

L'apoptose spontanée des neutrophiles peut être induite ou retardée *in vitro* et *in vivo* par différents médiateurs de l'inflammation ou autres agents divers. Par exemple, le GM-CSF, l'IL-6 et les endotoxines bactériennes sont reconnus pour retarder l'apoptose spontanée des neutrophiles (Colotta *et al.*, 1992 et Coxon, Tang et Mayadas, 1999). Ces derniers interviennent dans le processus de l'apoptose de différentes façons : par exemple, ils préservent le récepteur FcγRIII (Edwards *et al.*, 1990), ils augmentent l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 de la famille Bcl-2 (Moulding *et al.*, 1998), etc. Différents agents peuvent également augmenter l'apoptose des neutrophiles, tels la clozapine, un agent antipsychotique utilisé dans le traitement de la schizophrénie (Williams *et al.*, 2000), la bactérie *Fusobacterium nucleatum* (Jewett *et al.*, 2000) et

différentes lectines végétales, dont la *Viscum album* (Bussing, Suzart et Schweizer, 1997 et Savoie *et al.*, 2000). Ces dernières pourraient donc être utilisées lors de traitements afin d'enrayer l'inflammation induite par les neutrophiles.

2.5.2 La reconnaissance du neutrophile par le macrophage

Le concept de l'ingestion des neutrophiles par les macrophages n'est pas nouveau. En 1891, Metchnikoff a observé au microscope des macrophages englobant des microphages (ancienne terminologie des neutrophiles) alors que des cellules de Reiter (macrophages ayant ingérés des neutrophiles) ont été observées durant les années 60 et 70 dans les fluides de patients atteints de différentes formes d'arthrite (cité dans Savill *et al.*, 1989). Aujourd'hui, il est reconnu que les macrophages phagocytent les neutrophiles apoptotiques, les empêchant de libérer leur contenu. Tel que mentionné précédemment, le macrophage reconnaît le neutrophile apoptotique par différents mécanismes, dont les phosphatidylsérines exposées à la surface des neutrophiles, mais également par le récepteur de la vitronectine ($\alpha_V\beta_3$) (Savill *et al.*, 1990) et le récepteur de la thrombospondine (CD36) (Savill *et al.*, 1992). De plus, l'ingestion d'un neutrophile apoptotique par le macrophage inhibe la production de médiateurs pro-inflammatoires par ce dernier et, par le fait même, diminue l'inflammation (Meagher *et al.*, 1992 et Fadok *et al.*, 1998). Dans certains cas, le macrophage lui-même peut induire l'apoptose du neutrophile lors d'un contact entre les deux cellules (Meszaros, Reichner et Albina, 2000). Évidemment, l'apoptose du neutrophile n'est pas éternelle. Si le macrophage ne le phagocyte pas, ce dernier terminera son existence par la nécrose, lorsque la membrane cytoplasmique va se désintégrer. Il y aura alors libération du contenu des neutrophiles dans le milieu.

2.6 Pathologies associées aux neutrophiles

Le rôle crucial des neutrophiles dans la protection de l'hôte démontre l'importance de ces cellules au niveau de l'immunité. Cette importance est d'autant plus grande chez les individus dont les fonctions des neutrophiles sont altérées, causant ainsi des pathologies. Cette section traitera donc de certaines maladies associées à des défauts génétiques des

neutrophiles et certains désordres inflammatoires humains où le neutrophile est impliqué dans la destruction tissulaire.

2.6.1 Pathologies associées aux déficiences du neutrophile

Les individus avec peu de neutrophiles circulants ou dont les processus-clés de ces cellules sont défectueux sont sujets à des infections. Ces infections peuvent même être létales dans certains cas. Heureusement, ces maladies sont très rares. Le **tableau 5** présente quelques-unes des maladies associées à certaines déficiences des neutrophiles. Il est à noter que la plupart des maladies n'ont pas de nom commun, mais porte plutôt le nom de la déficience des neutrophiles. Cette section présentera donc seulement quelques-unes de ces maladies puisque cela dépasse l'objectif du présent travail.

Tableau 5 : Maladies associées à certaines déficiences génétiques des neutrophiles

1. Neutropénie
2. Granulomatose chronique (déficience de la NADPH oxydase)
3. Déficience au niveau de l'adhésion leucocytaire (LAD)
4. Maladie de Chédiak-Higashi (déficience des microtubules et des lysosomes)
5. Syndrome de Job (déficience de la chimiotaxie)
6. Déficience au niveau de la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6-PD)
7. Déficience de la myéloperoxydase
8. Déficience en granules secondaires
9. Syndrome de Schwachman (insuffisance pancréatique héréditaire associée à la neutropénie et à une déficience au niveau de la chimiotaxie des neutrophiles)

(Inspiré de Leff et Repine, 1993)

2.6.1.1 La neutropénie

La neutropénie est caractérisée par un nombre relativement faible de neutrophiles circulants (<1 x 10^6/mL de sang). Normalement, la concentration sanguine se situe entre 1 et 5 x 10^6 cellules/mL pour un adulte normal. La neutropénie peut être due à des maladies, telles la neutropénie congénitale et la leucémie myéloïde aiguë, ou à des effets secondaires d'une thérapie, comme dans le cas de la prise de médicaments

immunosuppressifs ou lors d'une chimiothérapie. Le patient est alors grandement sujet à des infections (Edwards, 1994).

2.6.1.2 La granulomatose chronique (GCD)

Cette maladie héréditaire polymorphe relativement rare se caractérise par l'absence de l'activation de la NADPH oxydase. La GCD peu être reliée à l'absence ou au mauvais fonctionnement du cytochrome *b* ou à un défaut de p47-*phox* ou p66-*phox*. Les neutrophiles de ces patients sont toujours aptes à effectuer la phagocytose, mais ne peuvent générer des radicaux libres. Le patient est alors sujet à des infections récurrentes multiples. Le traitement de la GCD se résume donc dans le contrôle des infections par les antibiotiques ou par l'injection de cytokines (i.e. INF-γ) afin d'augmenter l'activité des cellules du système immunitaire. La transplantation de moelle osseuse s'est également avérée efficace et la thérapie génique pourrait également être employée dans l'avenir (Edwards, 1994).

2.6.1.3 Déficience au niveau de l'adhésion leucocytaire (LAD)

Le LAD est une maladie autosomale récessive rare. Elle est caractérisée par des infections bactériennes récurrentes et/ou chroniques sans la formation de pus, malgré la persistance des leucocytes (i.e. granulocytose) dans la circulation sanguine. Un des premiers symptômes de cette maladie est le retard remarquable du détachement naturel du cordon ombilical à la naissance. Le LAD est causé par une mutation du gène codant pour la β_2 intégrine (CD18). Le précurseur protéique de la β_2 intégrine est soit indétectable ou soit incapable de se lier à la sous-unité α. L'expression des trois structures hétérodimériques $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18 ou LFA-1), $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18 ou CR3) et $\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18, CR4 ou p150,95) est alors déficiente et se situe entre l'absence totale et 20 à 30 % d'expression. La sévérité de la maladie est alors proportionnelle à l'expression des intégrines. Les neutrophiles des patients atteints de LAD sont donc capables de rouler sur l'endothélium, mais sont incapables d'y adhérer fermement pour ensuite transmigrer vers les tissus. Les neutrophiles de ces patients sont également incapables de phagocyter les bactéries opsonisées par le composant iC3b du complément. Une autre forme de

déficience au niveau de l'adhésion leucocytaire a également été rapportée, le LAD de type II, où les cellules sont déficientes au niveau du syalyl-Lewis x (hydrates de carbone à la surface des neutrophiles et des cellules endothéliales liant les sélectines et permettant aux neutrophiles de rouler et de ralentir sur l'endothélium). Les patients atteints de ce type de LAD souffrent d'un retard mental, de malformations et d'infections répétées (Curnutte, Orkin et Dinauer, 1994).

2.6.2 Pathologies associées à l'hyperactivité des neutrophiles

Un grand nombre de maladies est relié à une hyperactivité des neutrophiles. Plusieurs fonctions reliées à la destruction des pathogènes, comme les radicaux libres et les protéases, peuvent attaquer autant les tissus de l'hôte que les microbes. L'activation inappropriée du neutrophile conduisant à la destruction des tissus est impliquée dans plusieurs maladies. Le **tableau 6** présente différents désordres inflammatoires où les neutrophiles exerceraient un rôle important. Quelques-unes des maladies sont détaillées plus loin. Heureusement, les cellules environnantes possèdent généralement des inhibiteurs de protéases et des systèmes de protection contre les radicaux libres qui permettent de réduire les dommages causés par le neutrophile.

Tableau 6 : Désordres inflammatoires humains dans lesquels le neutrophile est impliqué comme un médiateur de la destruction tissulaire

1.	Syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (ARDS)
2.	Ischémie - Réperfusion
3.	Emphysème
4.	Arthrite rhumatoïde
5.	Goutte
6.	Glomérulonéphrite
7.	Asthme
8.	Dermatose neutrophilique
9.	Brûlures (Grands brûlés)
10.	Bronchite chronique
11.	Fibrose kystique
12.	Athérosclérose
13.	Psoriasis
14.	Maladie de Crohn

(Inspiré de Leff et Repine, 1993)

2.6.2.1 L'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde (AR) est la maladie rhumatoïde la plus commune. La prévalence mondiale de cette maladie est d'environ 1% et peut se déclencher à n'importe quel moment entre la puberté et le vieil âge. L'arthrite rhumatoïde affecte principalement les articulations synoviales périphériques et se manifeste par une inflammation de celles-ci. Normalement, dans les articulations synoviales, les os s'unissent par l'intermédiaire d'une cavité remplie d'un faible volume de liquide synovial (liquide très visqueux qui contient peu ou pas de cellules jouant un rôle de lubrifiant). Cette disposition offre une grande liberté de mouvement. L'articulation d'une personne atteinte de l'arthrite rhumatoïde, quant à elle, se gonfle suite à l'accumulation de liquide synovial. Ce fluide est alors envahi par les neutrophiles (jusqu'à 5 x 10^7 cellules/mL), les lymphocytes et les macrophages. Avec le temps, la membrane synoviale s'épaissit pour constituer le pannus, un tissu anormal qui adhèrent aux cartilages articulaires. Le cartilage finit par être érodé sous l'action des enzymes libérées par la réaction inflammatoire et il se forme un tissu cicatriciel pouvant s'ossifier. Le mouvement de l'articulation est alors restreint et une douleur intense apparaît (Marieb, 1993).

L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune. Le facteur déclenchant cette réaction est inconnu, mais il est généralement bien accepté que son origine est multi-paramétrique. Et qui plus est, des microbes et des virus pourraient en être la cause. Entre autres, il est possible que les microorganismes soient porteurs de molécules semblables à celles présentes dans les articulations, et que le système immunitaire activé tente de détruire les deux types de molécules (réactions croisées ou mimétisme moléculaire) (Marieb, 1993). Comme les neutrophiles comptent pour 90% des cellules contenues dans le liquide synovial, il a été suggéré que les enzymes lysosomales et les autres médiateurs de l'inflammation libérés par le neutrophile après l'ingestion de complexes immuns soient grandement responsables de l'inflammation au niveau de l'articulation (Leff et Repine, 1993).

2.6.2.2 La goutte

La goutte est une forme d'arthrite où l'acide urique, normalement excrété dans l'urine, s'accumule dans les articulations sous forme de cristaux. Ces dépôts provoquent des attaques généralement très douloureuses et, initialement, touche le plus souvent l'articulation de la base du gros orteil (Marieb, 1993). Les neutrophiles sont grandement impliqués dans la pathogénèse de la maladie. Brièvement, suite à la phagocytose des cristaux d'acide urique insoluble, le neutrophile relâche des substances toxiques qui entretiennent l'attaque de goutte. L'efficacité des médicaments anti-inflammatoires, tel la colchicine, dans le traitement de l'arthrite goutteuse est médiée, en grande partie, par leurs effets envers les neutrophiles (Leff et Repine, 1993).

2.6.2.3 Le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (ARDS)

L'ARDS se caractérise comme un désordre inflammatoire qui altère la structure et les fonctions des tissus pulmonaires. Cette maladie touche environ 150 000 personnes par année aux États-Unis et le taux de mortalité est d'environ 60%. Certaines constatations portent à croire que le neutrophile joue un rôle important dans cette pathologie (Leff et Repine, 1993). Tout d'abord, il y a un nombre anormalement élevé de ces cellules dans les espaces interstitielles et alvéolaires et il y a accumulation de produits dérivés des neutrophiles (élastase et autres), tel que déterminé par les biopsies et les lavages broncho-alvéolaires. Ensuite, les neutrophiles sont présents au tout début de la maladie. De plus, les gens atteints de neutropénie sont très rarement atteints de l'ARDS. Finalement, des altérations ont été notées chez les neutrophiles des patients atteints de l'ARDS, telle la diminution du taux d'apoptose (Matute-Bello *et al.*, 1997). La stimulation de l'apoptose des neutrophiles pourrait donc être un traitement important dans la résolution de la phase aiguë du syndrome de détresse respiratoire de l'adulte.

3. Interaction entre les neutrophiles et les contaminants environnementaux

Comme mentionné précédemment, l'activation inappropriée du neutrophile peut engendrer des dommages importants chez l'hôte et mener à certaines maladies. Cette

activation des neutrophiles peut être due à un dysfonctionnement de certains processus-clés ou peut être due à des agents extérieurs, tels des contaminants environnementaux. Il a déjà été démontré que certaines fonctions essentielles du neutrophile sont altérées par des contaminants environnementaux et ceci pourrait expliquer, en partie, certains effets toxiques des xénobiotiques. Les fonctions sont modulées, entre autres, par des biphényles polychlorés (BPCs), des métaux comme le mercure et le zinc, des pesticides organochlorés et des polluants de l'air. Cependant, peu d'études sont effectuées sur l'activation des neutrophiles par des contaminants environnementaux. De plus, la plupart de ces études ne caractérisent qu'une ou deux fonctions des neutrophiles modulées par les xénobiotiques.

Les BPCs sont des contaminants environnementaux persistants ayant plusieurs effets sur les organismes vivants, tels l'altération des fonctions neuronales (Shain, Bush et Seegal, 1991), endocriniennes (McKinney et Waller, 1994) et immunitaires (Davis et Safe, 1990 et Tryphonas *et al.*, 1991), incluant certaines fonctions cellulaires du neutrophile. L'aroclor 1242, un mélange de BPCs, stimule la production d'inositol phosphates (Tithof, Contreras et Ganey, 1995), la dégranulation et la production d'O_2^- (Ganey *et al.*, 1993) via les tyrosines kinases (Tithof, Watts et Ganey, 1997) et les phospholipases A_2 (Tithof *et al.*, 1996 et Tithof, Peters-Golden et Ganey, 1998). Cette augmentation de la production d'O_2^- pourrait être reliée à l'inhibition de l'activité de la superoxyde dismutase par l'aroclor 1242 (Narayanan *et al.*, 1998).

Les métaux lourds, tels le zinc, le plomb et le mercure, sont des polluants environnementaux pouvant induire une toxicité aiguë chez les organismes exposés. Cependant, les effets de ces métaux sur les mécanismes de défense de l'hôte sont peu décrits dans la littérature, tout comme les effets de ces derniers sur les neutrophiles. Certaines recherches sur les fonctions cellulaires des neutrophiles exposés aux métaux ont montré que certaines fonctions étaient altérées. Par exemple, les neutrophiles de travailleurs exposés au mercure sont toujours aptes à effectuer la phagocytose, mais leur capacité à tuer certaines espèces bactériennes est diminuée (Perlingeiro et Queiroz, 1994), tout comme la chimiotaxie et la flambée respiratoire (Perlingeiro et Queiroz, 1995) alors

que le zinc stimule la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Lindahl, Leanderson et Tagesson, 1998), ce qui pourrait contribuer à la fièvre du zinc (zinc fume fever).

Les pesticides organochlorés sont des composés qui possèdent la propriété de s'accumuler et de se concentrer dans la chaîne alimentaire et qui peuvent être très néfastes pour la santé des êtres humains. Il est reconnu que ces composés ont des effets sur le système immunitaire (Saboori et Newcombe, 1992). Par exemple, la chimiotaxie induite par des chimiokines (i.e. IL-8) est supprimée lorsque le neutrophile est incubé avec certains insecticides organochlorés, tels l'heptachlore, le chlordane et le toxaphène (Miyagi *et al.*, 1998). L'hexachlorobenzène, quant à lui, diminue la chimiotaxie et la flambée respiratoire des neutrophiles de travailleurs exposés à ce pesticide (Queiroz *et al.*, 1997).

3.1 Le sulfite de sodium (Na_2SO_3)

Les dioxydes de soufre, les sulfates et les formes de sulfite des oxydes de soufre sont des polluants de l'air générés par l'augmentation de l'activité industrielle depuis plusieurs années (Lippmann, 1985). Parmi ceux-ci, le Na_2SO_3 est un composé chimique qui peut être véhiculé par les particules aéroportées et qui est abondamment utilisé comme agent de blanchiment dans l'industrie de pâtes et papiers et comme agent anti-microbien et antioxydant dans l'industrie alimentaire (IARC Working Group, 1992 et Denisov et Tkachev, 1990).

Le Na_2SO_3 et d'autres oxydes de soufre sont connus pour causer ou aggraver l'asthme bronchique (Wright *et al.*, 1990 et Arai *et al.*, 1998) et d'autres maladies respiratoires chroniques (Euler *et al.*, 1987, Reist, Jenner et Halliwell, 1998 et Toren, Hagberg et Westberg, 1996). Des études *in vivo* ont montré que la capacité respiratoire diminuait proportionnellement à la concentration de Na_2SO_3 administrée (Chen *et al.*, 1987). En plus des effets sur le système respiratoire, le sulfite est relié à divers effets secondaires sur la santé, tels le choc anaphylactique, l'urticaire, les nausées, les douleurs abdominales et, dans certains cas, la mort (Gunnison et Jacobsen, 1986 et Yang et Purchase, 1985). Les

effets du sulfite sur l'organisme seraient reliés, en partie, à l'activité de la sulfite oxydase, l'enzyme responsable de l'oxydation du sulfite en sulfate afin que la molécule soit excrétée de l'organisme (Beck-Speier, Hinze et Holzer, 1985 et Gunnison *et al.*, 1987). Une déficience en sulfite oxydase serait donc un facteur de risque de développer des réactions aux sulfites (Calabrese *et al.*, 1981 et Acosta *et al.*, 1989).

Une récente étude *in vivo* réalisée sur une période de 13 mois où 8 chiens ont été exposés dans une chambre d'inhalation à un environnement recréant un milieu urbain et contenant de l'air pollué (combinaison de particules contenant du sulfite et de l'hydrogène) a montré que le système respiratoire est peu affecté par cet environnement, suggérant que les maladies respiratoires ne soient pas initiées par ces polluants (Heyder *et al.*, 1999). Cette étude, réalisée sur les chiens, a toutefois été réalisée sur une courte période de temps dans un environnement qualifié de réel et ne représente pas des expositions chroniques de l'humain à ces polluants atmosphériques. Le côté toxique attribué au sulfite pourrait également jouer un rôle potentiel de médiateur de l'inflammation locale et/ou systémique, étant donné ses activités antimicrobiennes. En effet, l'administration *in vivo* de LPS est associée à une augmentation de la concentration sérique de sulfite chez le rat Wistar (Mitsuhashi *et al.*, 1998). Cette production de sulfite est effectuée par les neutrophiles en réponse au LPS et dépend de la concentration de sulfate inorganique dans le milieu. Les glucocorticoïdes et le FK506 (des agents immunosuppresseurs) inhibent complètement la libération du sulfite par les neutrophiles. Ces résultats suggèrent que le sulfite serait un médiateur de la défense de l'hôte par les neutrophiles.

3.1.1 Effet du Na_2SO_3 sur les composantes cellulaires du système respiratoire

Le Na_2SO_3 est un polluant atmosphérique qui peut avoir des effets néfastes sur le système respiratoire et ses composantes cellulaires. Les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires sont les premières cellules susceptibles d'entrer en contact avec cette molécule. Dans le cas d'une inflammation des tissus respiratoires, les neutrophiles sont les cellules qui seront appelées sur le site inflammatoire. Une étude de Beck-Speier et ses collègues (Beck-Speier, Dayal et Maier, 1998a) a montré que les macrophages alvéolaires

sont activés par le sulfite et qu'ils libèrent des médiateurs pouvant activer la flambée oxydative des neutrophiles, principalement par le récepteur PAF. Une seconde étude a par la suite montré que les médiateurs en question, le PAF et la LTB_4, sont libérés par la voie métabolique des phospholipases A_2 et du 5-lipoxygénase (Beck-Speier *et al.*, 1998b). Les fonctions des macrophages alvéolaires et des autres cellules phagocytaires peuvent être modulées par le Na_2SO_3 puisque ces cellules exhibent une faible quantité de sulfite oxydase (Beck-Speier, Hinze et Holzer, 1985). Ces cellules ont donc une capacité de protection relativement faible vis-à-vis le sulfite.

3.1.2 Effet du Na_2SO_3 sur les neutrophiles

Les neutrophiles peuvent être activés par les macrophages lors d'une stimulation au Na_2SO_3, mais également par le toxique lui-même. En effet, une exposition au sulfite induit une accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires chez les humains et les animaux (Shore *et al.*, 1987). De plus, le Na_2SO_3 induit la flambée respiratoire dont la production extracellulaire d'O_2^- et la génération intracellulaire de H_2O_2 (Beck-Speier, Lenz et Godleski, 1994). L'activation de la NADPH oxydase pour générer des anions superoxydes serait dépendante des protéines kinases C et de la voie métabolique du Ca^{2+}/calmoduline. Les neutrophiles provenant d'individus atteints de GCD ne généraient pas, quant à eux, d'O_2^- en présence de Na_2SO_3 (Beck-Speier *et al.*, 1993). Des études ultastructurales ont également confirmé l'activation des neutrophiles par le Na_2SO_3 puisque les cellules ont démontré une surface membranaire rugueuse et des signes de vésiculation et de dégranulation (Beck-Speier, Lenz et Godleski, 1994). Malgré la faible quantité de sulfite oxydase retrouvée chez les neutrophiles, ces dernières ont la capacité d'oxyder le sulfite en sulfate via deux voies différentes grâce à l'activité enzymatique de la sulfite oxydase. La voie majeure implique la catalyse de l'oxydation par la sulfite oxydase chez les individus possédant une forte activité de la sulfite oxydase et la seconde implique l'autooxydation du sulfite en sulfate par la formation d'un intermédiaire radicalaire trioxyde sulfureux chez les individus avec une faible activité enzymatique (Constantin *et al.*, 1994). La génération de superoxydes pourraient donc favoriser la transformation du sulfite en sulfate afin de détoxifier la cellule (Fridovch et Handler,

1961). Ainsi, les neutrophiles apparaissent comme les principaux médiateurs de la toxicité du sulfite. Malheureusement, aucune autre donnée concernant les effets du Na_2SO_3 sur d'autres réponses physiologiques du neutrophile humain n'était disponible avant nos recherches.

3.2 Le dieldrine

Le dieldrine est un insecticide organochloré de la famille des cyclodiènes considéré comme une priorité en matière de santé publique (le dieldrine est l'un des 12 polluants organiques persistants (POPs) hautement prioritaires pour Santé-Canada). Ces composés qui s'accumulent dans la chaîne alimentaire et qui persistent dans l'environnement, requièrent jusqu'à plusieurs siècles pour se dégrader complètement. Plusieurs insecticides de la famille des cyclodiènes, dont l'aldrine et le dieldrine, sont bannis dans plusieurs pays et contrôlés très sévèrement dans certains autres. Le dieldrine était utilisé majoritairement dans les pays tropicaux afin de contrôler les insectes vecteurs de maladies, surtout la malaria, et dans le traitement des sols alors que l'aldrine était utilisé dans le traitement des sols. Quoique bannis, le dieldrine et l'aldrine se retrouvent partout dans l'environnement, c'est-à-dire dans l'eau, l'air et les sols. La nourriture, plus spécifiquement les produits laitiers et les viandes animales, sont les sources principales d'exposition des humains au dieldrine. Cet insecticide a été retrouvé dans les tissus humains et également dans le lait maternel, démontrant que les humains sont réellement exposés au dieldrine (Voccia *et al.*, 1999).

Le dieldrine est toxique pour les humains. Une exposition aiguë à de fortes doses de dieldrine entraînent plusieurs effets, dont des maux de tête, des nausées et des pertes de conscience. Les effets d'une exposition chronique, par contre, n'ont pas été documentée, mais des études *in vivo* ont montré que le dieldrine possède des propriétés immunosuppressives (Bernier *et al.*, 1987 et Krzystyniak *et al.*, 1989), hépatotoxiques (Kolaja *et al*, 1996; Bachowski *et al.*, 1997 et Bachowski *et al.*, 1998) et neurologiques (Joy, 1982 et Brannen *et al.*, 1998). L'aldrine, un stéréoisomère du dieldrine, est un insecticide rapidement métabolisé en dieldrine dans les organismes vivants et sa toxicité est donc essentiellement la même que celle du dieldrine. Le mode d'action du dieldrine au

niveau neurologique est connu : l'insecticide bloquerait l'effet d'un neurotransmetteur inhibiteur, l'acide γ-aminobutyrique (GABA), et du récepteur de GABA en se liant directement aux canaux de chlore des synapses (Brannen *et al.*, 1998). Au niveau du foie, le stress oxydatif serait la cause principale de l'hépatotoxicité relié au dieldrine (Bachowski *et al.*, 1997 et Bachowski *et al.*, 1998). Le dieldrine serait également cancérogène, puisqu'une étude a démontré que cet insecticide est associé au risque de développer le cancer du sein (Hoyer *et al.*, 1998). Au niveau immunologique, le mode d'action du dieldrine est mal défini. Il est connu que le dieldrine s'accumule dans les globules rouges et lorsque les érythrocytes âgés ou endommagés se retrouvent dans le lit vasculaire de la rate, le dieldrine s'accumule dans les organes lymphoïdes, induisant ainsi une réponse immunitaire (Voccia *et al.*, 1999).

3.2.1 Effet du dieldrine sur le système immunitaire

Le dieldrine module certaines fonctions des cellules du système immunitaire. Des études *in vivo* sur des souris ont montré une réduction du nombre de cellules sécrétrices d'anticorps et une réduction de la production d'anticorps contre les antigènes T-dépendants et T-indépendants du LPS (Bernier *et al.*, 1997 et Fournier *et al.*, 1988). La toxicité du dieldrine sur la réponse humorale peut être expliquée, en partie, par la réduction de la capacité des CPA (macrophages) à capter l'antigène et à le traiter, comme démontré avec l'avidine (Krzystyniak *et al.*, 1989). Une autre étude a montré une dérégulation des réponses à médiation cellulaire des lymphocytes T lorsque ces derniers sont traités avec du dieldrine, en l'occurrence la réponse lymphocytaire mixte, la prolifération stimulée par des mitogènes et la réponse du greffon versus l'hôte (Hugo *et al.*, 1988a et Hugo *et al.*, 1988b). La réponse immunitaire non spécifique semble également être une cible pour cet organochloré. Entre autres, le dieldrine altère la résistance de l'hôte en modulant certaines réponses des macrophages (Loose *et al.*, 1981). Des études sur la souris ont également montré que la phagocytose de *Salmonella typhimurium* par les macrophages était inhibée jusqu'à 7 et 10 jours suite à une injection intrapéritonéale de dieldrine (Jolicoeur, Fournier et Krzystyniak, 1988). Dans une autre expérience, le dieldrine a diminué l'activité intrinsèque des macrophages à restreindre la

réplication du virus de l'hépatite de la souris (MHV-3) et a augmenté la cytolyse *in vitro* du MHV-3 dans les cellules de l'hôte (Krzystyniak *et al.*, 1985 et Krzystyniak *et al.*, 1986).

3.2.2 Effet du dieldrine sur le neutrophile

Le dieldrine possède la capacité de moduler la réponse immunitaire innée, comme démontré par la modulation de réponses importantes du macrophage. L'étude des réponses physiologiques des neutrophiles au dieldrine ont toutefois été négligées, car les recherches sur ce sujet sont peu nombreuses dans la littérature. Il est connu que le dieldrine active les neutrophiles de rat *in vitro* (Hewett et Roth, 1988). Cette activation se résume à une augmentation de la production de superoxydes selon un modèle dépendant de la dose et du calcium extracellulaire. Cette production est également augmentée par une pré-incubation des cellules avec des concentrations sous-optimales de PMA et de fMLP. Plus récemment, une étude a montré que le dieldrine augmente la production d'O_2^- et d'acide arachidonique chez les neutrophiles de rat selon un modèle concentration-dépendante. Le dieldrine activerait différentes isoformes (calcium-dépendante et calcium-indépendante) des phospholipases A_2 pour activer le neutrophile (Tithof *et al.*, 2000). Malheureusement, la littérature ne traite aucunement de l'interaction du dieldrine et des neutrophiles humains afin d'expliquer, en partie, les propriétés immunosuppressives du dieldrine. C'est pourquoi nous avons décidé de porter nos études sur la modulation des réponses physiologiques des neutrophiles humains par le dieldrine.

