

Université de Montréal

**La régulation des fonctions des neutrophiles
par l'ADN bactérien**

par

Levente JÓZSEF

Département des Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences Biomédicales

Décembre, 2005

© Levente JÓZSEF, 2005



W
4
U58
2006
V.134



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**La régulation des fonctions des neutrophiles
par l'ADN bactérien**

présentée par :
Levente JÓZSEF

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Dindial Ramotar, président-rapporteur
Dr. János G. Filep, directeur de recherche
Dr. Yahye Merhi, membre du jury
Dr. Denis Girard, examinateur externe
Dr. Francois Robert , représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La puissance destructive des neutrophiles activés est bien connue, avec les dommages tissulaires dus aux neutrophiles contribuant de manière significative à la pathogénie de nombreuses maladies. Les études rapportées dans cette thèse sont concentrées sur la régulation des fonctions des neutrophiles par l'ADN bactérien, avec une attention particulière sur la compréhension des mécanismes moléculaires fondamentaux, ainsi que de nouvelles stratégies anti-inflammatoires visant la signalisation du peroxynitrite (ONOO⁻) dans les neutrophiles activés.

Durant l'inflammation, le fonctionnement efficace des neutrophiles est dépendant de la prolongation de leur survie et leur recrutement aux tissus enflammés. L'ADN bactérien, contenant des motifs CpG non-méthylés (ADN-CpG), émerge en tant que régulateur important des fonctions des neutrophiles. Ici, nous rapportons que les neutrophiles humains expriment le TLR-9 par lequel l'ADN-CpG, mais non l'ADN de mammifère ou l'ADN bactérien méthylé, retarde l'apoptose constitutive des neutrophiles et induit la production d'IL-8, des événements clés régulant la destinée et le trafic des leucocytes lors de l'inflammation. La maturation endosomale de l'ADN-CpG est requise pour initier la signalisation du récepteur. L'inhibition de l'apoptose des neutrophiles par l'ADN-CpG est médiée par l'activation concourante des voies de signalisation ERK et AKT, menant à la phosphorylation de BAD sur la Ser112 et Ser136, respectivement, et à la prévention de la diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-3. L'ADN bactérien prolonge la survie des neutrophiles *in vitro* et *ex vivo* en atténuant l'apoptose spontanée. L'ADN-CpG évoque également la sécrétion de l'IL-8

des neutrophiles via l'augmentation concomitante des niveaux intracellulaires de superoxyde et de NO, menant à la formation accrue d'ONOO⁻, et par conséquent à l'accumulation nucléaire de c-Fos et de NF-κB. Ces résultats indiquent que l'ONOO⁻ peut fonctionner en tant que signal intracellulaire pour la production de cytokines proinflammatoires, comme l'IL-8 dans les neutrophiles humains. Confirmant ces résultats, les composés contenant du sélénium, l'ebesen, la sélénométhionine, et la sélélocystéine, atténuent efficacement l'expression du gène d'IL-8 et la production de la protéine dans les neutrophiles induits par l'ONOO⁻ exogène et l'ONOO⁻ formé de façon endogène. Les actions inhibitrices des molécules contenant du sélénium sont dépendantes de la concentration.

Nos études indiquent que les motifs CpG nonméthylés de l'ADN bactérien favorisent la survie des neutrophile et leur recrutement en supprimant leur machinerie apoptotique exprimée constitutivement et en induisant la production d'IL-8 par l'intermédiaire de la signalisation de l'ONOO⁻. Par conséquent l'ADN-CpG contribue à la prolongation et à l'amplification de l'inflammation. Nos études suggèrent également que l'inhibition de la signalisation de l'ONOO⁻ avec les molécules contenant du sélénium pourrait représenter une approche nouvelle pour contrer les conditions pathologiques liées au trafic inadéquat des leucocytes.

MOTS-CLÉS

Immunité innée, inflammation, neutrophiles, apoptose, cytokines, stress peroxydatif

ABSTRACT

The destructive power of activated neutrophils is well recognized, with neutrophil-mediated tissue injury contributing significantly to the pathogenesis of numerous diseases. The studies reported in this thesis are focused on the regulation of neutrophil functions by bacterial DNA, with special emphasis on our current understanding on the underlying molecular mechanisms, as well as emerging anti-inflammatory strategies targeting peroxynitrite (ONOO⁻) signaling in activated neutrophils.

During inflammation, effective neutrophil functioning is contingent upon prolonged survival and trafficking to inflamed tissues. Bacterial DNA, containing unmethylated CpG motifs (CpG-DNA) is emerging as an important regulator of neutrophil functions. Here, we report that human neutrophils express TLR-9 through which CpG-DNA, but not mammalian DNA or methylated bacterial DNA, can delay constitutive neutrophil apoptosis and induce IL-8 production, key events in regulating the fate and trafficking of leukocytes in inflammation. Endosomal processing of CpG-DNA is prerequisite for initiating receptor signaling. CpG-DNA suppression of neutrophil apoptosis is mediated through the concurrent activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathways, leading to phosphorylation of BAD at Ser112 and Ser136, respectively, and to prevention of decreases in mitochondrial transmembrane potential, cytochrome c release and caspase-3 activation. Bacterial DNA prolonged neutrophil survival by suppressing spontaneous apoptosis both in vitro and ex vivo. CpG-DNA also evoked IL-8 release from neutrophils by concomitant increases in intracellular superoxide

and NO levels, leading to enhanced ONOO⁻ formation, and consequently to nuclear accumulation of c-Fos and NF-κB. These results indicate that ONOO⁻ may function as an intracellular signal for production of proinflammatory cytokines, such as IL-8 in human neutrophils. Consistent with these findings, selenium-containing compounds, ebselen, selenomethionine, and selenocysteine, effectively attenuated IL-8 gene and protein expression by neutrophils evoked by both exogenous authentic ONOO⁻ and endogenously formed ONOO⁻. The inhibitory actions of selenium-containing molecules were concentration-dependent.

Our studies indicate that unmethylated CpG motifs in bacterial DNA promote neutrophil survival and trafficking by suppressing the constitutively expressed apoptotic machinery and by inducing IL-8 release via ONOO⁻ signaling. Therefore CpG-DNA contributes to prolongation and amplification of inflammation. Our studies also suggest that targeting ONOO⁻ signaling with selenium-containing molecules may represent a novel approach to counter pathological conditions associated with inappropriate leukocyte trafficking.

KEY WORDS

Innate immunity, inflammation, neutrophils, apoptosis, cytokines, peroxidative stress

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
MOTS-CLÉS	II
ABSTRACT	III
KEY WORDS	IV
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
I. REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1. AVANT-PROPOS	1
2. LES NEUTROPHILES	3
2.1 LE RECRUTEMENT DES NEUTROPHILES AU SITE ENFLAMMÉ	4
2.1.1 <i>Recrutement et roulement sur l'endothélium</i>	6
2.1.2 <i>L'adhésion ferme</i>	7
2.1.3 <i>Extravasation</i>	8
2.1.4 <i>Migration au site enflammé</i>	8
2.2 IDENTIFICATION DU PATHOGÈNE	9
2.2.1 <i>Les récepteurs Toll-like</i>	10
2.2.3 <i>L'ADN bactérien</i>	14
2.2.4 <i>La mise à disposition de l'ADN bactérien</i>	17
2.2.5 <i>Le récepteur TLR9</i>	18
2.2.6 <i>L'ADN bactérien et les neutrophiles</i>	19
2.3 LA SYNTHÈSE DE CYTOKINES	21
2.3.1 <i>L'interleukine-8</i>	22
2.3.2 <i>La structure de l'IL-8</i>	22
2.3.3 <i>L'activité de l'interleukine-8</i>	23
2.3.4 <i>La régulation du gène IL-8</i>	24
2.3.5 <i>Le facteur de transcription NF-κB</i>	26
2.3.6 <i>Le facteur de transcription AP-1</i>	27

2.4 LE PEROXYNITRITE	28
2.4.1 <i>La réactivité du peroxynitrite</i>	29
2.4.2 <i>Les réactions du peroxynitrite avec les protéines</i>	31
2.4.3 <i>Les réactions avec des centres métalliques</i>	31
2.4.4 <i>Les réactions avec des acides aminés</i>	33
2.4.5 <i>Les acides aminés contenant du sélénium</i>	35
2.4.6 <i>La nitrotyrosine</i>	36
2.4.7 <i>Le peroxynitrite, une molécule de signalisation intracellulaire</i>	38
2.5 ACTIVITÉ ANTI-BACTÉRIENNE	39
2.5.1 <i>La phagocytose</i>	40
2.5.2 <i>L'oxydase NADPH et les espèces réactives de l'oxygène</i>	42
2.5.3 <i>Les granules et substances anti-microbiennes</i>	44
2.6 LE PROLONGEMENT DE LA SURVIE DES NEUTROPHILES	46
2.6.1 <i>Les changements morphologiques et fonctionnels</i>	47
2.6.2 <i>La régulation de l'apoptose et de la survie des neutrophiles</i>	47
2.6.3 <i>Les caspases</i>	49
2.6.4 <i>Les homologues pro-apoptotiques de Bcl-2</i>	50
2.6.5 <i>Les homologues anti-apoptotiques de Bcl-2</i>	52
2.6.6 <i>Les facteurs dérivés de la mitochondrie</i>	53
2.6.7 <i>Les voies de signalisation régulant la survie des neutrophiles</i>	55
2.7 LA PHAGOCYTOSE DES CELLULES APOPTOTIQUES	58
2.7.1 <i>Altérations de la surface des cellules apoptotiques</i>	58
2.7.2 <i>Reconnaissance des cellules apoptotiques</i>	60
2.7.3 <i>Conséquences de la phagocytose des cellules apoptotiques</i>	62
II. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	64

III. RÉSULTATS	65
3.1 CHAPITRE I (ARTICLE 1)	65
3.1.1 <i>Contribution des auteurs</i>	66
3.1.2 <i>Introduction générale du chapitre I (article 1)</i>	67
3.1.3 <i>CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes</i>	68
3.1.3.1 Abstract	69
3.1.3.2 Introduction	70
3.1.3.3 Materials and Methods.....	72
3.1.3.4 Results.....	77
3.1.3.5 Discussion	83
3.1.3.6 Acknowledgments.....	90
3.1.3.7 References	90
3.1.3.8 Figures.....	99
3.2 CHAPITRE II (ARTICLE 2)	111
3.2.1 <i>Contribution des auteurs</i>	112
3.2.2 <i>Introduction générale du chapitre II (article 2)</i>	113
3.2.3 <i>Activation of Toll-like Receptor-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils</i>	114
3.2.3.1 Abstract	115
3.2.3.2 Introduction	116
3.2.3.3 Materials and Methods	117
3.2.3.4 Results.....	122
3.2.3.5 Discussion	126
3.2.3.6 References	132
3.2.3.7 Figures	141

3.3 CHAPITRE III (ARTICLE 3)	150
3.3.1 <i>Contribution des auteurs</i>	151
3.3.2 <i>Introduction générale du chapitre III (article 3)</i>	152
3.3.3 <i>Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-κB and AP-1 activation, and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes</i>	153
3.3.3.1 Abstract.....	154
3.3.3.2 Introduction.....	155
3.3.3.3 Materials and Methods.....	156
3.3.3.4 Results.....	160
3.3.3.5 Discussion.....	163
3.3.3.6 References.....	168
3.3.3.7 Figures.....	174
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE	182
V. CONCLUSIONS	207
VI. DIRECTIONS FUTURES	209
VII. LISTE DE PUBLICATIONS 2002-2006	211
VII. BIBLIOGRAPHIE	212

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

Figure 1. Représentation schématique de la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire.	5
Tableau I. Les récepteurs de l'immunité innée	10
Tableau II. Les récepteurs Toll-like et leurs ligands.....	12
Figure 2. Les voies de signalisation des TLRs.....	13
Figure 3. Régulation du promoteur IL-8.....	25
Figure 4. Vue d'ensemble des processus réactionnels du peroxy-nitrite.....	30
Figure 5. L'activation de l'oxydase NADPH.....	43
Figure 6. La voie intrinsèque de l'apoptose.....	49
Figure 7: Rôles possibles de MAPKs et de PI3K dans l'apoptose et la survie des neutrophiles.....	56
Figure 8. La synapse de l'internalisation de cellules apoptotiques.....	59

RÉSULTATS

Chapitre I (article 1)

Figure 1. TLR-9 expression on human neutrophils.	99
Figure 2. CpG-DNA delays apoptosis of human neutrophils.	100
Figure 3. Inhibition of endosomal acidification blocks the anti-apoptotic action of CpG-DNA.	102
Figure 4. CpG-DNA delays neutrophil apoptosis by activation of the ERK and Akt signaling pathways.....	103
Figure 5. CpG-DNA attenuates disruption of $\Delta\Psi_m$, cytochrome c release and activation of caspase-3.....	105
Figure 6. Effects of pan-caspase inhibition on neutrophil apoptosis.	107
Figure 7. Effects of CpG-DNA on hemodynamic parameters and blood cells in conscious rats.....	108
Figure 8. CpG-DNA delays apoptosis of rat neutrophils ex vivo.....	109

Figure 9. Proposed mechanism for the apoptosis delaying action of bacterial DNA in human neutrophils.....	110
---	-----

Chapitre II (article 2)

Figure 1. TLR-9 expression in human neutrophils.	141
Figure 2. CpG-DNA stimulation of IL-8, IL-6 and TNF release.....	142
Figure 3. Inhibition of endosomal acidification and NO synthesis blocks CpG-DNA-induced IL-8 release.....	143
Figure 4. CpG-DNA-induced IL-8 mRNA expression and its inhibition by L-NAME.	144
Figure 5. CpG-DNA induces formation of superoxide, NO and ONOO ⁻ in PMN...	145
Figure 6. Effect of CpG-DNA on expression of NOS isoforms.	146
Figure 7. CpG-DNA stimulates nuclear accumulation of NF- κ B and c-Fos.	147
Figure 8. PDTC and gliotoxin suppress CpG-DNA-induced nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and IL-8 release.	149

Chapitre III (article 3)

Figure 1. Selenium-containing compounds attenuated peroxynitrite-induced IL-8 production.	174
Figure 2. Selenium-containing compounds inhibited LPS-stimulated IL-8 production.	175
Figure 3. Selenium-containing compounds inhibited ONOO ⁻ -stimulated IL-8 mRNA expression.....	176
Figure 4. Selenium-containing compounds inhibited LPS-stimulated IL-8 mRNA expression.....	177
Figure 5. Selenium-containing compounds inhibited LPS-induced oxidation of DHR 123 to rhodamine in human leukocytes.	178
Figure 6. Selenium-containing compounds inhibited peroxynitrite-induced nuclear accumulation of NF- κ B and AP-1 in PMN and mononuclear leukocytes.	179
Figure 7. Selenium-containing compounds inhibited LPS-induced nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and AP-1/c-Fos in PMN and mononuclear leukocytes.....	181

DISCUSSION

Figure 1. Mécanisme proposé pour l'action anti-apoptotique de l'ADN bactérien dans les neutrophiles humains.....	189
Figure 2. Mécanisme proposé pour l'induction de la signalisation peroxy-nitrite-dépendante menant à l'expression de l'IL-8 en réponse à l'ADN bactérien chez les neutrophiles humains.....	196
Figure 3. Représentation schématique de l'inhibition de la signalisation du peroxy-nitrite dans les neutrophiles humains.....	203
Figure 4. Liens proposés entre l'ADN bactérien, les neutrophiles et les maladies inflammatoires.	206

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN-CpG	ADN contenant des motifs CpG non-méthylés
AKT	protéine kinase B
AP-1	protéine activatrice-1
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATL	lipoxines induites par l'aspirine
ATP	Adénosine triphosphate
BAD	protéine de la mort associée à la famille Bcl-2
Bcl	lymphome de cellule B
BPI	protéine bactéricide accroissant la perméabilité
C5a	composante 5a du complément
cDNA	Acide deoxyribonucléique complémentaire
CGD	maladie granulomateuse chronique
CO ₂	dioxyde de carbone
CO ₃ ⁻	radical carbonate
CpG	cytosine-guanosine
CRP	protéine C-réactive
DHR 123	dihydrorhodamine 123
DISC	complexe de signalisation induisant la mort
EGF	facteur de croissance épidermique
ERK	kinase régulé par un signal extracellulaire
ESL1	ligand 1 de la E-selectine
FcγR	récepteur Fcγ
fMLP	formyl de methioninyl-leucyl-phénylalanine
GADD	arrêt de croissance et dommage d'ADN
GM-CSF	facteur stimulant les colonies granulocyte/macrophage
GTP	guanidine triphosphate
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène

HOCl	acide hypochlorique
IAP	protéines inhibitrices de l'apoptose
ICAM-1	molécule d'adhésion intercellulaire-1
Ig-CAM	molécule d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines
IgG	immunoglobulin G
IKK	kinase d'I- κ B
IL	interleukine
IL-1Ra	antagoniste du récepteur d'IL-1
IL-8R	récepteur d'IL-8
IP-10	protéine interféron inductible 10
IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
I- κ B	inhibiteur de la protéine κ B
JAM	molécule d'adhésion jonctionnelle
JNK	C-jun kinase
LPS	lipopolysaccharide
LRR	répétitions riches en leucine
LX	lipoxine
Mac-1	CD11b/CD18
Mcl-1	leucémie de cellule myéloïde-1
mCRP	protéine C-réactive monomérique/modifiée
MIP-1	protéine inflammatoire de macrophage-1
MPO	myeloperoxydase
NADH	dinucléotide adénine nicotinamide
NADPH	forme réduite du phosphate dinucléotide adénine nicotinamide
NF- κ B	facteur nucléaire κ B
NO	oxyde nitrique
NO ₂	dioxyde d'azote
NO ₃ ⁻	nitrate
NOS	synthase d'oxyde nitrique
O ₂ ⁻	superoxyde

O ₃	ozone
ODN	oligodeoxyribonucleotide
ODN-CpG	ODN synthétiques contenant des motifs CpG non-méthylés
ODN-PO	ODN-CpG phosphodiester
ODN-PS	ODN-CpG phosphorothioate-stabilisés
OH	hydroxyle
ONOO-	peroxynitrite
PAF	facteur d'activation des plaquettes
PAMP	motif moléculaire microbe-associés
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PECAM-1	molécule d'adhésion cellulaire plaquette-endothéliale
Phox	oxydase de phagocyte
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKC	protéine kinase C
PLA ₂	phospholipase A ₂
PMA	acétate de phorbolmyristate
PMN	polymorphonucléaires
PR3	protéinase 3
PRR	récepteur de reconnaissance de motifs
PS	phosphatidylserine
PSGL-1	ligand glycoprotéique de la P-sélectine
PSR	récepteur à PS
RFU	unité relative de fluorescence
ROS	espèces réactives d'oxygène
SOD	dismutase du superoxyde
TIR	récepteurs Toll/IL-1
TLR	récepteur de la famille Toll
TLR	récepteurs Toll-like
TNF α	facteur de nécrose tumorale- α
V-ATPase	ATPase vacuolaire
VEGF	facteur de croissance endothélial vasculaire

REMERCIEMENTS

Il m'aurait été impossible de produire cette thèse sans l'assistance et le support de plusieurs collègues et amis. À tous ceux que je ne peux mentionner par leurs noms, je vous remercie de votre assistance et support pendant mes études de doctorat à l'Université de Montréal.