Seconde partie
Les articles scientifiques

1. Article # 1 : Functional responses of human neutrophils to sodium sulfite (Na_2SO_3) *in vitro*

1.1 Résumé français de l'article #1

Réponses physiologiques des neutrophiles humains au sulfite de sodium (Na_2SO_3) *in vitro*

Pierrette Labbé, Martin Pelletier, Félix O Omara et Denis Girard

Une accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires est un phénomène commun observé lors d'une inflammation pulmonaire induite par des polluants de l'air, dont les dioxydes sulfureux et les sulfates. Dans cette étude misant sur les interactions entre le sulfite de sodium (Na_2SO_3) et les neutrophiles *in vitro*, nous avons confirmé que ce sulfite induit la production de superoxyde (O_2^-). Nous avons démontré que cette réponse survient plus rapidement que ce que la littérature rapportait et que le Na_2SO_3 peut sensibiliser la cellule à répondre au tripeptide bactérien fMLP selon un modèle dépendant de la dose, en augmentant la production d'O_2^-. De plus, nos résultats démontrent que le Na_2SO_3 induit l'expression des gènes des neutrophiles humains selon un modèle dépendant de la dose, tel que mesuré par l'incorporation de 5-[^{3}H]-uridine dans l'ARN total. Toutefois, ce sulfite n'induit pas de changements morphologiques apparentes de la cellule. Nous avons également démontré que le Na_2SO_3 ne module pas l'apoptose des neutrophiles et n'affecte en rien l'effet du GM-CSF. Nous concluons que le Na_2SO_3 agit rapidement sur la physiologie des neutrophiles, en quelques minutes selon la production d'O_2^-, et en quelques heures (4h) selon l'expression des gènes et ce, sans altérer le taux d'apoptose évalué après une longue période d'incubation (20h). De plus, ces travaux nous permettent de conclure que la production d'O_2^- induite par le Na_2SO_3 n'entraîne pas le neutrophile en apoptose, un mécanisme connu pour survenir dans d'autres conditions. Ainsi, le potentiel toxique du Na_2SO_3 durant l'inflammation pulmonaire pourrait être relié à la capacité d'induire la production d'O_2^- sans moduler le taux d'apoptose des neutrophiles.

1.2 Article #1

Human & Experimental Toxicology (1998) 17, 600–605
© 1998 Stockton Press All rights reserved 0144–5952/98 $12.00

http://www.stockton-press.co.uk/het

Functional responses of human neutrophils to sodium sulfite (Na_2SO_3) *in vitro*

Pierrette Labbé, Martin Pelletier, Felix O Omara and Denis Girard

Institut National de la Recherche Scientifique-Santé (INRS-Santé), Université du Québec, Pointe-Claire, Québec, H9R 1G6 Canada

An influx of neutrophils into the airways is a common feature observed during pulmonary inflammation induced by air pollutants, including sulfur dioxide and sulfates. In the present study focusing on the *in vitro* interactions of sodium sulfite (Na_2SO_3) with human neutrophils, we confirm results indicating that this sulfite induces superoxide production (O_2^-) by itself. We demonstrated that this response can occur more rapidly than previously reported (within 5 min), and that Na_2SO_3 can act as a priming agent, in a concentration-dependent fashion, to the bacterial tripeptide N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) by increasing O_2^- production. In addition, our results show that Na_2SO_3 induces gene expression in human neutrophils in a concentration-dependent manner as assessed by incorporation of 5-[^{3}H] uridine into total RNA. However, it does not induce cell shape changes. We also demonstrated that Na_2SO_3 does not modulate neutrophil apoptosis nor reverse the well-known delaying effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on apoptosis. We conclude that Na_2SO_3 acts rapidly on neutrophil physiology, within a few minutes with respect to superoxide production, and a few hours (4 h) with respect to gene expression without altering a biological process such as the rate of apoptosis evaluated after a long period of incubation (20 h). We further conclude that Na_2SO_3-induced production of O_2^- does not drive neutrophils to undergo apoptosis, a mechanism known to occur in other conditions. Therefore, the potential toxicity of Na_2SO_3 during pulmonary inflammation or lung-associated diseases may be related to its ability to induce superoxide production without altering neutrophil apoptosis rate.

Keywords: sodium sulfite; neutrophils; superoxide; gene expression; apoptosis

Introduction

Neutrophils are the first cell type to arrive at an inflammatory site. Following activation, these cells are known, among other functions, to generate reactive oxygen intermediates (ROI), release various proteolytic enzymes and toxic products via degranulation, exert phagocytosis, and synthesize various products such as cytokines.[1–5] We and others have previously reported that GM-CSF can activate neutrophil gene expression as well as *de novo* proteins synthesis and can delay neutrophil apoptosis.[6–11] In addition, GM-CSF is known to prime the fMLP-induced oxidative burst of human neutrophils,[10,12] a physiological state that is likely to occur in process such as inflammation, a disorder where cells such as neutrophils can be in close contact with a plethora of different cytokines.[1,2,11,13,14] For example, neutrophils present in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients can be activated by numerous molecules including, among others, interleukin-13 (IL-13) and IL-15.[13,14]

In humans, neutrophils are the predominant leukocyte cell type and may represent up to 65% of total leukocytes in the circulation. Neutrophils are known to spontaneously undergo apoptosis in both *in vivo* and *in vitro* conditions.[15,16] This biological process is probably the best mechanism that controls the important cell turnover rate that has to be well regulated because of the high rate of production and release of neutrophils from bone marrow to the circulation.[1,2] This may explain why neutrophils have a short half-life (about 12 h) in the circulation. The same beneficial functions exerted by neutrophils can be highly deleterious for human health if inappropriately activated. In this sense, ROI are very potent anti-microbial factors and are important for defense against various microorganisms, but on the other hand, ROI can be highly toxic to surrounding cells and tissues when dysregulation occurs such as during myocardial infarct[17] or pulmonary inflammation.[18]

Sulfur dioxide, sulfate, and sulfite forms of sulfur oxides are well known air pollutants.[19] Among them, sodium sulfite (Na_2SO_3) is used as an anti-darkening food agent and is largely used in the pulp and paper sector as a bleaching agent during chemical pulping processes.[20,21] Recently, it was found that sodium sulfite can induce the production of superoxide anions by neutrophils as well as hydrogen peroxide (H_2O_2) by itself[22], but no clear

Correspondence: Dr D Girard
Received 29 April 1998; revised 15 July 1998; accepted 27 July 1998

concentration-dependent effects were reported. Previously, it was demonstrated that sodium sulfite activates the neutrophil NADPH oxidase to produce free radicals via protein kinase C and Ca^{2+}/calmodulin pathways.[23] In addition to their unique observation that sodium sulfite induces a respiratory burst, the authors reported that human neutrophils stimulated with Na_2SO_3 exhibit increased ruffled surface membranes which is characteristic of activated cells. No additional data concerning the effect of sodium sulfite on other functional neutrophil responses is presently available. In order to better characterize and to further document the interaction between Na_2SO_3 and human neutrophils, we decide to verify if this contaminant can act as a priming agent, such as GM-CSF, by studying the fMLP-induced O_2^- production. In addition, we studied the ability of Na_2SO_3 to induce neutrophil gene expression, used as a marker of activation,[6-10] as well as its capacity to modulate neutrophil apoptosis.

Materials and methods

Neutrophil isolation and incubation conditions
Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc, QUE, Canada), as described previously.[6-10] Cell viability, monitored by the ability to exclude Trypan blue was greater than 98% immediately after isolation as well as following all different treatments.

Agonists
Sodium sulfite (Na_2SO_3) was purchased from Sigma, St-Louis, MO, USA and was used in concentration-dependent experiments (0.1, 1 or 10 mM) according to a previous published study[22] and was freshly prepared just before the different experiments as previously documented.[22,23] Phorbol myristate acetate (PMA), and the microbial tripeptide N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) were also purchased from Sigma, and recombinant human GM-CSF (specific activity of 9×10^6 U/mg) was a gift from the Genetics Institute, Boston, MA, USA. This latter cytokine was used at 65 ng/ml as previously published.[6-10]

Superoxide production
Superoxide production was monitored as the (superoxide dismutase-sensitive) reduction of cytochrome *c*, as previously reported.[8,9] Briefly, neutrophil suspensions (1×10^6 cell/ml HBSS-1.2 mM $CaCl_2$) were incubated with 130 μM cytochrome *c* (Sigma) for 5 or 30 min at 37°C in the presence or absence of Na_2SO_3 (0.1, 1.0 or 10 mM) or PMA (10^{-7} M) used as positive control.[8,9] For the priming experiments, cells were incubated for 30 min with Na_2SO_3 or GM-CSF (positive control) as above and followed by a 5 min incubation with fMLP (10^{-7} M). Reactions were stopped by transferring the tubes to an ice-cold bath. The absorption of cytochrome *c* was monitored at 550 and 540 nm and the amount of superoxide anions produced was calculated from the difference between the OD at the two wavelengths using an extinction coefficient of 21.1.[24]

RNA synthesis
The RNA synthesis was performed by measuring the incorporation of [5-^{3}H]uridine (Amersham Corp., Oakville, ONT, Canada) into total RNA as previously described.[6-10] Briefly, 100 μl of a 5×10^6 cells/ml suspensions were incubated in 96-well microtiter plates in the presence of 1 μCi of [^{3}H]uridine along with buffer, 65 ng/ml GM-CSF (positive control), or increasing concentrations of Na_2SO_3 (0.1, 1.0 or 10 mM) for 4 h (previously shown to be optimal) at 37°C, 5% CO_2 in RPMI-1640 supplemented with 1% autologous serum.[6-10] Following incubation, the cells were collected onto borosilicate glass fiber paper by a multiple-cell culture harvester (Skatron Instruments Inc., Sterling, VA, USA), and sections of the filter corresponding to each microwell were then punched out and placed in scintillation counting vials in the presence of 4 ml of Scintisafe Econo-1 (Fisher Scientific Ltd., Nepean, ONT, Canada). Results are expressed as stimulation indices which represent the mean c.p.m. of triplicate from treated cells/mean c.p.m. of triplicate from unstimulated control cells. During this 4 h incubation, the morphology of cells was monitored by optical microscopy.[7,8,10] The number of cells as well as their viability remained stable during the incubation as assessed by Trypan blue exclusion.

Assessment of neutrophil apoptosis by cytology
Cytocentrifuge preparations of neutrophils were performed with a Cyto-tek® centrifuge, Miles Scientific, IN, USA essentially as previously described.[7,10] Cells were incubated in the presence of buffer, GM-CSF (65 ng/ml), Na_2SO_3 (0.1, 1.0 or 10 mM) or GM-CSF+increasing concentrations of sodium sulfite for 20 h, in RPMI-1640-10% autologous serum[7-10] and were stained with a Diff-Quick staining kit, from Baxter, FL, USA, according to the manufacturer's instructions. Cells were examined by light microscopy at ×400 final magnification and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei.[11,12] An ocular containing a 10×10 squares grill was used in order to count at least five different fields (>100 cells) for assessment of apoptotic cells. Results were expressed as percentage of apoptotic cells. GM-CSF is used as a control since this agonist is well known to delay neutrophil apoptosis.[8,10,11]

Results

Sodium sulfite induces superoxide production by itself and primes the response to fMLP

We verified the ability of Na_2SO_3 to induce superoxide production by itself as well as the ability to prime the fMLP response. Results shown in Figure 1 indicate that superoxide production by neutrophils is increased by Na_2SO_3 in a concentration-dependent fashion. After 5 min, superoxide production from human neutrophils stimulated with buffer, 0.1, 1.0, 10 mM Na_2SO_3, or 10^{-7} M PMA was 2.6 ± 0.5 (mean $\pm$ s.e.m., $n=3$); 4.5 ± 1.3; 9.5 ± 1.1; 22.3 ± 2.1 and 24 ± 4.0 nmoles/10^6 cells, respectively. Results were 3.3 ± 0.1; 5.8 ± 0.3; 14.0 ± 0.1; 34.9 ± 0.6 and 41.8 ± 0.9 after 30 min of stimulation, in the same order. Figure 2 illustrates that Na_2SO_3 can also prime human neutrophils to respond to fMLP in a concentration-dependent fashion. After 30 min of incubation with buffer, 0.1, 1.0, 10 mM Na_2SO_3, or GM-CSF (positive control), O_2^- production by fMLP-induced neutrophils (5 min) was 11.5 ± 2.1; 14.5 ± 1.6; 24.9 ± 2.1; 38.4 ± 1.6 or 22.0 ± 1.9 nmoles /10^6 cells.

Na_2SO_3 induces RNA synthesis in a concentration-dependent fashion but does not induce cell shape changes

Results in Figure 3 illustrate that total RNA synthesis is increased in a concentration-dependent manner as assessed by incorporation of 5-[^{3}H]uridine. Because of variability among individuals, results are expressed as stimulation indices and as we have previously documented[6-10] an index >1 indicates a stimulation. Indices of stimulation were 1.01 ± 0.08 (mean $\pm$ s.e.m., $n=8$); 1.20 ± 0.2; and 1.50 ± 0.3 for 0.1, 1.0, or 10 mM Na_2SO_3, respectively and 4.93 ± 0.7 for GM-CSF. During the 4 h incubation we monitored the morphology of neutrophils by microscopic observations using cells treated with GM-CSF as positive control. We found that Na_2SO_3 did not induce neutrophil shape changes as the cells remained with a round morphology in contrast to the irregular morphology observed with GM-CSF (data not shown).

Na_2SO_3 does not modulate neutrophil apoptosis rate

We next verified if Na_2SO_3 could act on neutrophil functions requiring longer period of incubation. In this sense, we evaluated neutrophil apoptosis rates in cells incubated for 20 h in the presence of increasing concentrations of Na_2SO_3. Figure 4

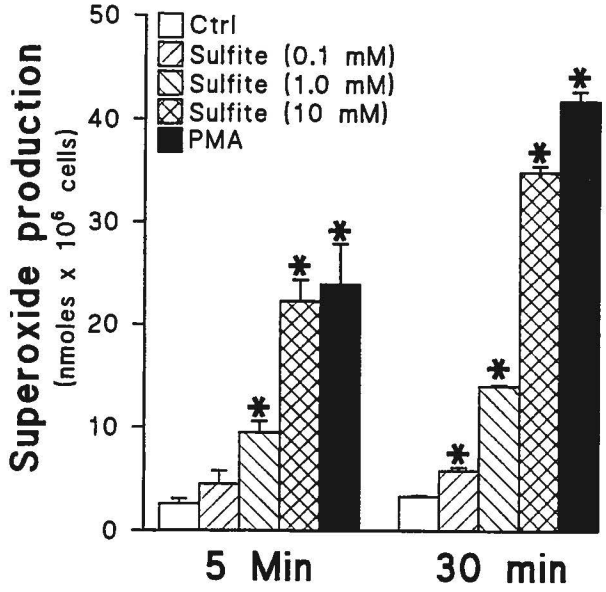


Figure 1 Superoxide production by human neutrophil is increased by Na_2SO_3 in a concentration-dependent fashion. Freshly isolated human neutrophils (1×10^6 cells/ml) were incubated in the presence of buffer (Ctrl), PMA (10^{-7} M), or increasing concentrations of Na_2SO_3, for 5 or 30 min, and superoxide production was measured as described in Materials and methods. Results are expressed as means $\pm$ s.e.m. ($n \geq 3$). *$P<0.05$ by Student's unpaired two-tailed t-test

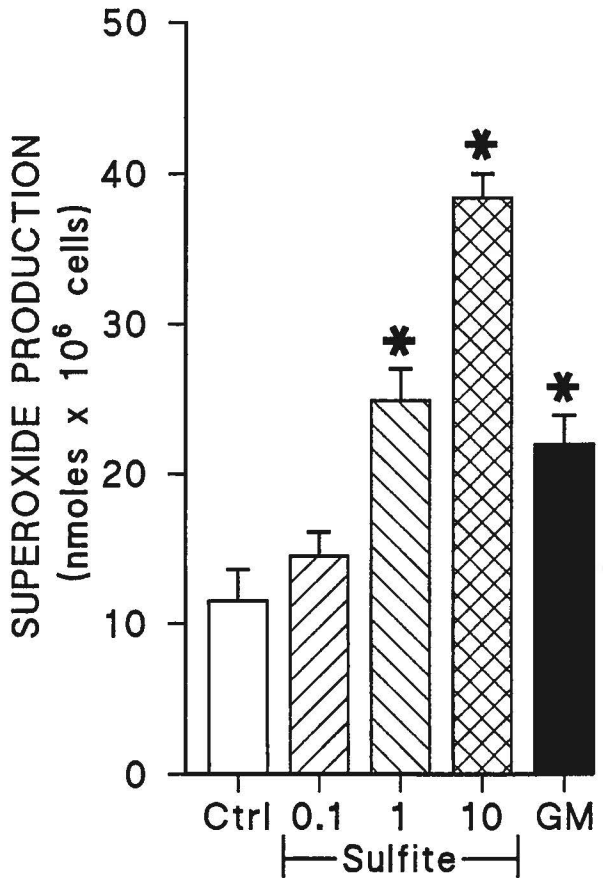


Figure 2 Na_2SO_3 acts as a priming agent in a concentration-dependent fashion on neutrophil superoxide production. Neutrophils were incubated as described in Figure 1 for 30 min with buffer (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF, or indicated increasing concentrations of Na_2SO_3, and then stimulated for 5 min with fMLP (10^{-7} M) and superoxide production was measured as described in Figure 1. Results are expressed as means $\pm$ s.e.m. ($n=4$). *$P<0.05$ by Student's unpaired two-tailed t-test

illustrates that neutrophil apoptosis rates remain similar to control cells (34.3±4.6% of cells in apoptosis, mean±s.e.m.) when incubated with 0.1 (41.5±9.3%), 1.0 (33.2±5.3%), or 10 mM Na_2SO_3 (44.7±6.1%) in contrast to GM-CSF which, as expected, significantly delays neutrophil apoptosis (11.7±2.4%). We then examined the possibility that Na_2SO_3 could reverse the GM-CSF effect on neutrophil apoptosis. Figure 5 shows that during co-incubation with GM-CSF, Na_2SO_3 did not reverse the known delaying effect of GM-CSF since the number of apoptotic cells was stable ranging from about 15–17%.

Discussion

The present study indicates that human neutrophils can be activated by Na_2SO_3 which is an important

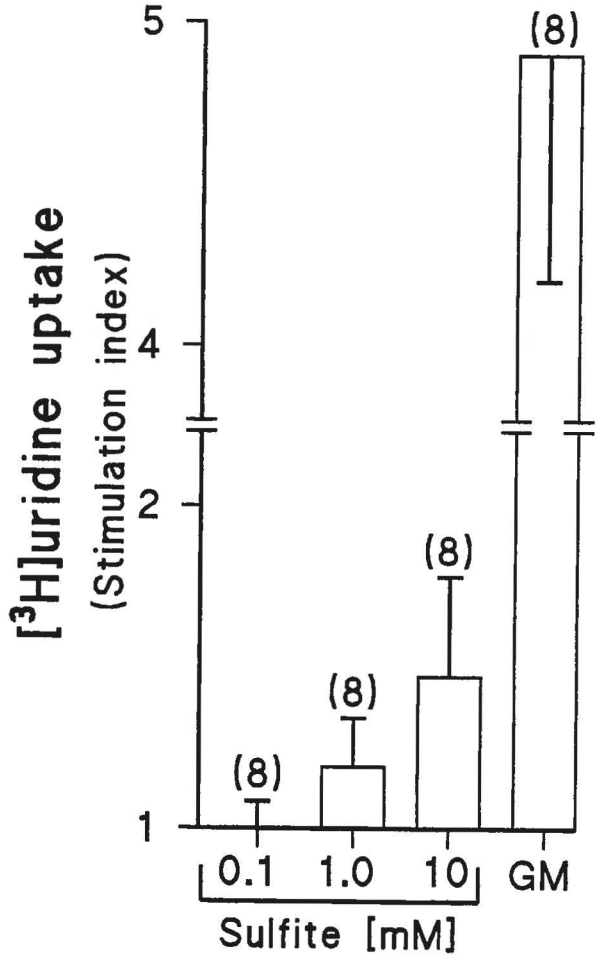


Figure 3 Induction of neutrophil gene expression by Na_2SO_3. Neutrophil (5×10^6 cells/ml) were incubated in RPMI-1640 supplemented with 1% autologous serum in the presence of buffer, increasing concentrations of Na_2SO_3, or 65 ng/ml GM-CSF (used as positive control). Gene expression was determined by incorporation of 5-[^{3}H]uridine into RNA as described in Materials and methods. Results (means from triplicates±s.e.m., n=8) are expressed as stimulation indices (c.p.m. from stimulated cells/c.p.m. from control cells)

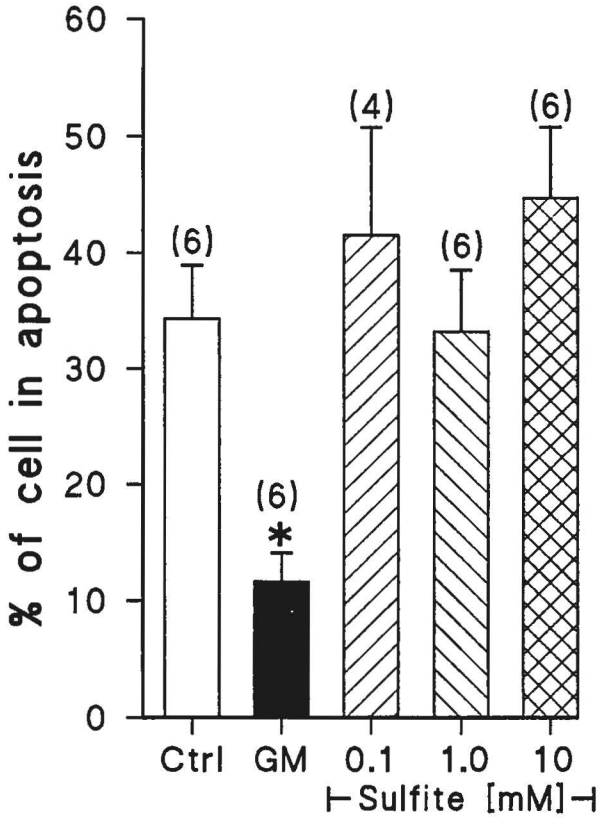


Figure 4 Na_2SO_3 does not modulate neutrophil apoptosis. Neutrophils (10×10^6 cells/ml) were incubated in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum in the presence of buffer only (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF, or increasing concentrations of Na_2SO_3 for 20 h and apoptosis was quantified as described in Materials and methods. Results are means±s.e.m. ($n\geqslant4$) performed at least in duplicates. *$P<0.05$ by Student's unpaired two-tailed t-test

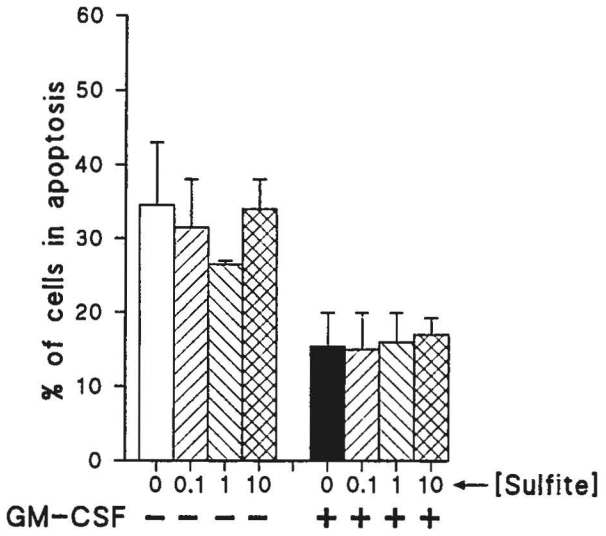


Figure 5 Na_2SO_3 does not reverse the delaying effect of GM-CSF on neutrophil apoptosis. Neutrophils were incubated as in legend of Figure 4 except that they were co-incubated or not with GM-CSF. Results are expressed as means±s.e.m. performed at least in duplicates from two different blood donors

environmental contaminant. In particular, this sulfite strongly induces superoxide production by itself as well as it can prime neutrophils to respond to fMLP. In one study, it was previously reported that sodium sulfite increases the respiratory burst in human neutrophils from 0.01–1 mM but dramatically decreased at higher concentrations (even under the basal level obtained with control cells) such as 10 mM.[22] However, in our hands, we observed that O_2^- production from Na_2SO_3-treated neutrophils increased in a concentration-dependent fashion and, at a concentration of 10 mM, O_2^- production increased ~tenfold after 5 or 30 min of stimulation. This discrepancy may be explained by a difference in experimental conditions. Of note is that our positive control PMA gave exactly the expected results[6,9] and that Na_2SO_3 was not toxic to cells at 0.1, 1.0 or 10 mM as assessed by Trypan blue exclusion. Furthermore, we also observed a concentration-dependent response in O_2^- production during priming experiments with 0.1, 1.0 or 10 mM of Na_2SO_3. Because ROI production from neutrophils can contribute to lung injury,[11,18] and that influx of neutrophils into the airways is a common feature observed during pulmonary inflammation induced by air pollutants, one has to consider Na_2SO_3 as an important risk factor in contributing to human lung diseases. The effects of Na_2SO_3 in *in vivo* conditions remains to be determined. Studies on neutrophil functions using cells isolated from human exposed to high concentrations of Na_2SO_3, such as those living in proximity of paper mills, will be of great interest.

We report herein that despite its ability to induce neutrophil gene expression, Na_2SO_3 does not induce cell shape changes. This is unlike GM-CSF and other cytokines that we have previously studied including fMLP, IL-4[8], IL-13[7] and IL-15.[10] Because of this, it is tempting to suggest that the mode of action of Na_2SO_3 is different than cytokines that mediate cell signals through ligation with specific cell surface receptors. However, because to date it is unclear if Na_2SO_3 bind to a receptor or any proteins, it is plausible to imagine that the differences observed are explained by a different cell signal pathway. In addition, it seems that the cytoskeleton is not an important cell structure target for Na_2SO_3 in contrast to cytokines. This observation is in agreement with one study showing that impairment of function including the integrity of the cytoskeleton in aging neutrophils is associated with apoptosis.[25] Our results are contradictory to those of Beck-Speier showing that Na_2SO_3 increased ruffled surface membranes.[22] However, it is possible that sodium sulfite induces subtle cytoskeleton rearrangements that can be observed only by electron microscopy.

To date, it is established that sodium sulfite activates the neutrophil NADPH oxidase to produce free radicals via protein kinase C and Ca^{2+}/calmodulin pathways.[23] Since no other neutrophil functions other than the respiratory burst activity were studied before our present study, no additional data were available on its mode of action on human neutrophils. Although production of ROI are thought to play important role in the induction of neutrophil apoptosis,[12] we found herein that albeit Na_2SO_3 is a potent activator of O_2^- it did not modulate apoptosis. It is well accepted that apoptosis is not under control during pulmonary inflammation and that failure to remove apoptotic neutrophils may contribute to the inflammatory process. Although we report herein that sodium sulfite did not by itself modulate neutrophil apoptosis *in vitro*, it does not rule out the possibility that it can alter the ability of macrophages to eliminate apoptotic neutrophils *in vivo*.

Because we found that Na_2SO_3 can induce gene expression, which is in agreement with its ability as being a neutrophil agonist,[7,8,10] identification of genes that are modulated by sodium sulfite will allow us to better understand its mode of action. Because neutrophil gene expression is induced by Na_2SO_3 without apparent cytoskeletal rearrangement, it will be of major interest to study if tyrosine phosphorylation of intracellular proteins occur in order to elucidate the cell signal pathway involved. This is not without any precedent with environmental contaminant since it was recently observed that the level of phosphorylation of some tyrosine containing proteins is induced rapidly by polychlorinated biphenyls such as aroclor 1242.[26] In addition, it will be of importance to verify the ability of this contaminant to induce *de novo* protein synthesis from neutrophils as we have previously documented for cytokines such as IL-4[8], IL-13[7] and IL-15[10]. In the future, identification of proteins modulated by Na_2SO_3 will be helpful for better understanding its mode of action. Such experiments are in progress in our laboratory.

Acknowledgements

This study was partly supported by Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). DG is a Scholar from FRSQ.

References

1 Kanwar VS, Cairo MS. The Natural Immune System. In: *The Neutrophil*. Abramson JS, Wheeler JG (eds.). IRL Press. 1993, pp 1–21.
2 McPhail LC, Harvath L. Natural Immune System. In: *The Neutrophil*. Abramson JS, Wheeler JG (eds.), IRL Press. 1993, pp 63–107.
3 Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995; **16:** 21–26.
4 Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 1992; **13:** 169–172.
5 Savill J, Haslett C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Sem Cell Biol* 1995; **6:** 385–393.
6 Girard D *et al*. Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils. *Blood* 1995; **86:** 1170–1176.
7 Girard D, Paquin R, Naccache PH, Beaulieu AD. Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. *J Leukoc Biol* 1996; **59:** 412–419.
8 Girard D, Paquin R, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: Induction of cytoskeletal rearrangements, *de novo* protein synthesis, and delay of apoptosis. *Biochem J* 1997; **325:** 147–153.
9 Girard D, Beaulieu AD. Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that γ_c expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; **83:** 264–271.
10 Girard D, Paquet ME, Paquin R, Beaulieu AD. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: Modulation of phagocytosis, cytoskeletal rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 1996; **88:** 3176–3184.
11 Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1993; **54:** 283–288.
12 Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML. Neutrophil superoxide release is required for spontaneous and FMLP-mediated but not for TNF-alpha-mediated apoptosis. *J Am Soc Neprhol* 1997; **8:** 1091–1100.
13 Isomaki P, Luukkainen R, Toivanen P, Punnonen J. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophage from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; **39:** 1693–1702.
14 McInnes IB, Liew FY. Interleukin-15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 1998; **19:** 75–79.
15 Cox G, Crossley J, Xing Z. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; **12:** 232–237.
16 Payne CM *et al*. Programmed cell death of the normal human neutrophil: an in vitro model of senescence. *Microscopy Research and Technique* 1994; **28:** 327–344.
17 Miller DJ, MacFarlane NG. Intracellular effects of free radicals and reactive oxygen species in cardiac muscle. *J Hum Hypertens* 1995; **9:** 465–473.
18 Gossart S *et al*. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-α production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol* 1996; **156:** 1540–1548.
19 Lippmann M. Airborn acidity: estimates of exposure and human health effects. *Environ Health Persper* 1985; **63:** 63–70.
20 IARC working group. Sulphur dioxide and some sulfites, bisulfites and metabisulfites. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human* 1992; **54:** 131–188.
21 Denisov IuN, Tkachev PG. Health aspects of sodium salts of sulfurous and sulfuric acids as environmental pollutants. *Gig Sanit* 1990; **9:** 11–13.
22 Beck-Speier I, Lenz A-G, Godleski JJ. Response of human neutrophils to sulfite. *J Toxicol Environ Health* 1994; **41:** 285–297.
23 Beck-Speier I, Liese JG, Belohradsky BH, Godleski JJ. Sulfite stimulates NADPH oxidase of human neutrophils to produce active oxygen radicals via protein kinase C and Ca^{2+}/calmodulin pathways. *Free Radic Biol Med* 1993; **14:** 661–668.
24 Naccache PH *et al*. Chemoattractant-induced cytoplasmic pH changes and cytoskeletal reorganization in human neutrophils. Relationship to the stimulated calcium transients and oxydative burst. *J Immunol* 1989; **142:** 2438–2444.
25 Whyte MKB, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 1993; **150:** 5124–5134.
26 Tithof PK, Watts S, Ganey PE. Protein tyrosine kinase involvement in the production of superoxide anion by neutrophils exposed to aroclor 1242, a mixture of polychlorinated biphenyls. *Biochem Pharmacol* 1997; **53:** 1833–1842.

2. Article # 2 : Activation of human neutrophils by the air pollutant sodium sulfite (Na_2SO_3) : Comparison with immature promyelocytic HL-60 and DMSO-differentiated HL-60 cells reveals that Na_2SO_3 is a neutrophil but not a HL-60 cell agonist

2.1 Résumé français de l'article #2

Activation des neutrophiles humains par le polluant atmosphérique sulfite de sodium (Na_2SO_3) : La comparaison avec les cellules immatures promyélocytiques HL-60 et les cellules HL-60 différenciées au DMSO indique que le Na_2SO_3 est un agoniste des neutrophiles, mais non des HL-60

Martin Pelletier, Anik Savoie et Denis Girard

Une exposition au sulfite peut induire une réponse inflammatoire caractérisée par une accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires pouvant mener à un mauvais fonctionnement des poumons. Les études axées sur les interactions entre le sulfite de sodium (Na_2SO_3) et les neutrophiles ont montré que ce composé chimique possède des propriétés pro-inflammatoires, de par sa capacité d'induire la flambée oxydative. La littérature est toutefois déficiente sur la possibilité que ce produit chimique puisse modifier d'autres réponses ou fonctions des neutrophiles et des cellules immatures promyélocytiques. Dans cette étude, nous démontrons que le Na_2SO_3 peut induire des événements de phosphorylation des résidus tyrosine chez les neutrophiles humains, mais pas chez les HL-60 et les HL-60 différenciées. Toutefois, les HL-60 et les HL-60 différenciées avaient la capacité de répondre, puisque le GM-CSF, utilisé comme contrôle positif, a induit la phosphorylation d'une protéine particulière de 120-130 kDa. De plus, nous démontrons que le Na_2SO_3 n'altère pas la phagocytose des neutrophiles et qu'il induit la libération de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, mais pas celle de TNF-α. Paradoxalement, nous avons trouvé que le Na_2SO_3 agit comme un inhibiteur potentiel de la synthèse protéique *de novo* des neutrophiles selon un modèle concentration-dépendante

(0.1, 1.0 et 10 mM), tel que déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide des cellules marquées métaboliquement avec de la [^{35}S]-méthionine et de la [^{35}S]-cystéine. Par opposition aux neutrophiles, nous avons trouvé que le Na_2SO_3 ne module pas la synthèse protéique *de novo* des HL-60 à de faibles concentrations (0.1 et 1.0 mM), mais qu'il est toxique à 10 mM, tel que déterminé par la diminution drastique du contenu protéique total coloré au bleu de Coomassie. Nous concluons que le Na_2SO_3 peut activer les neutrophiles humains, de par sa capacité d'augmenter la production d'IL-8. De plus, nos résultats indiquent clairement que les HL-60 et les HL-60 différenciées répondent différemment que les neutrophiles au Na_2SO_3. Il faut donc être prudent lors de l'extrapolation des données obtenues avec les HL-60 (et/ou les HL-60 différenciées) aux neutrophiles. Nos résultats obtenus avec le Na_2SO_3 en sont un exemple.

2.2 Article #2

Clinical Immunology
Vol. 96, No. 2, August, pp. 131–139, 2000
doi:10.1006/clim.2000.4883, available online at http://www.idealibrary.com on IDEAL®

Activation of Human Neutrophils by the Air Pollutant Sodium Sulfite (Na_2SO_3): Comparison with Immature Promyelocytic HL-60 and DMSO-Differentiated HL-60 Cells Reveals That Na_2SO_3 Is a Neutrophil but Not a HL-60 Cell Agonist

Martin Pelletier, Anik Savoie, and Denis Girard[1]

INRS-Institut Armand-Frappier/Santé Humaine, Université du Québec, Québec H9R 1G6, Canada

Sulfite exposure can induce inflammatory responses characterized by an influx of neutrophils into the airways leading to lung malfunctions. Studies focusing on sodium sulfite (Na_2SO_3)/neutrophil interactions have shown that this chemical possesses proinflammatory properties based on its ability to induce a respiratory burst. Information regarding how this chemical could alter other neutrophil responses/functions as well as its role on immature promyelocytic cells is currently lacking in the literature. In this study, we report that Na_2SO_3 can induce tyrosine phosphorylation events in human neutrophils but not in both HL-60 and HL-60 + DMSO. As a positive control, GM-CSF was found to induce tyrosine phosphorylation of a particular protein of 120–130 kDa in both HL-60 and HL-60 + DMSO cells testifying that these cells were responsive. In addition, we report that Na_2SO_3 does not alter neutrophil phagocytosis and that this chemical increases the release of the proinflammatory cytokine IL-8 but not TNF-α. Paradoxically, we found that Na_2SO_3 acts as a potent inhibitor of *de novo* neutrophil protein synthesis in a concentration-dependent fashion (0.1, 1, or 10 mM) as assessed by SDS–PAGE from metabolically [^{35}S]-labeled cells. In contrast to mature neutrophils, we found that Na_2SO_3 does not modulate *de novo* protein synthesis in HL-60 cells treated with low concentrations (0.1 or 1 mM) and that this pollutant was toxic at 10 mM as judged by a drastic decrease of total protein content stained with Coomassie blue. We conclude that Na_2SO_3 can activate human neutrophils and that its proinflammatory potential is further supported by its ability to increase IL-8 production. In addition, our results clearly indicate that HL-60 and HL-60 + DMSO respond differently than mature human neutrophils to the inflammatory pollutant Na_2SO_3. Extrapolation of data obtained with HL-60 (and/or HL-60 + DMSO) to neutrophils should be taken with caution. Our data obtained with Na_2SO_3 are an example. © 2000 Academic Press

Key Words: **Inflammation; air pollutant; tyrosine phosphorylation; *de novo* protein synthesis; interleukin-8.**

INTRODUCTION

The air pollutant sodium sulfite (Na_2SO_3)[2] was recently found to activate human neutrophils (1–5). This chemical induces H_2O_2 and superoxide (O_2^-) production (1–5) by itself and can prime neutrophils to respond to the bacterial tripeptide fMLP (4). It is believed that Na_2SO_3 activates the neutrophil NADPH oxidase to produce free radicals via protein kinase C and Ca^{2+}/calmodulin pathways (2). Production of free radicals from neutrophils is of major biological importance. On one hand, they act as potent anti-microbial agents important in host defense (6, 7). On the other hand, free radicals overproduction can contribute to tissue injuries and alter normal physiological function of various organs such as the lungs. Since an influx of neutrophils into the airways is a common feature observed during pulmonary inflammation induced by air pollutants, Na_2SO_3 should be considered an important risk factor that may contribute to human lung diseases (8–10). Although production of free radicals is thought to play an important role in the induction of neutrophil apoptosis (11), we found that although Na_2SO_3 is a potent activator of O_2^-, it did not modulate human neutrophil apoptosis *in vitro* (4). Moreover, we found that Na_2SO_3 cannot reverse the characterized delaying effect of GM-CSF on neutrophil apoptosis (4). More recently, it was found that sulfite can be released by LPS-induced human neutrophils *in vitro* and that *in vivo* injection of LPS into Wistar rats induces a marked increase of serum sulfite as assessed by reverse-phase HPLC (5).

[1] To whom correspondence should be addressed at INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, 245 boul Hymus, Pointe-Claire (QUE), Canada, H9R 1G6. Fax: (514) 630-8850. E-mail: Denis.Girard@INRS-Sante.Uquebec.ca.

[2] Abbreviations used: Na_2SO_3, sodium sulfite; GM-CSF, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; SRBC, sheep red blood cells.

1521-6616/00 $35.00
Copyright © 2000 by Academic Press
All rights of reproduction in any form reserved.

This suggests potential roles of sulfite as a mediator of inflammation.

Although data have been generated from studies dealing with interactions between Na_2SO_3/neutrophils, the role of this air pollutant on promyelocytic immature cells is currently unknown. However, it has been recently found that younger neutrophils released from the bone marrow following smoking treatments preferentially sequestered in pulmonary capillaries and that these immature cells may contribute to the alveolar wall damage associated with smoke-induced lung emphysema (11a).

Because it is still unknown whether Na_2SO_3 can alter other neutrophil responses/functions, and taking advantage of the fact that human promyelocytic HL-60 cells could be differentiated toward the more mature "neutrophil-like" cells by dimethylsulfoxide (DMSO), we decided to study the physiological responses of HL-60 as well as HL-60 + DMSO cells in response to treatment with the air pollutant Na_2SO_3 in comparison with fully mature human neutrophils. Our results bring new evidence that Na_2SO_3 is a neutrophil agonist that possesses proinflammatory properties other than the production of free radicals. In addition, the results of this study clearly indicate that HL-60 and HL-60 + DMSO respond differently than mature human neutrophils to chemical treatment such as Na_2SO_3.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and agonists. Na_2SO_3 (freshly prepared) was purchased from Sigma. Since optimal effects of Na_2SO_3 on human neutrophils *in vitro* were observed at 1 mM (1–3) and because we are interested in answering whether Na_2SO_3 can modulate cell physiology *in vitro,* we decided to use Na_2SO_3 at concentrations of 0.1 (10 times less), 1, and 10 (10 times greater) mM. Recombinant human GM-CSF (specific activity of 9×10^6 U/mg) was a gift from the Genetics Institute (Boston, MA). This latter cytokine was used at 65 ng/ml as previously published (12–16).

Neutrophil isolation and HL-60 cell culture. Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by centrifugation over Ficoll–Hypaque (Pharmacia Biotech Inc, Québec), as described previously (12–16). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability (>99%) was monitored by trypan blue exclusion and the purity (>98%) was verified by cytology from cytospin preparations colored by Diff-Quick staining (14). HL-60 cells (ATCC) were cultivated at a concentration of $<1 \times 10^6$ cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and antibiotics. For differentiation toward the neutrophil-like phenotype, 1.25% (v/v) DMSO (17, 18) was added to the culture for 5 days and the efficiency of the differentiation was evaluated by the NBT (Sigma, St. Louis, MO) dye reduction (blue–black formazan deposits). Experiments were conducted with >75% of differentiation. Under these conditions, HL-60 cells can almost double their population after 24 h.

Tyrosine phosphorylation. HL-60 or neutrophil cells (100 μl of 40×10^6 cells/ml) were incubated during 1, 5, 15, or 30 min at 37°C with buffer alone, GM-CSF (65 ng/ml), or increasing concentrations of Na_2SO_3 (0.1, 1.0, 10 mM), in a final volume of 120 μl. Under these conditions, we did not observe any apoptotic or necrotic cells as assessed by cytology. Reactions were stopped by the addition of 120 μl of a 2× Laemmli's sample buffer as previously described (16). Aliquots corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS–PAGE and transferred from the gel to PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA) according to Towbin *et al.* (19). Protein loading was verified by staining with Ponceau Red before immunoblotting was performed. Nonspecific sites were blocked with 2% gelatin in TBS–Tween (25 mM Tris–HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween 20) for 1 h at 37°C. The monoclonal anti-phosphotyrosine UB 05-321 (1:5000) was incubated with membranes for 1 h at 37°C, followed by washes, and incubated with a horseradish-peroxidase-labeled sheep anti-mouse IgG (1:15000) (Bio/Can for 1 h at 37°C in fresh blocking solution). Membranes were washed three times with TBS–Tween, and phosphotyrosine bands were revealed with the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system (Amersham, Pharmacia Biotech Inc.).

Phagocytosis of sheep erythrocytes. Sheep red blood cells (SRBC) were opsonized with a final 1/200 dilution of rabbit IgG anti-SRBC antibody (Sigma) by an incubation of 45 min at 37°C as previously described (14, 15). Neutrophils (2.5×10^6 cells) pretreated 30 min with buffer, IL-4 (10 ng/ml), or 10 mM Na_2SO_3 were incubated with 50×10^6 opsonized sheep erythrocytes for 45 min as above. The samples were centrifuged 200*g* at 4°C for 10 min. Supernatants were discarded and an osmotic shock was performed on the pellets by treating them with 500 μl H_2O for 15 s followed immediately with the addition of 10 ml of ice-cold HBSS. The samples were washed twice with ice-cold HBSS and the final pellets were suspended in 1 ml HBSS. Duplicate cytocentrifuge preparations were prepared in aliquots of ~200 μl and processed as previously published (14, 15). Phagocytosis was measured as the percentage of neutrophils ingesting at least one opsonized sheep erythocyte. IL-4 was used herein as a positive control (14, 15).

Production of cytokines. Cytokine production was measured in freshly isolated neutrophils (10×10^6 cells/ml) stimulated with buffer (RPMI 1640 supple-

mented with 5% FCS), GM-CSF, or Na_2SO_3 at concentrations of 0.1, 1, or 10 mM) for 24 h. Release of cytokines into supernatants was determined using commercially available ELISA kits for IL-8 and TNF-α (R&D Systems) according to the manufacturer's instruction with a sensitivity of <10 and 4.4 pg/ml for IL-8 and TNF-α, respectively. All assays were performed at least in duplicate.

Metabolic labeling and de novo protein synthesis assay. Cells (10×10^6 cells/ml) were metabolically labeled with 125 μCi of the Redivue Pro-Mix L-[^{35}S] *in vitro* cell labeling mix (Amersham Biopharmacia) in the presence or absence of GM-CSF or Na_2SO_3, as indicated in the figure legends, for 24 h as previously published (13–15). Cell lysates were prepared and one-dimensional SDS–PAGE was performed. Equivalent volumes of cell lysates were loaded in each lane in order to compare appropriately *de novo* protein synthesis and to consider possible cytotoxic effects of the chemical revealed by a decrease in protein content (13–15). After electrophoresis, gels were stained with Coomassie blue (this allows us to verify equivalent loading), dried, and exposed with Kodak film X OMAT-RA at −80°C for 1–3 days.

RESULTS

Na_2SO_3 induces tyrosine phosphorylation in mature human neutrophils. Results shown in Fig. 1 illustrate that Na_2SO_3 increases tyrosine phosphorylation levels of different proteins (regions I, II, and III) that comigrate with those induced by GM-CSF. However, one distinction between GM-CSF and Na_2SO_3 is that this latter activates a particular protein of an apparent molecular weight of 60 kDa (bottom band of the doublet, region III).

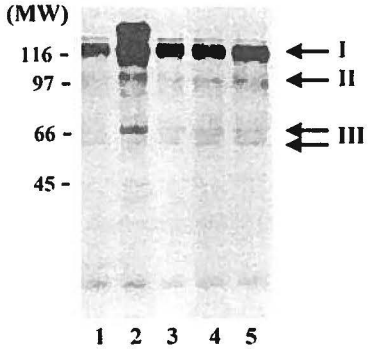


FIG. 1. Na_2SO_3 induces tyrosine phosphorylation in human neutrophils. Cells (100 μl of 40×10^6 cells/ml) were incubated in the presence of buffer (lane 1), 65 ng/ml GM-CSF (lane 2), or increasing concentrations of 0.1, 1.0, or 10 mM Na_2SO_3 (lanes 3, 4, and 5, respectively) for 30 min and phosphotyrosine protein levels were visualized as described under Materials and Methods. Results are from one representative experiment of five. Regions of interest are designated I, II, and III. Molecular weight (MW) standards are illustrated on the left.

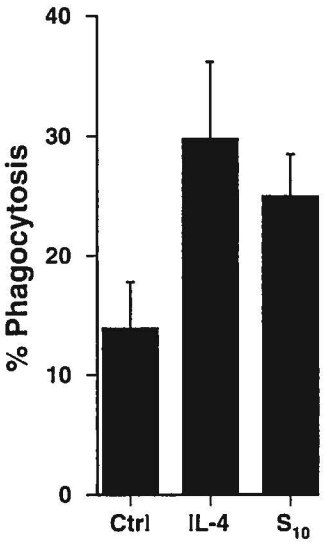


FIG. 2. Na_2SO_3 does not alter the neutrophil phagocytosis of opsonized sheep red blood cells. Phagocytosis was evaluated by ingestion of opsonized SRBC by neutrophils pretreated 15 min with buffer (Ctrl); 10 ng/ml IL-4 used as a positive control (14); or 10 mM Na_2SO_3 (S_{10}) as described under Materials and Methods. Results are expressed as the percentage of phagocytosis (cells that ingested at least one opsonized SRBC/number of cell counted × 100) and are means ± SEM (n = 3).

Effect of Na_2SO_3 on neutrophil phagocytosis. Under our conditions, we found that the percentage of neutrophils that can ingest at least one opsonized SRBC was 14 ± 3.9 (mean ± SEM, n = 3), 25 ± 3.5, and 30 ± 6.4% for neutrophils treated with buffer, 10 mM Na_2SO_3, or 10 ng/ml IL-4, respectively (Fig. 2).

Na_2SO_3 is a potent activator of neutrophil IL-8 production. As illustrated in Fig. 3, Na_2SO_3 can induce the production of the proinflammatory cytokine IL-8 but not TNF-α. Incubation of cells for 24 h with buffer, GM-CSF (65 ng/ml), or increasing concentrations of 0.1, 1, or 10 mM Na_2SO_3 stimulate the production of IL-8 whereas the production of TNF-α was under 5 pg/ml for all treatments (we have increased the TNF-α production to 20 in Fig. 3 simply for clarity). Note that the production of TNF-α in LPS-induced peripheral blood mononuclear cells was about 400 pg/ml (data not shown).

Na_2SO_3 inhibits de novo protein synthesis of human neutrophils in a concentration-dependent fashion. The results of Fig. 4 illustrate that the level of newly synthesized polypeptide is inhibited by Na_2SO_3 in a concentration-dependent fashion whereas GM-CSF, as expected, induces *de novo* protein synthesis. As previously documented by us and others, the concentrations

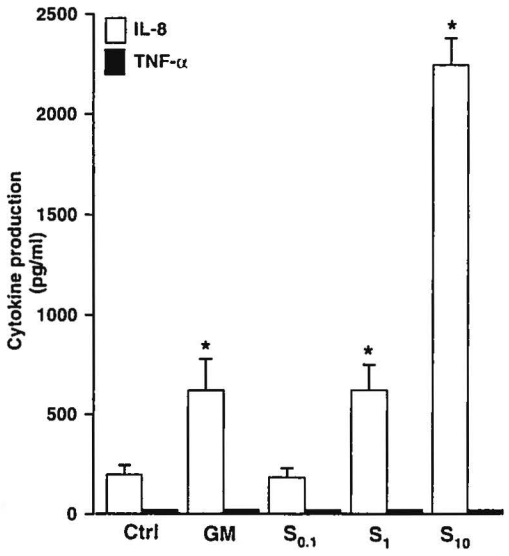


FIG. 3. Na_2SO_3 induces the production of the proinflammatory cytokine IL-8 by neutrophils in a concentration-dependent fashion but not TNF-α. Freshly isolated neutrophils (10×10^6 cells/ml) were incubated for 24 h in the presence of buffer (ctrl), 65 ng/ml GM-CSF (GM), or increasing concentrations of 0.1 ($S_{0.1}$), 1 (S_1), or 10 (S_{10}) mM Na_2SO_3 and corresponding supernatants were collected and used for quantifying the cytokines by ELISA. Results are means ± SEM (n = 6). *, $P < 0.05$ by Student's t test.

used were not toxic for mature human neutrophils (1, 4, and Fig. 6). The inhibition of *de novo* protein synthesis observed in the autoradiogram (Fig. 4, right side, designated "^{35}S") could not be related to cell loading. As illustrated in the corresponding Coomassie blue stained gel, a relatively equal number of cell/equivalent volume of cell lysate loaded can be observed. Note that although there is no apparent newly synthesized polypeptide detected in the autoradiogram (lane 5, on the right, designated "^{35}S"), numerous proteins were colored by the Commasie blue staining procedure.

Cytotoxicity of Na_2SO_3. We have previously documented that Na_2SO_3 is a neutrophil agonist at concentrations of 0.1, 1.0, or 10 mM without being cytotoxic for up to a 24-h incubation period (4). In this study, we determine whether this contaminant could be cytotoxic for HL-60 as wells as HL-60 + DMSO cells in comparison with human neutrophils (Fig. 5). As illustrated in Fig. 6, the percentage of mortality remains stable after 4, 12, or 24 h of incubation when HL-60 or human neutrophil cells were incubated with or without 0.1 or 1.0 mM Na_2SO_3 (numbers vary from 3.0 ± 2.2 through 9.9 ± 5.8, mean ± SEM, n = 3). However, Fig. 6 also illustrates that the highest concentration of 10 mM Na_2SO_3 was cytotoxic to HL-60 cells after 12 and 24 h of incubation and results were statistically significant (40.3 ± 9.7 vs 6.2 ± 3.9 and 91.9 ± 7.2 vs 6.4 ± 4.7, respectively (n = 3)). A slight increase of the percentage of mortality was observed in HL-60 + DMSO cells during the 24-h incubation but results ranging from 10.5 ± 4.5 through 36.9 ± 6.9 (n = 3) were not significantly different from controls. As expected (4), mature human neutrophils were very tolerant to such a chemical treatment as the percentage of mortality never exceeded 9% (Fig. 6C). Only the concentration of 10 mM Na_2SO_3 altered the capability of HL-60 cells to double their population after 24 h. Control cell numbers were 1.15 ± 0.07, 1.35 ± 0.25, and 1.92 ± 0.14 after 4, 12, or 24 h, respectively, whereas HL-60 cell numbers treated with 10 mM Na_2SO_3 were 1.16 ± 0.02, 1.21 ± 0.17, or 1.32 ± 0.08, after 4, 12, or 24 h, respectively (Fig. 7A).

In these experiments, we used a cell concentration of ~1×10^6 cells/ml at the starting point. Because apoptosis can occur when HL-60 cells are cultivated at a concentration above 1×10^6 cells/ml, we were interested in determining whether Na_2SO_3 is cytotoxic (necrosis). Because of this, our results are expressed as the number of viable cells including those in apoptosis, if any. The effect of DMSO in inducing the maturation of HL-60 cells toward the nondividing neutrophil phenotype is shown in Fig. 7B where it can be seen that the cell population remains stable during the 24-h incubation even if cells were incubated in the presence or absence of increasing concentrations of Na_2SO_3.

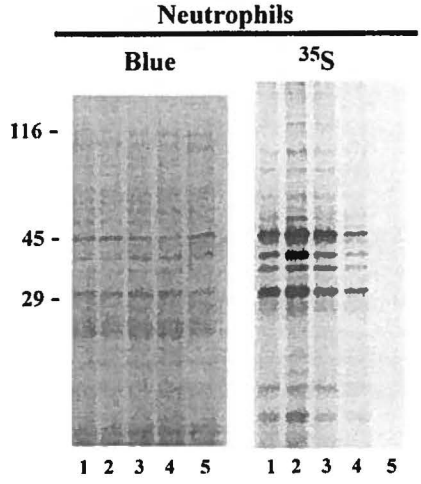


FIG. 4. Na_2SO_3 is a potent inhibitor of *de novo* protein synthesis in human neutrophils. Freshly isolated human neutrophils were metabolically labeled using Redivue Pro-Mix L-[^{35}S] *in vitro* cell labeling mix for 24 h as described under Materials and Methods. Total protein content was revealed by Coomassie blue staining of gels (blue) while newly synthesized polypeptides are shown in corresponding autoradiograms (^{35}S). Lanes 1, 2, 3, 4, and 5 were loaded with an equivalent number of cells incubated with buffer, 65 ng/ml GM-CSF, or 0.1, 1.0, or 10 mM Na_2SO_3, respectively. Results are from one representative experiment of seven.