J'aimerais exprimer des remerciements spéciaux à mon directeur Dr. János G. Filep qui m'a fourni l'occasion et l'assistance financière pour accomplir mes études. Ses conseils et son encouragement constant ont joué un rôle essentiel dans le succès de mes études de maîtrise et de Ph.D. et mon développement comme scientifique.

Je suis aussi reconnaissant pour l'assistance et la coopération de mes collègues qui ont travaillé avec moi durant mes études. Ma gratitude va surtout à Tarek Khreiss pour son encouragement, enthousiasme et support dans tous les aspects du travail. Je le remercie aussi de son apport constant d'aide et de conseils durant mes études sans mentionner les innombrables services rendus.

Finalement, j'aimerais prendre cette opportunité afin d'exprimer ma gratitude infinie à ma famille, mon père Mihail József, ma mère Aranka József, mon frère Lehel József et ma sœur Katalin József pour leur attention et leur amour ainsi que leur encouragement tout au long de mes études. Je leur dédie cette thèse.

I. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Avant-propos

Le système immunitaire surveille continuellement le corps car la survie est impossible sans une défense vigilante contre des perturbations à l'homéostasie corporelle. Première à agir sur les lieux de l'agression, l'inflammation permet notre survie.

Récemment, l'inflammation a suscité beaucoup d'intérêt à cause des effets néfastes qu'elle peut causer et son association avec plusieurs maladies. Lorsque exposé à une attaque, le système immunitaire induit volontairement une réponse inflammatoire discrète et locale qui peut contrer la majorité des menaces pathogéniques. L'intensité de la réponse inflammatoire est cruciale: une réponse insuffisante résulte en immunodéficience, qui peut mener à des infections et le cancer; une réponse excessive cause morbidité et mortalité dans des maladies telles que l'arthrite rhumatoïde, le diabète, la maladie d'Alzheimer, et le choc septique. Dans certaines de ces conditions la réponse inflammatoire peut-être plus dangereuse que le stimulus déclencheur original.

Si toutes les maladies inflammatoires étaient combinées, elles pourraient être considérées comme étant la maladie principale de la société moderne. Tout comme le cancer et les maladies coronariennes (où l'implication de l'inflammation semble de plus en plus évidente), l'incidence des maladies inflammatoires est à la hausse, avec des coûts incalculables quant à la morbidité et mortalité.

Un contribuant majeur à ce fardeau de maladies inflammatoires est le sepsis, un syndrome clinique complexe qui résulte d'une réponse systémique de l'hôte à une

infection bactérienne. Le sepsis est la principale cause de décès dans les unités de soins critiques dans le monde entier et l'incidence du sepsis augmente progressivement (entre 1.5% et 8% par année) en dépit des améliorations des soins de support disponibles pour traiter les patients souffrant de sepsis (Riedemann et al, 2003). Il est estimé qu'aux Etats-Unis seulement il y a autour de 750 000 nouveaux cas de sepsis par an, avec une mortalité brute à 28 jours de 30%. La mortalité annuelle due au sepsis rivalise celle de l'infarctus du myocarde et excède celle de tous les cancers communs (Angus et Wax, 2001).

L'élément déclencheur du sepsis pourrait être le débordement dans le sang des microorganismes envahissant ou de composants structuraux bactériens tels que l'endotoxine (lipopolysaccharide; LPS) des bactéries Gram-négatives (Roger et Bone, 1991). L'activation des leucocytes en circulation mène à la libération massive de médiateurs endogènes et au dysfonctionnement du système circulatoire. L'inflammation systémique qui en résulte est associée à une extravasation et l'infiltration des leucocytes, principalement des neutrophiles, dans les tissus, pouvant progresser, même sous des traitements optimaux, au syndrome de dysfonctionnement d'organes multiples (Cohen, 2002).

Due aux dommages induits suite à l'accumulation massive de neutrophiles, l'organe qui échoue le plus fréquemment est le poumon et l'insuffisance respiratoire qui s'ensuit est actuellement considérée comme étant la cause principale de la mortalité associée au sepsis (Kappel et al, 2004).

Les thérapies développées contre le LPS ont été fâcheusement inefficaces chez l'homme (Riedemann et al, 2003), indiquant que l'endotoxine n'est pas l'unique médiateur responsable du développement de la réponse inflammatoire systémique associé au sepsis. Plusieurs autres composants bactériens, dont l'ADN, se sont avérés être proinflammatoires et capables d'induire des réponses semblables au sepsis dans des systèmes expérimentaux (Sparwasser et al, 1997). Déterminer les composants structuraux des bactéries qui initient le processus septique et comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux dommages tissulaires associés aux neutrophiles est important pour identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

Ainsi nos études portent sur l'éclaircissement des mécanismes moléculaires induits par l'ADN bactérienne qui contribuent au recrutement et à l'activation des neutrophiles et au prolongement de leur survie, menant à l'amplification de la réponse inflammatoire. Nous essaierons également de réguler ces processus.

2. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des phagocytes professionnels caractérisés par un noyau multilobé et un cytoplasme granulaire. Le terme "neutrophile" fait référence au fait que ces cellules sont facilement marquées par les colorants neutres, c'est-à-dire sans charge. Les neutrophiles sont abondants dans le sang (50-70% des leucocytes), où elles ont une demi vie courte (environ 12-14 h dans la circulation) si elles ne sont pas recrutées à un site inflammatoire. L'abondance des neutrophiles dans le sang, l'efficacité de leur recrutement et leur action antimicrobienne font de ces cellules une première ligne de défense essentielle de l'immunité innée contre les bactéries, les

levures, et les mycètes qui ont déjoués les défenses muqueuses-épithéliales locales et peuvent rapidement se multiplier et se disséminer à l'extérieur des cellules hôtes.

Schématiquement, l'activité fonctionnelle des neutrophiles se compose comme suit. Tout d'abord il y a migration des neutrophiles au site inflammatoire. Ce processus est principalement dirigé par l'interleukine (IL)-8. Une fois arrivé dans la région, les neutrophiles identifient les pathogènes via différents récepteurs dont les plus importants sont les récepteurs de la famille Toll (TLR) qui reconnaissent des composantes bactériennes tels que l'ADN bactérienne. Par la suite, il y a amplification de la réponse inflammatoire suite à la synthèse, par les neutrophiles, de médiateurs proinflammatoires tels que l'IL-8, menant au recrutement de neutrophiles additionnels et la suppression de l'apoptose constitutive des neutrophiles activés. Subséquemment, les neutrophiles détruisent la source inflammatoire par phagocytose, génération d'espèces réactifs de l'oxygène (ROS), et libération de substances microbicides. Après l'élimination des pathogènes, les neutrophiles accumulés dans le tissu enflammés meurent par apoptose et sont éliminés par les macrophages.

2.1 Le recrutement des neutrophiles au site enflammé

Les neutrophiles sont divisés dans le sang entre un bassin en circulation, présent dans les grands vaisseaux sanguins, et un bassin de marginalisation (Witko-Sarsat, 2000). En l'absence d'inflammation, le bassin de marginalisation comporte des granulocytes provisoirement arrêtés dans les capillaires étroits (principalement pulmonaires). Cette accumulation des neutrophiles dans les capillaires semble être dû à leur rigidité. Les neutrophiles qui ont un diamètre de 7 à 8 μm doivent se déformer

et adopter une forme allongé pour passer par les capillaires qui sont en moyen 5 à 6 μm et peuvent être aussi petit que 2 μm (Downey et al, 1990).

La double fonction de surveillance immune et d'élimination de micro-organismes ou de débris cellulaire exige une transition rapide des neutrophiles entre un état non-adhérent en circulation à un état adhérent, leur permettant d'émigrer dans les tissus en cas de besoin. L'événement initial est l'apparition, sur l'endothélium, de nouvelles molécules d'adhésion, induit par les médiateurs de l'inflammation libérés par les tissus endommagés, qui a pour conséquence le roulement des leucocytes le long de l'endothélium, médié par les séléctines, l'adhésion soutenu et stationnaire via l'activation des intégrines, suivie de l'extravasation local des leucocytes (figure 1).

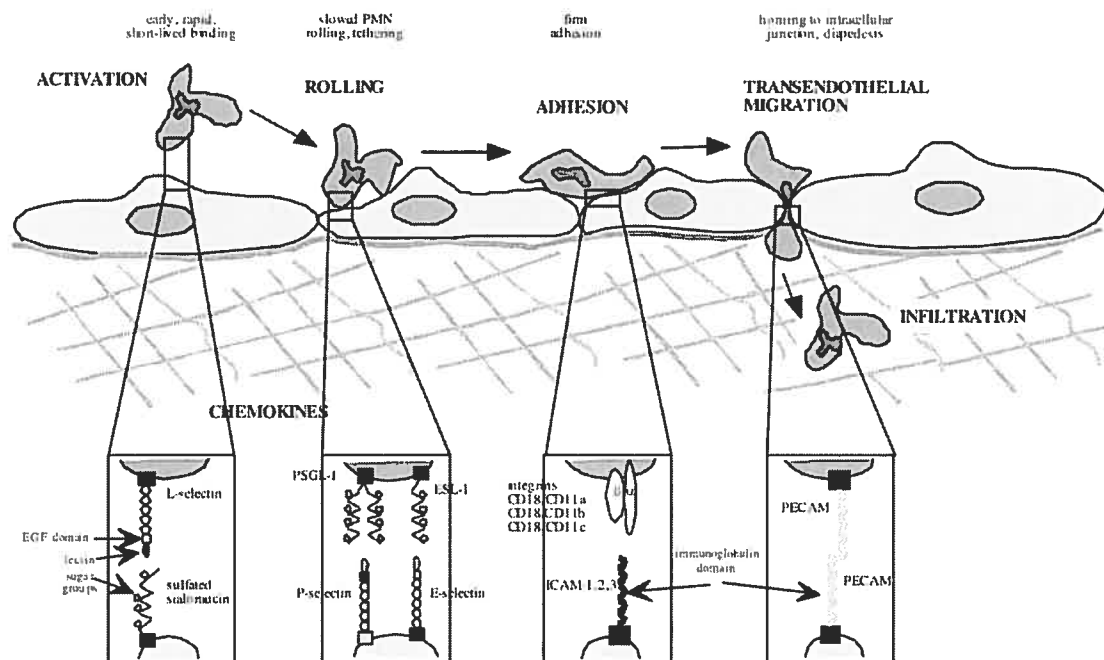


Figure 1. Représentation schématique de la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire. Tirée de Michiels, 2003.

2.1.1 *Recrutement et roulement sur l'endothélium*

L'étape de roulement est négociée par la L-selectine des neutrophiles et par les E- et P-selectines nouvellement exprimés sur les cellules endothéliales enflammées (Springer, 1995). P-selectin, aisément mobilisé en quelques minutes à la surface des cellules endothéliales après stimulation, interagit principalement avec le ligand PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) des leucocytes (McEver et Cummings, 1997). Le roulement implique plus tard la E-selectin, qui apparaît sur les cellules endothéliales une à deux heures après stimulation (Patel et al, 1995). Les contre-récepteurs d'E-selectine incluent le PSGL-1 et le ESL1 (E-selectin-ligand 1), situé sur les neutrophiles (Stegmaier et al, 1997). Contrairement aux P- et E-selectines, la L-selectine est constitutivement présent sur les leucocytes. Sa capacité de liaison cependant est rapidement et transitoirement augmentée après activation des leucocytes, probablement par l'intermédiaire de l'oligomérisation des récepteurs (Li et al, 1998). Jusqu'à date, seulement un contre-récepteur inductible de L-selectin exprimé sur l'endothélium enflammé a été décrit, l'antigène cutané de lymphocyte (CLA) (Tu et al, 1999). En plus de son attachement aux ligands endothéliaux, le PSGL-1 des leucocytes est un contre-récepteur pour la L-selectin et il y a évidence que les neutrophiles roulent, par l'intermédiaire de la L-selectin, sur d'autres neutrophiles déjà adhérents (Alon et al, 1996). Cet attachement secondaire augmenterait synergiquement l'accumulation de leucocyte sur l'endothélium enflammé.

2.1.2 L'adhésion ferme

L'adhérence ferme des neutrophiles aux cellules endothéliales semble impliquer exclusivement l'interaction des $\beta 2$ intégrines leucocytaires (CD11a, CD11b, CD11c/CD18) avec l'ICAM-1 endothélial (Sleigh et al, 1993). Sur les neutrophiles non stimulées, les $\beta 2$ intégrines ne peuvent pas interagir avec leurs ligands physiologiques, un mécanisme de sûreté important dans la régulation des réponses inflammatoires aiguës et chroniques. La capacité de liaison du ligand est acquise suite à des signaux d'activation ("signalisation de l'intérieur vers l'extérieur") qui mènent à l'agglomération des intégrines et à une transition à un état élevé d'affinité (Stewart et Hogg, 1996).

Divers agonistes déclenchent l'activation CD11b/CD18 dans les neutrophiles, incluent les chemoattractants (par exemple, le facteur d'activation des plaquettes, PAF; l'IL-8, le formyle de methioninyle-leucyle-phénylalanine, fMLP; la composante 5a du complément, C5a), les cytokines et les facteurs de croissance (par exemple, le facteur de nécrose tumorale α , TNF α ; le facteur colonie-stimulant de granulocyte/macrophage, GM-CSF), et les produits bactériens (par exemple, les peptides formylés et le LPS) (Springer, 1994). Les neutrophiles intègrent les signaux déclenchés par l'agglomération des intégrines et leur interaction avec leurs substrats ("signalisation de l'extérieur vers l'intérieur") avec ceux livrés simultanément par les cytokines inflammatoires ou les chemoattractants pour activer une cascade d'événements intracellulaires ayant pour résultat le changement de forme et la migration transendothéliale des neutrophiles (Fuortes et al, 1999; Lowell et Berton, 1999).

2.1.3 *Extravasation*

L'extravasation des neutrophiles se produit prédominamment aux frontières des cellules endothéliales, où on observe une discontinuité des jonctions serrées (Burns et al, 1999). La P-selectine a été montré comme étant concentré le long des frontières endothéliales et peut ainsi cibler l'adhésion des neutrophiles à cet endroit.

Deux molécules d'adhésion cellulaires de la superfamille des immunoglobulines (Ig-CAM) ont été montrées à être impliquées dans la transmigration des leucocytes, la molécule d'adhésion cellulaire plaquete-endothéliale (PECAM-1) et la molécule d'adhésion jonctionnelle (JAM) (Martin-Padura et al, 1998; Muller et al. 1993). PECAM-1 est exprimé sur la surface des neutrophiles et aux jonctions des cellules endothéliale et négocie l'extravasation des neutrophiles par l'intermédiaire des interactions homophilique PECAM-1/PECAM-1. Un modèle de « zipper » a été proposé qui expliquerai le maintient la barrière de perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales (Muller et al. 1993). La JAM est sélectivement concentrée aux jonctions serrées inter-endothéliales mais n'est pas présente sur les neutrophiles. Les anticorps contre la JAM empêchent la transmigration in vitro des leucocytes. Le contre-récepteur de JAM n'est pas connu (Martin-Padura et al, 1998).

2.1.4 *Migration au site enflammé*

Les neutrophiles émigrent dans les tissus en suivant un gradient de chemoattractants (chimiotactisme) produits par les bactéries, les cellules mortes, ou par diverses cellules stromal et épithéliales des tissus enflammés.

Les modèles *in vitro* montrent que les leucocytes se dirigent dans un champ complexe de chimioattractants en migrant d'une source d'agoniste à l'autre (Le et al, 2000). Les interférences entre les récepteurs de chimioattractants et leurs voies de signalisation peuvent avoir comme conséquence la désensibilisation à une chimioattractant par d'autres (Foxman et al, 1999; Kitayama et al, 1997; Le et al, 2000). En particulier, les signaux fournis par les chimioattractants des « cibles terminales », tels que les peptides formylés, libérés par les bactéries ou par les mitochondries des cellules mortes, sont dominant et surpassent les attractants cellule-dérivés, tels que les peptides et lipides bioactifs (par exemple, la leukotriène B4) ou les chemokines (par exemple, l'IL-8) (Foxman et al, 1999; Kitayama et al, 1997). Cela permet aux leucocytes recrutés par les chimioattractants endothélial-dérivés d'émigrer loin de la source d'agonistes endothéliale vers leur cible finale dans les tissus.

2.2 Identification du pathogène

L'identification des pathogènes par le système immune innée se fonde sur un nombre de plus en plus important des récepteurs, nommé les récepteurs d'identification de motifs (« pattern recognition receptors », PRR), qui ont évolué pour reconnaître les motifs moléculaires microbe-associés (« pathogen-associated molecular patterns », PAMP) (Blach-Oleszweska, 2005). Ces PAMP se composent d'une variété de constituants, y compris des combinaisons de sucres, de protéines, de lipides et des motifs distincts d'acides nucléiques qui sont uniques, et essentiels, pour la survie microbienne. Une caractéristique qui unie ces cibles est la forte conservation

de leurs structures, qui sont invariables entre les micro-organismes d'une même classe (Heine et Ulmer, 2005; Hopkins et Sriskandan, 2005). Les différents types de PRR ainsi que les PAMP associés sont présentés dans le tableau I.

Tableau I. Les récepteurs de l'immunité innée

Type of receptor	Expressed on cells	Ligands	Function
Toll-like receptors	monocytes, macrophages, DCs, epithelial cells, mast cells, neutrophils	lipoproteins, peptidoglicans, zymosan, LPS, flagellin, CpG DNA, viral dsRNA, viral envelope structure	antibacterial, antiviral, antitumor
Mannose receptors	macrophages, DCs, hepatic endothelial cells, kidney mesangial, tracheal smooth muscle, retinal pigment epithelial cells	carbohydrates present on the envelope structures of viruses containing DNA and RNA, cell walls of microorganisms chondroitin-4 sulfate, pituitary hormones	phagocytosis, IFN- α production, modification of acquired immunity, clearance of apoptotic cells
Scavenger receptors	macrophages, DCs, some endothelial cells, smooth muscle cells	LTA, lipid A of LPS, LDL, CpG DNA	uptake and clearance effete components, phagocytosis of bacteria
NK activating receptors (CD16, NKG2D, NKp30, NKp46, 2B4, NTBA)	NK cells, macrophages	not identified	antitumor and antiviral activity, killing of tumor and virus-infected cells

Tiré de Blach-Oleszewska, 2005.

Les récepteurs Toll-like (TLR) sont considérés comme étant les récepteurs principaux du système immunitaire pour l'identification des PAMP (Blach-Oleszewska, 2005).

2.2.1 Les récepteurs Toll-like

Les protéines TLR de mammifère tirent leur nom de la protéine Toll de drosophile, avec laquelle ils partagent des séquences similaires. À l'origine, Toll s'est avéré critique pour le développement dorsal-ventral des embryons de mouche (Stein

et al, 1991). La génération de mouches adultes exprimant un mutant de Toll a révélé que ce récepteur transmembranaire sert également de composant critique de l'immunité de l'hôte contre des infections (Lemaitre et al, 1996).

Le domaine cytoplasmique de Toll s'est avéré semblable à celui du récepteur IL-1 de mammifère, suggérant que des récepteurs orthologues pourraient être codés dans le génome de mammifère. La chasse suivante pour de véritables orthologues humains de Toll de drosophile a mené à la découverte du hToll (Medzhitov et al, 1997). L'expression d'un mutant constitutivement actif de hToll dans les cellules leucémiques a démontré que cette expression a comme conséquence l'activation du facteur de transcription facteur nucléaire (NF)- κ B ainsi que l'expression de plusieurs gènes de la réponse immunitaire innée (Medzhitov et al, 1997). Ensuite, d'autres protéines TLR ont été identifiées et hToll a été plus tard renommé TLR4.

Les protéines TLR font partie de la famille des récepteurs transmembranaires de type I caractérisés par un domaine extracellulaire N-terminal riche en répétitions de leucines (LRR) et une queue intracellulaire C-terminal contenant une région conservée appelée le domaine d'homologie des récepteurs Toll/IL-1 (TIR) (Hoffmann et al, 1999; Aderem et Ulevitch, 2000). Le domaine extracellulaire, contenant un nombre variable de LRR, est vraisemblablement impliqué dans la liaison de ligands, bien que ces domaines puissent également être nécessaires pour la dimérisation des TLR (Bell et al, 2003). La région intracellulaire du domaine TIR s'étale sur plus de 150 acides aminés et négocie les interactions protéine-protéine entre les TLR et leurs composants de transduction du signal (Takeda et al, 2003; Janeway et Medzhitov, 2002; Imler et Hoffmann, 2001). Le domaine TIR est le motif qui définit la

superfamille TLR/IL-1, et il est probablement un des premiers domaines de signalisation à avoir évolué (Kimbrell et Beutler, 2001).

Dix protéines distinctes de TLR de mammifère ont été identifiées jusqu'à ce jour (passé en revue par Akira et al, 2001) et sont énumérées dans le tableau II avec leurs ligands respectifs.

Tableau II. Les récepteurs Toll-like et leurs ligands

TLRs	Ligands
TLR-2	peptidoglycan, lipopeptides, products of Gram-positive bacteria, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , zymosan, <i>L. interrogans</i> and <i>P. gingivalis</i> , LPS, lipoarabinomannan and phosphatidylinositol dimannoside <i>M. tuberculosis</i>
TLR-3	viral replicative form dsRNA, synthetic dsRNA-poly I:C
TLR-4	LPS of Gram-negative bacteria, taxol, HSP 60, fibronectin, F protein of respiratory syncytial virus, envelope structures of different viruses
TLR-5	bacterial flagellin
TLR-7	chemical compounds with antiviral (imidazoquinolines) and anticancer (imiquimod, R-848) activity
TLR-9	bacterial DNA, CpG DNA. structures of HSV-1 virus
Heterodimer TLR:	
TLR-1/TLR-2	bacterial lipopeptide
TLR-6/TLR-2	mycoplasmal lipopeptide
TLR-?/TLR-2	peptidoglycan

Tiré de Blach-Oleszewska, 2005.

L'activation des récepteurs TLR mène à la formation d'homo- ou hétéro-dimères, et également de plus grands agrégats (Ozinsky et al, 2000; Hajjar et al, 2001; Zhang et al, 2002; Tapping et Tobias, 2003). L'activation des voies de signalisation dépend de l'association et/ou du recrutement constitutif de molécules adaptatrices spécifiques au domaine TIR intracytoplasmique. Les adaptateurs, à leur tour, fournissent une plateforme structurale à laquelle diverses kinases et substrats sont

recrutés. Une cascade de réactions biochimiques est initiée à la plateforme et celles-ci aboutissent à l'activation de facteurs de transcription distincts, initiant ainsi l'expression de divers gènes impliqués dans l'inflammation (Vogel et al, 2003). En d'autres termes, la combinaison spécifique des adaptateurs qui s'associent à un TLR particulier dicte ultimement le motif distinct d'expression de gènes qu'on observe en réponse à différents agonistes de TLR. Les composantes des différentes voies de signalisation des TLRs sont illustrées dans la figure 2.

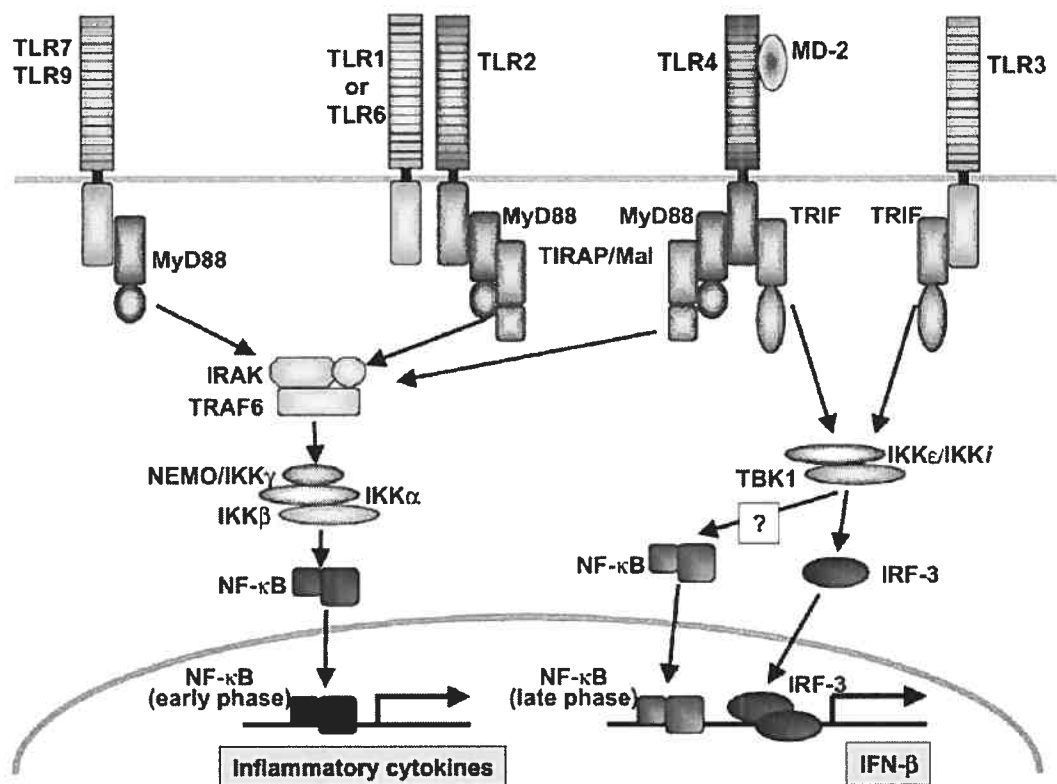


Figure 2. Les voies de signalisation des TLRs. Le MyD88 est un adaptateur, contenant le domaine TIR, essentiel pour l'induction des cytokines inflammatoires par l'intermédiaire de tous les TLRs. Le TIRAP/Mal est un deuxième adaptateur contenant le domaine TIR qui négocie spécifiquement la voie MyD88-dépendante par l'intermédiaire de TLR2 et de TLR4. Il existe une voie MyD88-indépendante dans la signalisation via le TLR3 et le TLR4 qui mène à l'activation d'IRF-3 par l'intermédiaire de TBK1 et d'IKK ϵ /IKK ι . L'adaptateur TRIF contenant le domaine TIR négocie cette voie MyD88-indépendante. Tirée de Yamamoto et al, 2004.

Finalement, les motifs d'expression des TLR diffèrent inter- et intracellulairement. Le marquage positif de la surface des cellules avec des anticorps TLR spécifiques indique que TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont tous localisés à la membrane plasmique tandis que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont préférentiellement exprimés sur les compartiments intracellulaires tels que les endosomes (Ahmad-Nejad et al, 2002; Heil et al, 2003; Matsumoto et al, 2003; Latz et al, 2004). La nature du ligand identifié par les TLR individuel semble déterminer leur motif d'expression. Par exemple, TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 identifient des structures d'acide nucléique tandis que TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 identifient généralement des composantes de la paroi cellulaire. Il est à noter cependant que TLR exposé sur la surface ne sont pas complètement limités dans leur motif d'expression, par exemple, TLR2 peut se localiser aux phagosomes après exposition à certains ligands (Underhill et al, 1999).

Parmi les composantes bactériennes, notre laboratoire s'intéresse surtout à l'ADN bactérien. Ce dernier est reconnu par le TLR9.

2.2.3 L'ADN bactérien

Le code génétique est plus ou moins le même dans les bactéries et chez l'homme; les bactéries produisent la même protéine à partir d'une séquence donnée d'ADN que les cellules de mammifères. Cependant, il y a des différences structurales et quelques particularités au niveau de la séquence qui rendent une distinction possible.

Le potentiel immunostimulant de l'ADN bactérien a été découvert lors d'études menées sur le potentiel anti-tumoral du bacille Calmette-Guérin (Tokunaga et al, 1999). Cette capacité de stimulation peut être transférée à des oligodeoxyribonucléotides simple-brin (ODN) contenant des séquences spécifiques (Yamamoto et al, 1992). Les conditions structurales pour l'immunostimulation par ces ODN ont été définies comme étant un noyau central de cytosine-guanosine (CpG), qui ne doit pas être méthylé et qui doit être flanqué de séquences de bases légèrement moins critiques afin de stimuler les cellules immunes (Yamamoto et al, 1992; Krieg et al, 1995). Par ailleurs, ces observations ont aidés à expliquer pourquoi le système immunitaire de mammifère peut distinguer entre l'ADN bactérien et celui de l'hôte: relativement parlant, l'ADN génomique de mammifère contient non seulement très peu de motifs CpG, mais et plus ils sont généralement méthylés (Bird, 1987).

En dépit de cette suppression et méthylation des CpG, l'ADN des vertébrés contient quand même beaucoup de motifs CpG nonméthylés (~20%), suggérant que des concentrations assez élevées de l'ADN de mammifères pourrait être immunostimulatoires. Cependant, ce n'est pas le cas. Curieusement, l'ADN génomique de mammifères, qui a été presque totalement déméthylé, n'a toujours aucun effet immuno-stimulatoire sur des cellules CpG-sensibles. Ceci démontre qu'il doit contenir des séquences immuno-neutralisantes qui bloquent les effets des motifs CpG nonméthylés (Goto et al, 2000). Ces motifs neutralisants (motifs CpG-N), formés lorsque le motif CG central est précédé par un C et/ou suivie par un G, antagonisent spécifiquement les effets des motifs stimuloires de CpG (Krieg et al, 1998).

À partir de ces résultats, des études ont été entreprises pour définir la séquence d'ADN responsable de l'immunostimulation, afin d'optimiser les ODN synthétiques. Le résultat de ce travail était l'identification d'une séquence qui produit une stimulation optimale (Krieg et al, 1995). L'ODN stimuloire optimale a une longueur de ~20 nucléotides et les régions flanquant le CpG affectent également le potentiel biologique. Notamment, la séquence optimale diffère de manière significative entre la souris et l'humain: un ODN optimisé pour stimuler les cellules de souris (GACGTT) sera, sur les cellules humaines, inférieur à un ODN optimisé pour les cellules humaines (GTCGTT), et vice versa (Van Uden et Raz, 2000). L'ADN qui contient une capacité immunostimuloire en raison des motifs de CpG non-méthylés sont désignés collectivement sous le nom d'ADN-CpG.

L'effet immunostimuloire de l'ADN-CpG est évidemment un résultat de la stimulation de certaines cellules immunes. Une recherche plus étroite a prouvé que les cellules sensibles à l'ADN-CpG sont en grande partie des cellules du système immunitaire inné, en particulier les cellules dendritiques, les macrophages, et les neutrophiles (Krieg, 2002). Les cellules sensibles à l'ADN-CpG sont ainsi les mêmes qui ont été connues pour réagir à l'exposition d'autres PAMP tels que le LPS. En outre, les réponses évoquées par l'ADN-CpG et par le LPS sont très similaires: les cellules répondent aux deux stimuli avec la sécrétion de cytokines comme le TNF, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-12 (Wagner, 1999). Dans les conditions in vivo l'ADN-CpG s'est avéré être un excellent adjuvant. La co-injection d'ADN-CpG avec l'antigène protéique augmente considérablement la réponse des cellules T et B à cet antigène. De manière significative, cette réponse est fortement décentrée vers la génération

d'une réponse Th1-dépendant avec toutes ses ramifications (Roman et al, 1997; Zimmermann et al, 1998).

Toutes ces observations faites à partir d'ADN-CpG soluble sont entravées par le fait que la façon par laquelle l'ADN bactérien est libéré de la bactérie est couramment inconnue.

2.2.4 La mise à disposition de l'ADN bactérien

Normalement, l'ADN est bien protégé à l'intérieur de la bactérie, couvert par des membranes cellulaires et une capsule bactérienne. Il est beaucoup plus aisément explicable que des composantes externes de la membrane tels que le LPS puissent atteindre des récepteurs sur les cellules immunes. Un mécanisme possible est que l'ADN est constamment libéré des bactéries pendant la croissance exponentielle et cela serait suffisant pour une telle stimulation (Stroun et Anker, 1972). Une deuxième possibilité est que l'ADN bactérien stimule les phagocytes à partir du phagosome, où il serait probablement libéré pendant le processus de la digestion. En effet, il y a des indices que l'ADN-CpG signale de l'environnement phagosome/lysosomal. Un certain nombre d'études ont démontré que la maturation endosomale est nécessaire pour que l'ADN-CpG puisse accéder au « compartiment de signalisation » de la cellule immune (Latz et al, 2004; Hacker et al, 1998; Yi et al, 1998; Macfarlane et Manzel, 1998).

Les inhibiteurs chimiques de la maturation endosomale, comme la chloroquine ou la bafilomycine A, peuvent bloquer l'activation cellulaire par l'ADN-CpG, tandis qu'ils n'ont presque aucun effet sur la signalisation par le LPS (József et

al, 2004; 2006). Bien que nous ne sachions pas avec précision ce que signifie ce blocage, il est compatible avec l'idée que l'ADN-CpG est en premier lieu internalisé par endocytose et, suite à un traitement quelconque, initie la signalisation à partir d'un compartiment cellulaire tel que l'endosome.

2.2.5 Le récepteur TLR9

Tel que mentionné auparavant, la reconnaissance de l'ADN bactérien est fait par le TLR9. De plus, parmi les produits microbiens, l'ADN-CpG est apparemment le seul ligand pour TLR9 (Wagner, 2004).

La localisation cellulaire de l'ADN-CpG et du TLR9 a été examinée. En absence de stimulation avec l'ADN-CpG, les molécules TLR9 sont localisées aux vésicules endocytiques se trouvant juste en-dessous de la membrane plasmique (Klinman et al, 2002). Suite à l'ajout de l'ADN-CpG, il y a une augmentation significative de la formation d'endosomes contenant l'ADN bactérien. Il s'ensuit une colocalisation de l'ADN-CpG et du TLR9, soit par la fusion des endosomes respectifs, ou due à la translocation inter-endosomale du TLR9 (Takeshita et al, 2001). Cette distribution n'est pas observée dans des cellules transfectées avec une forme mutante de TLR9, c'est-à-dire sans domaine intracellulaire, suggérant que le signal de tri et les changements conformationnels de TLR9 en présence du domaine intracellulaire soient nécessaires pour le trafic de TLR9 aux endosomes contenant l'ADN-CpG (Takeshita et al, 2001).

2.2.6 L'ADN bactérien et les neutrophiles

Bien que de multiples études sur l'impact de l'ADN-CpG ont été menées sur les cellules dendritiques, lymphocytes et macrophages, l'impact de la signalisation du TLR9 sur les fonctions des neutrophiles est très peu connue.

Dans des études *in vivo*, le traitement de souris avec de l'ADN-CpG change le phénotype et la fonction des neutrophiles avec une augmentation des récepteurs phagocytaires et une capacité accrue à phagocyter des bactéries et à produire des métabolites réactifs de l'oxygène (Weighardt et al, 2000). L'ADN-CpG accroît aussi la synthèse de cytokines dans les neutrophiles induites par des stimuli pro-inflammatoires tels que LPS (Weighardt et al, 2000). Finalement, le traitement de souris avec de l'ADN-CpG (au préalable d'une infection) mène à un influx massif de neutrophiles phénotypiquement actifs avec une capacité accrue de phagocytose et de production d'espèces réactives d'oxygène (Schwartz et al, 1997).

Les études menées *in vitro* pour étudier l'action directe de l'ADN bactérien sur les neutrophiles isolés sont difficiles à interpréter du au fait que différentes formes d'ADN-CpG sont employées. Puisque l'activité de l'ADN bactérien peut être imitée par les ODN synthétiques qui contiennent des motifs de CpG (ODN-CpG), la plupart des études sur l'action de l'ADN-CpG utilisent maintenant des ODN phosphorothioate-stabilisés (ODN-PS). Les ODN-PS ont un niveau d'activité semblable à celui de l'ADN bactérien dans les macrophages *in vitro* et sont des immunomodulateurs efficaces *in vivo* (Stacey et Blackwell, 1999). Bien qu'on assume généralement que l'activité élevée des ODN-PS soit dû à leur stabilité, la modification PS augmente également de façon considérable l'internalisation de l'ODN

dans les macrophages, et cela est susceptible de contribuer au pouvoir de l'ODN-PS (Sester et al, 2000). Dans les macrophages, les ODN-CpG phosphodiester (ODN-PO) sont des activateurs beaucoup moins efficaces que l'ADN d'*Escherichia coli* en dépit de la haute molarité des motifs actifs par microgramme d'ODN (Roberts et al, 2005). Le plus grand pouvoir de l'ADN d'*E. coli* pourrait être dû à la présence de doubles brins, à la longueur, aux motifs supplémentaires non caractérisés, aux facteurs épigénétiques ou à une combinaison de ces derniers. Ces facteurs peuvent affecter le taux d'internalisation, de la stabilité intra ou extra cellulaire, ou l'identification du CpG et l'activation cellulaire consécutive (Roberts et al, 2005).

Dû à ce litige, l'habilité des ODN-CpG à induire une réponse directe des neutrophiles en culture est sujet à controverse et ceci bien que l'expression de l'ARNm et de la protéine du TLR9 a été détecté dans ces cellules (Schwartz et al, 1997; Weighardt et al, 2000). Ainsi dans certaines études faites *in vivo* sur des neutrophiles isolés, l'ODN-PO induit des changements phénotypiques tels que la perte de la L-selectine et l'augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion CD11b. Également, suite à un traitement au préalable avec le GM-CSF, l'ODN-PO hausse l'activité phagocytaire ainsi que la production de superoxyde des neutrophiles (Hayashi et al, 2003). Sans amorçage, les neutrophiles semblaient inaptes à répondre à l'ODN-PO seule. Cependant, d'autres études ont démontré que l'ADN bactérien induit l'activation des neutrophiles humains sans co-stimulant. L'exposition des neutrophiles à l'ADN bactérien de quatre espèces différentes a stimulé la perte de la L-selectine, le changement de forme, l'augmentation de l'expression du CD11b, et la

sécrétion de l'IL-8, des réponses considérées caractéristiques de l'activation des neutrophiles (Trevani et al, 2003).

2.3 La synthèse de cytokines

Étant des cellules matures, les neutrophiles ont été longtemps considérés comme ayant peu d'activité transcriptionnelle. Cependant, des études récentes ont montré que les neutrophiles sont en mesure de synthétiser et libérer un large éventail de cytokines et des facteurs de croissances en réponse à une variété de stimuli inflammatoires (passé en revue par Cassatella, 1999).