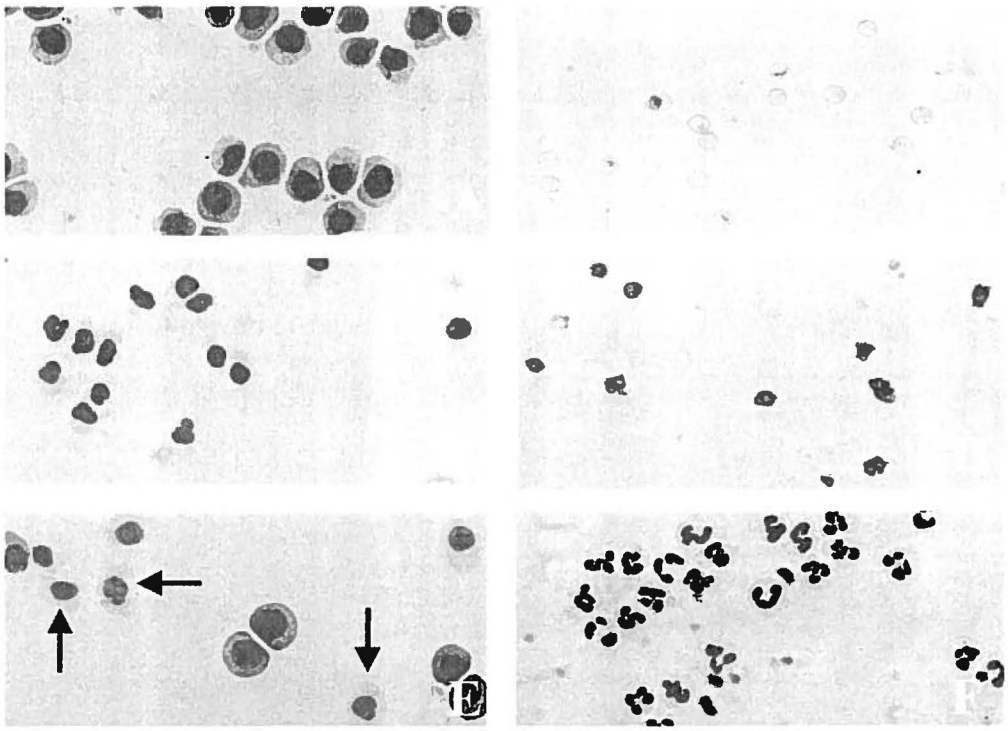


FIG. 5. Evaluation of the differentiation induced by DMSO. HL-60 cells (A) were cultivated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS as described under Materials and Methods and were differentiated toward "neutrophil-like" phenotype by addition of 1.25% (v/v) DMSO for 5 days (C). Efficiency of the differentiation was evaluated by NBT dye reduction. Blue–black formazan deposits can be observed in HL-60 + DMSO (D) but not in undifferentiated HL-60 cells (B). E illustrates a mixture of HL-60 (big cells) and HL-60 + DMSO cells (arrows) to more clearly observed differences between these cells. For comparison, freshly isolated human neutrophils are shown in F. All images are scans from photomicrographs observed by optical microscopy at 400× and those shown in A, C, E, and F are cytospin preparations colored with Diff-Quick staining kit as described under Materials and Methods.

Na_2SO_3 does not induce tyrosine phosphorylation in both HL-60 and HL-60 + DMSO cells. As shown in Fig. 8, Na_2SO_3 does not induce tyrosine phosphorylation in both HL-60 and HL-60 + DMSO cells. Experiments were conducted in parallel with human neutrophils and, again, Na_2SO_3 was found to activate this response in a concentration-dependent fashion excluding the possibility that the sulfite preparation was inadequate. In addition, as expected (20), we observed one particular protein of about 120–130 kDa that was induced by GM-CSF in both HL-60 and HL-60 + DMSO cells.

Na_2SO_3 and de novo HL-60 cell protein synthesis. As illustrated in Fig. 9, cells treated with buffer, GM-CSF, or 0.1 or 1.0 mM Na_2SO_3 have synthesized new polypeptides. Results obtained with the more mature HL-60 + DMSO cells were similar to those of HL-60 cells except that they were slightly more responsive to GM-CSF vs HL-60 cells. In contrast, when cells were treated with 10 mM Na_2SO_3, almost no polypeptides were visible (few polypeptides could be observed when gels were overexposed). This marked down-regulation could be explained by the cytotoxic effect of 10 mM Na_2SO_3 as revealed by a drastic reduction of total protein content visualized by the Coomassie blue staining (Fig. 9) and results from Figs. 7 and 8.

DISCUSSION

We decided to study the interaction between the air pollutant Na_2SO_3 and human neutrophils more in depth and to verify whether this chemical can also modulate immature phagocyte functions/responses considering the involvement of neutrophils during air-pollutant-induced pulmonary inflammation. Our results demonstrate that Na_2SO_3 is a more important neutrophil agonist than previously thought and that immature HL-60 and the more mature HL-60 + DMSO cells respond differently than mature neutrophils. We found that Na_2SO_3 (i) induces tyrosine phosphorylation events in human neutrophils but not in both HL-60 and HL-60 + DMSO cells; (ii) does not alter the neutrophil phagocytosis function; (iii) induces the neutrophil production of IL-8 but not TNF-α; (iv) inhibits *de novo* neutrophil protein synthesis but not that of HL-60 and HL-60 + DMSO cells; and (v) exerts a

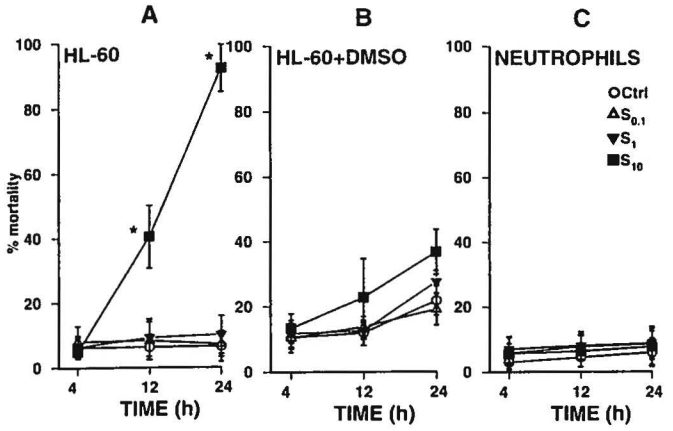


FIG. 6. HL-60 cells are less tolerant to a Na_2SO_3 chemical treatment than human neutrophils. A, Undifferentiated HL-60 cells; B, 5-day DMSO-differentiated HL-60 cells (HL-60 + DMSO); or C, freshly isolated human neutrophils were incubated (1×10^6 cells/ml) in the presence or absence of increasing concentrations of Na_2SO_3 for 24 h and the cytotoxicity was evaluated by trypan blue exclusion at the indicated time points. Results are means ± SEM ($n = 3$) and are expressed as a percentage of mortality. *, $P < 0.05$ by Student's t test. Ctrl, control cells; $S_{0.1}$, S_1, and S_{10}, cells incubated with 0.1, 1, or 10 mM Na_2SO_3, respectively.

certain toxicity in HL-60 and HL-60 + DMSO cells but not in human neutrophils under the tested conditions.

Signal transduction events induced by chemicals of environmental concern are not well understood and such studies conducted with human neutrophil cells are limited. In view of the potential importance of tyrosine phosphorylation in the regulation of various cells functions, we decided to determine whether Na_2SO_3 could induce such an activity in mature human neutrophils, HL-60, and HL-60 + DMSO cells. Our results allowed us to conclude that Na_2SO_3 induces signal transduction in mature human neutrophils by increasing the level of a set of tyrosine phosphorylated proteins denoted regions I (~120 kDa), II (~90 kDa), and III (~60 kDa) in Fig. 1. Although the identification of these proteins is yet unknown, it is of interest to note that the pattern of tyrosine phosphorylated proteins induced by Na_2SO_3 is similar to the pattern induced by the GM-CSF cytokine, a well-described neutrophil agonist. One protein appears unique to Na_2SO_3 (see bottom band in region III, Fig. 1). Tyrosine phosphorylation events are known to regulate granulocyte apoptosis (21, 22) as well as GM-CSF-induced suppression of neutrophil apoptosis (22). In particular, lyn kinase was found to be critical for the delaying effect of GM-CSF on neutrophil apoptosis (23). We have previously documented that Na_2SO_3 does not alter both spontaneous and GM-CSF-induced suppression of neutrophils apoptosis (4). This raises the question of what is the ultimate functional necessity for Na_2SO_3 to activate tyrosine kinases. This is yet unknown and identification of these proteins remains to be determined. Unlike mature neutrophils, Na_2SO_3 does not induce tyrosine phosphorylation events in both HL-60 and HL-60 + DMSO cells. This is not due to an unresponsive state of cells since, as expected, GM-CSF was found to induce a particular protein of 120–130 kDa (20). Tyrosine phosphorylation of this band was more pronounced in the more mature HL-60 + DMSO cells and remained of greater intensity after 30 min when compared with HL-60 cells. It is tempting to speculate that this could be related to an increased expression of GM-CSF receptors on the HL-60 cell surface after their differentiation by DMSO toward the neutrophil phenotype, but this has previously been shown not to be the case (20). Whether this protein is the same in HL-60, HL-60 + DMSO, and human neutrophils remains to be determined. Our results are intriguing since they raised the possibility that a chemical of environmental concern such as the air pollutant Na_2SO_3 can mediate signal transduction events like a cytokine, GM-CSF, known to mediate biological activities via a specific cell surface receptor (20). In preliminary experiments, we found that Na_2SO_3 can also induce the production of IL-8 by both HL-60 and HL-60 + DMSO cells (data not shown). This suggests that Na_2SO_3 can stimulate the release of an existing pool of IL-8. This remained to be determined.

Neutrophils play a major role in protection against infection, and defects in one of several neutrophils functions including phagocytosis are accompanied by

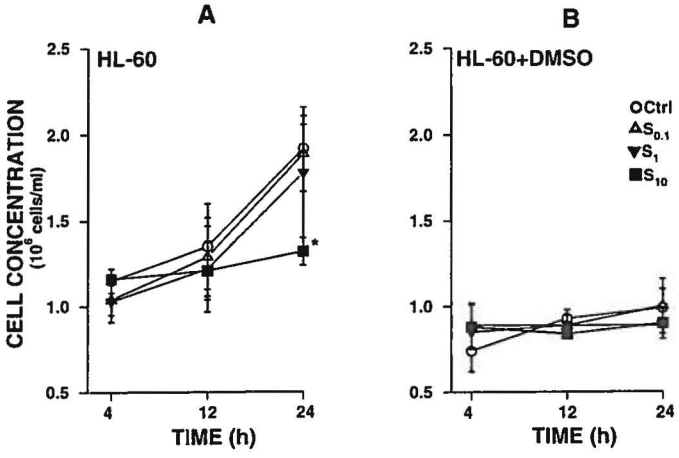


FIG. 7. Na_2SO_3 reduces the capability of HL-60 cells to double their population. Undifferentiated HL-60 cells (A) and 5-day DMSO-differentiated HL-60 cells (B) were incubated as described in the legend to Fig. 6 and the numbers of viable cells were evaluated after 4, 12, and 24 h of incubation. Ctrl, control cells; $S_{0.1}$, S_1, and S_{10}, are cells incubated with 0.1, 1, or 10 mM Na_2SO_3, respectively. Note that cell counts obtained from 5-day DMSO-differentiated HL-60 cells (HL-60 + DMSO) remain stable indicating that cells have acquired their "neutrophil-like" phenotype of nondividing cells. Cell counts are means ± SEM ($n = 3$). *$P < 0.05$ by Student's t test.

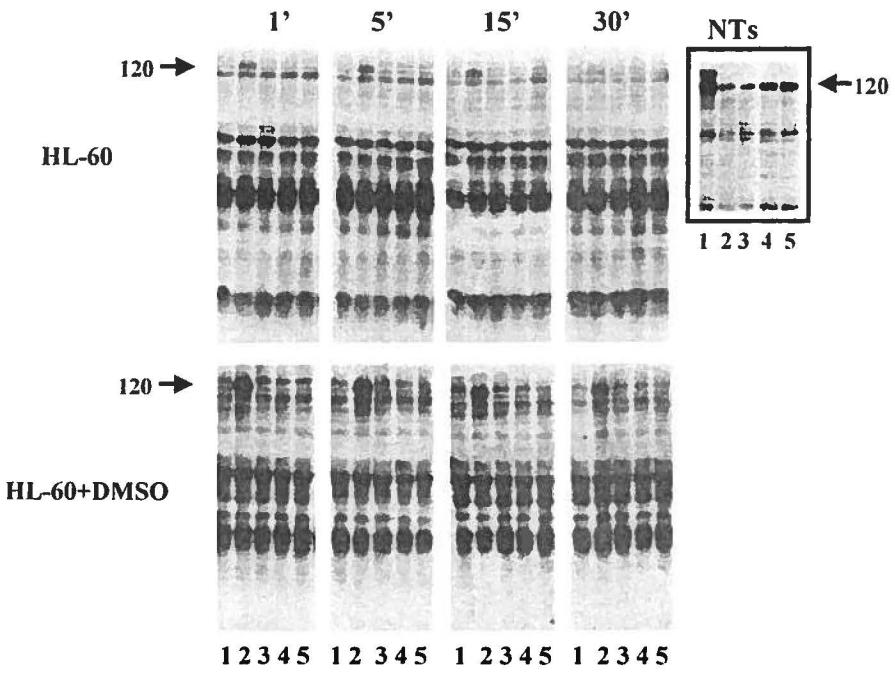


FIG. 8. Na_2SO_3 does not induce tyrosine phosphorylation events in HL-60 cells. Cells (100 μl of 40 $\times$ 10^6 cells/ml) were incubated in the presence of buffer (lane 1), 65 ng/ml GM-CSF (lane 2), or increasing concentrations of 0.1, 1.0, or 10 mM Na_2SO_3 (lanes 3, 4, and 5, respectively) for 1, 5, 15, or 30 min and phosphotyrosine protein levels were visualized as described under Materials and Methods. Results are from one representative experiment of three. Freshly isolated human neutrophils (NTs) were used as positive controls in parallel (inset) essentially as described in the legend to Fig. 1.

chronic or recurrent infection. Before our study, it was not clear whether Na_2SO_3 could alter other neutrophil responses/functions than the generation of free radicals and apoptosis. Our results indicate that Na_2SO_3 does not decrease the neutrophil capacity to phagocytosis opsonized SRBCs and such an observation, in addition with our other data, testifies that this chemical is not toxic for human neutrophils under the conditions used. Although it was previously reported that Na_2SO_3 is a proinflammatory agent based on its ability to induce a respiratory burst, our present study allow us to better characterized this pollutant as a proinflammatory product since it strongly increases the production of the proinflammatory chemokine IL-8. In regard to the production of cytokines by Na_2SO_3-induced neutrophils, our results indicate that a certain selectivity exists since the level of TNF-α production remained stable during all Na_2SO_3 treatments.

Although human neutrophils are terminally differentiated nondividing cells, they are known to synthesize various different proteins (13–16, 24, 25). Here we report, for the first time, that a neutrophil agonist known to activate these cells (oxidative burst (1–5), tyrosine phosphorylation (this report), production of IL-8 (this report)) does not induce *de novo* protein synthesis. In contrast, we found that this chemical inhibits this important biological function in a concentration-dependent fashion without being toxic. We have also studied how Na_2SO_3 can alter *de novo* protein synthesis of both HL-60 and HL-60 + DMSO cells and found a certain toxicity of the contaminant. This was reflected by the inability of HL-60 cells to double their population after 24 h as well as an increased number of dead cells. The more mature HL-60 + DMSO differentiated cells appear to be more tolerant to such a chemical treatment. The down-regulation of *de novo* protein synthesis observed with the highest concentration of 10 mM could be due to the cytotoxic effects rather than an inhibition as shown in fully mature human neutrophils (Fig. 4). A drastic decrease of the total protein content loaded on gels (Coomassie blue) is also in agreement with a toxic effect of the pollutant. Although HL-60 + DMSO cells appear to be slightly more tolerant than parental HL-60 cells to the 10 mM Na_2SO_3 treatment, they do not respond like mature neutrophils. It was recently proposed that Na_2SO_3 could be metabolized by human neutrophils by two alternative pathways, one enzymatic route dependent on sulfite oxidase and one nonenzymatic route involving intermediate formation of sulfur trioxide anion radicals (26). The activity of this enzyme in human neutrophils was reported to vary greatly among individuals (26). This latter observation could explain why neutrophils were previously believed to be devoid of

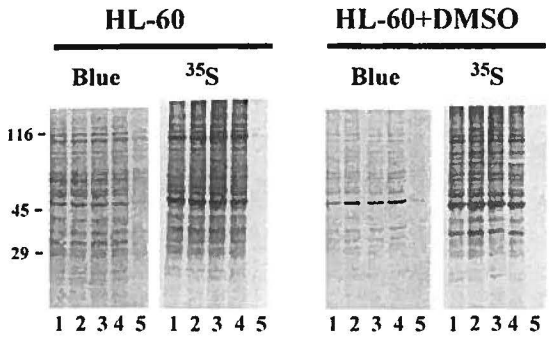


FIG. 9. Effect of Na_2SO_3 on de novo HL-60 cell protein synthesis. HL-60 and HL-60 + DMSO cells were metabolically labeled using Redivue Pro-Mix L-[^{35}S] *in vitro* cell labeling mix for 24 h as described in the legend to Fig. 4. Lanes 1, 2, 3, 4, and 5 are cells incubated with buffer, 65 ng/ml GM-CSF, or 0.1, 1.0, or 10 mM Na_2SO_3, respectively. The total protein content in both HL-60 and HL-60 + DMSO treated with 10 mM Na_2SO_3 (blue, lane 5) is strongly decreased. Results are from one representative experiment of four.

this enzyme which detoxifies sulfite. This enzyme is of importance since genetic deficiency of sulfite oxidase results in neurological abnormalities and often leads to death at an early age (26, 27). Our results argue against a strong activity of this enzyme in HL-60 cells but raised the possibility that HL-60 cells acquire this enzymatic activity as they differentiated toward the more mature neutrophil phenotype induced by DMSO. This remains to be determined.

We have paid close attention in selecting well-differentiated HL-60 cells toward the neutrophil-like phenotype induced by DMSO throughout this study in order to compare the effect of Na_2SO_3 with mature human neutrophils. We were interested in determining whether we can use HL-60 + DMSO in replacement of human neutrophils, preventing daily isolation of these granulocytes, for screening experiments conducted with various other environmental contaminants. Based on our results, we conclude that we cannot. We encourage the performance of experiments with mature neutrophils in parallel with both HL-60 and HL-60 + DMSO cells.

In our present study, we conclude that Na_2SO_3 can be designated a neutrophil agonist with proinflammatory properties. These data can be added to the growing evidence that human neutrophils are targets for this proinflammatory air pollutant (1–5). In addition, we also conclude that, at least for Na_2SO_3, HL-60 cells are not necessarily an excellent model of neutrophil-like cells. In this sense, they cannot be used in replacement of the fully mature human neutrophils for studying cell physiology in response to chemicals of environmental concern. We suggest the use of them in parallel.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Annie Couture and Pierrette Labbé for technical help and Dr. Kenneth Finnson for the reading of the manuscript. This study was partly supported by Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). DG is a Scholar from FRSQ, MP holds a M.Sc FCAR-FRSQ Santé award, and AS holds a M.Sc. Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada award.

REFERENCES

1. Beck-Speier, I., Lenz, A. G., and Godleski, J. J., Responses of human neutrophils to sulfite. *J. Toxicol. Environ. Health* **41,** 2852–2897, 1994.
2. Beck-Speier, I., Liese, J. G., Belohradsky, B. H., and Godleski, J. J., Sulfite stimulates NADPH oxidase of human neutrophils to produce active oxygen radicals via protein kinase C and Ca^{2+} calmodulin pathways. *Free Radic. Biol. Med.* **14,** 661–668, 1993.
3. Mishra, A., Dayal, N., and Beck-Speier, I., Effect of sulphite on the oxidative metabolism of human neutrophils: Studies with lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence. *J. Biolumin. Chemilumin.* **10,** 9–19, 1995.
4. Labbé, P., Pelletier, M., Omara, F. O., and Girard, D., Functional responses of human neutrophils to sodium sulfite (Na_2SO_3) in vitro. *Hum. Exp. Toxicol.* **17,** 600–605, 1998.
5. Mitsuhashi, H., Nojima, Y., Tanaka, T., Ueki, K., Maezawa, A., Yano, S., and Naruse, T., Sulfite is released by human neutrophils in response to stimulation with lipopolysaccharide. *J. Leukocyte Biol.* **64,** 595–599, 1998.
6. Miller, R. A., and Britigan, B. E., Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **10,** 1–18, 1997.
7. Babior, B. M., Superoxide: A two-edged sword. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30,** 141–155, 1997.
8. Weiss, S. J., Superoxide: A two-edged sword. *N. Engl. J. Med.* **320,** 365–376, 1989.
9. Ginsburg, I., and Kohen, R., Cell damage in inflammatory and infectious sites might involve a coordinated "cross-talk" among oxidants, microbial haemolysins and ampiphiles, cationic proteins, phospholipases, fatty acids, proteinases and cytokines (an overview). *Free Radic. Res.* **22,** 489–517, 1995.
10. Ricevuti, G., Host tissue damage by phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **832,** 426–448, 1997.
11. Rollet-Labelle, E., Grange, M. J., Elbim, C., Marquetty, C., Gougerot-Pocidalo, M. A., and Pasquier, C., Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **24,** 563–572, 1998.

11a. Terashima, T., Klut, M. E., English, D., Hards, J., Hogg, J. C., and van Eeden, S. F., Cigarette smoking causes sequestration of polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow in lung microvessels. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20,** 171–177, 1999.

12. Girard, D., and Beaulieu, A. D., Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that gamma(c) expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **83,** 264–271, 1997.
13. Girard, D., Gosselin, J., Heitz, D., Paquin, R., and Beaulieu, A. D., Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils. *Blood* **86,** 1170–1176, 1995.
14. Girard, D., Paquet, M. E., Paquin, R., and Beaulieu, A. D., Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: Modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* **88,** 3176–3184, 1996.

15. Girard, D., Paquin, R., and Beaulieu, A. D., Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: Induction of cytoskeletal rearrangements, *de novo* protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem. J.* **325,** 147–153, 1997.
16. Girard, D., Paquin, R., Naccache, P. H., and Beaulieu, A. D., Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. *J. Leukocyte Biol.* **59,** 412–419, 1996.
17. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., and Gallo, R. C., Terminal differentiation of human romyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75,** 2458–2562, 1978.
18. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., and Gallo, R. C., Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. Exp. Med.* **149,** 969–974, 1979.
19. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 4350–4354, 1979.
20. Roberts, P. J., Khwaja, A., Lie, A. K., Bybee, A., Yong, K., Thomas, N. S., and Linch, D. C., Differentiation-linked changes in tyrosine phosphorylation, functional activity, and gene expression downstream from the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood* **84,** 1064–1073, 1994.
21. Yousefi, S., Blaser, K., and Simon, H. U., Activation of signaling pathways and prevention of apoptosis by cytokines in eosinophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112,** 9–12, 1997.
22. Yousefi, S., Green, D. R., Blaser, K., and Simon, H. U., Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91,** 10868–10872, 1994.
23. Wei, S., Liu, J. H., Epling-Burnette, P. K., Gamero, A. M., Ussery, D., Pearson, E. W., Elkabani, M. E., Diaz, J. I., and Djeu, J. Y., Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* **157,** 5155–5162, 1996.
24. Cassatella, M. A., The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* **16,** 21–26, 1995.
25. Meda, L., Gasperini, S., Ceska, M., and Cassatella, M. A., Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon. *Cell. Immunol.* **157,** 448–454, 1994.
26. Constantin, D., Mehrotra, K., Jernstrom, B., Tomasi, A., and Moldeus, P., Alternative pathways of sulfite oxidation in human polymorphonuclear leukocytes. *Pharmacol. Toxicol.* **74,** 136–140, 1994.
27. Garrett, R. M., Johnson, J. L., Graf, T. N., Feigenbaum, A., and Rajagopalan, K. V., Human sulfite oxidase R160Q: Identification of the mutation in a sulfite oxidase-deficient patient and expression and characterization of the mutant enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95,** 6394–6398, 1998.
28. Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W. A., Garrett, R. M., Rajagopalan, K. V., Enemark, J. H., and Rees, D. C., Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* **91,** 973–983, 1997.

Received December 15, 1999; accepted with revision April 18, 2000

3. Article # 3 : Activation of human neutrophils *in vitro* and induction of neutrophilic inflammation *in vivo* by dieldrin

3.1 Résumé français de l'article #3

Activation des neutrophiles humains *in vitro* et induction d'un influx de neutrophiles *in vivo* par le dieldrine

Martin Pelletier, Charles J. Roberge, Marc Gauthier, Karen Vandal, Philippe A. Tessier et Denis Girard

Un nombre croissant de contaminants environnementaux sont connus pour modifier le système immunitaire. Une diminution des fonctions des phagocytes, principalement de la lignée des monocytes/macrophages, a été observée chez des animaux traités avec ces molécules chimiques. Dans cette étude, nous démontrons que le dieldrine, un insecticide organochloré, n'altère pas la capacité des neutrophiles à phagocyter des globules rouges de mouton à des concentrations non cytotoxiques. Inversement, nous avons trouvé que le dieldrine augmente la production de superoxyde (O_2^-), la synthèse d'ARN (comme déterminé par l'incorporation de [^{3}H]-uridine) et la production de l'interleukine-8 (IL-8), une cytokine pro-inflammatoire. Le niveau d'apoptose n'était pas altéré par le dieldrine et ceci était en corrélation avec l'impossibilité d'inhiber l'étalement des neutrophiles sur le verre. Par la suite, la production d'O_2^- induite par le dieldrine et le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ont été comparée. Lorsque les cellules étaient pré-incubées avec des inhibiteurs de certaines voies de signalisation, nous avons trouvé que l'induction d'O_2^- par le dieldrine était significativement réduite par la génistéine, le H-7, le HA-1077, la staurosporine et le calphostin C alors que celle induite par le PMA était réduite significativement par le H-7, le HA-1077 et la staurosporine. Ceci indique que le dieldrine induit ces effets par les protéines kinases C et les tyrosines kinases. En utilisant le modèle inflammatoire murin de la poche d'air, nous avons trouvé que le dieldrine induit une infiltration de neutrophiles. À notre connaissance, ceci est la première étude

déterminant que le dieldrine est un agoniste des neutrophiles humains et qu'un tel composé chimique peut induire une réponse inflammatoire *in vivo*.

3.2 Article #3

Activation of human neutrophils *in vitro* and induction of neutrophilic inflammation *in vivo* by dieldrin.

Martin Pelletier[1], Charles J. Roberge[2], Marc Gauthier[1], Karen Vandal[3], Philippe A. Tessier[3], and Denis Girard[1*]

From [1]INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, Université du Québec, [2]Association du Cancer de l'Est du Québec (ACEQ), [3]Centre de Recherche en Infectiologie, CHUQ, Pavillon CHUL, Université Laval, PQ, Canada.

Key words: Inflammation, pollutants, organochloride, O_2^- production, IL-8, murine air pouch

Running title: Interaction between dieldrin and neutrophils

[*]Corresponding author: Denis Girard, PhD
INRS-Institut Aramand-Frappier/Santé Humaine
245 boul Hymus, Pointe-Claire (PQ),
Canada, H9R 1G6
Tel/fax: (514) 630-8847/8850
E mail: **Denis.Girard@INRS-Sante.Uquebec.ca**

ABSTRACT

Chemicals of environmental concern are known to alter the immune system and are frequently presented as toxic molecules as they alter many immune cell functions. Inflammation related to environmental chemical exposure is however poorly documented, except for the case of air pollutants. In this study, we found that at non necrotic concentrations (0.1, 1, 10, and 50 μM), the organochlorinated insecticide dieldrin could not alter the ability of human neutrophils to phagocytose opsonized-sheep red blood cells. However, dieldrin was found to increase human neutrophil superoxide production (O_2^-), RNA synthesis, and production of the proinflammatory cytokine IL-8. Normal apoptotic rate of neutrophils evaluated by both cytology and flow cytometry (CD-16 staining) was not altered by dieldrin treatments and this was correlated with its inability to inhibit neutrophil spreading onto glass. Dieldrin- and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced O_2^- responses were compared. For this purpose, cells were pre-incubated with a series of signal transduction inhibitors including genistein, H-7, HA-1077, *Pertussis toxin*, staurosporine, calphostin C, SB203580, PD098059, and wortmannin. Dieldrin-induced O_2^- response was significantly reduced with treatment with genistein, H-7, HA-1077, staurosporine, and calphostin C, whereas PMA-induced response was significantly reduced by treatment with H-7, HA-1077, and staurosporine. This indicates that dieldrin mediates its effect via PKCs and tyrosine kinases. Using the murine air pouch model, we found that dieldrin induces a neutrophilic inflammation. Taken together, these results demonstrate that dieldrin is a pro-inflammatory contaminant. To our knowledge, this is the first report establishing that dieldrin is a contaminant exhibiting pro-inflammatory properties. In addition, it is the first time that the murine air pouch model has been

successfully used to confirm that a chemical of environmental concern, namely dieldrin, can induce an inflammatory response *in vivo*.

INTRODUCTION

The toxicity of chemicals of environmental concern on the immune system has been largely evaluated in animals and, to a lesser extend, in human. In particular, the effects of various pollutants on B, T, NK, and monocyte-macrophage cells have been the focus of several reports whereas neutrophils have been largely neglected. Recent data indicate that inflammation is a manifestation that occurs in response to such chemicals (1-6). In particular, different dust and air pollutants are known to induce leukocytes infiltration into rodent airways (3-7).