Les profils d'expression des cytokines dérivés des neutrophiles sont semblables à ceux des monocytes/macrophages. Comme les monocytes, les neutrophiles peuvent sécréter des cytokines proinflammatoires (par exemple, TNF α et l'IL-1 β), les cytokines anti-inflammatoires (par exemple, l'antagoniste du récepteur d'IL-1, IL-1Ra), les facteurs angiogéniques (par exemple, le facteur de croissance endothélial vasculaire, VEGF), ainsi que des chimiokines CC et CXC (par exemple, la protéine interféron inductible 10, IP-10; la protéine inflammatoire de macrophage-1, MIP-1; et l'IL-8).

Bien que les neutrophiles soient capables de sécréter d'autres médiateurs, l'IL-8 est la cytokine la plus abondamment produite par ces cellules (Scapini et al, 2000).

2.3.1 *L'interleukine-8*

Tel que discuté auparavant, le recrutement des neutrophiles à un site d'infection est dirigé, entre autres, par les chimiokines (Streiter et al, 1994). Les chimiokines sont composées de deux superfamilles, la soi disant superfamille des chimiokines CC, caractérisée par la juxtaposition des deux premiers résidus de cystéine, et la superfamille des chimiokines CXC, dans laquelle les deux résidus de cystéine sont séparés par un autre acide aminé (Streiter et al., 1994). L'IL-8, appartient à la superfamille des chimiokines CXC.

L'IL-8 a originalement été identifié dans des cultures de monocytes du sang humain (Yoshimura et al, 1987). Par la suite, il a été démontré que la majorité des cellules, e.g. les cellules endothéliales, les fibroblastes de différents tissus, les kératinocytes, plusieurs types de cellules épithéliales, les cellules tumorales, ainsi que les neutrophiles, peuvent produire et libérer de l'IL-8 biologiquement actif.

2.3.2 *La structure de l'IL-8*

Chez l'humain, le gène *IL-8* se trouve sur le chromosome 4, dans la région q12-21, et contient quatre exons séparés par trois introns. La transcription du gène *IL-8* génère un ARNm de 1.8 kilobases qui est traduit par la suite sous forme d'un précurseur de 99 acides aminés et contenant une séquence signal de 20 peptides (Matsushima et al, 1988). La forme mature d'IL-8 sécrétée par les cellules, après le clivage du peptide signal, consiste en 79 acides aminés, qui après un procédé protéolytique extracellulaire à la partie N-terminal, produit plusieurs variants avec des

activités biologiques légèrement variables dont la forme prédominante consistent en 72 acides aminés (Van Damme et al, 1990).

Des études de résonance magnétique montrent que l'IL-8 existe sous forme de dimère en solution (Baldwin et al, 1991) dont chaque monomère est biologiquement actif (Rajaratnam et al, 1994). Le monomère possède trois feuillettes- β antiparallèles suivi d'une hélice- α C-terminal (Baldwin et al, 1991). L'IL-8 contrairement aux autres chimiokines est remarquablement résistante à l'inactivation chimique ou protéolytique et son activité biologique dans les tissus enflammés peut durer plusieurs heures (Oppenheim et al, 1991).

2.3.3 L'activité de l'interleukine-8

Les effets biologiques de l'IL-8 sont médiées par la liaison de récepteurs spécifiques suivie d'une transduction subséquente du signal. Deux récepteurs de l'IL-8 (IL-8R), l'IL-8R α et l'IL-8R β , ont été identifiés et ils appartiennent à la superfamille de récepteurs couplés à la protéine G (Murphy et Tiffany, 1991). Ces récepteurs sont caractérisés par sept domaines transmembranaires. À cause de cette structure aucun récepteur soluble n'est envisageable.

Par rapport à ses effets biologiques, l'IL-8 démontre une spécificité remarquable envers les neutrophiles (Baggiolini et al, 1992). L'IL-8 a une activité chimiotactique (Colditz et al, 1989) et est capable d'induire la dégranulation, provoquer un changement de forme, éliciter l'accroissement respiratoire et activer l'arachidonate-5-lipoxygénase dans les neutrophiles (Schröder et al, 1987; Schröder, 1989); des procédés qui favorisent l'inflammation. De plus, l'IL-8 promeut

l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium en augmentant l'expression des molécules d'adhésion et en régulant la migration transendothéliale (Huber et al, 1991). Donc, *in vivo*, l'IL-8 est présumément un régulateur important de l'activation et migration des neutrophiles. Une injection intradermique d'IL-8 induit rapidement une réponse inflammatoire avec une infiltration et accumulation massive de neutrophiles sans la participation des autres leucocytes (Leonard et al, 1991).

L'importance de l'IL-8 a été d'avantage démontrée par la parution de nouvelles études révélant que l'IL-8 est aussi impliquée dans la régulation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Gerszten et al, 1998).

2.3.4 La régulation du gène IL-8

L'expression d'IL-8 est régulée principalement au niveau de la transcription du gène, cependant un contrôle post-transcriptionnel a aussi été rapporté, celui de l'altération de la stabilité de l'ARNm (Cleveland et Yen, 1989). Lors d'une stimulation cellulaire, il y a une induction rapide le l'ARNm d'IL-8, détectable en dedans de 60 minutes, indiquant que le gène d'IL-8 est un gène de réponse rapide (Lakshminarayanan et al, 1997).

La région promotrice du gène (figure 3) contient un seul site d'initiation de la transcription avec une boite TATA localisée en amont et plusieurs sites de liaisons potentiels pour différents facteurs de transcription (Mukaida et al, 1991).

Deux régions distinctes du promoteur sont considérées étant les plus importantes. Un élément distal du promoteur constituant le site de liaison pour la protéine activatrice-1 (AP-1) et un élément proximal du promoteur contenant le site

de liaison pour NF- κ B. Des études de mutations du promoteur suggèrent que le site de liaison NF- κ B est l'élément prédominant dans l'expression du gène IL-8 (Sugita et al, 1998). Cet élément est le plus rapproché de la boîte TATA et lie les facteurs de transcription inductibles de la famille Rel/NF- κ B.

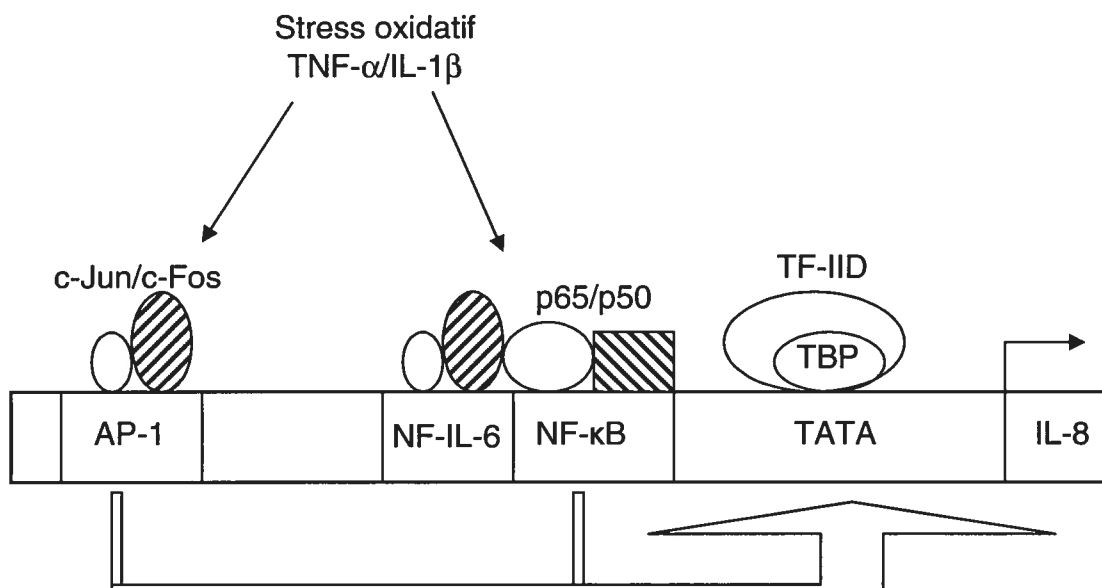


Figure 3. Régulation du promoteur IL-8. Les sites de liaison de AP-1, NF-IL-6 et NF- κ B sont identifiés par des rectangles à l'intérieur du promoteur IL-8. La flèche suivant la boîte TATA indique le site d'initiation de la transcription. Les facteurs de transcription activés par des stimuli inflammatoires sont illustrés en train d'interagir avec leur site de liaison spécifique. Modifié de Roebuck, 1999.

L'IL-8 peut aussi être induite par une variété d'oxydants (Deforge et al, 1993) et son expression peut être modulée par des antioxydants (Deforge et al, 1992). Le mécanisme par lequel l'oxydation induit la transcription du gène IL-8 n'est pas bien connu, cependant une étude récente suggère que cette induction passe par la régulation des facteurs de transcription directement par l'agent oxydant. Un tel mécanisme semble cohérent puisque NF- κ B et AP-1 sont des facteurs de transcription

redox-sensibles (Meyer et al, 1994). De plus, notre laboratoire a démontré que le peroxy-nitrite (un oxydant puissant; voir le chapitre sur le peroxy-nitrite), ajouté de façon exogène ou produit en réponse au LPS, induit l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et mène à la synthèse de l'IL-8 chez les neutrophiles humains (Zouki et al, 2001).

2.3.5 *Le facteur de transcription NF- κ B*

La famille NF- κ B est composée d'un groupe de protéines structurellement apparentées qui interagissent et lient l'ADN sous forme de dimères, dont l'activité est régulée par la localisation intracellulaire (Barnes et Karin, 1997). Les membres de la famille incluent Rel-A (p65), Rel-B, c-Rel, NF- κ B1 (p50) et NF- κ B2 (p52).

Les gènes codant pour chacun des cinq membres de la famille de NF- κ B ont été supprimés par recombinaison homologue chez des souris (Gerondakis et al, 1999). Ces modèles d'animaux « knockout » illustrent les rôles distincts qu'ont les protéines NF- κ B dans la régulation des réponses immunes innées et adaptatives, la fonction des lymphocytes et la survie cellulaire. L'absence de la sous-unité p65 est mortelle au stade embryonnaire dû à la dégénération du foie; en revanche, les souris qui n'expriment pas l'un des quatre autres membres sont immunodéficientes mais n'ont pas de défauts développementaux. Les souris « knockout » pour plus d'un membre de la famille de NF- κ B, tel que des souris p50^{-/-}RelB^{-/-} et p50^{-/-}p52^{-/-}, ont des phénotypes plus graves, indiquant qu'il y a redondance fonctionnelle entre les membres de la famille NF- κ B.

Aussi, chaque sous-unité possède des propriétés de liaisons et de transactivations distinctes, qui lorsque combinées comme homodimères ou hétérodimères, forment les facteurs de transcriptions NF- κ B avec des fonctions biologiques uniques (Perkins et al, 1992). Par exemple, l'hétérodimère classique de NF- κ B (p65/p50) est le facteur prédominant dans l'expression d'IL-8 dans les neutrophiles. Cependant, il est incapable de transactiver le gène *IL-8* dans les cellules épithéliales (Kunsch et Rosen, 1993).

Dans les cellules au repos, le NF- κ B latent est complexé à une famille de protéines de rétention cytoplasmique appelée I- κ B (Baldwin, 1996). Des signaux d'activation initient les cascades des kinases d'I- κ B (IKK) qui résulte en la phosphorylation d'I- κ B et la dissociation subséquente du complexe I- κ B/NF- κ B. La phosphorylation d'I- κ B marque ce dernier pour la dégradation par le protéosome 26S, permettant à NF- κ B de transloquer dans le noyau et lier son élément de reconnaissance sur le promoteur des gènes NF- κ B inductibles (Mercurio et al, 1997) (figure 4). Même si NF- κ B est indispensable pour l'expression du gène d'IL-8, sa coopération avec AP-1 est apparemment requise pour une activation optimale du gène IL-8 dans plusieurs types cellulaires y compris les neutrophiles (Sugita et al., 1998).

2.3.6 *Le facteur de transcription AP-1*

Bien qu'il ne soit pas essentiel dans la majorité des types cellulaires, le site de liaison distal AP-1 contribue à l'activation du promoteur IL-8 (Sugita et al, 1998). AP-1 peut physiquement interagir avec NF- κ B (Stein et al, 1993) et activer synergiquement l'expression du gène IL-8 (Okamoto et al, 1994). AP-1 est un facteur

de transcription inductible et appartient à la famille bZip. Il est essentiel pour l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. AP-1 est composé soit d'hétérodimères c-Jun/c-Fos ou d'homodimères c-Jun/c-Jun (Okamoto et al, 1994). L'activité d'AP-1 est contrôlée au niveau transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Sa régulation au niveau post-transcriptionnelle est médié par l'état de phosphorylation des résidus serines et thréonines dans le domaine de liaison à l'ADN (Karin et Hunter, 1995) et de résidus serines dans le domaine de transactivation de c-Jun (Karin, 1995). En termes de régulation transcriptionnelle de AP-1, le gène *c-fos* est rapidement activé en réponse à une variété de stimuli. Ceci mène à l'augmentation de la production de c-Fos qui, lorsque combiné à un membre de la famille Jun, augmente l'activité d'AP-1 (Karin et al., 1997).

2.4 Le peroxy-nitrite

Lors de la réponse inflammatoire il y a une forte production des radicaux libres d'oxyde nitrique (NO) et de superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Freeman et Crapo, 1982; Turko et Murad, 2002; Beckman et Koppenol, 1996; Radi et al, 2000; White et al, 1994). L'oxyde nitrique est produit enzymatiquement à partir de la L-arginine par la synthase d'oxyde nitrique (NOS) (Fukoto et Ignarro, 1997; Alderton et al, 2001). Trois isoformes de cette enzyme ont été décrites : nNOS (neuronal), eNOS (endothéliale) et iNOS (inductible, inflammatoire). D'autre part, le superoxyde peut être catalytiquement produit (par exemple, par l'oxydase xanthine ou l'oxydase NADPH), et également formé par la réduction partielle de l'oxygène dans la membrane mitochondriale ou par la réduction non enzymatique de l'oxygène (par

exemple, auto-oxydation de l'hémoglobine). La réaction entre le NO et l' O_2^- est diffusion-conrollée ($k = 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Kissner et al, 1998) et le produit de cette réaction est l'anion de peroxynitrite ($ONOO^-$) (Pryor et al, 1995). Cette réaction est présentement acceptée comme étant la principale source biologique de $ONOO^-$ (Beckman, 1996). Etant donné les propriétés de diffusion des précurseurs radicaux (Lynch et Fridovich, 1978; Denicola et al, 1996), l' $ONOO^-$ est principalement formé près de l'emplacement de la génération d' O_2^- (Chen et al, 1998; Chen et Deen, 2001). L' $ONOO^-$ a une courte demi vie biologique (10-20 ms), mais peut traverser les membranes biologiques et diffuser d'un à deux diamètres de cellules (Denicola et al, 1998).

2.4.1 La réactivité du peroxynitrite

Les propriétés biochimiques d' $ONOO^-$ sont complexes. Ces principaux aspects sont récapitulés dans la figure 4 et brièvement décrits ci-dessous.

L' $ONOO^-$ est un oxydant plus fort que ses précurseurs radicaux. C'est un acide faible, avec un pKa de 6,8, donc, dans des conditions physiologiques, tous les deux formes, protonées ($ONOOH$) et anionique ($ONOO^-$), sont présentes. L' $ONOO^-$ est relativement stable. Cependant, l' $ONOOH$ se décompose rapidement pour former du dioxyde d'azote ($\cdot NO_2$) et des radicaux hydroxyles ($\cdot OH$). Une grande partie de ces radicaux libres se recombinent pour former du nitrate (NO_3^-), le produit principal de la décomposition de l' $ONOO^-$ en l'absence de cibles (Anbar et Taube, 1954; Bohle et Hansert, 1997).

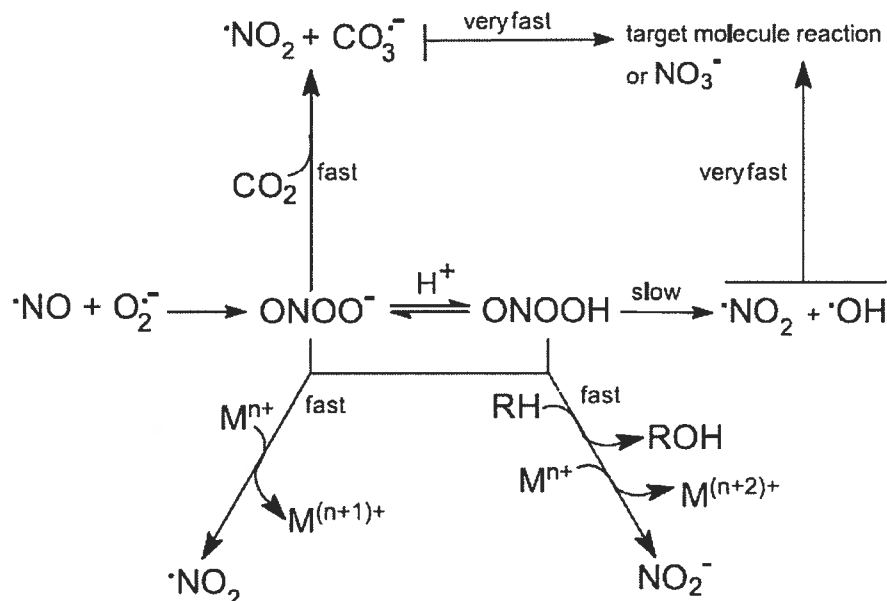


Figure 4. Vue d'ensemble des processus réactionnels de l' ONOO^- . L' ONOO^- est formé par la réaction entre l'oxyde nitrique et le superoxyde. L' ONOO^- et l' ONOOH produisent des réactions d'oxydation avec les centres métalliques de transition et d'autres biomolécules et produisent du dioxyde d'azote ou du nitrite respectivement. L' ONOO^- peut également réagir avec le dioxyde de carbone secondairement pour former des radicaux de dioxyde d'azote et de carbonate. Alternativement, l'acide peroxy-nitrique peut subir l'homolyse en radicaux d'hydroxyle et de dioxyde d'azote. Les radicaux secondaires dérivés du ONOO^- peuvent effectuer des oxydations sur des biomolécules cibles ou se recombiner en nitrate. Tirée de Alvarez et Radi, 2003.

L' ONOO^- réagit avec les molécules cibles par deux voies possibles. D'abord, l' ONOO^- , ou l' ONOOH , peut réagir directement avec une certaine molécule cible. C'est le cas, par exemple, de l'oxydation des thiols. En second lieu, l' ONOOH se dissocie pour former du NO_2 et des radicaux d'hydroxyles, qui réagissent à leur tour avec la molécule cible. À ce dernier type de réaction appartiennent la nitration de tyrosines et la peroxydation de lipides. Due à la présence, in vivo, de plusieurs molécules qui réagissent directement avec l' ONOO^- avec des constantes de taux relativement élevé, la majorité de l' ONOO^- (> 99%) réagira avant l'homolyse.

Une des réactions le plus biologiquement appropriée de l'ONOO⁻ est celui avec le dioxyde de carbone (CO₂), qui est présent dans les systèmes biologiques à des concentrations relativement élevées. La réaction du CO₂ avec l'ONOO⁻ mène à la formation de NO₂ et du radical carbonate (CO₃·⁻) (Bonini et autres, 1999). La majeure partie de ces radicaux se recombinent pour former du nitrate en régénérant du CO₂ et seule une partie réagit avec des molécules cibles. (Goldstein et Czapski, 1997; Lyman et Hurst, 1998). Les radicaux de NO₂ et de CO₃·⁻ sont des oxydants forts. Ainsi le CO₂, au lieu d'être un extracteur d'ONOO⁻, réoriente plutôt sa réactivité.

2.4.2 Les réactions du peroxy-nitrite avec les protéines

La réactivité de l'ONOO⁻ est reflétée dans les voies qui mènent à la modification des protéines (voir Beckman et Koppenol, 1996; Jozsef et al, 2003). D'abord, l'ONOO⁻ réagit directement avec certains résidus acides aminés tels que la cystéine et la méthionine. En second lieu, les groupes prosthétiques, et en particulier les centres en métal de transition, sont susceptibles de réagir rapidement avec l'ONOO⁻. Troisièmement, les radicaux secondaires dérivés de l'ONOO⁻ (par exemple, les radicaux d'hydroxyle, de carbonate et de dioxyde d'azote) réagissent également avec les résidus des protéines.

2.4.3 Les réactions avec des centres métalliques

Les réactions de l'ONOO⁻ avec des centres métalliques de transition, en particulier ceux qui contiennent du fer, du cuivre et des ions de manganèse, sont parmi les plus rapides connus pour l'ONOO⁻.

La réaction de l'ONOO⁻ avec un centre métallique résulte dans la formation d'une espèce oxydante secondaire, plus le dioxyde d'azote. L'espèce oxydante peut être réduite par des réducteurs appropriés tels que le glutathion ou l'acide ascorbique. Si l'espèce d'oxydant est formée à l'emplacement métallique actif d'une enzyme, et réagit avec un acide aminé critique voisin, le résultat peut être la perte de fonction de l'enzyme. L'implication de ce mécanisme emplacement-spécifique a été proposé dans le cas de la dismutase à manganèse du superoxyde et de la synthase de prostacycline, où la réaction initiale de l'ONOO⁻ avec le centre métallique mène à la modification des résidus voisins de tyrosine (Zou et al, 1997; Quijano et al, 2001). Alternativement, l'oxyradical ou l'oxo-composé peut réagir avec le dioxyde d'azote formé et générer ainsi du nitrate et de ce fait catalyser l'isomérisation de l'ONOO⁻ (Stern et al, 1996; Herold et al, 2001). L'ONOO⁻ peut également oxyder les centres métalliques réduits par deux électrons générant l'oxyradical ou oxo-composé correspondant et la formation de nitrite au lieu du dioxyde d'azote. Cette réaction est illustrée dans le cas de l'oxydase cytochrome c réduite. Dans le cas de l'oxydation par un électron du cytochrome c, l'ONOO⁻ réagit avec la forme réduite mais pas la forme oxydée, oxydant le Fe²⁺ à Fe³⁺, probablement par un processus de transfert d'électron de la sphère externe (Thomson et al., 1995). Dans la plupart des cas, l'oxydation du centre métallique peut être renversée par un réducteur approprié. Cependant, la réaction de l'ONOO⁻ avec l'aconitase mené à la rupture du complexe de soufre et de fer et par conséquent à l'inactivation de cette enzyme (Castro et al., 1994).

Ainsi, les interactions de l'ONOO⁻ avec les centres métalliques de transition sont complexes et, selon la protéine, résultent d'une variété de mécanismes différents et ont des conséquences différentes.

2.4.4 Les réactions avec des acides aminés

Quant aux réactions des radicaux libres ONOO⁻-dérivés avec des acides aminés, il faut préciser que les plus susceptibles de l'oxydation sont ceux contenant du soufre (la méthionine et la cystéine) et les aromatiques (le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine et l'histidine). Ces résidus possèdent le plus bas potentiel de réduction et réagissent le plus rapidement. Cependant, d'autres résidus ainsi que les liens peptidiques peuvent aussi être des cibles pour ces radicaux libres.

La cinétique des réactions de l'ONOO⁻ avec les vingt acides aminés formant des protéines a été déterminée (Alvarez et autres, 1999). Les seuls acides aminés qui réagissent directement avec l'ONOO⁻ sont la cystéine, la méthionine et le tryptophane. Les réactions de l'ONOO⁻ ou de ses radicaux dérivés avec des acides aminés mène à la formation de produits oxydés, nitrates et nitrosés.

La réaction d'ONOO⁻ avec les thiols de la cystéine libre et de l'albumine est la première réaction directe de l'ONOO⁻ qui a été rapportée (Radi et autres, 1991), et la cystéine est l'acide aminé qui réagit le plus rapide avec l'ONOO⁻. La réaction de l'ONOO⁻ avec les thiols produit des disulfides correspondants et du nitrite. L'oxydation des thiols par l'ONOO⁻ a été montrée dans un certain nombre de protéines, et dans beaucoup de cas, est attribué à la perte de fonction. L'oxydation des thiols peut interférer avec des événements ultérieurs, comme c'est le cas des

phosphatases de tyrosine contenant des thiols, des facteurs de transcription et des protéases à cystéine (Alvarez et Radi, 2003).

Due à l'atome de soufre nucléophile dans la chaîne latérale de la méthionine, ce dernier est susceptible d'être oxydé par l' ONOO^- . L'espèce réactive principale semble être l'acide peroxy-nitrique. Les produits formés sont le sulfoxyde de méthionine et le nitrite (Pryor et al, 1994; Jensen et al, 1997; Perrin et Koppenol, 2000). L'oxydation de la méthionine par l' ONOO^- a également été observé, *in vitro*, dans des protéines telles que l'inhibiteur de α 1-antitrypsine et la synthétase de glutamine (Moreno et Pryor, 1992; Berlett et al, 1998).

Le tryptophane peut également réagir directement avec l' ONOO^- ou avec ses radicaux libres dérivés, menant à la formation de nitrotryptophane et de radicaux tryptophaniques (Pietraforte et Minetti, 1997). La formation des radicaux tryptophaniques et de produits nitrés augmentent en présence du dioxyde de carbone (Alvarez et al, 1996; Gatti et al, 1998). La formation du nitrotryptophane a été détectée *in vitro* dans la superoxyde dismutase (SOD) humaine suite à l'exposition au ONOO^- et la présence de dioxyde de carbone (Yamakura et autres, 2001). La modification ONOO^- -dépendante du tryptophane peut être liée à la perte de fonction dans le cas du lysozyme du blanc d'oeuf de poule, qui a des résidus de tryptophane importants pour la liaison du substrat (Alvarez et al, 2005).

Les acides aminés qui ne réagissent pas directement avec l' ONOO^- (par exemple, la tyrosine, la phénylalanine et l'histidine) peuvent néanmoins être modifiés, par l'intermédiaire d'espèces secondaires comme les radicaux d'hydroxyle, de

carbonate et de dioxyde d'azote ou, en présence de métaux de transition, des espèces oxydant formées par la réaction de l' ONOO^- avec ces derniers.

2.4.5 *Les acides aminés contenant du sélénium*

Les composés de sélénium réagissent avec l' ONOO^- plus rapidement que leurs analogues de soufre et inhibent la nitration et l'oxydation des molécules cibles. L'intérêt pour ces composés a commencé avec l'ebesen, qui réduit l' ONOO^- en nitrite en formant du sélénosénoxide (Masumoto et Sies, 1996). Ce dernier est réduit de nouveau en ebesen par le glutathion.

Le sélénocystéine est un acide aminé contenant du sélénium qui est incorporé à un certain nombre de sélénoprotéines par une machinerie spécifique d'insertion, alors que la sélénométhionine est incorporée aux protéines au hasard au lieu de la méthionine (Sies et Arteel, 2000). La réactivité de la sélénométhionine est dix fois supérieure à celle de la méthionine et, de façon analogue, la sélénocystine offre plus de protection que la cystine selon des études d'oxydation et de nitration (Briviba et al, 1996). Les sélénosénoxides formés peuvent être réduits par différents systèmes de réduction tels que le glutathion (Assmann et al, 1998).

Le fait que les composés de sélénium réduisent l' ONOO^- en nitrite (et peuvent alternativement être réduits à leur tour par les réducteurs physiologiques) les rendent intéressants en tant qu'éléments des mécanismes de défense normaux et en tant qu'inhibiteurs pharmacologiques de l' ONOO^- . À cet égard, la sélénoprotéine peroxydase de glutathion a été proposée d'agir comme une réductase de l' ONOO^- (Sies et al, 1997) et la sélénoprotéine P du plasma humain peut également protéger

contre l'ONOO⁻ (Arteel et al, 1998). La réductase de mammifère, la thioredoxine, est une autre sélénoprotéine qui fonctionne comme réductase d'ONOO⁻ aux dépens du NADH, en présence de la sélénocystine ou l'ebselel (Arteel et al, 1999a).

2.4.6 La nitrotyrosine

La tyrosine ne peut pas réagir directement avec l'ONOO⁻ tel que démontré par le fait qu'elle n'augmente pas le taux de décomposition de l'ONOO⁻. Néanmoins, son exposition au ONOO⁻ mène à la formation de 3-nitrotyrosine, de 3-hydroxytyrosine et de 3,30-dityrosine. Le mécanisme de la nitration ONOO⁻-dépendante implique la réaction de la tyrosine avec des radicaux d'hydroxyle ou de dioxyde d'azote pour former le radical de tyrosyle qui se recombine avec le dioxyde d'azote pour produire le nitrotyrosine.

L'homolyse de l'ONOO⁻ est lente comparativement aux processus qui peuvent se produire *in vivo*. Ainsi dans les systèmes biologiques, la formation ONOO⁻-dépendante de nitrotyrosine doit être médiée par la réaction précédente de l'ONOO⁻ avec le dioxyde de carbone ou des centres de métal afin de produire les espèces oxydantes secondaires qui réagissent à leur tour avec la tyrosine pour former le radical phénolique. Ainsi, en présence de dioxyde de carbone, les rendements de nitration augmentent. De plus, les composés à faible poids moléculaire contenant du cuivre, du fer et de la manganèse augmentent aussi les taux et les rendements de nitration, de même que les protéines qui contiennent ces métaux de transition comme les protéines contenant du hème, les SOD de manganèse et de cuivre, zinc (Beckman

et al, 1992; Ferrer-Sueta et al, 1997; Zou et al, 1997; Ferrer-Sueta et al, 1999; Quijano et al, 2001).

D'abord proposés à être seulement dépendantes de l'ONOO⁻, d'autres mécanismes ont été mis en avant pour la formation de nitrotyrosine. En premier lieu, la nitration peut être négociée par des peroxydases telles que la myeloperoxydase en présence de peroxyde d'hydrogène et de nitrite (Eiserich et al, 1998). En second lieu, la nitration peut se produire de la réaction du radical de tyrosyl avec de l'oxyde nitrique suivi d'une autre oxydation pour former le nitrotyrosine (Gunther et al, 1997). Le dioxyde d'azote par lui-même n'est pas un agent de nitration efficace. Afin d'attribuer le nitrotyrosine à la formation d'ONOO⁻, d'autres évidences sont nécessaires. Dans ce sens, si la nitration est négociée par myeloperoxidase, on devrait aussi observer le chlorotyrosine (van der Vliet et al, 1997), alors que s'il est médié par l'ONOO⁻, le hydroxytyrosine devrait être présent (Santos et al, 2000; Linares et al, 2001).

La liste de protéines où le nitrotyrosine a été identifié est en croissance continue. Par exemple, une approche protéomique employant un anticorps monoclonal contre le nitrotyrosine a mené à l'identification de plus de 40 protéines différentes qui semblent subir la nitration pendant la réponse inflammatoire in vivo (Aulak et al, 2001). Dans certains cas, la formation de nitrotyrosine est liée à la perte de fonction des protéines. C'est le cas de la SOD de manganèse, où le groupement nitro encombrant peut empêcher l'accessibilité du substrat à l'emplacement actif. De plus, le nitrotyrosine a un pKa d'environ 7,5, contrairement à la tyrosine qui a un pKa de 10. Ainsi, la nitration peut introduire une charge négative dans la protéine. D'une

manière primordiale, la nitration peut interférer avec des cascades de signalisation, puisque les résidus nitrés de tyrosyle ne peuvent pas être phosphorylés (Gow et al, 1996; Kong et al, 1996). D'ailleurs, les phosphatases de tyrosine ont un résidu critique de cystéine qui peut être oxydé par l'ONOO⁻, fournissant un mécanisme additionnel pour l'altération de la signalisation (Takakura et al, 1999).

2.4.7 Le peroxy-nitrite, une molécule de signalisation intracellulaire

Un nombre croissant d'évidences indique que l'ONOO⁻ a la capacité d'influencer plusieurs fonctions cellulaires dont la transcription des gènes et les cascades de signalisation. Notre laboratoire a précédemment démontré que l'ONOO⁻ est impliqué dans l'induction de l'expression du gène IL-8 chez les leucocytes humains stimulés avec le LPS et que l'ONOO⁻ est capable d'induire lui-même l'expression de ce gène (Filep et al, 1998). D'autres groupes ont aussi observé l'implication de l'ONOO⁻ dans la transcription des gènes. Dans les cellules épithéliales pulmonaires, l'ONOO⁻ augmente l'expression du gène de MnSOD sans en moduler l'expression de la protéine (Jackson et al, 1998). Chez les cellules endothéliales, il a été démontré que l'ONOO⁻ est capable d'induire l'expression de la hèmeoxygénase (Faresti et al, 1999) qui aurait possiblement un rôle protecteur contre les effets cytotoxiques de ONOO⁻. Dans les cellules du neuroblastome SH-SY5Y humaines, l'ONOO⁻ induit trois gènes GADD impliqués dans l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire (Oh-Hashi et al, 2001).

En ce qui concerne la modulation des voies de signalisation, dans les cellules P12, l'ONOO⁻ active ERK1/2 et p38 via l'activation des récepteurs EGF (Zhang et al,

2000; Jopes et al, 2000). Dans les cellules endothéliales, le ONOO^- agit en tant que molécule signalisatrice de la survie cellulaire en réponse aux stress environnementaux via l'activation de JNK (Go et al, 1999). Dans les cellules épithéliales de rat (Schieke et al, 1999) et les cellules du blastome humain SH-SY5Y (Oh-Hashi et al, 1999), l' ONOO^- augmente l'activité de p38 et de ERK1/2. Dans les cellules SH-SY5Y, la voie p38/ERK semble médier l'apoptose via l'activation d'une protéase apparentée à la caspase-3. L'activation de ERK1/2 peut aussi avoir d'autres fonctions tout dépendant du type cellulaire étudié. Des études dans notre laboratoire ont démontré que l'activation de ERK par l' ONOO^- induit un changement dans le phénotype des neutrophiles (Zouki et al, 2001). Le ONOO^- est aussi capable d'activer des kinases de la famille Src (Mallozi et al, 1999), d'empêcher la liaison du GTP à Rac2, une protéine G impliquée dans une variété de fonctions cellulaires (Rohn et al, 1999) ainsi qu'inactiver les phosphatases de tyrosine PTP1B, CD45 et LAP (Takakura et al, 1999).

2.5 Activité anti-bactérienne

Les neutrophiles représentent un système puissant de défense contre les micro-organismes envahissants qui menacent la vie ou l'intégrité fonctionnelle de l'hôte. La capacité de ces cellules à produire et libérer des quantités substantielles de molécules antimicrobiennes est une propriété unique des phagocytes polymorphonucléaires activés. Le rôle crucial de ces molécules dans la destruction des micro-organismes et leur contribution consécutive aux dommages tissulaires pendant l'inflammation sont largement connus.

2.5.1 La phagocytose

Les neutrophiles peuvent internaliser des particules opsonisées et non-opsonisées. Les principaux récepteurs des neutrophiles pour l'opsonine, les récepteurs Fc et un sous-groupe des intégrines $\beta 2$, lient l'immunoglobuline ou les particules couvertes par le complément, respectivement. Les récepteurs Fc des neutrophiles au repos incluent le Fc γ RIIA (CD32) et le Fc γ RIIIb (CD16), alors que le Fc γ RI (CD64) de haut-affinité fonctionne principalement après que les neutrophiles soient activés avec l'interféron (McKenzie et Schreiber, 1998). Le fragment C3bi du complément est reconnu par l'intégrine $\beta 2$ activée MAC1 (CD11b/CD18) (Ohkuro et al, 1995).

Tandis que l'engouffrement de la particule dans une vacuole dérivée de la membrane est le résultat ultime dans les deux cas, le processus d'internalisation n'est pas identique dans les événements engendrés par l'IgG ou le complément. Tandis que les particules opsonisées par le complément sont internalisées doucement dans la cellule, la liaison du récepteur Fc γ initie vigoureusement la prolongation de pseudopodes qui entourent et séquestrent finalement la particule (Greenberg et Grinstein, 2002). Une fois formée, la vacuole subit une série rapide d'événements de transformation, appelée la maturation, qui change sa composition, conférant sur elle la capacité de tuer des microbes pathogènes et de se débarrasser des débris.

Même après la formation d'un phagosome autour d'une particule, sa composition initiale n'est pas antimicrobienne: le terme « maturation phagosomale » se rapporte donc au processus par lequel le phagosome naissant acquiert la machinerie cellulaire nécessaire pour la destruction et la disposition des micro-

organismes internalisés. Ce développement est un processus dynamique qui implique de multiples événements de fusion et de fission vésiculaires (Vieira, 2002).

Un des dispositifs principaux de la maturation des phagosome est l'augmentation de son acidité. Les phagosomes tardifs (phagolysosomes) peuvent atteindre un pH luminal inférieur à 5,0 (Pitt et al, 1992). Cette acidification est indispensable à l'activité optimale des protéases et autres hydrolases lysosomales impliquées dans la destruction des microbes pathogènes. Cependant, en plus de son effet inhibiteur direct sur la croissance et la viabilité des microbes, le pH acide est également important pour la maturation du phagosome. Ainsi, le traitement avec des bases faibles comme le NH_4Cl empêche la fusion phagosome-lysosome (Hart et Young, 1991). Le mécanisme de cette inhibition n'est pas connu, cependant des études suggèrent que plutôt d'être simplement une conséquence de la maturation, l'acidification elle-même serait nécessaire pour que le phagosome puisse se développer entièrement. Cette notion est conforme aux observations faites sur la voie endocytaire, où l'inhibition de l'ATPase vacuolaire (V-ATPase) diminue le taux de translocation du contenu des endosomes aux lysosomes (Umata et al, 1990; van Deurs et al, 1996).

Comme dans les endosomes, l'acidification des phagosomes est établie principalement par l'action de la V-ATPase, une protéine transmembranaire qui pompe des protons dans le lumen du phagosome (Hackam et al, 1997; Nanda et al, 1996). Les V-ATPases sont à peine discernables dans la membrane plasmique des cellules au repos et ne sont donc pas présents dans les néo phagosomes. Cependant, elles sont promptement insérées lors des événements de fusion avec des organelles

endomembranaires (Hackam et al, 1997; Nanda et al, 1996). Chez les neutrophiles, les vésicules de sécrétion, les granules primaires et tertiaires, contiennent des V-ATPases (Grinstein et al, 1992).