Neutrophils are greatly involved in inflammation. They are the most abundant leukocytes of the blood and the first cell type to arrive at an inflammatory site. These cells, are known to exert phagocytosis, produce free radicals, synthesize various products such as cytokines and chemokines, and release proteolytic enzymes via degranulation (8-11). Neutrophils also spontaneously undergo apoptosis in both *in vitro* and *in vivo* conditions (12,13). This important mechanism controls the cell turnover rate of neutrophils. Although the responses of neutrophils to different agonists and pathogens are generally beneficial for host defense, their responses can be very deleterious to the organism if these cells are inappropriately activated. In this sense, production of free radicals and proteolytic enzymes used as defense against bacteria and microorganisms can be highly toxic to surrounding cells and tissues (14,15). Because of this, it remains important to identify neutrophil agonists.

Chlorinated compounds are recognized as environmental pollutants since acute toxicity is associated to these substances. However, little is known about their effects on host defense mechanisms (16). Dieldrin is a chlorinated chemical which belongs to the category of environmental pollutants designated as "persistent organic pollutants" or POPs since these compounds accumulate in the food chain. They persist in the environment and reach higher levels in animals higher in the food chain. Many countries have therefore either restricted or banned the use of POPs (17). Nevertheless, humans are still at risk of exposure to POPs. These chemicals, enter the human body through the respiratory system or contaminated food, or directly through the epidermis.

Dieldrin was traditionally used in agriculture as an insecticide and has been detected in air, water, soil, as well as in fishes, birds, and humans (particularly in milk) (18,19). Food, especially dairy products and meals, is the primary source of human exposure to dieldrin (20) but it can also originate from the metabolism of aldrin, another POP targeted by the United Nations Environment Program (UNEP). Dieldrin and aldrin are toxic to human (21). Symptoms of aldrin and dieldrin intoxication include headache, dizziness, nausea, convulsions (21), but there is limited evidence that dieldrin may affect the immune system. Dieldrin is known to activates rat neutrophils *in vitro* (22), causing a marginal concentration-dependent increase in superoxide (O_2^-) production by neutrophils. In addition, this chemical was found to act as a priming agent in a concentration-dependent fashion to the bacterial tripeptide N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) agonist and PMA. This effect was found to be dependent on extracellular calcium (22). Furthermore, it was recently found that dieldrin can induce the liberation of arachidonic acid and that more than one isoform of phospholipase A_2 is activated by this chemical in

rat neutrophils (23). To date, there is no available information concerning the interaction between dieldrin and human neutrophils and no clear evidence that this chemical possess proinflammatory properties has been reported. This is of importance since inflammatory disorders are increasingly associated and/or related to contaminant exposure.

The use of human neutrophils as potential targets to chemicals of environmental concern is gaining increasing attention (24-32). We have recently initiated studies focussing on environmental contaminants/neutrophil interactions aiming to answer whether or not neutrophils respond differently to various pollutants as well as to compare their responses to other stimuli such as cytokines and lectins (33). Recently, we have documented that sodium sulfite (Na_2SO_3) can activate human neutrophils to produce O_2^- and enhance phagocytosis without altering the apoptotic rate (26). The same pollutant was found to inhibit *de novo* protein synthesis in human neutrophils but was cytotoxic for immature promyelocytic HL-60 cell line (27). In addition, we have recently observed that toxaphene, another POP, is a potent neutrophil agonist as it induces O_2^- via PKCs and tyrosine kinases as well as it enhances phagocytosis, and induces apoptosis (28) by as yet unknown mechanisms.

Herein, we bring evidence that dieldrin is a human neutrophil agonist as it was found to induce O_2^- production, RNA synthesis, and production of the chemokine IL-8 without modulating phagocytosis, apoptosis, or cell spreading, In addition, the use of the murine air pouch model allowed us to conclude that dieldrin can induce a neutrophilic inflammation *in vivo*. This is the first study identifying dieldrin as a human neutrophil

agonist. In addition, this is the first time the murine air pouch model has been used in immunotoxicological study.

MATERIALS and METHODS

Chemicals and agonists. Dieldrin (freshly prepared in a final concentration of <0.1% (v/v) EtOH) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ont). Recombinant human GM-CSF (specific activity of 9 x 10^6 U/mg) was a gift from the Genetics Institute (Boston, MA). It was used herein as a positive control in some experiments at a concentration of 65 ng/ml as previously published (26,27,34). LPS was purchased from Sigma Aldrich Canada and IL-4 from R&D Systems Inc (Minneapolis, MN). Phorbol 12-myristate 13-acetate PMA, and the following inhibitors: genistein (tyrosine kinases), *Pertussis toxin* (G proteins), staurosporine (PKCs), H-7 (PKCs), Calphostin C (PKCs), SB203580 (p38 MAP kinase), and wortmannin (PI-3 kinase) were purchased from Sigma Aldrich Canada. HA-1077 (PKA and PKG inhibitor) and PD098059 (MAP-ERK kinase 1 inhibitor) were purchased from Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA). All inhibitors were dissolved in low endotoxin DMSO at a final concentration <0.1% (*v/v*) except HA-1077, *Pertussis toxin*, and H-7 which were dissolved in H_2O.

Neutrophil isolation. Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc, QUE), as previously described (26-28). 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 colored by Diff-Quik staining. Dieldrin (0-50

μM), and its diluent EtOH, were not toxic for neutrophils in the different conditions used in this study as cell viability was always greater than 98%.

Phagocytosis of sheep erythrocytes. Sheep red blood cells (SRBCs) (Quelab, Montreal, Quebec) were opsonized with a 1/200 dilution of a rabbit IgG anti-SRBCs antibody (Sigma Aldrich Canada) for 45 min at 37 °C, as previously described (26-29). Neutrophils (4×10^6 cells in RPMI-1640 alone) pretreated 30 min with buffer, diluent, IL-4 (10 ng/ml), or increasing concentrations of dieldrin (0-50 μM), were incubated with 20×10^6 opsonized SRBCs for 45 min as described above. The samples were centrifuged at 200 x g for 10 min at 4°C. Supernatant were discarded and an osmotic shock was performed on the pellets by treating them with 500 μl H_2O for 15 seconds followed immediately by the addition of 10 ml HBSS. The samples were washed and the final pellets were resuspended in 1 ml HBSS. Duplicate cytocentrifuged preparations were prepared in aliquots of ~200 μl and processed as for apoptosis (described under). Phagocytosis was measured by counting the number of neutrophil ingesting at least one opsonized-SRBC. IL-4 was used as a positive control since it has been previously reported that it enhances neutrophil phagocytosis (35).

Superoxide production. Superoxide production was monitored as the reduction of cytochrome *c*, as previously reported (26-28). Briefly, neutrophil suspensions (1×10^6 cell/ml in HBSS-1.6 mM $CaCl_2$) were incubated in the presence or absence of 10 μg/ml superoxide dismutase (Sigma) with 130 μM cytochrome *c* (Sigma) for 15 or 30 min at 37 °C in the presence of buffer, diluent, PMA (10^{-7} M), or an increasing concentration of

dieldrin. The absorbance of cytochrome *c* was monitored at 550 nm and the amount of superoxide anions produced was calculated from the difference between corresponding wells containing or not superoxide dismutase using an extinction coefficient of 21.1.

RNA synthesis. RNA synthesis was evaluated by measuring the incorporation of [5-^{3}H]-uridine (Amersham Corp., Oakville, ONT), into total RNA essentially as previously described (34). Briefly, 100 µl of a 5 x 10^6 cells/ml suspension were incubated in 96-well microtiter plates in the presence of 1 µCi of [^{3}H]-uridine along with buffer, diluent, GM-CSF, or increasing concentrations of dieldrin for 4 h at 37 °C, 5% CO_2. Following incubation, the cells were collected onto borosilicate glass fiber paper by a multiple-cell culture harvester (Skatron Instruments Inc., Sterling, VA), and sections of the filter corresponding to each microwell were then punched out and placed in scintillation counting vials with 4 ml of ScintiSafe Econo 1 (Fisher Scientific Canada). Results were expressed as stimulation indices (*cpm* from tested cells/*cpm* from cells treated diluent alone).

Assessment of neutrophil apoptosis by cytology and by CD16 expression. Freshly isolated human neutrophils (100 µl of a 10 x 10^6 cells/ml suspension in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 24 h in the presence or absence of an increasing concentration of dieldrin and apoptosis was evaluated by cytology. Cytocentrifuged preparations of neutrophils were performed using a Cyto-tek® centrifuge (Miles Scientific, IN, USA), as previously described (26-28,34) and were stained with a Diff-Quik staining kit (Baxter, FL, USA) according to the manufacturer's

instructions. Cells were examined by light microscopy at X 400 final magnification. Apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei. An ocular containing a 10 x 10 squares grid was used in order to count at least five different fields (>100 cells) for assessment of apoptotic cells. Results were expressed as percentage of neutrophils in apoptosis.

CD16 expression is known to be down-regulated on apoptotic neutrophils (36,37). This was determine in order to confirm the inability of dieldrin to modulate neutrophil apoptotic rate (36,37). After 24 h of incubation in the presence or absence of dieldrin, cells were suspended at 1,5 x 10^6 cells/ml washed and pre-incubated 30 min (4°C, light protected) with 20% autologous serum for preventing non specific binding via Fc receptors. Cells were then washed and incubated with 2 µl of FITC-mouse anti-human CD16 mAb (PharMingen Canada) for 30 min at 4 °C, light protected, before FACS analysis. Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton Dickinson, USA).

Neutrophil spreading onto glass. Inability of neutrophils to spread onto glass was previously found to correlate with induction of apoptosis (38,39). We have evaluated such response by incubating cells (5 x 10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 1% autologous serum) in 24-well plates at 37 °C, 5% CO_2 in the presence of buffer, diluent, LPS (1 µg/ml), or increasing concentrations of dieldrin, for 12 h, the time point previously found to be optimal for this assay (38,39). Ten microliters of the cell suspension were loaded onto a hemacytometer and incubated for 5 min at 37 °C. Immediately after incubation, cells were examined under light microscopy and scored as spread (irregular

shape) or non-spread (round shape).

Production of IL-8. IL-8 production was measured in freshly isolated neutrophils (10 x 10^6 cells/ml in RMPI-1640-5% FCS) stimulated with buffer, 65 ng/ml GM-CSF, or increasing concentrations of dieldrin for 24h. The concentration of IL-8 release in the external milieu was determined using a commercially available ELISA kit (sensitivity of <10 pg/ml) (R&D Systems) according to the manufacturer's instruction. All assays were performed at least in duplicate.

***In vivo* neutrophilic inflammation.** We decided to use the murine air pouch model (40-42) for evaluating potential pro-inflammatory effect of dieldrin. Six to eight-week-old C57Bl/6 mice were obtained from Charles River, Canada. Animals (five/group) were anesthetized with isofurane and the dorsal nuchal region was shaved and swabbed with isopropyl alcohol. Then, 3 ml of sterilized air (filtered through a 0.2 μm Millipore filter) were injected subcutaneous into the back using a 26-gauge needle to make an air pouch on day 0 and day 3. At day 6, mice were injected in the air pouches with 1 ml of dieldrin (50 μM), its diluent (EtOH-0.1% in PBS), or 1 μg/ml LPS (positive control) 6 or 12 hours before being killed by CO_2 asphyxiation. The air pouches were washed once with 1 ml, then twice with 2 ml of PBS containing 5 mM EDTA and the exudates were centrifuged at 100x g for 10 minutes at room temperature. The cells were resuspended in 1 ml of PBS, stained with acetic blue and counted. Two hundred thousand cells were centrifuged onto microscope slides and stained with Diff-Quik to allow quantification of granulocytic and monocytic populations. To further characterize the leukocyte sub-populations, cells were

suspended in PBS–BSA-0.1% and stained as previously described (40) with purified rat anti-mouse Ly-6G (Gr-1) mAb directed against murine neutrophils (PharMingen Canada) or rat anti mouse F4/80 antigen antibody directed against murine monocyte/macrophages (PharMingen Canada) for 30 minutes at 4°C. The cells were washed three times with PBS- BSA-0.1% before being incubated with goat anti-rat-FITC antibodies diluted in the same buffer for 30 minutes at 4°C. The cells were washed three times and flow cytometric analysis was performed by using a EPICS 753 (Coulter, Miami Lakes, FL).

RESULTS

Neutrophil phagocytosis function is not altered by dieldrin. Phagocytosis is an important function exerted by neutrophils. We decided to investigate if dieldrin could alter the ability of human neutrophils to phagocytose opsonized-SRBCs. As illustrated in **Fig 1**, this chemical did not significantly modulate phagocytosis. As expected, IL-4 was found to increase this response as the percentage of cells ingesting at least one SRBC was 39 ± 4% to 23 ± 5% for control neutrophils. Although the data obtained with dieldrin at a concentration of 50 μM were in the same range as those obtained with IL-4, (36 ± 4% for dieldrin), results were not statistically different when compared with those obtained with the diluent (29 ± 5%).

Dieldrin induces superoxide production. In order to better investigate how dieldrin could influence neutrophil cell physiology, we next studied its effect on neutrophil respiratory burst activity by measuring O_2^- production. As illustrated in **Fig 2**, dieldrin can induce such a response at 10 and 50 μM but not at 0.1 and 1 μM. In fact, after 30 min of stimulation with 10 or 50 μM dieldrin, we observed that this chemical can induce O_2^- production as strongly as the classical neutrophil agonist PMA (**Fig 2B**).

Dieldrin is an activator of RNA synthesis. Modulation of RNA synthesis, as assessed by measurement of [^{3}H] uridine incorporation, can be used as a marker of neutrophil activation (34). Results in **Fig 3** illustrate that dieldrin can activate RNA synthesis in a concentration-dependent manner. The indices of stimulation (mean ± SEM, n=4) increase

from 1.3 ± 0.2 to 3.5 ± 0.2 when cells were treated with dieldrin at 0.1 or 50 μM, respectively. As expected (34), the potent agonist GM-CSF was found to significantly increase neutrophil RNA synthesis (index: 8.2 ± 0.5).

Neutrophil apoptotic rate and spreading onto glass are not modulated by dieldrin. Because we found that dieldrin could induce the O_2^- production and that free radicals can induce neutrophils to undergo apoptosis (43), we next verified if dieldrin could alter neutrophil apoptotic rates. As illustrated in **Fig 4**, after 24h of culture, ~40 to ~70% of neutrophil were apoptotic as measured by cytology and by lost of CD16 expression (inset). Dieldrin could not significantly modulate neutrophil apoptotic rate. As expected, GM-CSF was found to delay normal neutrophil apoptotic rate. In addition, because it was previously found that apoptotic neutrophils lose their ability to spread onto glass (38,39), we investigated whether or not dieldrin could decrease this response. Results from **Fig 5** are in agreement with the fact that dieldrin cannot alter the neutrophil apoptotic rate. The number of spread cells remained stable following treatment with dieldrin and was similar to cells treated with the diluent. This reinforces the fact that this chemical is not a modulator of neutrophils apoptosis and that it is not cytotoxic for these cells at the concentrations used.

Production of IL-8 is increased by dieldrin. IL-8 is a potent chemotactic factor for neutrophils. Moreover, production of this pro-inflammatory cytokine is an important marker of neutrophil activation. We performed experiments in order to answer whether or not dieldrin could induce the secretion of IL-8 by human neutrophils. As illustrated in **Fig**

6, dieldrin induced the secretion of IL-8 in a concentration-dependent manner but being statistically significant only at a concentration of 50 μM dieldrin. All other treatments were not significant when compared to both control and the diluent.

Dieldrin induces neutrophil O_2^- production via PKCs and tyrosine kinases. In order to better understand how dieldrin can induce neutrophils to produce O_2^-, we investigated the effect of several signal transduction inhibitors on this response. Because PMA is known to induce O_2^- production and that its mode of action is largely dependent on PKCs, we compared the effect of dieldrin to PMA. Neutrophils were treated for 30 min with inhibitors prior to activation for 30 min with 50 μM dieldrin or 10^{-7} M PMA. Similarly to PMA, the effect of dieldrin was significantly inhibited by the PKC inhibitors H-7 (58%), staurosporine (83%), and calphostin C (61%), and by the PKA and PKG inhibitor HA-1077 (34%) (**Fig. 7**). The values obtained with PMA were 75, 25, 92, and 43%, in the same order. However, in contrast to PMA, the effect of dieldrin was also significantly inhibited by the tyrosine kinase inhibitor genistein (58% vs 5%).

Induction of neutrophil influx in vivo by dieldrin. The murine air pouch model was used to evaluate the potential inflammatory effect of dieldrin *in vivo*. Dieldrin was found to significantly increase the number of total leukocytes 6h after injection in the air pouch. Leukocyte influx induced by dieldrin was however transitory since leukocyte accumulation observed in the air pouch returned to baseline levels within 12h. As expected, leukocyte influx was observed after 6h of LPS treatment used herein as a positive control (**Fig. 8**). Neutrophils constituted the main cell population which migrated

to the pouch after 6h in both dieldrin- and LPS-induced animals as they represented ~76% and ~68% of total leukocytes in the pouch, respectively. Cells of the monocytic lineage were the other main population observed in the air pouches and represented no more than ~24% and ~16% of the dieldrin- and LPS-induced cell populations, respectively.

DISCUSSION

Recently, an increasing number of chemicals of environmental concern were found to possess some pro-inflammatory properties (8-10). The present study was aimed at better understanding how the organochlorinated insecticide dieldrin can alter the human neutrophil cell physiology and to verify its potential as being pro-inflammatory. In this report, we found that dieldrin is a potent activator of O_2^- production, RNA synthesis, and IL-8 production in human neutrophils. In contrast, this compound did not modulate phagocytosis, apoptosis, or cell spreading, demonstrating that this chemical was not cytotoxic at concentrations ranging from 0.1 to 50 μM. Dieldrin proinflammatory properties were confirmed *in vivo* as it was found to induce neutrophil accumulation in murine air pouches.

The use of a series of signal transduction inhibitors suggest that, similarly to PMA, dieldrin induces O_2^- production via PKCs. However, unlike PMA, tyrosine kinases were involved in dieldrin-induced O_2^- production since we observed a ~58% inhibition of the response when neutrophils were pre-incubated with genistein. Involvement of tyrosine kinases in PMA-induced neutrophil O_2^- production is still not clear. In human lymphocytes, it was previously found that PMA-induced reactive oxygen species were partly reduced by tyrphostin B42 and ST-638, two tyrosine kinases inhibitors (44). However, in guinea pig, neutrophil O_2^- production induced by PMA is less sensitive to the inhibitor ST-638 than the production induced by pervanadate (45). PMA-induced O_2^- production in human neutrophils was also increased with the use of genistein or ST638 in

another study (46). Data from the latter study also demonstrated that PMA-induced O_2^- production was sensitive to H-7 and staurosporine, two inhibitors of PKCs. Our results confirm that tyrosine kinases play at the most a minor role in PMA-induced neutrophil O_2^- production.

The fact that dieldrin was found to induce RNA synthesis testifies that this chemical is a potent activator of human neutrophil. These data suggest that dieldrin induces neutrophil gene expression. We have observed similar results with sodium sulfite (26,27) and with cytokines such as IL-4 (47), IL-15 (34), TNF-α (48), fMLP (48), and GM-CSF (48). Unlike these latter cytokines, dieldrin (this report) and sodium sulfite (27) did not alter neutrophil apoptotic rate. However, sodium sulfite was found to enhance phagocytosis of opsonized SRBCs by neutrophils (27) which what not the case for dieldrin (this report). Taken together, these observations suggest that the dieldrin-induced neutrophil RNA synthesis is not initiated for modulating apoptosis or phagocytosis.

The ability of dieldrin to increase IL-8 production is of interest. This proinflammatory molecule is a powerful neutrophil chemoattractant. The fact that a chemical such as dieldrin can induce IL-8 production suggest that some environmental contaminants exert pro-inflammatory properties as other molecules such as cytokines do. This is in agreement with the fact that we found that dieldrin could induce an *in vivo* neutrophilic inflammation. Although it is known that LPS can induce an inflammatory response that is still observable after 12h of initial challenge, dieldrin-induced leukocyte infiltration peeked after near 6h being no longer observable after 12h of treatment. It is tempting to speculate that LPS could induce a different chemokine profile (or at higher level of

chemotactic factors) than dieldrin. In concentration-dependent experiments (0.1-50 μM), we observed a potent *in vivo* inflammatory response only at the concentration of 50 μM dieldrin (*data not shown*). This is of interest since IL-8 production in dieldrin-induced neutrophils was significantly higher than control only at a concentration of 50 μM (**Fig. 2**).

In contrast to the other POP toxaphene (28), but similarly to the non-POP air pollutant sodium sulfite (26), dieldrin is not an inductor of neutrophil apoptosis. These observation indicate that neutrophils can respond differently to various chemicals of environmental concerns. The mechanisms involved in these responses remain to be determined. In addition, our observations indicate that contaminant are not necessarily toxic at relatively high concentrations to human neutrophil as they do not automatically induce apoptosis or necrosis. It is tempting to speculate that neutrophil possess some mechanisms of detoxification. In this sense, neutrophil are known to express the enzyme sulfite oxidase that can be over-expressed or become more active upon stimulation with sodium sulfite. The mechanism by which neutrophil could detoxify dieldrin is totally unknown and remains purely speculative at this moment.

In this study, we demonstrated for the first time that a chemical of environmental concern that possesses some *in vitro* pro-inflammatory properties can induce *in vivo* inflammation. To our knowledge, this is the first time that the murine air pouch model has successfully been used to evaluate pollutant-induced *in vivo* inflammation. The air pouch model has been used in the past to evaluate the pro- or anti-inflammatory activities of

pharmacological compounds. This model, in addition to our general proposed *in vitro* approach with the use of human neutrophils, should be added for immunotoxicological evaluation of pesticides and other related molecules since it could shed light on the effect of environmental contaminants on human health, particularly regarding inflammatory host responses

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), FRSQ-Réseau de Recherche en Santé Environnementale, and ACEQ. MP holds a M.Sc FCAR-FRSQ Santé award, DG and PAT are Scholars from FRSQ and The Arthritis Society, respectively.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Dieldrin does not alter the neutrophil phagocytosis of opsonized-sheep red blood cells.* Phagocytosis was evaluated by ingestion of opsonized SRBCs by neutrophils pretreated 30 min with buffer (Ctrl); diluent (Dil); 10 ng/ml interleukin-4 (IL-4); or increasing concentrations of dieldrin as described in Materials and Methods. Results are expressed as the percentage of phagocytosis (cells ingesting at least one opsonized SRBC/number of cell counted x 100) and are means ± SEM (n=3 different donors). *, $p < 0.05$ by Student's *t*-test.

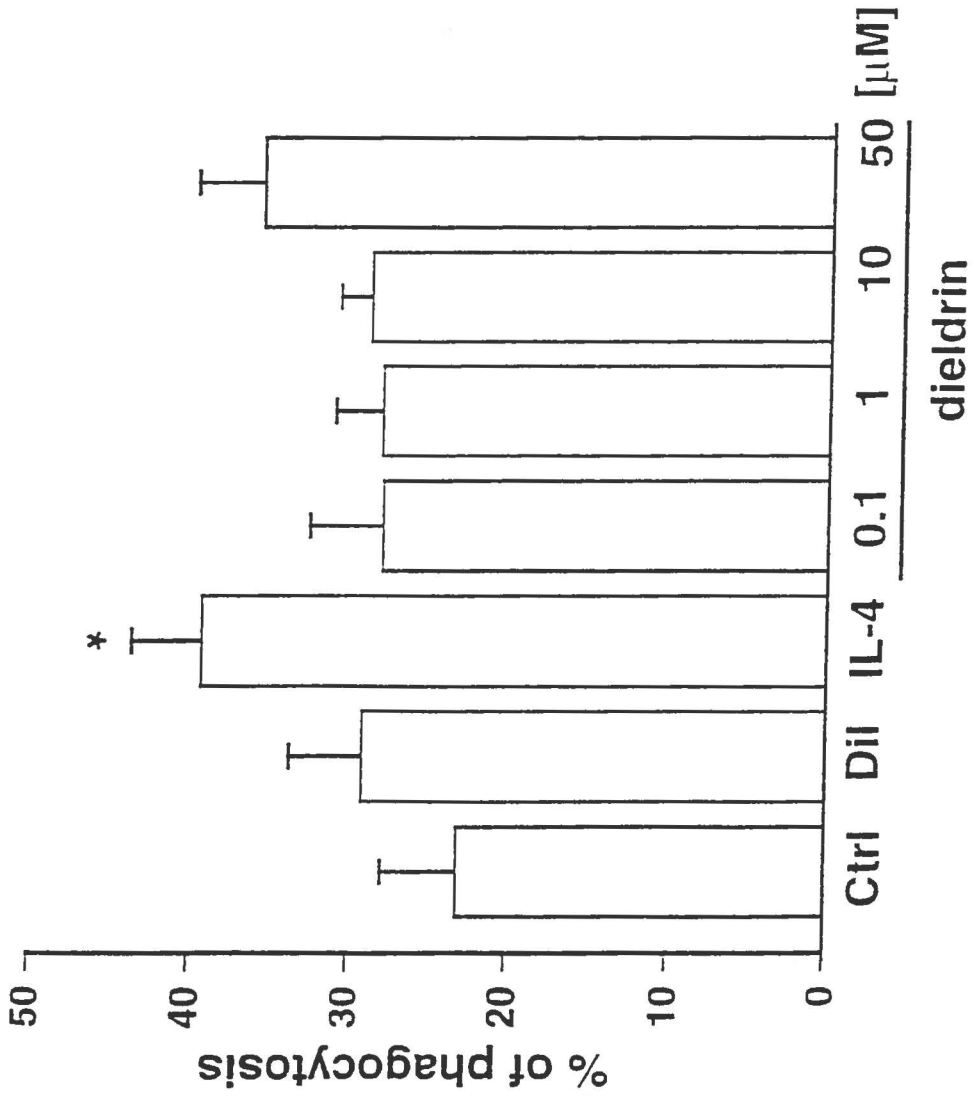

% of phagocytosis
0
10
20
30
40
50
*
Ctrl
DiI
IL-4
0.1
1
10
50 [μM]
dieldrin

Figure 2. *Activation of O_2^- production by dieldrin.* Freshly isolated human neutrophils were treated with buffer (Ctrl), the diluent (Dil), or an increasing concentration of 0.1, 1, 10 or 50 μM dieldrin for 15 (A) or 30 (B) min and the O_2^- production was measured as described in Materials and Methods. Results are means ± SEM (n=4 different blood donors). *, $p < 0.05$ by Student's *t*-test.

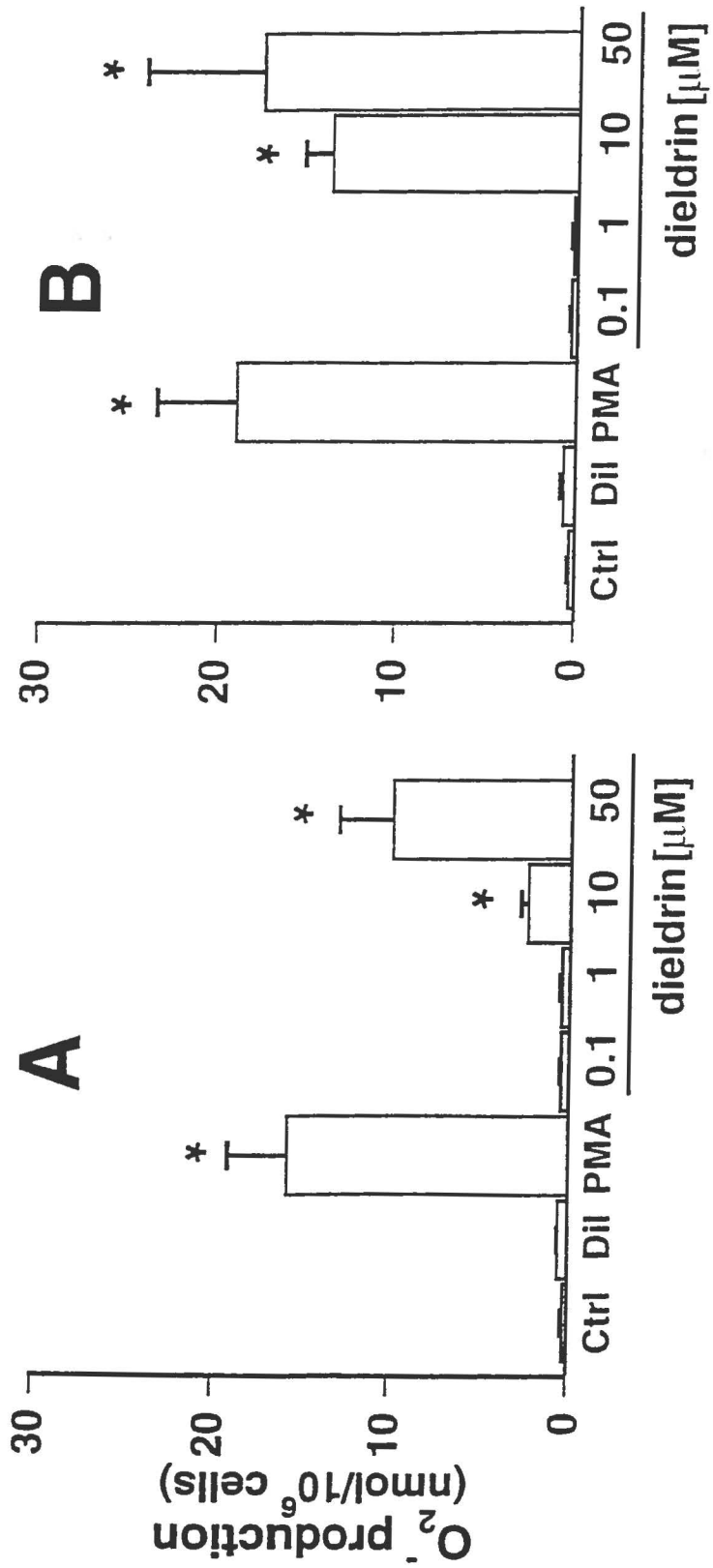

A
B
O_2^- production (nmol/10^6 cells)
30
20
10
0
Ctrl
Dil
PMA
0.1
1
10
50
dieldrin [μM]
*

Figure 3. *Induction of RNA synthesis by diedrin.* Neutrophils were stimulated with agonists for 4h in the presence of 5-[^{3}H] uridine and RNA synthesis was evaluated as described in Materials and Methods. Results are means ± SEM (n=4). Ctrl, buffer; Dil, diluent; GM, GM-CSF. *, $p < 0.05$ by Student's *t*-test.

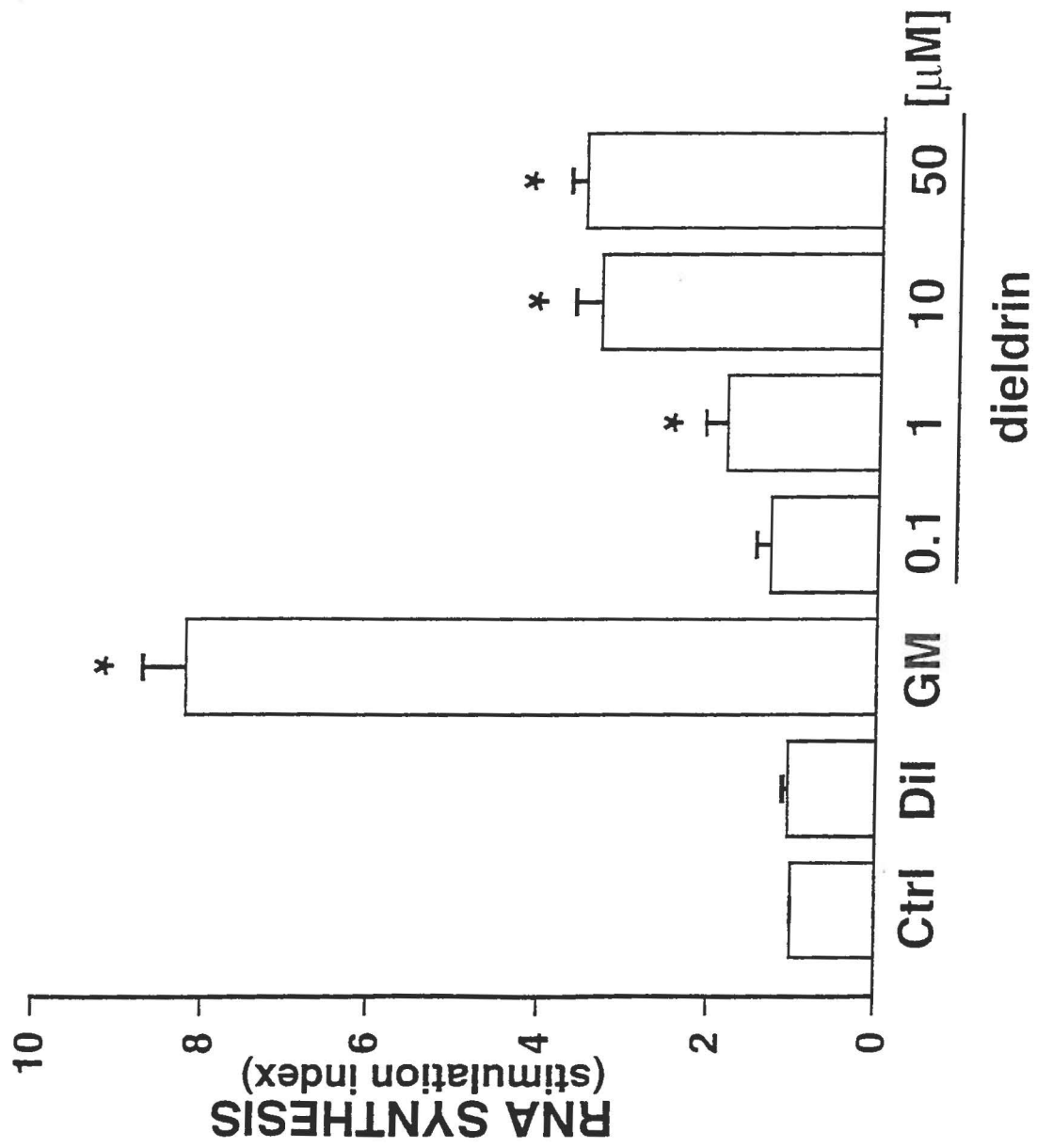
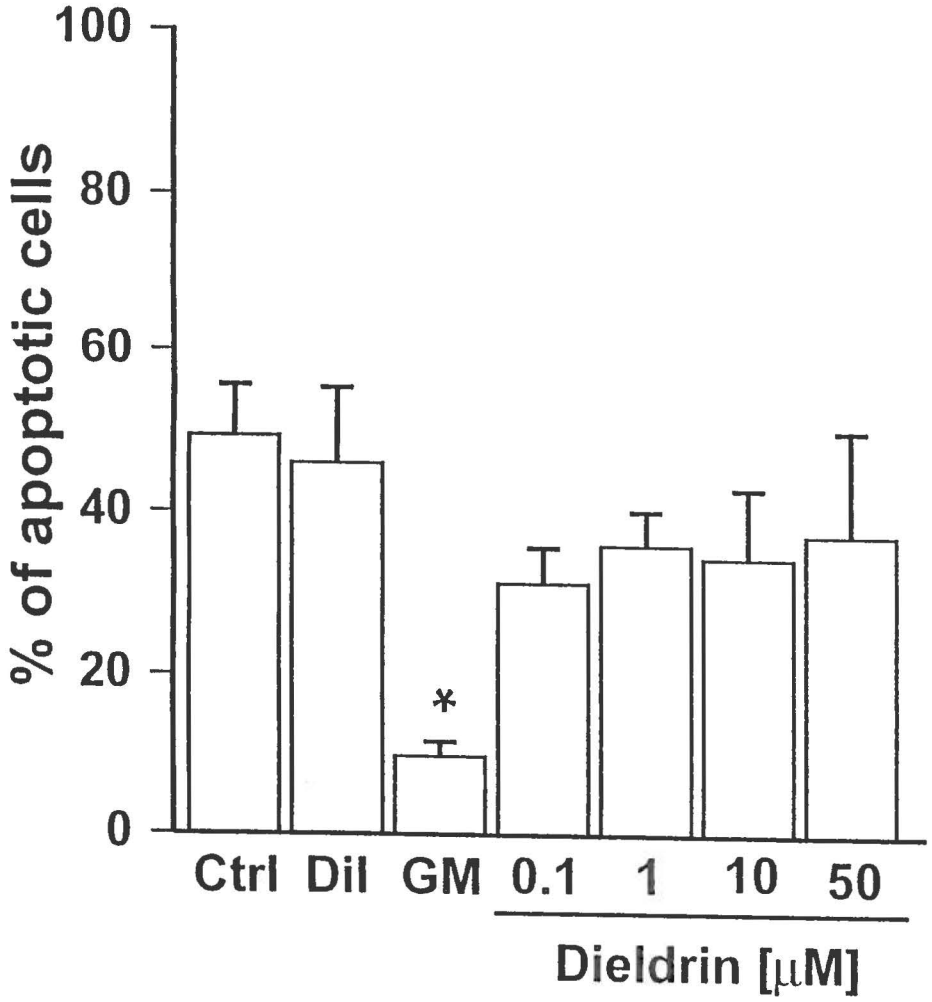

RNA SYNTHESIS
(stimulation index)
10
8
6
4
2
0
Ctrl
Dil
GM
0.1
1
10
50
[μM]
dieldrin
*
*
*
*

Figure 4. *Neutrophil apoptotic rate is not altered by dieldrin.* Freshly isolated human neutrophils (10 x 10^6 cells/ml) were incubated for 24h in presence of buffer (Ctrl), diluent (Dil), GM-CSF (GM), or increasing concentrations of dieldrin. Apoptosis was assessed by cytology (Diff-Quik staining) as described in Materials and Methods. Results are mean ± SEM (n=4). *, $p< 0.05$ by Student's *t*-test. Inset, one representative experiment out of 3 illustrating cell surface expression of CD16.


100
80
60
40
20
0
% of apoptotic cells
*
Ctrl
Dil
GM
0.1
1
10
50
Dieldrin [μM]

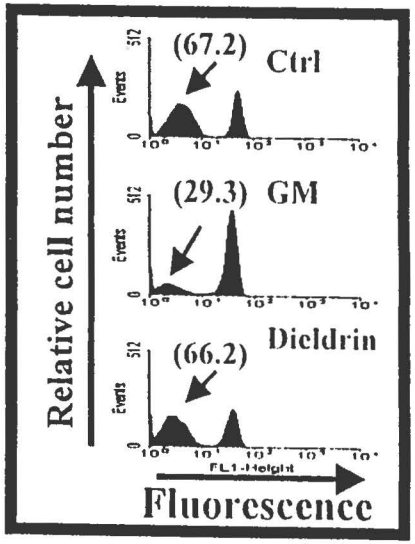

Relative cell number
(67.2)
Ctrl
(29.3)
GM
(66.2)
Dieldrin
Events
FL1-Height
Fluorescence

Figure 5. *Dieldrin does not alter neutrophil cell spreading*. Cells were incubated for 12h with buffer (Ctrl), diluent (Dil), LPS (1 μg/ml), or increasing concentrations of dieldrin and cell spreading onto glass was assessed as described in Materials and Methods. Results are mean ± SEM (n=4). *, $p < 0.05$ by Student's *t*-test.

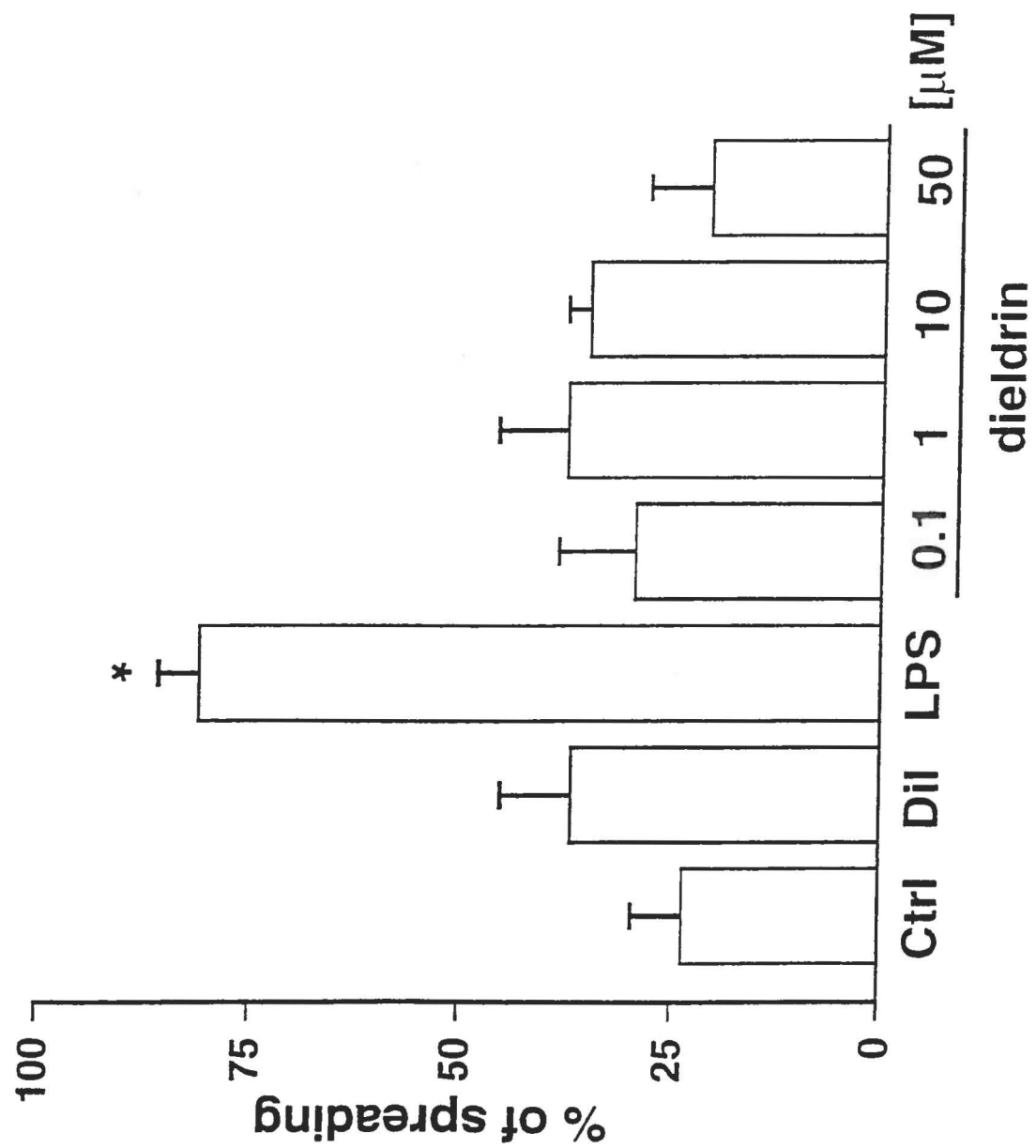

% of spreading
100
75
50
25
0
Ctrl
Dil
LPS
*
0.1
1
10
50
[μM]
dieldrin

Figure 6. *IL-8 production is increased by dieldrin.* Neutrophils were incubated for 24h in the presence of buffer (ctrl), diluent (Dil), or increasing concentrations of dieldrin. Supernatants were harvested and IL-8 production was measured by ELISA as described in Materials and Methods. Results are mean ± SEM (n=4). *, $p < 0.05$ by Student's *t*-test.

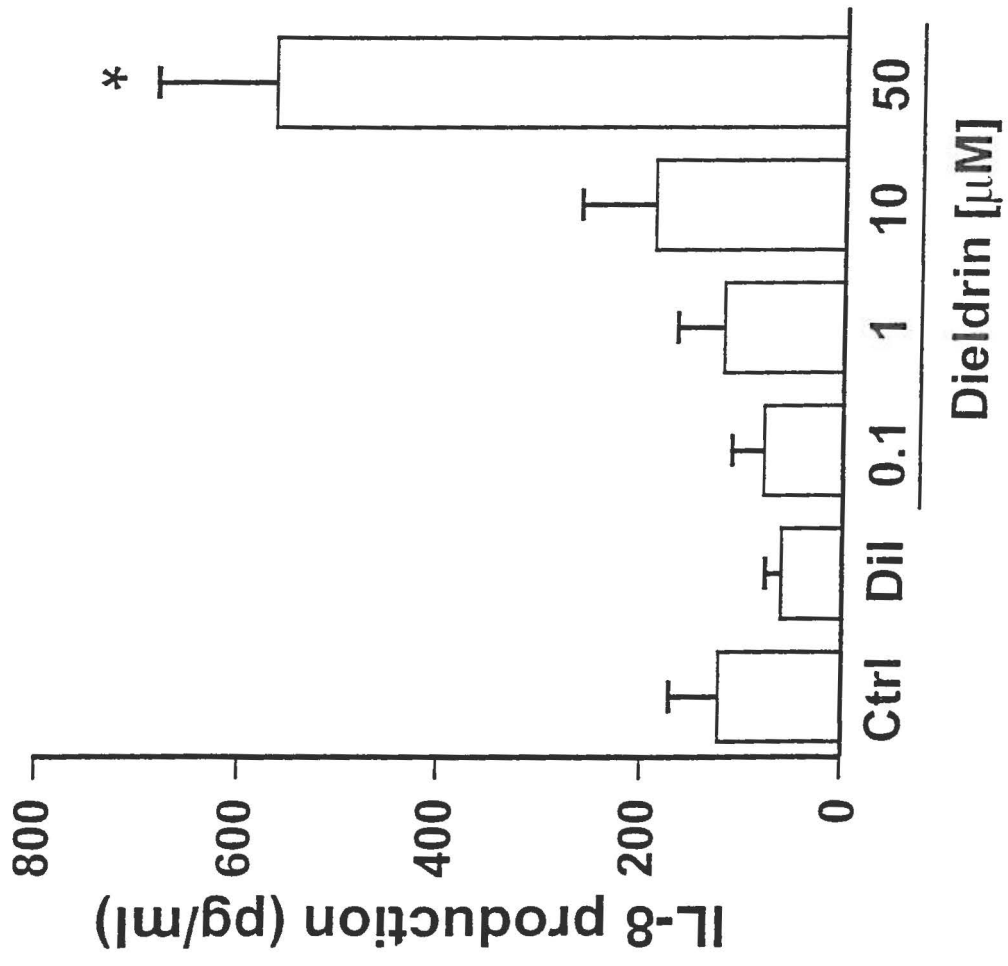

IL-8 production (pg/ml)
800
600
400
200
0
*
Ctrl
Dil
0.1
1
10
50
Dieldrin [μM]

Figure 7. *Involvement of PKCs and tyrosine kinases in dieldrin-induced O_2^- production.* Cells were pre-incubated 30 min with or without inhibitors before assessing O_2^- production as described in Materials and Methods. The inhibitor used were: 50 μg/ml genisteine (tyrosine kinases), 50 ng/ml *Pertussis toxin* (G proteins), 100 nM staurosporine (PKCs), 0.5 mM H-7 (PKCs), 1.3 μM Calphostin C (PKCs), 1μM SB203580 (p38 MAP kinase), 100 nM wortmannin (PI-3 kinase), 40 μM HA-1077 (PKA and PKG inhibitor), and 10 μM PD098059 (MAP-ERK kinase 1 inhibitor), all dissolved in low endotoxin DMSO at a final concentration <0.1% (*v/v*) except HA-1077, *Pertussis toxin*, and H-7 which were dissolved in H_2O. Results are means ± SEM (n=6). *, $p < 0.05$ vs no inhibitor by Student's *t*-test.

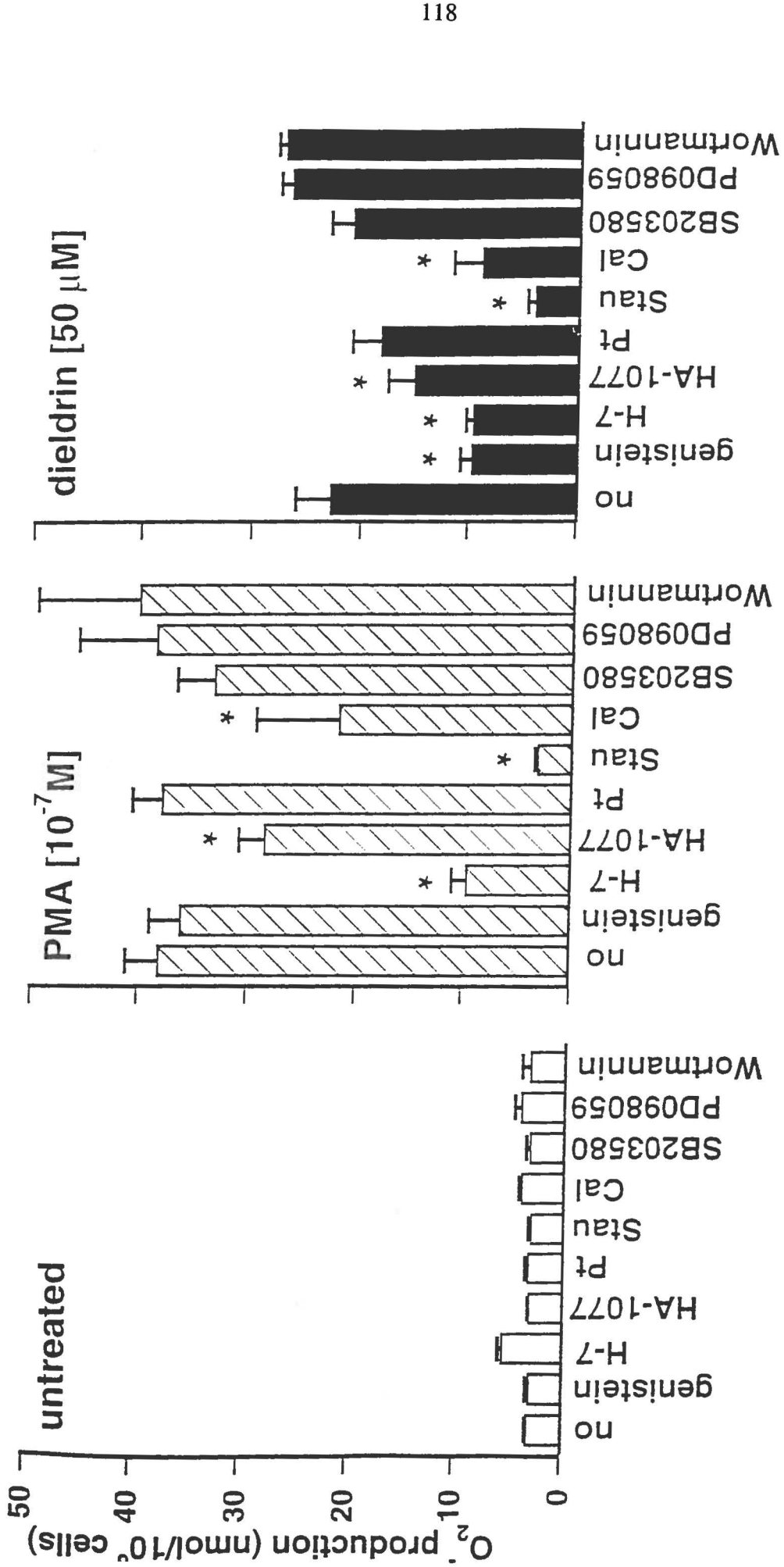
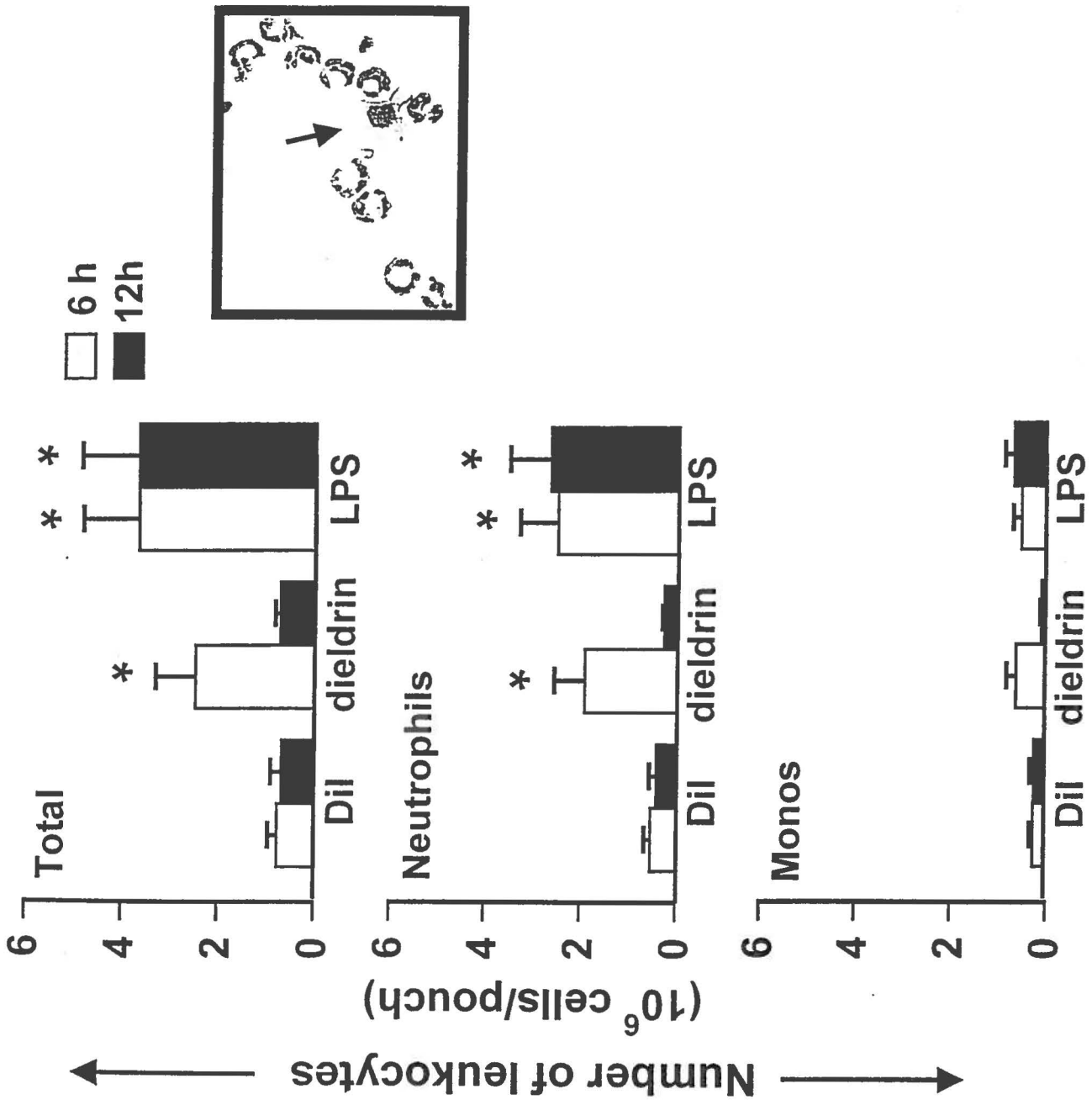

O_2^- production (nmol/10^6 cells)
0
10
20
30
40
50
untreated
no
genistein
H-7
HA-1077
Pt
Stau
Cal
SB203580
PD098059
Wortmannin
PMA [10^{-7} M]
no
genistein
H-7
HA-1077
Pt
Stau
Cal
SB203580
PD098059
Wortmannin
dieldrin [50 μM]
no
genistein
H-7
HA-1077
Pt
Stau
Cal
SB203580
PD098059
Wortmannin

Figure 8. *Dieldrin induces a neutrophilic inflammation in vivo.* The murine air pouch model was used for evaluating potential pro-inflammatory effect of dieldrin by counting total leukocytes, neutrophils, and monocytes-macrophages as described in Materials and Methods. Mice were treated for 6h or 12h with 50 μM dieldrin, the diluent (Dil), or 1 μg/ml LPS. Results are mean ± SEM (n=5). *, $p < 0.05$ by Student's *t*-test. Inset, a representative cytocentrifuged preparation of cells collected from one dieldrin-induced mouse after 6h. Arrow, a cell of the monocytic lineage. Note the predominance of neutrophils.


6 h
12h
Total
Neutrophils
Monos
Dil
dieldrin
LPS
0
2
4
6
*
Number of leukocytes
(10^6 cells/pouch)

REFERENCES

1. Stoker, T.E., Robinette, C.L., Cooper, R.L. (1999) Perinatal exposure to estrogenic compounds and the subsequent effects on the prostate of the adult rat: evaluation of inflammation in the ventral and lateral lobes. Reprod. Toxicol. 13, 463-472

2. Michielsen, C.C., Bloksma, N., Klatter, F.A., Rozing, J., Vos, J.G., van Dijk, J.E. (1999) The role of thymus-dependent T cells in hexachlorobenzene-induced inflammatory skin and lung lesions. Toxicol. Appl. Pharmacol. 161, 180-191

3. Koren, H., O'Neill, M. (1998) Experimental assessment of the influence of atmospheric pollutants on respiratory disease. Toxicol. Lett. 28, 102-103, 317-321

4. Ischiropoulos, H., Mendiguren, I., Fisher, D., Fisher, A.B., Thom, S.R. (1994) Role of neutrophils and nitric oxide in lung alveolar injury from smoke inhalation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150, 337-341

5. Clarke, R.W., Catalano, P.J., Koutrakis, P., Murthy, G.G., Sioutas, C., Paulauskis, J., Coull, B., Ferguson, S., Godleski, J.J. (1999) Urban Air Particulate Inhalation Alters Pulmonary Function and Induces Pulmonary Inflammation in a Rodent Model of Chronic Bronchitis. Inhal. Toxicol. 8, 637-656

6. Devlin, R.B., Horstman, D.P., Gerrity, T.R., Becker, S., Madden, M.C., Biscardi, F., Hatch, G.E., Koren, H.S. (1999) Inflammatory Response in Humans Exposed to 2.0 ppm Nitrogen Dioxide. Inhal. Toxicol. 2, 89-109

7. Gossart, S., Cambon, C., Orfila, C., Seguelas, M.H., Lepert, J.C., Rami, J., Carre, P., Pipy, B. (1996) Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF-α production in rat lung inflammation induced by silica. J. Immunol. 156, 1540-1548.