2.5.2 L'oxydase NADPH et les espèces réactives de l'oxygène

L'enzyme responsable de la production des ROS s'appelle l'oxydase NADPH ou l'oxydase de l'éclat respiratoire (Babior, 1999). L'oxydase NADPH des phagocytes joue un rôle primordial dans les défenses de l'hôte contre les pathogènes microbiens en produisant du superoxyde et autres ROS (Babior, 1984). L'oxydase NADPH activée est un système enzymatique à composants multiples situés dans la membrane plasmatique des cellules activées (Chanock et al, 1994). Ses composants sont le cytochrome b558 (un hétérodimère composé de gp91phox et de p22phox; phox, oxydase de phagocyte), p47phox, p67phox, p40phox, et Rac1 (dans les monocytes) ou rac2 (dans les neutrophiles). L'oxydase NADPH est non active dans les cellules au repos mais s'active après stimulation des cellules.

Des mécanismes dépendants ou non des récepteurs peuvent induire l'activation de l'oxydase NADPH. Un grand nombre de facteurs tels que les bactéries opsonisées, le fragment C5a du complément, les peptides formylés comme le fMLP, la LTB₄, le PAF, le diacylglycerol, et les activateurs de PKC comme le PMA induisent l'activation de l'oxydase NADPH (Bokoch, 1995). L'angiotensine II stimule également la production de superoxyde dans les neutrophiles (El Bekay et al, 2003). Finalement, des composants bactériens comme le LPS mènent à la production de ROS dans les neutrophiles via la liaison du TLR4 (DeLeo et al, 1998).

Deux événements accompagnent l'activation de l'oxydase NADPH: 1) la phosphorylation de protéines et 2) la translocation des composants cytosoliques à la membrane plasmatique (figure 5).

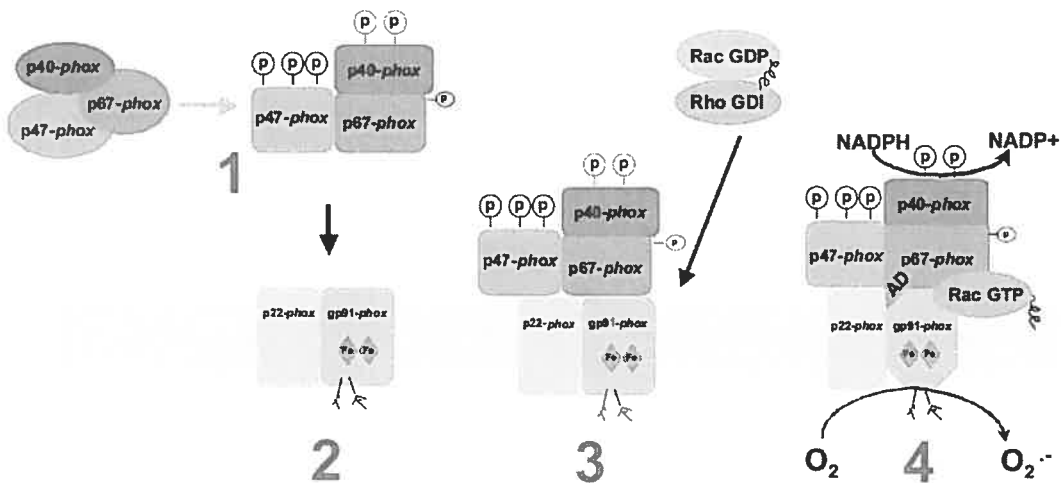


Figure 5. L'activation de l'oxydase NADPH. Dans les cellules au repos les composantes de NADPH sont distribuées entre les membranes et le cytosol. (1) Suite à l'activation cellulaire, les composantes cytosoliques sont phosphorylées et (2) migrent aux membranes où elles s'associent aux composantes membranaires; (3) en même temps, Rac est recruté au complexe et (4) gp91-phox est activé via le domaine d'activation de p67-phox à l'aide de Rac. Par la suite, l'oxydase NADPH activée utilise le NADPH cytosolique pour réduire l'oxygène et produire des anions de superoxyde. Tirée de El-Banna et al, 2005.

L'importance du système de l'oxydase NADPH est démontrée dans la maladie granulomateuse chronique. Les patients atteints de cette maladie sont susceptibles à des infections bactériennes et fongiques récurrentes dues à la fonction déficiente de l'oxydase de leurs phagocytes et à l'incapacité de ces cellules à produire du superoxyde ainsi que les ROS apparentés (Roos et al, 1996). Cependant, le superoxyde a un faible pouvoir bactéricide, ainsi ce n'est probablement pas le superoxyde lui-même qui tue les microbes (Hampton et al, 1998).

Dans le phagosome, le superoxyde est, spontanément ou enzymatiquement, converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peut alors réagir avec le superoxyde pour produire des radicaux d'hydroxyles et de l'oxygène singulet, deux composés fortement réactifs et toxiques (Hampton et al, 1998). Le H_2O_2 peut également, ainsi que le chlorure, être employé comme substrat par le myeloperoxidase libéré des granules azurophiles pour produire de l'acide hypochloriques (également connu sous le nom d'agent de blanchiment), un composé très toxique pour presque tous les microbes (Clifford et Repine, 1982). Par la suite, l'acide hypochlorique peut réagir avec des amines secondaires pour former des chloramines secondaires, qui sont aussi microbicides que l'acide hypochlorique, mais beaucoup plus stables (Bernofsky, 1991). Il y a également des indications que l'oxygène singulet peut être converti en composé semblable à l'ozone (O_3) dans une réaction catalysée par des anticorps liés aux microbes ou aux neutrophiles (Wentworth et al, 2002). Le superoxyde peut également réagir avec le NO, produit par les NOS, pour générer de l' $ONOO^-$, un intermédiaire de l'azote très réactif (Packer et al, 1996).

2.5.3 Les granules et substances anti-microbiennes

Les neutrophiles contiennent une variété de vésicules et de granules spécialisés. Ces organelles sont formés à partir de vésicules dérivées du réseau Golgi durant l'ontogénie des neutrophiles et contiennent un arsenal de peptides microbicides et d'enzymes protéolytiques très hétérogènes et puissants, ainsi que de nombreuses protéines liées à la membrane qui contribuent à l'élimination des pathogènes (Bainton et Farquhar, 1966; Bainton et al, 1971; Hartmann et al, 1995).

Quatre catégories de granules ont été identifiées: les granules primaires (ou azurophiliques), les granules secondaires (également connues sous le nom de granules spécifiques), les granules tertiaires, et les vésicules de sécrétion.

Les granules primaires sont les premiers à apparaître à l'étape promyélocyte; ils contiennent du MPO et s'appellent azurophiliques à cause de leur affinité pour le colorant d'azure (Spicer et al, 1969; Segal, 2005). Plus tard dans la maturation des neutrophiles (étape métamyélocyte), les granules spécifiques apparaissent et contiennent la collagénase, la lactoferrine, et la gélatinase, parmi d'autres protéines (Segal, 2005). Les granules de gélatinase (tertiaires) ressemblent aux granules spécifiques, mais ont des concentrations élevées de gélatinase (Segal, 2005). À maturité, les neutrophiles développent des vésicules de sécrétion fortement mobilisables (Segal, 2005). Ces vésicules contiennent des protéines plasmatiques non synthétisées dans le neutrophile (par exemple, l'albumine, l'IgG, la transferrine, etc.), mais qui sont plutôt d'origine endocytaire (Borregaard et Cowland, 1997). La stimulation des neutrophiles cause la sécrétion extracellulaire des granules dans l'ordre suivant: sécrétion, gélatinase, spécifique, et azurophilique (Sengelov et al, 1995).

Les enzymes des granules des neutrophiles sont la pierre angulaire de l'immunité innée dans la défense de l'hôte. En plus de la fusion des granules avec la membrane plasmique, la stimulation des neutrophiles permet la fusion des granules spécifiques et azurophiliques avec la vacuole phagocytaire. Ces événements de fusion permettent non seulement la production des métabolites de l'oxydase NADPH dans la vacuole phagocytaire, mais également le dégagement intravacuolaire d'une gamme de

protéinases cationiques qui interagissent avec, et perturbent, les surfaces bactériennes chargées négativement.

Parmi les principaux agents antibactériens des neutrophiles, on retrouve la protéine bactéricide augmentant la perméabilité (BPI), les défensines, l'élastase, la phospholipase A₂ (PLA₂), les cathelicidines qui contribuent à l'élimination des organismes envahissants en ciblant et rendant les membranes bactériennes plus perméables (Elsbach, 1998; Ganz et al, 1990; Belaaouaj et al, 2000; Zarembet et al, 1997; Levy et al, 1994).

D'autres agents contenus dans les granules comme la protéinase 3 (PR3) et la gélatinase B potentialisent, respectivement, l'activité de certaines cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF α et l'IL-1 β et plusieurs chimiokines, notamment l'IL-8 (Campbell et al, 2000; Coeshott et al, 1999; Van Den Steen et al, 2000).

Plusieurs métalloprotéinases, incluant la gélatinase B et la collagénase sont également nécessaires pour la migration des neutrophiles aux sites enflammés lors de la réponse inflammatoire (Borregaard et Cowland, 1997; Weiss et al, 1985; Weiss et Peppin, 1986).

2.6 Le prolongement de la survie des neutrophiles

L'apoptose joue un rôle vital dans le maintien du nombre de neutrophiles en circulation, l'élimination efficace des pathogènes envahissant ainsi que dans le contrôle de la durée et de l'intensité de la réponse inflammatoire et, par conséquent, l'ampleur du dommage tissulaire médié par les neutrophiles.

2.6.1 Les changements morphologiques et fonctionnels

Les changements morphologiques des neutrophiles en apoptose sont typiques du scénario apoptotique général. Les caractéristiques sont le rétrécissement de la cellule et des organelles intracellulaires, la condensation et la fragmentation de la chromatine nucléaire, ainsi que la perte de la forme multilobée du noyau. Tous ces événements sont discernables dans les cultures de neutrophiles, c.-à-d. durant le vieillissement *in vitro*. Les changements apoptotiques sont accompagnés d'un déclin des fonctions cellulaires, particulièrement des réactions modérées par des récepteurs. Les neutrophiles qui sont entrés dans le processus apoptotique perdent les capacités de chimiotactisme, de phagocytose, de la flambée oxydatif et de la dégranulation (Whyte et al, 1993; Dransfield et al, 1995). Ceci pourrait être dû à la perte d'expression de récepteurs et du dysfonctionnement des voies de signalisation qui y sont associées, car la stimulation indépendante des récepteurs, par exemple avec le PMA, reste moins altéré dans les cellules apoptotiques (Whyte et al, 1993). En dépit de l'hyperexpression des intégrines $\beta 2$, les neutrophiles apoptotiques ne peuvent pas adhérer due à la dégradation des filaments d'actine et la rigidité de la membrane plasmatique, qui empêche l'aplatissement cellulaire sur le substrat (Dransfield et al, 1995; Greenstein et al, 2000; Kothakota et al, 1997). Ensemble, ces données indiquent que l'apoptose des neutrophiles mène à une perte de leurs fonctions.

2.6.2 La régulation de l'apoptose et de la survie des neutrophiles

L'apoptose est contrôlée par deux voies principales: extrinsèque (par les récepteurs de la mort) et intrinsèque (via la mitochondrie) (Danial et al, 2004).

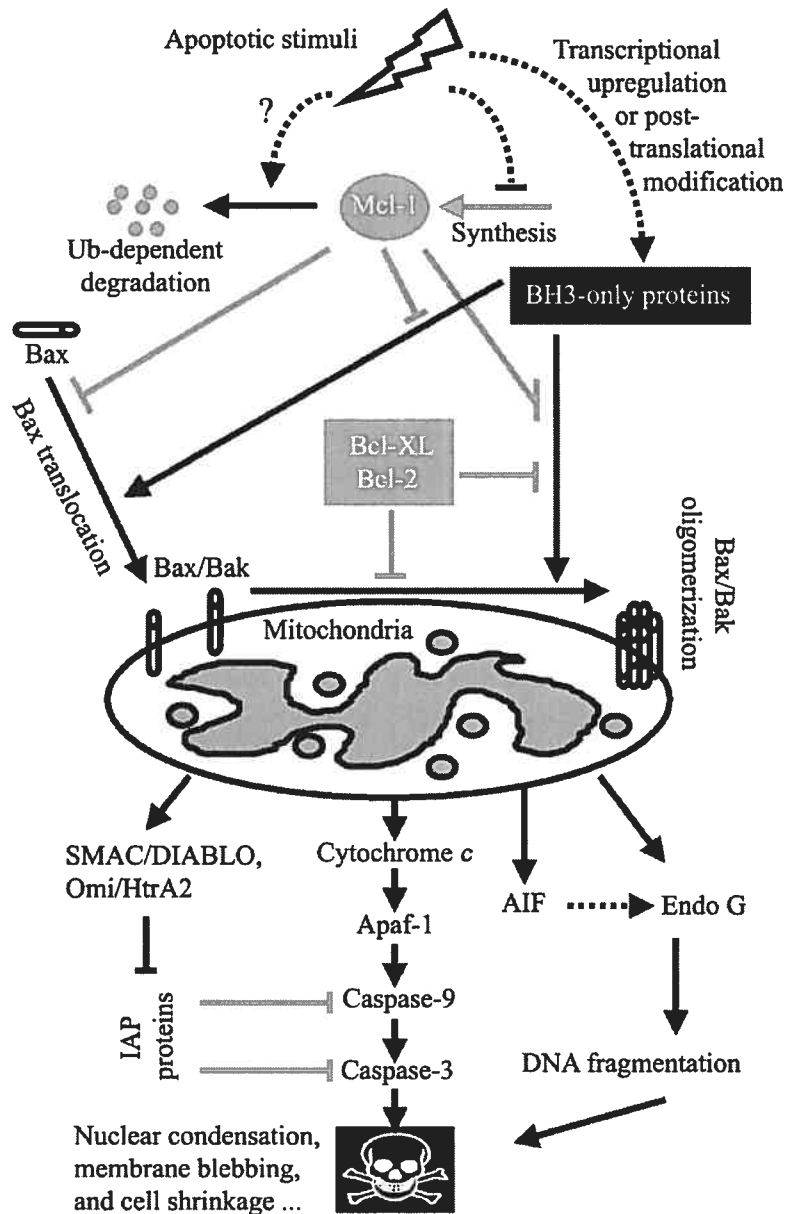
La signalisation extrinsèque est initiée par la liaison du ligand à son récepteur apparenté à la surface cellulaire (Ashkenazi et Dixit, 1998). Bien que cette voie soit présente chez les neutrophiles, elle ne semble pas jouer un rôle important dans l'apoptose constitutive (ou spontanée) ni lors du délai de cette dernière lors de l'inflammation (Brown et Savill, 1999; Renshaw et al, 2000). Les neutrophiles de souris déficientes en CD95 (manquant Fas) subissent l'apoptose spontanée au même taux que les souris témoins, suggérant que le système Fas n'est pas impliqué dans l'apoptose constitutive (Fecho et Kohen, 1998; Villunger et al, 2000).

Contrairement à la voie extrinsèque qui transmet un ensemble spécialisé de stimuli de la mort, la voie intrinsèque intègre un large éventail de stress extracellulaires et intracellulaires. Les stimuli extracellulaires incluent des insuffisances de facteurs de survie, les radiations, et tout autres stress chimiques et physiques, tandis que les stimuli intracellulaires comprennent le stress oxydatif, les dommages à l'ADN et le mauvais repliement des protéines.

La voie apoptotique intrinsèque reste encore évasive chez les neutrophiles, bien qu'elle doit être d'importance majeure car ces cellules sont destinées à une mort cellulaire rapide sans influence externe (spontanément) (Scheel-Toellner et al, 2004).

À courts termes, cette voie de signalisation apoptotique mène à la neutralisation des fonctions mitochondriales et l'activation des procaspases (figure 6).

Figure 6. La voie intrinsèque de l'apoptose. La voie intrinsèque implique les mitochondries, qui libèrent leurs constituants pro-apoptotiques dans le cytosol. Ces protéines favorisent l'activation de la caspase-9 (par le cytochrome c) ou inactivent les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) via Smac/Diablo, menant à la progression de l'apoptose au niveau de la caspase-3. Les homologues de Bcl-2 contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale, empêchant (anti-apoptotique) ou induisant (pro-apoptotique) la mort cellulaire. Tirée de Jiang et Wang, 2004.



2.6.3 Les caspases

Les caspases, une sous-classe de protéases à cystéine qui clivent des substrats après des résidus d'acide aspartique, sont importantes pour l'exécution de l'apoptose (Thornberry et Lazebnik, 1998).

Les caspases humaines sont subdivisées en caspases de signalisation (caspases 2, 8, 9, 10, et 12) et caspases effectrices (caspases 3, 6, et 7). Les procaspases de signalisation sont activées par dimérisation (Renatus et al, 2001; Boatright et al, 2003). En revanche, les procaspases effectrices, qui existent en tant que dimères inactifs préformés, sont activées par clivage protéolytique habituellement effectué par des caspases de signalisation déjà activées (Stennicke et al, 1998). Après activation, les caspases effectrices réalisent la destruction protéolytique de la cellule (Fischer et al, 2003). Il a été rapporté que les neutrophiles expriment une variété de caspases régulatrices et effectrices, y compris les caspases 3, 8, et 9 (Daigle et Simon, 2001; Yamashita et al, 1999; Santos-Beneit et Mollinedo, 2000).

2.6.4 Les homologues pro-apoptotiques de Bcl-2

Les protéines Bcl-2 constituent une famille de protéines ayant des propriétés pro- ou anti-apoptotiques. Les membres anti-apoptotiques (c.-à-d. Bcl-2, Mcl-1, A1, Bcl-XL) contiennent quatre domaines de similitude, désignés BH1 à BH4 (Pedros et al, 2004). Il est généralement accepté que les neutrophiles humains n'expriment pas la protéine anti-apoptotique Bcl-2, mais elles expriment les protéines Mcl-1 et A1 (Moulding et al, 2001; Akgul et al, 2001).

Les membres pro-apoptotiques, d'autre part, sont classifiés selon qu'ils contiennent une telle région d'homologie (les protéines 'BH3-seulement', par exemple Bid, et Bad) ou trois de ces régions ('multi-domaine' ou les protéines 'BH1-3', y compris Bax, et Bak) (Pedros et al, 2004).

La présence de Bax ou Bak est exigée dans tous les cas d'apoptose via la voie intrinsèque (Wei et al, 2001). Les cellules qui n'expriment pas ces deux protéines sont résistantes aux activateurs de cette voie. Ainsi, ces protéines contrôlent l'accès des signaux apoptotiques ascendants aux mitochondries. En réponse à des stimuli apoptotiques il y a translocalisation de Bax et/ou Bak à la mitochondrie, oligomérisation, et insertion dans la membrane mitochondriale externe. Bax et/ou Bak stimulent alors la libération du cytochrome c et d'autres protéines mitochondriales apoptogéniques dans le cytosol (Suzuki et al, 2000). L'inhibition de Bax/Bak est assurée par Mcl-1, une protéine Bcl-2 antiapoptotique (Leu et al, 2004). Suite à l'initiation de l'apoptose, Mcl-1 est déplacée de Bax/Bak par Bid et BAD activés.

Bid est clivé par la caspase-8 dans la voie médiée par les récepteurs de la mort, le calpain, et le granzyme B pour exposer son domaine BH3 (Wang et al, 1996; Li et al, 1998; Barry et al, 2000). La caspase-3 peut également cliver et activer Bid après le début de l'apoptose en tant qu'élément d'une boucle à rétroaction positive (Slee et al, 2000). Après clivage, la partie tronquée C-terminal de Bid (tBid) transloque à la mitochondrie et s'insère dans la membrane externe par l'intermédiaire de sa queue (Gross et al, 1999; Wei et al, 2000), laissant son domaine BH3 faire face au cytosol, où il peut lier Bak, ayant pour résultat l'activation de Bak (Wei et al, 2000). Le domaine BH3 de Bid interagit également avec Bax, facilitant son insertion dans la membrane mitochondriale externe (Eskes et al, 2000). Ainsi, Bid fonctionne comme une sorte de conduit direct entre les voies extrinsèques et intrinsèques.

La perte de facteurs de survie, comme GM-CSF, mène à l'activation de Bad (Scheid et Duronio, 1998; Klein et al, 2000). Le BAD actif (non phosphorylé) induit l'apoptose en inhibant les membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2, tels que Mcl-1, permettant de ce fait à Bak et Bax d'agréger, d'induire la libération mitochondriale du cytochrome c, l'activation des caspases, et l'apoptose (Jiang et Wang, 2004). En présence de facteurs de survie, BAD est phosphorylé sur des résidus spécifiques de sérine (Ser-112, Ser-136, et Ser-155) par une variété de kinases de survie, tels que ERK et AKT, menant à la séquestration et inactivation de BAD par la protéine 14-3-3 (Datta et al, 2000; Masters et al, 2001).

2.6.5 Les homologues anti-apoptotiques de Bcl-2

Les protéines Bcl-2 proapoptotiques sont antagonisées par les membres antiapoptotiques de la famille, y compris Mcl-1 et A1 chez les neutrophiles (Hofman, 2004). Bien que ces derniers aient été parmi les premiers régulateurs apoptotiques à avoir été découverts, leurs mécanismes d'action précis, incluant la façon dont ils empêchent la libération du cytochrome c, restent mal connus (Kharbanda et al, 1997; Kluck et al, 1997).

Un mécanisme postulé est que les protéines antiapoptotiques séquestrent les protéines de BH3-seulement, comme tBid et BAD, empêchant ces dernières d'activer Bax et Bak (Cheng et al, 2001). Par exemple, les niveaux cellulaires de Mcl-1 dans les neutrophiles humains corrèlent étroitement avec leur cinétique de survie (Francois et al, 2005; Moulding et al, 2000; Moulding et al, 2001). Les cellules non-apoptotiques ont des niveaux élevés de cette protéine de survie, tandis que les

niveaux sont faibles dans les cellules apoptotiques. En raison de l'absence de l'expression Bcl-2 dans les neutrophiles, les niveaux de Mcl-1 jouent un rôle crucial en déterminant le destin des cellules: si les niveaux de la protéine sont élevés (au-dessus d'un niveau seuil), la neutrophile survivra, tandis que s'ils tombent en-dessous de ce seuil protecteur, alors l'activité des protéines pro-apoptotiques prédomine et les cellules deviennent apoptotiques. La confirmation de cette hypothèse est issue d'expériences basées sur la stratégie d'antisense, perturbant spécifiquement l'expression de Mcl-1. En effet, une déplétion de Mcl-1 accélère l'apoptose constitutive (Moulding et al, 2000).

2.6.6 Les facteurs dérivés de la mitochondrie

Les mitochondries jouent un rôle important dans les signaux de transmission et d'amplification de la mort des neutrophiles. Cette découverte est surprenante puisque les neutrophiles sont connus comme étant des cellules qui possèdent très peu de mitochondries (Bainton et al, 1971; Clark et al, 1980).

Dans la voie intrinsèque, les mitochondries fonctionnent comme interface entre les voies apoptotiques en amont et les caspases en aval. Les événements mitochondriaux les plus critiques de l'apoptose sont le remodelage structural et fonctionnel de ces organelles et la libération subséquente des protéines apoptogéniques dans le cytosol. Ces protéines incluent le cytochrome c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, les facteurs induisant l'apoptose (AIF), et l'endonuclease G (EndoG) (Kluck et al, 1997; Liu et al, 1996; Du et al, 2000; Suzuki et al, 2001; Susin et al, 1999; Li et al, 2001).

Les mécanismes qui régulent la libération des protéines mitochondriales sont mal connus. Cependant, une fois libéré dans le cytoplasme, le cytochrome c se lie à Apaf-1 (Zou et al, 1997; Li et al, 1997). Cela mène à un changement de conformation d'Apaf-1 qui résulte en son homo-oligomérisation et le recrutement de procaspase-9 pour former un complexe nommé l'apoptosome (Zou et al, 1999; Acehan et al, 2002). La proximité forcée de la procaspase-9 dans l'apoptosome mène à l'activation. Comme avec l'activation de la procaspase-8 dans le DISC, la dimérisation de procaspase-9 semble être l'événement capital, avec le clivage protéolytique suivant jouant un rôle moins important (Stennicke et al, 1999; Renatus et al, 2001; Boatright et al, 2003). Une fois activée, la caspase-9 clive et active la procaspase-3 qui est également recrutée dans l'apoptosome (Bratton et al, 2001). La caspase-3, à son tour, agit rétroactivement et active aussi la procaspase-9 (Slee et al, 1999).

Plusieurs protéines endogènes, antagonisent les étapes postmitochondriales dans la voie intrinsèque. Une telle famille de protéines, les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), lient et inhibent les caspases 9, 3 et 7 (Deveraux et al, 1998).

La libération de Smac/DIABLO et d'Omi/HtrA2 des mitochondries au cytosol oppose l'inhibition des caspases par les IAP (Du et al, 2000; Verhagen et al, 2000; Suzuki et al, 2001). Cette levée d'inhibition est médiée par l'attachement de Smac/DIABLO et d'Omi/HtrA2 aux IAP, déplaçant ces derniers des caspases. En plus de ce mécanisme, Omi/HtrA2 clive et inactive, irréversiblement, les IAP (Yang et al, 2000). Ainsi, Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 agissent comme "inhibiteurs des inhibiteurs," permettant l'activation des caspases.

2.6.7 Les voies de signalisation régulant la survie des neutrophiles

Malgré le fait que les cytokines et autres agents peuvent moduler l'apoptose des neutrophiles, les voies de signalisations intracellulaires qui commandent ce processus sont en grande partie méconnues. Il est clair que les cascades de phosphorylation, impliquant la phosphorylation des résidus de tyrosine, sérine et de thréonine, sont importantes. Les agents qui augmentent les niveaux d'AMPc retardent l'apoptose des neutrophiles par l'intermédiaire de l'activité des protéines kinases A et C qui sont également impliquées dans l'apoptose constitutive des neutrophiles (Rossi et al, 1995; Pongracs et al, 1999). Cependant, les cibles et les voies de signalisation de ces kinases n'ont pas été entièrement identifiées (figure 7).

Des trois principaux types de MAPKs (ERK, p38MAPK et JNK) présents dans les neutrophiles humains, seulement l'implication de ERK et p38MAPK, dans l'apoptose des neutrophiles, a été rapportée. Le rôle fonctionnel de ces kinases peut être examiné via l'utilisation des inhibiteurs PD98059 (qui inhibe le MEK, empêchant de ce fait la phosphorylation et l'activation d'ERK), SB203580 qui est employé pour inhiber le p38MAPK et le wortmannin qui bloque l'activation du PI3K tout comme le LY294002.

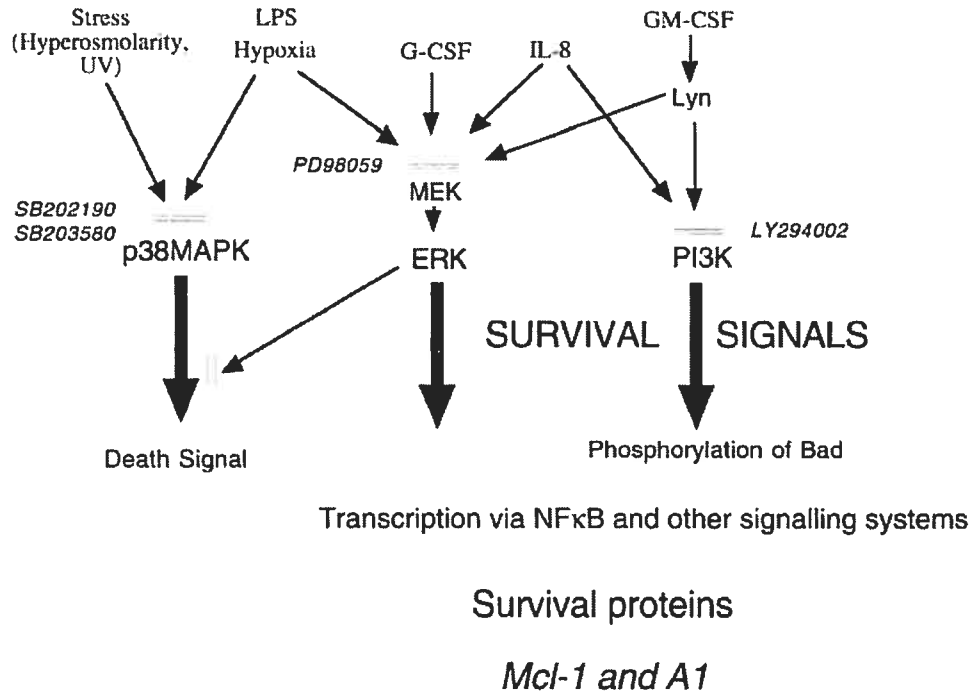


Figure 7: Rôles possibles de MAPKs et de PI3K dans l'apoptose et la survie des neutrophiles. Les signaux proapoptotiques sont générés par l'intermédiaire de l'activation de p38MAPK. En présence des signaux de survie (par exemple des cytokines ou du LPS) le p38MAPK peut encore être activé, mais les signaux produits par l'intermédiaire d'ERK et de PI3K activés peuvent empêcher le signal de la mort de p38MAPK, et ainsi l'apoptose des neutrophiles est retardée. Les signaux de survie peuvent inclure la phosphorylation (par exemple l'inactivation de Bad), et/ou l'activation des facteurs de transcription qui haussent l'expression des protéines de survie, A1 et Mcl-1. D'autres voies de signalisation ainsi que des composants intermédiaires sont susceptibles d'exister. Tiré de Akgul, 2001.

Le rôle de p38MAPK dans la régulation de l'apoptose des neutrophiles, a suscité beaucoup d'intérêt en recherche. Tandis que des expériences utilisant des inhibiteurs et la technologie d'antisense indiquaient un rôle pour p38MAPK dans l'apoptose constitutive des neutrophiles (Aoshiba et al, 1999), ceci n'a pas été confirmé dans d'autres études (Villunger et al, 2000; Frasch et al, 1998). De plus, l'inhibition de l'apoptose médié par hypoxie exige l'activité de p38MAPK (Klein et al, 2000) et p38MAPK est phosphorylé lors de l'inhibition de l'apoptose spontanée

des neutrophiles humains traités avec l'IL-15 (Pelletier et al, 2002). Par contre, l'inhibition de l'apoptose par le LPS est augmentée quand l'activité de p38MAPK est inhibée (Leuenroth et al, 2000). Le rôle de p38MAPK dans la régulation de l'apoptose et la survie des neutrophiles est donc mal connu. Il est possible que des signaux divergents produits en aval de l'activation de p38MAPK et provenant d'autres systèmes (par exemple de ERK, voir ci-dessous) tranchent soit en faveur de la mort ou la survie de la cellule.

Contrairement au p38MAPK, le rôle de ERK semble plus clair quant à l'apoptose des neutrophiles. L'activation de ERK dans ces cellules a comme conséquence la génération de signaux de survie (Nolen et al, 1999). Une variété de stimuli pro-inflammatoires tels que le GM-CSF, l'IL-1 β , l'IL-15, le LPS et une forme monomérique/modifiée de la protéine C-réactive (mCRP) ont tous été montrés à augmenter l'activité de ERK et à retarder l'apoptose des neutrophiles (Waterman et Sha'afi, 1995; Nahas et al, 1996; Pelletier et al, 2002; Khreiss et al, 2002).

Les agents suppresseurs de l'apoptose (tels que GM-CSF et l'IL-8) peuvent aussi activer la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Nolan et al, 1999), également associée à la génération de signaux de survie (Frasch et al, 1998). Certains de ces signaux de survie passent par l'activation d'AKT, qui peut, avec la complicité d'ERK, inactiver BAD par phosphorylation de résidus spécifiques et, diminuer ses effets pro-apoptotiques (Nolan et al, 1999; Scheid et Duronio, 1998). D'autres études ont démontré l'implication de mécanismes additionels tels que l'induction de l'expression ou l'augmentation de la stabilité de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Francois et al, 2005; Bouchard et al, 2004).

2.7 La phagocytose des cellules apoptotiques

Lorsque les cellules deviennent apoptotiques, elles sont rapidement englouties par des phagocytes professionnels, tels que les macrophages et les cellules dendritiques, qui sont des cellules hautement phagocytaires et mobiles, capables d'infiltrer une grande variété de tissus. Cependant, il devient de plus en plus évident que toute cellule possède la capacité d'engloutir une cellule voisine mourante (Gregory et al, 2004). De cette façon, la phagocytose protège les tissus et les cellules avoisinantes contre le contenu inflammatoire et immunogène des cellules mourantes, particulièrement des neutrophiles dont le contenu est fortement cytotoxique.

2.7.1 Altérations de la surface des cellules apoptotiques

Divers signaux sur les cellules apoptotiques servent de marqueurs pour leur identification pour la phagocytose (figure 8): l'apparition de nouvelles molécules sur la surface cellulaire, tels que la phosphatidylserine (PS) ou l'annexine I, la modification de molécules existantes, comme les changements apportés aux molécules ICAM-3, CD31 et CD16, ainsi que des altérations de la charge membranaire (Fadok et al, 2001; Henson et al, 2001; Savill et al, 2002; Frank, 2002; Brown et al, 2002; Moffat et al, 1999). L'interaction spécifique des protéines plasmatiques avec la surface cellulaire apoptotique favorise aussi la phagocytose (Fadok et al, 2001; Henson et al, 2001; Savill et al, 2002; Frank, 2002).

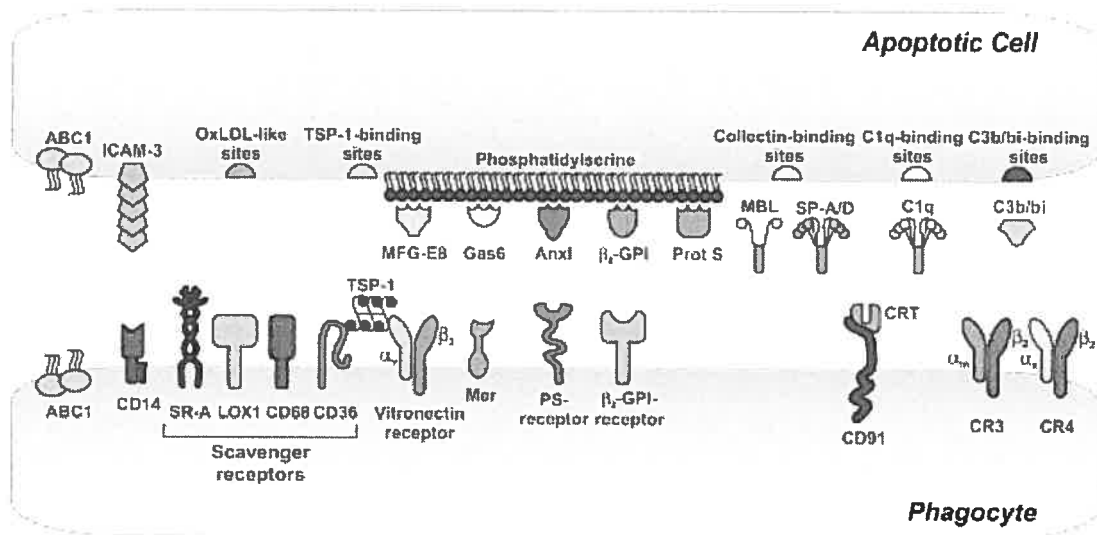


Figure 8. La synapse de l'internalisation de cellules apoptotiques. Les cellules apoptotiques affichent divers signaux d'engloutissement qui sont reconnus directement ou indirectement, par l'intermédiaire de différentes molécules de pontage, par les divers récepteurs des phagocytes. Tiré de Lauber et al, 2004.

Ainsi, des molécules de pontage extracellulaires, tels que le MFG-E8 (milk-fat-globule-EGF-factor-8), le β 2GPI (β 2 glycoprotein I), la protéine S du sérum, et le GAS6 (growth arrest-specific 6), lient des phospholipides, tels que le PS sur la surface des cellules apoptotiques. MFG-E8 est reconnue par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Hanayama et al, 2002), tandis que GAS6 est un ligand pour les récepteurs tyrosine kinases de la famille Axl, Sky et Mer (Nagata et al, 1996).

D'autres molécules de pontage, telles que certains membres de la famille des collectines, notamment SP-A, SP-D (surfactant protein-A, -D) et MBL (mannose-binding lectin), ainsi que le C1q (le premier composant de la cascade classique du complément), interagissent avec des sucres altérés de la surface (Ogden et al, 2001; Vandivier et al, 2002). Une fois liés aux cellules apoptotiques, SP-A, SP-D MBL et C1q sont reconnues par la calréticuline (CRT). Le CRT permet le lien entre le corps cellulaire et la phagocyte via la liaison LPR (LDL-receptor-related protein) ou CD91.

De plus, les cellules apoptotiques sécrètent la thrombospondine (TSP-1) qui se lie au CD36 présent sur la surface des cellules apoptotiques (Moodley et al, 2003). TSP-1 est par la suite reconnue par le complexe intégrine $\alpha_v\beta_3$ -CD36 présent sur la surface des phagocytes (Fadok et al, 1992).

Il est à noter qu'il existe une certaine redondance dans ce système complexe de signaux de reconnaissance et qu'il n'est pas nécessaire que les cellules apoptotiques affichent tous ces marqueurs pour être phagocytée de façon efficace.

2.7.2 Reconnaissance des cellules apoptotiques

Différents récepteurs de la surface cellulaire des phagocytes, peuvent reconnaître et répondre aux signaux apoptotiques. Ces récepteurs incluent: certains récepteurs « éboueurs », tels que CD36, CD68 et LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1), qui peuvent reconnaître la PS; certaines intégrines, tel que le récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui par la coopération avec CD36 et TSP-1 lie la MFG-E8; plusieurs lectines, qui interagissent avec une variété de sucres présents sur la surface des cellules apoptotiques; le récepteur tyrosine kinase MER, qui lie la molécule de pontage GAS6; CD91, qui interagit avec CRT lié à MLB et C1q via le CRT; le récepteur à LPS CD14, qui lie ICAM-3; et le récepteur à PS (PSR) (Fadok et al, 2001; Henson et al, 2001; Savill et al, 2002; Frank, 2002). De façon similaire aux marqueurs d'englobement, une internalisation efficace ne nécessite que l'expression d'un sous-ensemble de ces récepteurs sur le phagocyte.