8. Kanwar VS, Cairo MS. The natural immune system. In: *The neutrophil.* Abramson JS, Wheeler JG (eds.). IRL Press. 1993, pp 1-21.

9. McPhail LC, Harvath L. The natural immune system. In: *The neutrophil.* Abramson JS, Wheeler JG (eds.). IRL Press. 1993, pp 63-107.

10. Casatella, M.A. (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today 16, 21-26.

11. Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J. (1992) Poly's lament: The neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in afferent limb of the immune response. Immunol Today 13, 169-172.

12. Payne, C.M., Glasser, L., Tischler, M.E., Wyckoff, D., Cromey, D., Fiederlein, R., Bohnert, O. (1994) Programmed cell death of the normal human neutrophil: an in vitro model of senescence. Microsc. Res. Tech. 28, 327-344.

13. Cox, G., Crossley, J., Xing, Z. (1995) Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *in vivo*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol 12, 232-237.

14. Miller, D.J., MacFarlane, N.G. (1995) Intracellular effects of free radicals and reactive oxygen species in cardiac muscle. J. Hum. Hypertens. 9, 465-473.

15. Dye, J.A., Madden, M.C., Richards, J.H., Lehmann, J.R., Devlin, R.B., Costa, D.L. (1999) Ozone Effects on Airway Responsiveness, Lung Injury, and Inflammation. Comparative Rat Strain and In Vivo/In Vitro Investigations. Inhal. Toxicol. 11, 1015-1040

16. Saboori, A.M., Newcombe, D.S. Environmental chemicals with immunotoxic properties. In: *Clinical Immunotoxicology*. Newcombe D.S., Rose N.R., Bloom J.C. (eds.) Raven Press Ltd. 1992, pp 365-499.

17. Fisher, B.E. (1999) Most unwanted. Environ. Health Perspect. 107, A18-23

18. Martijn, A., Bakker, H., Schreuder, R.H. (1993) Soil persistence of DDT, dieldrin, and lindane over a long period. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 51, 178-184

19. Schmitt, C.J., Zajicek, J.L., May, T.W., Cowman, D.F. (1999) Organochlorine residues and elemental contaminants in U.S. freshwater fish, 1976-1986: National Contaminant Biomonitoring Program. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 162, 43-104

20. Bro-Rasmussen, F. (1996) Contamination by persistent chemicals in food chain and human health. Sci. Total Environ. 188, Suppl 1, S45-60

21. Carvalho, W.A., Matos, G.B., Cruz, S.L., Rodrigues, D.S. (1991) Human aldrin poisoning. Braz. J. Med. Biol. Res. 24, 883-887

22. Hewett, J.A., Roth, R.A. (1988) Dieldrin activates rat neutrophils in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 96, 269-278

23. Tithof, P.K., Olivero, J., Ruehle, K., Ganey, P.E. (2000) Activation of neutrophil calcium-dependent and -independent phospholipases A_2 by organochlorine compounds. Toxicol. Sci. 53, 40-47

24. Queiroz, M.L., Bincoletto, C., Perlingeiro, R.C., Souza, C.A., Toledo, H. (1997) Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. Hum. Exp. Toxicol. 16, 322-326

25. Queiroz, M.L., Quadros, M.R., Valadares, M.C., Silveira, J.P. (1998) Polymorphonuclear phagocytosis and killing in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 20, 447-454

26. Labbé, P., Pelletier, M., Omara, F.O., Girard, D. (1998) Functional responses of human neutrophils to sodium sulfite (Na_2SO_3) in vitro. Hum. Exp. Toxicol. 17, 600-605

27. Pelletier, M., Savoie, A., Girard, D. (2000) Activation of human neutrophils by the air pollutant sodium sulfite (Na_2SO_3): Comparison with immature promyelocytic HL-60 and DMSO-differentiated HL-60 cells reveals that Na_2SO_3 is a neutrophil but not HL-60 cell agonist. Clin. Immunol. 96, 131-139

28. Gauthier, M., Roberge, C.J., Pelletier, M., Tessier, P.A., Girard, D. Activation of human neutrophils by technical toxaphene. Clin. Immunol. (accepted for publication)

29. Perlingeiro, R.C., Queiroz, M.L. (1995) Measurement of the respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from mercury-exposed workers. Hum. Exp. Toxicol. 14, 281-286

30. Narayanan, P.K., Carter, W.O., Ganey, P.E., Roth, R.A., Voytik-Harbin, S.L., Robinson, J.P. (1998) Impairment of human neutrophil oxidative burst by polychlorinated biphenyls: inhibition of superoxide dismutase activity. J. Leukoc. Biol. 63, 216-224

31. Beck-Speier, I., Lenz, A.-G., Godleski J.J. (1994) Responses of human neutrophils to sulfite. J. Toxicol. Environ. Health 41, 285-297

32. Lindahl, M., Leanderson, P., Tagesson, C. (1998) Novel aspect on metal fume fever: zinc stimulates oxygen radical formation in human neutrophils. Hum. Exp. Toxicol. 17, 105-110

33. Savoie A, Lavastre V, Pelletier, Hajto T, Hostanska K, Girard D (2000). Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): Modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that induction of apoptosis is caspase-dependent. *J. Leukoc. Biol.* (In press).

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

35. Boey, H., Rosenbaum, R., Castracane, J., Borish, L. (1989) Interleukin-4 is a neutrophil activator. J. Allergy Clin. Immunol. 83, 978-984

36. Dransfield, I., Buckle, A.M., Savill, J.S., McDowall, A., Haslett, C., Hogg, N. (1994) Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. J. Immunol. 153, 1254-1263

37. Moulding, D.A., Hart, C.,A., Edwards, S.W. (1999) Regulation of neutrophil FcγRIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. J. Leukoc. Biol. 65, 875-882

38. Whyte, M.K., Meagher, L.C., MacDermot, J., Haslett, C. (1993) Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. J. Immunol. 150, 5124-5134

39. Lee, A., Whyte, M.K., Haslett, C. (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflam-matory mediators. J. Leukoc. Biol. 54, 283-288

40. Tessier, P.A., Naccache, P.H., Clark-Lewis, I., Gladue, R.P., Neote, K.S., McColl, S.R. (1997) Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. J. Immunol. 159, 3595-3602

41. Terkeltaub, R., Baird, S., Sears, P., Santiago, R., Boisvert, W. (1998) The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis. Arthritis Rheum. 41, 900-909

42. Wisniewski, H.G., Hua, J.C., Poppers, D.M., Naime, D., Vilcek, J. Cronstein, B.N. (1996) TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect *in vivo*. J. Immunol.156, 1609-1615

43. Rollet-Labelle, E., Grange, M.J., Elbim, C., Marquetty, C., Gougerot-Pocidalo, M.A., Pasquier, C. (1998) Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. Free Radic. Biol. Med. 24, 563-572

44. Geijsen, N., van Delft, S., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Collard, J.G., Koenderman, L., Coffer, P.J. (1999) Regulation of p21rac activation in human neutrophils. Blood 94, 1121-1130

45. Yamaguchi, M., Oishi, H., Araki, S., Saeki, S., Yamane, H., Okamura, N., Ishibashi, S. (1995) Respiratory burst and tyrosine phosphorylation by vanadate. Arch. Biochem. Biophys. 323, 382-386

46. Utsumi, T., Klostergaard, J., Akimaru, K., Edashige, K., Sato, E.F., Utsumi, K. (1992) Modulation of TNF-alpha-priming and stimulation-dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors. Arch. Biochem. Biophys. 294, 271-278

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

48 Girard, D., Gosselin, J., Heitz, D., Paquin, R., Beaulieu, A.D. (1995) Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils. Blood 86, 1170-1176.

Troisième partie

Conclusion

Peu de recherches sont axées sur les effets des contaminants environnementaux sur les neutrophiles. La majorité des études immunotoxicologiques traite de la modulation des réponses physiologiques des lymphocytes B et T et des macrophages chez les animaux. Pourtant, les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes du sang (outre les plaquettes et les globules rouges) et sont les premières cellules à se rendre au foyer inflammatoire. Ces cellules peuvent également répondre de façon non spécifique à différents agents par la production de radicaux libres, la dégranulation, la synthèse de cytokines et chimiokines, etc. De plus, l'activation inappropriée des neutrophiles par ces différents agents peut conduire à la destruction des cellules et des tissus environnants et mener à certaines maladies importantes, comme l'asthme et l'arthrite rhumatoïde. Ces cellules méritent donc d'être davantage étudiées dans le domaine de l'immunotoxicologie. Des études sur l'interaction des neutrophiles avec des contaminants de l'environnement ont été entreprises avec deux polluants de nature différente, soient le Na_2SO_3, un polluant de l'air, et le dieldrine, un insecticide.

Avant notre étude sur l'interaction entre le Na_2SO_3 et les neutrophiles, peu de données étaient disponibles concernant les réponses physiologiques des neutrophiles vis-à-vis ce polluant atmosphérique. Il était fortement suggéré que les neutrophiles étaient une cible pour le Na_2SO_3, puisqu'une exposition au sulfite induit une accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires des humains et des animaux. De plus, les macrophages alvéolaires sont activés par le sulfite, ce qui entraîne la libération de médiateurs pouvant activer la flambée oxydative des neutrophiles. Il semble également que les neutrophiles soient responsables en partie des effets toxiques du Na_2SO_3 au niveau du système respiratoire. En effet, il était connu que le Na_2SO_3 induit des signes de dégranulation et la production de radicaux libres chez ces cellules via les PKCs et la voie du Ca^{2+}/calmoduline. Malheureusement, la littérature se limitait à ces quelques fonctions des neutrophiles afin d'expliquer la toxicité du sulfite.

Nos recherches ont donc permis de déterminer que le Na_2SO_3 possède des propriétés pro-inflammatoires, de par la production de superoxydes et d'IL-8. Des études supplémentaires sont toutefois nécessaires afin de déterminer si cette production d'IL-8 provient d'une réserve intracellulaire ou s'il s'agit d'une synthèse *de novo*. Par contre, le Na_2SO_3 est incapable de moduler significativement la phagocytose, si ce n'est une légère augmentation, par les neutrophiles de globules rouges de mouton opsonisées et le niveau d'apoptose de ces mêmes cellules. Le Na_2SO_3 n'a également aucun effet sur le retard d'apoptose induit par le GM-CSF. De plus, notre étude a permis de mieux documenter le mécanisme d'action du Na_2SO_3 lors de l'activation du neutrophile. Il est clair que le Na_2SO_3 induit l'expression des gènes et, paradoxalement, inhibe la synthèse protéique *de novo*. Nous pouvons postuler que le Na_2SO_3 intervient dans le processus de traduction des gènes. En plus d'activer le neutrophile par les voies métaboliques des PKCs et du Ca^{2+}/calmoduline, nous avons trouvé que le Na_2SO_3 induit la phosphorylation de résidus tyrosine de certaines protéines encore non identifiées par l'activation des tyrosines kinases. Il est également très intéressant de noter que certaines protéines phosphorylées co-migrent avec celles induites par le GM-CSF. Ceci suggère qu'un contaminant de l'environnement puisse utiliser une voie semblable à une cytokine connue pour induire ces effets via une liaison à un récepteur de surface. Il reste toutefois à déterminer la raison pour laquelle le Na_2SO_3 active les tyrosines kinases. Les cellules immatures de la lignée neutrophile, contrairement aux neutrophiles matures semblent plus sensibles à la toxicité du Na_2SO_3. En effet, le Na_2SO_3 est toxique pour les cellules HL-60 et légèrement toxique pour les HL-60 différenciées en « neutrophiles », contrairement à une absence de toxicité chez les neutrophiles. Nos résultats suggèrent donc que les cellules HL-60 ne possèdent aucune activité au niveau de la sulfite oxydase, mais soulèvent la possibilité que les HL-60 acquièrent cette activité enzymatique lors de leur différentiation vers le phénotype plus mature. Ceci reste à être déterminé.

Ainsi, le potentiel toxique du Na_2SO_3 pendant l'inflammation pulmonaire pourrait être relié à l'accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires par ce polluant atmosphérique et par sa capacité d'induire la production de radicaux libres et d'IL-8 et ce, sans altérer le niveau d'apoptose. En d'autres mots, les neutrophiles activés (par le

Na_2SO_3 et par les médiateurs des macrophages) libèreraient des superoxydes et de l'IL-8 (attirant plus de neutrophiles), puis persisteraient dans les voies respiratoires (aucune modulation de l'apoptose), tout en endommageant les tissus environnants. Ceci maintiendrait l'inflammation et diminuerait la capacité respiratoire, ce qui pourrait expliquer partiellement comment le Na_2SO_3 peut causer ou aggraver l'asthme et d'autres maladies respiratoires. Afin de confirmer cette hypothèse, des études sur les fonctions des neutrophiles isolés d'humains exposés à de fortes doses de Na_2SO_3 et souffrant de troubles respiratoires (personnes habitant près des usines de pâtes et papiers ou travailleurs dans ces mêmes usines) seraient intéressantes. Des études *in vitro* sur les cellules provenant des fluides broncho-alvéolaires de ces personnes pourraient montrer un état d'hyperactivité chez les neutrophiles et permettraient de renforcer notre hypothèse. Il serait également possible d'effectuer des injections intra-trachéales de Na_2SO_3 chez des animaux et d'effectuer une panoplie d'expériences à l'aide des cellules récoltées afin d'obtenir des résultats similaires. La porte est donc ouverte pour de futures expériences.

Un autre objectif de cette étude était de déterminer si les cellules HL-60 peuvent remplacer les neutrophiles dans des tests de criblage de toxicité des xénobiotiques en vérifiant si leurs réponses au Na_2SO_3 sont similaires à celles obtenues avec les neutrophiles. Nous avons donc vérifié deux réponses physiologiques des cellules HL-60 et des cellules HL-60 différenciées en phénotype neutrophile, soient la synthèse protéique *de novo* et la phosphorylation des résidus tyrosines. Contrairement aux neutrophiles où le Na_2SO_3 induit la phosphorylation des résidus tyrosine selon un modèle concentration-dépendante, le sulfite n'induit pas cette réponse chez les HL-60 et les HL-60 différenciées. Aucune phosphorylation n'était apparente pour des temps variant de 1 à 30 minutes. Les cellules étaient toutefois aptes à répondre puisque le GM-CSF, utilisé ici comme contrôle positif, a induit la phosphorylation d'une protéine de 120-130 kDa. Cette réponse était de plus prononcée pour les HL-60 différenciés et demeurait d'une grande intensité après 30 minutes de stimulation au GM-CSF. Il a déjà été montré que ceci n'était pas dû à une augmentation du nombre de récepteurs de GM-CSF lors de la différentiation (Roberts *et al.*, 1994). Il serait toutefois intéressant de déterminer, lors d'expériences futures, si cette bande dans la région de 120 kDa est la même chez les HL-60, les HL-60

différenciés et les neutrophiles lors d'une stimulation au GM-CSF. Il serait également important de vérifier la phosphorylation au niveau des résidus sérine et thréonine afin d'exclure ou non l'implication de protéines intracellulaires dans la signalisation cellulaire des HL-60 et HL-60 différenciées. Pour ce qui est de la synthèse protéique *de novo*, le Na_2SO_3 n'a pas d'effet sur cette fonction chez les HL-60 et les HL-60 différenciées. En effet, la diminution de la synthèse protéique *de novo* observée à la plus haute concentration (10 mM) est attribuable à la cytotoxicité du Na_2SO_3 chez ces cellules plutôt qu'à une inhibition, comme le témoigne la chute drastique du contenu protéique total. Ainsi, nos résultats indiquent clairement que les HL-60 et les HL-60 différenciées répondent différemment des neutrophiles au Na_2SO_3. Il faut donc être prudent lors de l'extrapolation des données obtenues avec les HL-60 aux neutrophiles, une pratique encore trop courante.

La deuxième partie du projet était de déterminer les réponses biologiques des neutrophiles humains au dieldrine, un insecticide organochloré. Avant notre étude, rien n'était connu sur l'interaction dieldrine/neutrophiles humains. Il était connu que le dieldrine induit la production de superoxydes chez les neutrophiles de rat *in vitro* et que cette réponse est dépendante de différentes isoformes des PLA_2. Le dieldrine induit également la libération d'acide arachidonique chez ces mêmes neutrophiles. Nos recherches ont donc permis de mieux caractériser les réponses physiologiques des neutrophiles humains au dieldrine. Ainsi, le dieldrine, aux concentrations testées, n'est pas toxique pour les neutrophiles, puisqu'ils sont toujours aptes à effectuer la phagocytose. Tout comme le Na_2SO_3, le dieldrine possède des propriétés pro-inflammatoires, de par la production de superoxydes et la production d'IL-8, en plus d'augmenter l'expression des gènes. La toxicité du dieldrine pourrait donc être reliée à ces propriétés pro-inflammatoires, puisque le niveau d'apoptose n'était pas altéré par le dieldrine et ceci était en corrélation avec l'impossibilité d'inhiber l'étalement des neutrophiles sur le verre. À notre connaissance, ceci est la première étude déterminant que le dieldrine est un agoniste des neutrophiles humains. La pré-incubation des cellules avec des inhibiteurs de certaines voies de signalisation nous a permis de déterminer que le dieldrine active la NADPH oxydase par les protéines kinases C et les tyrosines kinases. Étant donné que la NADPH oxydase des

neutrophiles de rat est activée par les PLA_2 suite à une stimulation au dieldrine, il est possible de supposer que cette voie de signalisation est également utilisée par les neutrophiles humains. Il est également possible que le dieldrine induise la libération d'acide arachidonique. Des études supplémentaires utilisant des inhibiteurs spécifiques permettront de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

Le dernier objectif de cette étude était d'établir ou non les effets pro-inflammatoires du dieldrine *in vivo* en utilisant le modèle inflammatoire de la poche d'air chez la souris. L'air injecté à la souris permet de créer une poche où nous pouvons injecter des composés afin de produire une réponse inflammatoire transitoire au cours de laquelle s'accumulent les neutrophiles. Lors de notre étude, le dieldrine a induit une infiltration rapide de neutrophiles dans les six premières heures, mais cette réponse s'est estompée après 12 heures. Ceci diffère de la réponse au LPS, où le nombre de neutrophiles dans la poche d'air se maintient lors des 12 premières heures. Ceci suggère un mécanisme d'activation différent entre le LPS et le dieldrine. Il est possible qu'un profil différents de chimiokines soit généré dans la poche d'air selon l'agoniste administrée ou encore que la concentration des chimiokines soit différente. Des études supplémentaires sont toutefois nécessaires afin de déterminer la cause de cette infiltration de neutrophiles. La recherche de différents chimioattractants dans les fluides provenant de la poche d'air pourrait révéler la présence de GRO-α, -β ou -γ. La présence de ces chimiokines permettrait de corréler *in vivo* la production d'IL-8 chez le neutrophile humain. À notre connaissance, cette étude est la première à déterminer que le dieldrine peut induire une réponse inflammatoire *in vivo*, tout comme elle est la première à utiliser le modèle inflammatoire murin de la poche d'air lors de tests immunotoxiques. Ainsi, le dieldrine induit l'accumulation rapide de neutrophiles dans le modèle inflammatoire et ceci peut expliquer, en partie, que ces cellules soient responsables des effets toxiques du dieldrine, de par l'hyperactivité des neutrophiles engendrée par le dieldrine.

Nos résultats ont donc permis de mieux caractériser les réponses biologiques des granulocytes aux contaminants environnementaux. Ils ont également montré l'importance d'étudier d'avantage les neutrophiles dans le domaine de l'immunotoxicologie ou autres

domaines connexes afin de déterminer l'implication de ces cellules dans les désordres inflammatoires induits par des composés chimiques. Finalement, nos résultats ont montré qu'il faut être prudent lors de l'extrapolation des données obtenues avec les HL-60 aux neutrophiles. Ces cellules possèdent des caractéristiques semblables aux neutrophiles, mais il faut se rappeler que cette lignée cellulaire ne remplacera jamais les neutrophiles humains, même pour des tests de criblage.

Bibliographie

ABBAS, A. K., A. H. Lichtman et J. S. Pober. 1997. Cellular and molecular immunology. 3^{e} édition. Montréal : W. B. Saunders Company. 494 p.

ARAI, Y., H. Muto, Y. Sano et K. Ito. 1998. « Food and food additives hypersensitivity in adult asthmatics. III. Adverse reaction to sulfites in adult asthmatics ». Arerugi. Japanese Journal of Allergology, vol. 47, p. 1163-1167.

ACOSTA, R., J. Granados, M. Mourelle, V. Perez-Alvarez et E. Quezada. 1989. « Sulfite sensitivity: relationship between sulfite plasma levels and bronchospasm: case report ». Annals of Allergy, vol. 62, p. 402-405.

AL-SHAMI, A. et P. H. Naccache. 1999. « Granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor-activated signaling pathways in human neutrophils ». Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 5333-5338.

BACHOWSKI, S., K. L. Kolaja, Y. Xu, C. A. Ketcham, D. E. Stevenson, E. F. Walborg Jr et J. E. Klaunig. 1997. « Role of oxydative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity ». Annals of Clinical and Laboratory Science, vol. 27, p. 196-209.

BACHOWSKI, S., Y. Xu, D. E. Stevenson, E. F. Walborg Jr et J. E. Klaunig. 1998. « Role of oxydative stress in the selective toxicity of dieldrin in the mouse liver ». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 150, p. 301-309.

BAGGIOLINI, M., B. Dewald et B. Moser B. 1997. « Human chemokines : an update » Annual Review of Immunology, vol. 15, p. 675-705.

BECK-SPEIER, I., H. Hinze et H. Holzer. 1985. « Effect of sulfite on the energy metabolism of mammalian tissues in correlation to sulfite oxidase activity ». Biochimica et Biophysica ACTA, vol. 841, p. 81-89.

BECK-SPEIER, I., J. G. Liese, B. H. Belohradsky et J. J. Godleski. 1993. « Sulfite stimulates NADPH oxidase of human neutrophils to produce active oxygen radicals via protein kinase C and Ca^{2+}/calmodulin pathways ». Free Radical Biology and Medicine, vol. 14, p. 661-668.

BECK-SPEIER, I., A.-G. Lenz et J. J. Godleski. 1994. « Resposes of human neutrophils to sulfite ». Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 41, p. 285-297.

BECK-SPEIER, I., N. Dayal et K. L. Maier. 1998a. « Pro-inflammatory response of alveolar macrophages induced by sulphite : studies with lucigenin-dependent chemiluminescence ». Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, vol. 13, p. 91-99.

BECK-SPEIER, I., N. Dayal, C. Denzlinger, C. Haberl et K. L. Maier. 1998b. « Sulfite induces release of lipid mediators by alveolar macrophages ». Zeitschrift Fur Naturforschung, vol. 53c, p. 264-272.

BENJAMINI, E., G. Sunshine et S. Leskowitz. 1996. Immunology. A short course. 3e édition. New Tork : Wiley-Liss, 484 p.

BERNIER, J., P. Hugo, K. Krzystyniak et M. Fournier. 1987. « Suppression of humoral immunity in inbred mice by dieldrin ». Toxicology Letters, vol. 35, p. 231-240.

BRANNEN, K. C., L. L. Devaud, J. Liu et J. M. Lauder. 1998. « Prenatal exposure to neurotoxicants dieldrin or lindane alters tert-butylbicyclophosphorothionate binding to GABA(A) receptors in fetal rat brainstem ». Developmental Neuroscience, vol. 20, p. 34-41.

BUSSING, A., K. Suzart et K. Schweizer. 1997. « Differences in the apoptosis-inducing properties of Viscum album L. extracts ». Anti-Cancer Drugs, vol.8, supplément 1, p. S9-S14.

BUTTKE, T. M. et P. A. Sandstrom. 1994. « Oxidative stress as a mediator of apoptosis ». Immunology Today, vol. 15, p. 7-10.

CALABRESE, E., C. Sacco, G. Moore et S. DiNardi. 1981. « Sulfite oxidase deficiency: a high risk factor in SO2, sulfite, and bisulfite toxicity ? ». Medical Hypotheses, vol. 7, p. 133-145.

CASSATELLA, M. A. 1999. « Production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils ». Chap. In D. I. Gabrilovich (ed.) The neutrophils : new outlook for old cells, p. 151-229. London : Imperial Colege Press

CHEN, L. C., H. F. Lam, D. Ainaworth, J. Guty et M. O. Amdur. 1987. « Functional changes in the lungs of guinea pigs exposed to sodium sulfite aerosols ». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 89 p. 1-8.

COLLINS, S. J., A. Bonder, R. Ting et R. C. Gallo. 1980. « Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells ». International Journal of Cancer, vol. 25, p.213-218.

COLOTTA, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani et A. Mantovani. 1992. « Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products ». Blood, vol. 80 : p. 2012-2020.

CONSTANTIN, D., K. Mehrotra, B. Jernström, A. Tomasi et P. Moldéus. 1994. « Alternative pathways of sulfite oxidation in human polymorphonuclear leukocytes ». Pharmacology and Toxicology, vol. 74, p. 136-140.

COXON, A., T. Tang et T. N. Mayadas. 1999. « Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor ». Journal of Experimental Medecine, vol. 190, p. 923-934.

CURNUTTE, J. T., S. H. Orkin et M. C. Dinauer. 1994. « Genetic disorders of phagocyte function ». Chap. *In* G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nieuwenhuis, Ph. W. Majerus et H. Varmus (eds.) The molecular basis of blood diseases, 2^{e} édition, Philadelphie : W. B. Saunders Company.

DAVIS, D. et S. Safe. 1990. « Immunosuppressive activities of polychlorinated biphenyls in C57BL/6N mice : Structure-activity relationships as Ah receptor agonists and partial antagonists ». Toxicology, vol. 63, p. 97-111.

DENISOV, IuN. et P. G. Tkachev. 1990. « Health aspects of sodium salts of sulfurous and sulfuric acids as environmental pollutants ». Gigiena I Sanitariia, vol. 9, p. 11-13.

EDAMATSU, T., Y. Q. Xiao, J. Tanabe, S. Mue et K. Ohuchi. 1997. « Induction of neutrophil chemotactic factor production by staurosporine in rat peritoneal neutrophils ». British Journal of Pharmacology, vol. 121, p. 1651-1658.

EDWARDS, S. W., F. Watson, R. MacLeod et J. M. Davies. 1990. « Receptor expression and oxidase activity in human neutrophils : regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and dependence upon protein biosynthesis ». Bioscience Reports, vol. 10, p. 393-401.

EDWARDS, S. W. 1994. Biochemistry and physiology of the neutrophil. New York : Cambridge University Press, 299 p.

EULER, G. L., D. E. Abbey, A. R. Magie et J. E. Hodgkin. 1987. « Chronic obstructive pulmonary disease symptom effects of long-term cumulative exposure to ambient levels of total suspended particulates and sulfur dioxide in California seventh-day adventist residents ». Archives of Environmental Health, vol. 42, p. 213-222.

FADOK, V. A., J. S. Savill, C. Haslett, D. L. Bratton, D. E. Doherty, P. A. Campbell et P. M. Henson. 1992. « Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells ». Journal of Immunology, vol. 149, p. 4029-4035.

FADOK, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott et P. M. Henson. 1998. « Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF ». Journal of Clinical Investigation, vol. 101, p. 890-898.

FOURNIER, M., G. Chevalier, D. Nadeau, B. Trottier et K. Krzystyniak. 1988. « Virus-pesticide interactions with murine cellular immunity after sublethal exposure to dieldrin and aminocarb ». Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 1, p. 103-118.

FRIDOVICH, I. et P. Handler. 1961. « Detection of free radicals generated during enzymatic oxidations by the initiation of sulfite oxidation ». Journal of Biological Chemistry, vol. 236, p. 1836-1840.

FURLONG, I. J., R. Ascaso, A. Lopez Rivas et M. K. Collins. 1997. « Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity ». Journal of Cell Science, vol. 110, p. 653-661.

GANEY, P. E., J. E. Sirois, M. Denison, J. P. Robinson et R. A. Roth. 1993. « Neutrophil function after exposure to polychlorinated biphenyls *in vitro* ». Environmental Health Perspectives, vol. 101, p. 430-434.

GIRARD, D., R. Paquin, P. H. Naccache et A. D. Beaulieu. 1996a. « Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, p. 412-419.

GIRARD, D., M. E. Paquet, R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1996b. « 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.

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, p. 147-153.

GLASSER, L. et R. Fiederlein. 1987. « Functional differenciation of normal human neutrophils ». Blood, vol. 69, p.937-944.

GOTTLIEB, R. A., H. A. Giesing, J. Y. Zhu, R. L. Engler et B. M. Babior. 1995. « Cell acidification in apoptosis : granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H^+-ATPase » Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 5965-5968.

GUNNISON, A. F. et D. W. Jacobsen. 1986. « Sulfite hypersensitivity. A critical review ». Critical Reviews in Toxicology, vol. 17, p. 185-214.

GUNNISON, A. F., A. Sellakumar, D. Currie et E. A. Snyder. 1987. « Distribution, metabolism and toxicity of inhaled sulfur dioxide and endogenously generated sulfite in the respiratory tract of normal and sulfite oxidase-deficient rats ». Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 21, p. 141-162.

HANKS, S. K. et T. Hunter. 1995. « Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification ». FASEB Journal, vol. 9, p. 576-596.

HART, S. P., J. A. Ross, K. Ross, C. Haslett et I. Dransfield. 2000. « Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils : implications for functional

downregulation and recognition by phagocytes. Cell Death and Differentiation, vol. 7, p. 493-503.

HEINECKE, J. W. 1999. « The respiratory burst of neutrophils : oxidative pathways for the initiation of tissue damage at sites of inflammation ». Chap. In D. I. Gabrilovich (ed.) The neutrophils : new outlook for old cells, p.31-57. London : Imperial Colege Press

HEWETT, J. A. et R. A. Roth. 1988. « Dieldrin activates rat neutrophils *in vitro* ». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 96, p. 269-278.

HEYDER, J., I. Beck-Speier B. Busch, P. Dirscherl, P. Heilmann, G. A. Ferron, M. Josten, E. Karg, W. G. Kreyling, A.-G. Lenz, K. L. Maier, U. Miaskowski, S. Platz, P. Reitmeir, H. Schulz, S. Takenaka et A. Ziesenis. 1999. « Health effects of sulfur-related environmental air pollution. I. Executive Summary ». Inhalation Toxicology, vol. 11, p. 343-359.

HEYWORTH, P. G., J. T. Curnutte et J. A. Badwey. 1999. « Structure and regulation of NADPH oxydase of phagocytic leukocytes ». Chap. In C. N. Serhan et P. A. Ward (eds) Molecular and cellular basis of inflammation, p. 165-191. New Jersey : Humana Press.

HOMBURG, C. H., M. de Haas, A. E. von dem Borne, A. J. Verhoeven, C. P. Reutelingsperger et D. Roos. 1995. « Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro ». Blood, vol. 85, p. 532-540.

HOYER, A. P., P. Grandjean, T. Jorgensen, J. W. Brock et H. B. Hartvig. 1998. « Organochlorine exposure and risk of breast cancer ». Lancet, vol. 352, p. 1816-1820.

HUGO, P., J. Bernier, K. Kzrystyniak, E. F. Potworowski et M. Fournier. 1988a. « Abrogation of graft-versus-host reaction by dieldrin in mice ». Toxicology Letters, vol. 41, p. 11-22.

HUGO, P., J. Bernier, K. Kzrystyniak et M. Fournier. 1988b. « Transient inhibition of mixed lymphocyte reactivity by dieldrin in mice ». Toxicology Letters, vol. 41, p. 1-9.

HUNTER, T. 1995. « Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling ». Cell, vol. 80, p. 225-236.

HURLEY, J. V. 1983. Termination of acute inflammation. I. Resolution. In Acute Inflammation. 2^{e} édition. London : Churchill Livingston, p. 109-117.

IARC WORKING GROUP. 1992. « Sulphur dioxide and some sulfites, bisulfites and metabisulfites ». IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, vol. 54, p. 131-188.

IWAI, K., T. Miyawaki, T. Takizawa, A. Konno, K. Ohta, A. Yachie, H. Seki et N. Taniguchi. 1994. « Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-

mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils ». Blood, vol. 84, p. 1201-1208.

JEWETT, A., W. R. Hume, H. Le, T. N. Huynh, Y. W. Han, G. Cheng et W. Shi. 2000. « Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, Fusobacterium nucleatum ». Infection and Immunity, vol. 68, p. 1893-1898.

JOLICOEUR, P., M. Fournier et K. Krzystyniak. 1988. « Suppression of microbicidal activity of peritoneal exudate by sublethal dieldrin exposure of outbred and inbred mice ». Pesticide Biochemistry and Physiology, vol. 31, p. 203-212.

JOY, R. M. 1982. « Mode of action of lindane, dieldrin and related insecticides in the central nervous system ». Neurobehavioral Toxicology and Teratology, vol. 4, p. 813-823.

KARIN, M. et T. Hunter. 1995. « Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus ». Current Biology, vol. 5, p.747-757.

KARLSSON, A., J. B. Nixon et L. C. McPhail. 2000. « Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways : dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 396-404.

KASAMA, T., R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick et S. L. Kunkel. 1997. « Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha ». Journal of Experimental Medecine, vol. 178, p. 63-72.

KLEIN, J. B., M. J. Rane, J. A. Scherzer, P. Y. Coxon, R. Kettritz, J. M. Mathiesen, A. Buridi et K. R. McLeish. 2000. « Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways ». Journal of Immunology, vol. 164, p. 4286-4291.

KNIGHTON, D. R., J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, N. H. Xuong, S. S. Taylor et J. M. Sowadski. 1991. « Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase ». Science, vol. 253, p. 414-420.

KOLAJA, K. L., D. E. Stevenson, J. T. Johnson, E. F. Walborg Jr et J. E. Klaunig. 1996. « Subchronic effects of dieldrin and phenobarbital on hepatic DNA synthesis in mice and rats ». Fundamental and Applied Toxicology, vol. 29, p. 219-228.

KOTHAKOTA, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Koths, D. J. Kwiatkowski et L. T. Williams. 1997. « Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis ». Science, vol. 278, p. 294-298.

KROEMER, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nature Medecine, vol. 3, p. 614-620.

KRZYSTYNIAK, K., P. Hugo, D. Flipo et M. Fournier. 1985. « Increased susceptibility to mouse hepatitis virus 3 of peritoneal macrophages exposed to dieldrin ». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 80, p. 397-408.

KRZYSTYNIAK, K., J. Bernier, P. Hugo et M. Fournier. 1986. « Suppression of of MHV3 virus-activated macrophages by dieldrin ». Biochemical Pharmacology, vol. 35, p. 2577-2586.

KRZYSTYNIAK, K., D. Flipo, S. Mansour et M. Fournier. 1989. « Suppression of avidin processing and presentation by mouse macrophages after sublethal exposure to dieldrin ». International Journal of Immunopharmacology, vol. 18, p. 157-166.

LEFF, J. A. et J. E. Repine. 1993. « Neutrophil-mediated tissue injury ». Chap. In J. S. Abramson et J. G. Wheeler (eds) The neutrophil, p. 229-262. New York : Oxford University Press.

LENNARTZ, M. R. 1999. « Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis ». International Journal of Biochemistry and Cell Biology, vol. 31, p. 415-430.

LI, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri et X. Wang. 1997. « Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade ». Cell, vol. 91, p. 479-484.

LILES, W. C., P. A. Keiner, J. A. Ledbetter, A. Aruffo et S. J. Klebannof. 1996. « Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes : Implications for the regulation of apoptosis of neutrophils ». Journal of Experimental Medecine, vol. 184, p. 429-440.

LINDAHL, M., P. Leanderson et C. Tagesson. 1998. « Novel aspect on metal fume fever : zinc stimulates oxygen radical formation in human neutrophils ». Human and Experimental Toxicology, vol. 17, p. 105-110.

LIPPMANN, M. 1985. « Airborn acidity : estimates of exposure and human health effects ». Environmental Health Perspectives, vol. 63, p. 63-70.

LOOSE, L. D., J. B. Silkworth, T. Charbonneau et F. Blumenstock. 1981. « Environmental chemical-induced macrophage dysfunction ». Environmental Health Perspectives, vol. 39, p. 79-91.

MALE, D. K. 1999. Immunologie. Aide-mémoire illustré. 2^{e} édition. Bruxelles : De Boeck Université. 130 p.

MARIEB, E. N. 1993. Anatomie et physiologie humaines. Montréal : Éditions du renouveau pédagogique. 1100 p.

MATUTE-BELLO, G., W. C. Liles, F. Radella II, K. P. Steinberg, J. T. Ruzinski, M. Jonas, E. Y. Chi, L. D. Hudson et T. R. Martin. 1997. « Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome ». American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 156, p. 1969-1977.

McDONALD, P. P., M. P. Russo, S. Ferrini et M. A. Cassatella. 1998. « Interleukin-15 (IL-15) induces NF-κB activation and IL-8 production in human neutrophils ». Blood, vol. 92, p. 4828-4835.

McKINNEY, J. D. et C. L. Waller. 1994. « Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues ». Environmental Health Perspectives, vol. 102, p. 290-297.

McPHAIL, L. C. et L. Harvath. 1993. Signal transduction in oxidative metabolism and chemotaxis. Chap. In J. S. Abramson et J. G. Wheeler (eds) The neutrophil, p. 63-107. New York : Oxford University Press.

MEAGHER, L. C., J. S. Savill, A. Baker, R. W. Fuller et C. Haslett. 1992. « Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2 ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 52, p. 269-273.

MESZAROS, A. J., J. S. Reichner et J. E. Albina. 2000. « Macrophage-induced neutrophil apoptosis ». Journal of Immunology, vol. 165, p. 435-441.

MITSUHASHI, H., Y. Nojima, T. Tanaka, K. Ueki, A. Maezawa, S. Yano et T. Naruse. 1998. « Sulfite is released by human neutrophils in response to stimulation with lipopolysaccharide ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, p. 595-599.

MIYAGI, T., K. M. Lam, L. F. Chuang et R. Y. Chuang. 1998. « Suppression of chemokine-induced chemotaxis of monkey neutrophils and monocytes by chlorinated hydrocarbon insecticides ». In Vivo, vol. 12, p. 441-446.

MOLD, C., T. W. Du Clos, S. Nakayama, K. M. Edwards et H. Gewurz. 1982. « C-reactive protein reactivity with complement and effects on phagocytosis ». Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 389, p.251-262.

MOULDING, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart et S. W. Edwards. 1998. « Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival ». Blood, vol. 92, p. 2495-2502

MURAO, S., M. A. Gemmell, M. F. Callaham, N. L. Anderson et E. Huberman. 1983. « Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-didydroxyvitamin D_3 and phorbol-12-myristate-13-acetate ». Cancer Research, vol. 43, p. 4989-4996.

MURRAY, J., J. A. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. Van Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett et E. Chilvers. 1997. « Regulation of neutrophil apoptosis by tumour necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro ». Blood, vol. 90, p. 2772-2783.

NARAYANAN, P. K., W. O. Carter, P. E. Ganey, R. A. Roth, S. L. Voytik-Harbin et J. P. Robinson. 1998. « Impairment of human neutrophil oxidative burst by polychlorinated biphenyls : inhibition of superoxide dismutase activity ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 63, p. 216-224.

PELMONT, J., 1995. Enzymes. Catalyseurs du monde vivant. Grenoble : Presses Universitaires de Grenoble. 1039 p.

PERLINGEIRO, R. C. R. et M. L. S. Queiroz. 1994. « Polymorphonuclear phagocytosis and killing in workers exposed to inorganic mercury ». International Journal of Immunopharmacology., vol. 16, p. 1011-1017.

PERLINGEIRO, R. C. R. et M. L. S. Queiroz. 1995. « Measurement of the respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from mercury-exposed workers ». Human and Experimental Toxicology, vol. 14, p. 281-286.

PONGRACZ, J. et J. M. Lord. 1998. « Superoxide production in human neutrophils: evidence for signal redundancy and the involvement of more than one PKC isoenzyme class ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 247, p. 624-629.

QUEIROZ, M. L. S., C. Bincoletto, R. C. R. Perlingeiro, C. A. Souza et H. Toledo. 1997. « Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to hexachlorobenzene ». Human and Experimental Toxicology, vol. 16, p. 322-326.

RAINBIRD, M. A., D. Macmillan et E. N. Meeusen. 1998. « Eosinophil-mediated killing of Haemonchus contortus larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5 ». Parasite Immunology, vol. 20, p. 93-103.

REED, J. C. 1994. « Bcl-2 and the regulation of programmed cell death ». Journal of Cell Biology, vol. 124, p. 1-6.

REIST, M., P. Jenner et B. Halliwell. 1998. « Sulphite enhances peroxynitrite-dependent alpha1 antiproteinase inactivation. A mechanism of lung injury by sulphur dioxide ? » FEBS Letters, vol. 423, p. 231-234.

RÉVILLARD, J.-P. 1998. Immunologie. 3^{e} édition. Bruxelles : De Boeck Université. 481 p.

BOBERTS, P. J., A. Khwaja, A. K. Lie, A. Bybee, K. Yong, N. S. Thomas et D. C. Linch. 1994. « Differentiation-linked changes in tyrosine phosphorylation, functional activity, and gene expression downstream from the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor » Blood, vol. 84, p. 1064-1073.

ROITT, I. M., J. Brostoff et D. K. Male. 1994. Immunologie. 3^{e} édition. Bruxelles : De Boeck Université. 400 p.

SABOORI, A. M. et D. S. Newcombe. 1992. « Environmental chemicals with immunotoxic properties ». In Newcombe, DS, Rose, NR et Bloom, JC (éditeurs) Clinical Immunotoxicology. New York : Raven Press Ltd, p 365-499.

SANTOS-BENEIT, A. M. et F. Mollinedo. 2000. « Expression of genes involved in initiation, regulation and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation oh HL-60 cells ». Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 712-724.

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 ». Journal of Clinical Investigation, vol. 83, p. 865-875.

SAVILL, J. S., I. Dransfield, N. Hogg et C. Haslett. 1990. « Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis ». Nature, vol. 343, p. 170-173.

SAVILL, J. S., N. Hogg, Y. Ren et C. Haslett. 1992. « Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis ». Journal of Clinical Investigation, vol. 90, p. 1513-1522.

SAVOIE, A., V. Lavastre, M. Pelletier, T. Hajto, K. Hostanka et D. Girard. 2000. « Activation of human neutrophils by the plant lectin Viscum album agglutinin-I (VAA-I) : Modulation of de novo protein synthesis and evidence that induction of apoptosis is caspase-dependent. Journal of Leukocyte Biology (accepté pour publication).

SHAIN, W., B. Bush et R. Seegal. 1991. « Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls : Structure-activity relationship of individual congeners ». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 111, p. 33-42.

SHIRAKAWA, F. et S. B. Mizel. 1989. « In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C ». Molecular and Cellular Biology, vol. 9, p. 2424-2430.

SHORE, S. A., S. T. Kariya, K. Anderson, W. Skornik, H. A. Feldman, J. Pennington, J. Godleski et J. M. Drazen. 1987. « Sulfur-dioxide-induced bronchitis in dogs-effects on aiway responsiveness to inhaled and intravenously adminestered methacholine ». American Review of Respiratory Disease, vol. 135, p. 840-847.

STRASSER, A., D. C. S. Huang et D. L. Vaux. 1997. « The role of bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of deflects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy ». Biochimica et Biophysica ACTA, vol. 1333, p. F151-F178.

TAKEDA, Y., H. Watanabe, S. Yonehara, T. Yamashita, S. Saito et F. Sendo. 1993. « Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha ». International Immunology, vol. 5, p. 691-694.

TAUB, D. D., A. R. Lloyd, K. Conlon, J. M. Wang, J. R. Ortaldo, A. Harada, K. Matsushima, D. J. Kelvin et J. J. Oppenheim. 1993. « Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells ». Journal of Experimental Medecine, vol. 177, p. 1809-1814.

TIKU, K., M. L. Tiku et J. L. Skosey. 1986. « Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils ». Journal of Immunology, vol. 136, p. 3677-3685.

TITHOF, P. K., M. L. Contreras et P. E. Ganey. 1995. « Aroclor 1242 stimulates the production of inositol phosphates in polymorphonuclear neutrophils ». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 131, p. 136-143.

TITHOF, P. K., E. Schiamberg, M. Peters-Golden et P. E. Ganey. 1996. « Phospholipase A_2 is involved in the mechanism of activation of neutrophils by polychlorinated biphenyls ». Environmental Health Perspectives, vol. 104, p. 52-58.

TITHOF, P. K., S. Watts et P. E. Ganey. 1997. « Protein tyrosine kinase involvement in the production of superoxide anion by neutrophils exposed to aroclor 1242, a mixture of polychlorinated biphenyls ». Biochemical Pharmacology, vol. 53, p. 1833-1842.

TITHOF, P. K., M. Peters-Golden et P. E. Ganey. 1998. « Distinct phospholipases A_2 regulate the release of arachidonic acid for eicosanoid production and superoxide anion generation in neutrophils ». Journal of Immunology, vol. 160, p. 953-960.

TITHOF, P. K., J. Olivero, K. Ruehle et P. E. Ganey. 2000. « Activation of neutrophil calcium-dependent and –independent phospholipases A_2 by organochlorine compounds ». Toxicological Sciences, vol. 53, p. 40-47.

TOREN, K., S. Hagberg et H. Westberg. 1996. « Health effects of working in pulp and paper mills: exposure, obstructive airways diseases, hypersensitivity reactions, and cardiovascular diseases ». American Journal of Industrial Medicine, vol. 29, p. 111-122.

TROWBRIDGE, H. O. et R. C. Emling. 1997. Inflammation. A review of the process. 5^{e} édition. Chicago : Quintessence Publishing Co, Inc. 236 p.

TRYPHONAS, H., M. I. Luster, G. Schiffman, L. L. Dawson, M. Hodgen, D. Germolec, S. Hayward, F. Bryce, J. C. K. Loo, F. Mandy et D. L. Arnold. 1991. « Effect of chronic exposure of PCB (Aroclor 1254) on specific and specific immune parameters in the Rhesus (Macaca mulatta) monkey ». Fundamental and Applied Toxicology, vol. 16, p. 773-786.

URIELI-SHOVAL, S., R. P. Linke et Y. Matzner. 2000. « Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states ». Current Opinions in Hematology, vol. 7, p. 64-69.

VOCCIA, I., B. Blakley, P. Brousseau et M. Fournier. 1999. « Immunotoxicity of pesticides : a review ». Toxicology and Industrial Health, vol. 15, p. 119-132.

WATSON, R. G. W., O. D. Rostein, J. Parodo, R. Bitar, D. Hackam et J. C. Marshall. 1997. « Granulocytic differentiation of HL-60 cells results in spontaneous apoptosis mediated by increased caspase expression ». FEBS Letters, vol. 412, p.603-609.

WHYTE, M. K. B., L. Meagher, J. MacDermot et C. Haslett. 1993. « Impairment of function in ageing neutrophils is associated with apoptosis ». Journal of Immunology, vol. 150, p. 5124-5134.

WILLIAMS, D. P., M. Pirmohamed, D. J. Naisbitt, J. P. Uetrecht et B. K. Park. 2000. « Induction of metabolism-dependent and -independent neutrophil apoptosis by clozapine ». Molecular Pharmacology, vol. 58, p. 207-216.

WYLLIE, A. H. 1985. « The biology of cell death in tumours ». Anticancer Research, vol. 5, p. 131-136.

WRIGHT, W., Y. G. Zhang, C. M. Salome et A. J. Woolcock. 1990. « Effect of inhaled preservatives on asthmatic subjects. I. Sodium metabisulfite ». American Review of Respiratory Disease, vol. 141, p. 1400-1404.

YANG, W. H. et E. C. Purchase. 1985. « Adverse reactions to sulfites ». Canadian Medical Association Journal, vol. 133, p. 865-867, 880.

Annexe

Cette section présente les résumés en anglais de trois articles où j'ai participé à la réalisation de certaines expériences ainsi qu'à la rédaction du manuscrit lors de ma maîtrise. L'article intitulé « Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): Modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved for induction of apoptosis » a été accepté pour publication dans la revue *Journal of Leukocyte Biology*. L'article « Activation of human neutrophils by technical toxaphene » a été accepté pour pubication dans *Clinical Immunology* alors que l'article intitulé « Modulation of interleukin-15 (IL-15)-induced neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* Agglutinin-I (VAA-I) » est soumis à la revue *Biochemical Journal*.

Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): Modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved for induction of apoptosis[π].

Anik Savoie[1], Valérie Lavastre[1], Martin Pelletier[1], Tibor Hajto[2], Katarina Hostanska[2], Denis Girard[1*]

[1]*From INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, Université du Québec, PQ, Canada.* [2]*From Department of Internal Medicine, University Hospital Zürich, Switzerland.*

[π]This study was partly supported by Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). DG is a Scholar from FRSQ, AS holds a M.Sc Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) award, and MP holds a M.Sc award from FCAR/FRSQ-Santé.

KEY WORDS: signal transduction inhibitors, cytology, flow cytometry, gelsolin

[*]Correspondance to: Dr Denis Girard, INRS/Institut Armand-Frappier/Santé humaine, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire (QUE), Canada, H9R 1G6.
Tel/Fax: (514) 630-8847/8850.

e-mail: Denis.Girard@INRS-Sante.uquebec.ca

RUNNING TITLE: Induction of neutrophil apoptosis by the plant lectin VAA-I

ABSTRACT

The plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) was recently found to modulate protein synthesis and to induce apoptosis in various cells of immune origin. In this study, we found that VAA-I induces *de novo* protein synthesis of metabolically [^{35}S]-labeled human neutrophils when used at low concentrations (<100 ng/ml) but acts as an inhibitor at higher concentrations. Using both flow cytometry (FITC-Annexin-V/PI labeling) and cytology (Diff-Quick staining) approaches, we found that VAA-I could not modulate neutrophil apoptosis at low concentrations but could induce it in <98% of cells at 500 and 1000 ng/ml. VAA-I was also found to reverse the delaying effect of GM-CSF on neutrophil apoptosis and to inhibit GM-CSF-induced *de novo* protein synthesis. In contrast to GM-CSF, VAA-I does not induce tyrosine phosphorylation by itself and does not alter the GM-CSF-induced response. Among the inhibitors genistein, pertussis toxin, staurosporine, H7, Calphostin C, manoalide, BpB, quinacrine HA-1077, and z-VAD-FMK, only the latter (inhibitor of caspases-1,-3,-4, and -7) was found to inhibit VAA-I-induced neutrophil apoptosis as the percentage of apoptotic cells decrease from 98 ± 1.3 to 54 ± 3.2% (means ± SEM, n=4). Furthermore, we confirm that caspases are involved in VAA-I-induced neutrophil apoptosis as we have observed the fragmentation of the cytoskeletal gelsolin protein that is known to be caspase-3-dependent. Such degradation was reversed by the z-VAD-FMK inhibitor. We conclude that induction of neutrophil apoptosis by VAA-I is a caspase-dependent mechanism that does not involve tyrosine phosphorylation events, G-proteins, PKCs, and PLA_2. In addition, we conclude that at least caspase-3 is involved. Correlation between VAA-I-induced neutrophil apoptosis and VAA-I-induced inhibition of *de novo* protein synthesis is discussed.

Activation of human neutrophils by technical toxaphene

Marc Gauthier[1], Charles J. Roberge[2], Martin Pelletier[1], Philippe A. Tessier[3], and Denis Girard[1*]

From [1]INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, Université du Québec, [2]Association du Cancer de l'Est du Québec (ACEQ), [3]Centre de Recherche en Infectiologie, CHUQ, Pavillon CHUL, Université Laval, PQ, Canada.

[*]Corresponding author: Denis Girard, PhD
INRS-Institut Aramand-Frappier/Santé Humaine
245 boul Hymus, Pointe-Claire (PQ),
Canada, H9R 1G6
Tel/fax: (514) 630-8847/8850
E mail: **Denis.Girard@INRS-Sante.Uquebec.ca**

Running title: Toxaphene induces neutrophil functions

Key words: Inflammation, neutrophils, organochlorine, phagocytosis, apoptosis, PKCs

ABSTRACT

Toxaphene is a persistent organic pollutant (POP) known to be composed of numerous congeners. Toxaphene technical mixture applied as a pesticide consists of over 800 congeners. Among these, T_2 and T_{12} are the two environmentally prevalent forms found in human. Although Toxaphene is known to exert some toxic effects including potential pro-inflammatory properties, little is known concerning its action on cells of the human immune system, especially neutrophils. In the present study, we found that Toxaphene was not necrotic for human neutrophils incubated for up to 24 h with concentrations ranging from 0.1 to 50 μg/ml. Toxaphene was found to induce neutrophil superoxide production (O_2^-) in a concentration-dependent manner. The potency as well as the kinetics of Toxaphene-induced O_2^- by neutrophils were found to be similar to that of the classical neutrophil agonists phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Furthermore, the use of various transduction signal inhibitors (genistein, *Pertussis toxin*, staurosporine, H-7, and HA-1077), suggests that, as for PMA, toxaphene mediates its effect primarily via PKCs and, to a lesser extend, via tyrosine kinases. In this respect, staurosporine, H-7, and genisteine were found to inhibit toxaphene- and PMA-induced O_2^- production by 52%, 72%, and 31%, and by 63%, 62%, and 23%, respectively. Toxaphene was also found to significantly enhance neutrophil phagocytosis of opsonized-sheep red blood cells and to induce neutrophil apoptosis. The induction of neutrophil apoptosis was paralleled with a decrease in CD16 expression. T_2 and T_{12}, the two prevalent congeners found in human, were also found to significantly increase the O_2^- production in neutrophils at a concentration of 5 μg/ml. We conclude that neutrophils are important targets for toxaphene as this POP can activate O_2^- production by a PKC- and tyrosine kinase-dependent mechanism, induce phagocytosis, and accelerate the apoptotic rate. This is the first study that focuses on toxaphene/human neutrophil interactions.

Modulation of interleukin-15 (IL-15)-induced neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* Agglutinin-I (VAA-I).

Anik Savoie[*], Valérie Lavastre[*], Martin Pelletier[*], Reinhard Saller[†] Katarina Hostanska[†], and Denis Girard[*‡]

[*]*From INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, Université du Québec, Pointe-Claire, PQ, Canada.* [†]*From Department of Internal Medicine, University Hospital Zürich, Switzerland.*

[‡]Correspondance to: Dr Denis Girard, INRS/Institut Armand-Frappier/Santé humaine, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6.

Tel/Fax: (514) 630-8847/8850.

e-mail: Denis.Girard@INRS-Sante.Uquebec.ca

Running title: Activation of neutrophils with VAA-I and interleukin-15

Suggested sections: Receptors and signal transduction or Cell biology and development

ABSTRACT

Viscum album Agglutinin-I (VAA-I) is a plant lectin with therapeutic properties known to modulate neutrophil functions. In this report, we found that VAA-I does not induce phosphorylation events by itself (tyrosine-, threonine-, or serine-phosphorylations) in human neutrophils. This was not due to an unresponsiveness state of the cells since both granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-15 were found to induce phosphorylation events. VAA-I was found to enhance phagocytosis when used alone but did not alter IL-15-induced phagocytosis. No additive or synergistic effect were observed on the *de novo* protein synthesis when cells were incubated with both 250 ng/ml IL-15 and a low concentration of VAA-I (1-100 ng/ml), a condition known to induce this biological response when both agonists are used separately. In contrast, when cells were incubated with both IL-15 or high concentration of VAA-I (>500 ng/ml), we observed that VAA-I inhibits the IL-15-induced *de novo* protein synthesis. A high concentration of VAA-I was found to inhibit the IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis as assessed by cytology, FITC-annexin-V binding, and by fragmentation of the cytoskeletal protein gelsolin. The use of 50 μM z-VAD-FMK (caspases-1,-3,-4,-7 inhibitor) was found to reverse the degradation of gelsolin induced by VAA-I, whether cells were co-incubated with or without IL-15. In addition, we report that the specific Jak-2 inhibitor, tyrphostin B42 (AG490) can reverse the IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis but does not alter the VAA-I-induced apoptosis after 21h. We conclude that VAA-I can be used to modulate some, but not all, IL-15-induced neutrophil responses, by a mechanism that is independent of phosphorylation events.