Parmi les changements multiples à la surface des cellules apoptotiques, la plus fréquente et la mieux caractérisée est la perte de l'asymétrie des phospholipides et l'exposition de la PS sur le feuillet externe de la membrane de la cellule (Fadok et al, 1992). L'externalisation de la PS survient très tôt dans le processus apoptotique et il est presque universellement requis pour la phagocytose (Fadok et al, 1992; Schlegel et al, 2001; Fadok et al, 1998; Fadok et al, 2001; Hoffman et al, 2001). Le mécanisme de translocation de la PS sur le feuillet externe de la couche lipidique est largement attribuable à l'inhibition de l'aminophospholipide translocase, en partie due à une élévation de Ca^{2+} intracellulaire (Verhoven et al, 1995), ainsi que l'activation d'une « scramblase » lipidique (Fasch et al, 2000).

Malgré le fait que plusieurs récepteurs, dits à ligands multiples, puissent lier la PS, seul le PSR reconnaît de façon stéréospécifique la PS (Fadok et al, 2000). Toutes les cellules capables d'engloutir des cellules apoptotiques expriment le PSR, dont l'inhibition bloque l'internalisation de la majorité des cellules mortes *in vitro* (Fadok et al, 2001; Fadok et al, 2000; Henson et al, 2001). La vaste majorité de ces signaux sont nécessaires pour l'accolade des cellules apoptotiques aux phagocytes, alors que l'interaction PS/PSR est responsable du déclenchement de la signalisation du processus d'internalisation (Somersan et al, 2001).

Il existe aussi des signaux de répulsion entre macrophages et leucocytes. Il a été démontré que, sous des conditions dynamiques, les macrophages palpent les leucocytes et si la cellule est viable, elle se détache rapidement du macrophage. Cependant, les leucocytes apoptotiques restent en contact et la phagocytose s'ensuit (Brown et al, 2002). Ce phénomène est médié par le CD31.

2.7.3 Conséquences de la phagocytose des cellules apoptotiques

Contrairement à l'effet pro-inflammatoire de la phagocytose des cellules nécrotiques qui stimule les réponses pro-inflammatoires chez les macrophages (Stern et al, 1996; Fadok et al, 2001), les cellules apoptotiques sont non seulement incapables de stimuler cette réponse (Meagher et al, 1992), mais peuvent aussi activement la supprimer (Fadok et al, 1998). Il a été rapporté que le contact neutrophile apoptotique-macrophage favorise la résolution de l'inflammation (Byrne et al, 2002). Un grand nombre d'études soutiennent qu'en réponse à des cellules apoptotiques, les phagocytes mononucléaires libèrent des cytokines anti-inflammatoires, incluant l'interleukine IL-10 et le TGF- β 1, qui peuvent agir en tant que facteurs anti-inflammatoires autocrines et paracrines (Voll et al, 1997). Le processus semble être dépendant des PS et impliquerait le PSR dans la réponse menant à la production de TGF- β 1 (Savill et al, 2002).

Puisque l'annexin 1 est capable de stimuler la production d'IL-10, cela pourrait être une autre voie par laquelle IL-10 serait secrété lors de l'ingestion phagocytaire des cellules apoptotiques (Parente et al, 2004). Aussi, la liaison de SHPS-1 (small heterodimer partner substrate-1) par le CD47 est connue pour inhiber la production de cytokines inflammatoires par les cellules dendritiques immatures (Tada et al, 2003). De plus, Mer a le potentiel de générer directement des réponses anti-inflammatoires dans les macrophages en réponse à des cellules apoptotiques, possiblement via la liaison de PS à la surface de la cellule (Brown et al, 2002; Lemke et al, 2003).

Finalement, les cellules apoptotiques elles-mêmes peuvent sécréter des facteurs immunomodulateurs tels que l'IL-10 (Gao et al, 1998) et TGF - β 1 (Chen et al, 2001). Chacun de ces médiateurs anti-inflammatoires peut potentialiser la capacité des macrophages à internaliser les cellules mourantes (Byrne et al, 2002).

De plus, contrairement à l'internalisation de cellules nécrotiques par les cellules phagocytaires qui aboutit à l'activation des cellules T et ainsi l'activation de l'immunité adaptative (Gallucci et al, 1999; Sauter et al, 2000; Basu et al, 2000), l'ingestion des cellules apoptotiques n'induit pas l'expression d'antigènes (Green et al, 2000). Ainsi, les cellules T qui entrent en contact avec les cellules présentatrices d'antigènes ayant englouti une cellule apoptotique peuvent devenir anergiques ou apoptotiques (Green et al, 2000). Des études ont également démontré que les cellules dendritiques ayant internalisé une cellule apoptotique sont incapables de répondre à des stimuli externes, de devenir matures et de présenter des antigènes dérivés de la cellule engloutie aux cellules T (Stuart et al, 2002; Urban et al, 2001). L'absence de la maturation des cellules dendritiques suite à l'internalisation d'une cellule apoptotique serait due à l'inhibition de la sécrétion d'IL-12, qui possède des effets autocrines et paracrines sur la maturation cellulaire (Stuart et al, 2002; Urban et al, 2001).

Ainsi, il est suggéré que l'interaction entre cellules apoptotiques et phagocytes mononucléaires crée un microenvironnement qui non seulement supprime les réponses immunes et inflammatoires, mais facilite aussi l'élimination des cellules apoptotiques.

II. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Principalement, ces études essaient de comprendre les mécanismes par lesquels l'ADN bactérien peut moduler les fonctions des neutrophiles impliqués dans le maintien et l'amplification de l'inflammation, des événements essentiels pour la défense de l'organisme, mais qui sont aussi associés à divers pathologies inflammatoires tels que le sepsis. Pour ce faire, nous avons testé les hypothèses que l'ADN-CpG (1) est un signal de survie pour les neutrophiles humains capable de retarder leur apoptose spontanée, (2) induit la sécrétion de l'interleukine-8 via la signalisation du ONOO⁻ chez les neutrophiles humains et finalement (3) que l'inhibition de la signalisation dépendante du ONOO⁻ pourrait être thérapeutiquement bénéfique pour atténuer la réponse inflammatoire et les dommages qui y sont associés.

Les principaux objectifs spécifiques sont :

- 1) Démontrer l'expression du TLR9 sur les neutrophiles humains et la présence de la signalisation par ce récepteur.
- 2) Étudier *in vitro* les mécanismes intracellulaires sous-jacents et confirmer *ex vivo* le prolongement de la survie des neutrophiles lorsque ces derniers sont stimulés avec l'ADN-CpG.
- 3) Examiner si l'ADN-CpG peut induire la sécrétion de l'interleukine-8 chez les neutrophiles et élucider les mécanismes intracellulaires.
- 4) Confirmer l'implication de la signalisation du ONOO⁻ dans l'induction de la sécrétion d'IL-8 des neutrophiles humains en réponse à l'ADN-CpG.
- 5) Vérifier s'il est possible d'inhiber la production d'IL-8 en ciblant la signalisation dépendante du ONOO⁻.

III. RÉSULTATS

3.1 Chapitre I (Article 1)

József L, Khreiss T, Filep JG. (2004) CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J.* 18 : 1776-1778.

3.1.1 Contribution des auteurs

Levente József

Dans ce projet j'ai mis au point et effectué toutes les expériences décrites dans l'article. De plus, j'ai analysé tous les résultats découlant de cet article et j'ai contribué à la rédaction de l'article.

Tarek Khreiss

Tarek Khreiss a participé à la mise au point de certaines techniques expérimentales. Il a également été d'une grande aide au niveau intellectuelle tout au long de l'avancement de ce projet.

Dr. Janos G. Filep

Étant mon directeur de recherche, Dr. Janos G. Filep, m'a guidé et m'a supervisé durant toutes les étapes du projet.

3.1.2 Introduction générale du chapitre I (article 1)

Dans la circulation, les neutrophiles ont une durée de vie très courte et meurent rapidement par apoptose spontanée. Lorsque recruté à un site enflammé, la survie des neutrophiles peut être prolongée par des signaux de l'environnement inflammatoire. Dans ce présent chapitre, nous avons examiné l'impact de l'ADN bactérien sur la machinerie apoptotique des neutrophils humains *in vitro* et des neutrophiles de rats *ex vivo*.

Nous avons trouvé que l'ADN-CpG promeut la survie des neutrophiles en retardant leur apoptose constitutive. Les neutrophiles expriment le TLR9 et la signalisation par cette voie nécessite, au préalable, une maturation endosomale de l'ADN-CpG. L'ADN-CpG active les voies de signalisation ERK et AKT, qui convergent sur la phosphorylation des serines de BAD, et par conséquent prévient le dysfonctionnement mitochondriale. L'ADN-CpG maintient le potentiel mitochondrial transmembranaire empêchant la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-3. Egalement, l'injection de l'ADN-CpG dans des rats résulte dans une atténuation de l'apoptose spontanée des neutrophiles évalué *ex vivo*.

Ces observations suggèrent qu'en prolongeant la survie des neutrophiles, l'ADN bactérien contribue à l'accumulation des neutrophiles aux sites enflammés résultant en la prolongation et l'amplification de l'inflammation pouvant mener à des dommages tissulaires excessifs.

Article 1**3.1.3 CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes**

Levente József, Tarek Khreiss, János G. Filep

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department of Medicine,
University of Montréal, Montréal, QC, Canada H1T 2M4

L.J. and T.K. contributed equally to this work.

Running title: CpG-DNA delays neutrophil apoptosis

Address correspondence to: Dr. János G. Filep
Research Center
Maisonneuve-Rosemont Hospital
5415 boulevard de l'Assomption
Montréal, Québec, Canada H1T 2M4
Phone: (514) 252-3400 ext. 4662
Fax: (514) 252-3430
E-mail: [REDACTED]

3.1.3.1 Abstract

Human neutrophil granulocytes die rapidly and their survival is contingent upon rescue from programmed cell death by signals from the environment. We now show that a novel signal for delaying neutrophil apoptosis is unmethylated CpG motifs prevalent in bacterial DNA (CpG-DNA). Human neutrophils express toll-like receptor 9 that recognizes these motifs. CpG-DNA, but not mammalian DNA or methylated bacterial DNA, markedly enhanced neutrophil viability by delaying spontaneous apoptosis. Endosomal maturation of CpG-DNA is prerequisite for these actions and was coupled to concurrent activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways, leading to phosphorylation of BAD at Ser¹¹² and Ser¹³⁶, respectively, and to prevention of decreases in mitochondrial transmembrane potential, cytochrome c release and caspase-3 activation. Consistently, pharmacological inhibition of either ERK or phosphatidylinositol 3-kinase partially reversed these actions of CpG-DNA; however, they did not produce additive inhibition. Furthermore, intravenous injection of CpG-DNA (200 µg/kg) into rats evoked slight decreases in blood pressure and induced a modest leukocytosis, whereas it effectively suppressed neutrophil apoptosis as assayed *ex vivo*. Our results indicate that unmethylated CpG motifs in bacterial DNA promotes neutrophil survival by suppressing the apoptotic machinery and may therefore contribute to prolongation and amplification of inflammation.

3.1.3.2 Introduction

Neutrophil granulocytes form the first line of defense against bacterial infection. Their excessive accumulation, activation and prolonged survival also contribute to tissue damage. Migration of neutrophils into inflamed or injured tissues is intimately linked to their activation as well as survival. Mature neutrophils have the shortest life span among leukocytes, and die rapidly via apoptosis *in vitro*, and apparently, *in vivo* (1-4). Neutrophils undergoing apoptosis lose the ability to respond to chemoattractants, and are rapidly ingested by scavenger macrophages (1, 5). This constitutively expressed program may promote removal of neutrophils from inflamed areas with minimal damage to the surrounding tissue, thereby facilitating the resolution of inflammation (6). The fate of neutrophils can, however, be influenced within the inflammatory microenvironment. Indeed, bacterial LPS and pro-inflammatory cytokines, such as IL-2, IL-8 and IFN- γ can prolong the life span of neutrophils by suppressing apoptosis (2, 5, 7). Clinical studies reported markedly suppressed neutrophil apoptosis in patients with inflammatory diseases, including acute respiratory distress syndrome (8) and sepsis (9).

Mammalian innate immune cells detect the presence of bacteria through toll-like receptors (TLR) that recognize pathogen-associated molecular patterns (10, 11). Bacterial genomic DNA is discriminated from host-derived self-DNA, and is recognized by TLR-9 (12-16). Bacterial DNA contains short sequences of nonmethylated CpG dinucleotides in certain base contexts (12, 17). CpG motifs are at least 20-fold more common in bacterial than vertebrate DNA, and in eukaryotic DNA these motifs are suppressed and mostly methylated (12). While numerous studies

have investigated the impact of bacterial DNA (CpG-DNA) on human and murine lymphocytes, macrophages and dendritic cells (reviewed in Ref. 12), surprisingly little is known about its effects on neutrophils. Administration of CpG-DNA to mice results in neutrophil accumulation at the primary sites of infection (18, 19). Consistent with enhanced neutrophil trafficking, CpG-DNA induces IL-8 release, triggers L-selectin shedding and upregulation of CD11b on the surface of isolated neutrophils (20, 21); it also enhances phagocyte activity and primes for superoxide production (19, 20). Recent studies showed that human neutrophils express TLR-9 mRNA (18, 19) and protein (18), though the TLR-9 dependence of neutrophil activation has been questioned (19).

In this study, we investigated whether CpG-DNA could delay neutrophil apoptosis. Our results demonstrate that unmethylated CpG motifs in bacterial DNA prolong the life span of neutrophils by suppressing the constitutively expressed apoptotic machinery both *in vitro* and *ex vivo*. We also found that endosomal maturation is required for CpG initiation of intracellular signaling, consistent with involvement of TLR-9. Furthermore, we also investigated the molecular mechanisms underlying the apoptosis-delaying action of CpG-DNA, observing a role for the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3kinase)/Akt signaling pathways, leading to prevention of mitochondrial dysfunction and activation of caspase-3.

3.1.3.3 Materials and Methods

Bacterial and mammalian DNA – *E. coli* DNA (strain B) and calf thymus DNA (Sigma-Aldrich) were purified by extraction with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 vol/vol/vol) and ethanol precipitation. Heat denatured (single stranded) genomic DNA was used in all experiments. For some experiments, *E. coli* DNA was treated for 16 h at 37°C with CpG methylase *SssI* (2U/μg DNA) in NE Buffer 2 supplemented with 160 μM S-adenosylmethionine (New England Biolabs). Methylated DNA was purified as above. *E. coli* and calf thymus DNA preparations contained <5 ng LPS per mg DNA by *Limulus* assay.

Isolation and culture of neutrophils - Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers (male and female, 23-54 years), who had not taken any drugs for at least 14 days before the experiments (22). The Clinical Research Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital approved the protocol. Neutrophils (5×10^6 cells/ml, purity >96%, viability >98%) were resuspended in Hanks' balanced salt solution (HBSS) supplemented with 10% autologous plasma, and incubated with CpG DNA, calf thymus DNA, methylated bacterial DNA or LPS (*E. coli* O114:B4, 1 μg/ml) in 0.5 ml conical polypropylene tubes on a rotator (Adams Nutator) at 37°C in 5% CO₂. In additional experiments, neutrophils were preincubated with 30 nM bafilomycin, 5 μg/ml chloroquine, 10 μM monensin, 50 μM PD98059, 100 nM wortmannin, 1 μM SB 203580, 20 μM Z-VAD-FMK or Z-FA-FMK, 20 min before addition of CpG-DNA. At the indicated times, cells were washed once in HBSS before use in the assays described below.

Assessment of Cell Viability and Apoptosis - Standard cytopsin preparations were stained with Wright-Giemsa dye for photographic demonstration of apoptotic morphologic features. Neutrophil apoptosis was quantitated as the percent of cells with hypodiploid DNA (23) and positive annexin V staining (24). For DNA detection, neutrophils ($\sim 10^6$) were suspended in 0.5 ml hypotonic fluorochrome solution (50 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide in 0.1% sodium citrate plus 0.1% Triton X-100) immediately before analysis. Propidium iodide fluorescence of 10,000 individual nuclei per sample was acquired and analyzed with a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). For specific annexin V binding, neutrophils (10^6) were incubated in 100 μl binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4) containing a saturating concentration of R-PE-labeled annexin V for 15 min at 20°C and then washed with phosphate buffered saline before analysis by flow cytometry. Non-specific binding was determined by using calcium-free binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.4).

DNA fragmentation - DNA cleavage was shown by gel electrophoresis as described (25). In brief, DNA was extracted from neutrophils, precipitated and resuspended in Tris-EDTA buffer containing 25 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (Roche), incubated for 5 min at 65°C, and then subjected to electrophoresis in 0.8% agarose at 80 V for 70 min. After staining with ethidium bromide, DNA was visualized by UV examination for image analysis.

Caspase-3 activity assay - Cell lysates, prepared from 10^7 neutrophils, were incubated for 60 min at 37°C in 200 μ l assay buffer containing 28 μ M N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (BD Biosciences). Release of AMC from Ac-DEVD-AMC was measured using a CytoFluor microplate reader (PE Biosystems) with excitation and emission wavelengths of 340 nm and 460 nm, respectively.

Analysis of Mitochondrial Transmembrane Potential ($\Delta\Psi_m$) - At the indicated times, aliquots of neutrophil suspensions (5×10^5 cells) were removed, incubated for 15 min at 37°C with 10 μ g/ml JC-1 (26) using the MitoPT detection kit (Immunonochemistry Technologies), and analyzed by flow cytometry in accordance with the manufacturer's protocol.

Mitochondrial cytochrome c release - At the indicated times, neutrophils (2×10^7 cells) were harvested and mitochondrial and cytosolic fractions were isolated using the Mitochondrial Fractionation kit (Active Motif). Cytochrome c levels in mitochondrial and cytosolic extracts (20 μ g protein each) were determined by a selective ELISA (Active Motifs). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were <10%.

Western blot analysis - Protein extracts were prepared by lysing 2×10^6 neutrophils in 100 μ l lysis buffer (20 mM Tris, 1 mM EGTA, 2 mM Na_3VO_4 , 25 mM NaF, 0.5% (vol/vol) Triton X-100, 2 mM PMSF, 40 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml each of chymostatin, leupeptin and pepstatin A), and western blot analysis of phosphorylated

ERK 1/2 and Akt was performed using the Phospho Plus ERK 1/2 and Akt Ab kits (New England Biolabs) as described (27). To assess ERK and Akt-mediated phosphorylation of BAD, Western blot analysis was performed on lysates from 2×10^7 cells using anti-phospho-BAD(Ser112) Ab (Biosource International) and anti-phospho-BAD(Ser136) Abs (Upstate Biotechnology), respectively (27).

Preparation of high purity neutrophil - Neutrophils (10^7) enriched by Ficoll centrifugation were incubated for 30 min at 4°C with 20% heat-inactivated autologous serum prepared in HBSS, washed twice, and simultaneously labeled for 30 min at 4°C with R-PE-conjugated anti-CD16, FITC-labeled anti-CD19, FITC-labeled anti-CD3, and FITC-labeled anti-HLA-DR (all from BD PharMingen) according to the manufacturer's instructions. After two washes with HBSS, cells were subjected to dual channel FACS analysis on a FACSVantage cytometer (Becton Dickinson). Neutrophils, defined as CD16⁺, CD3⁻, CD19⁻, and HLA-DR⁻ cells, were separated by sorting with a flow rate of 10,000 cells/s. Gates were set to exclude debris and non-viable cells on the basis of light-scatter properties. Aliquots of the sorted cells were reanalyzed on a FACScan flow cytometer, and were routinely >99.9% pure and >92% viable (determined by trypan blue exclusion).

TLR-9 expression - Freshly isolated neutrophils or neutrophils were incubated for 2 h at 37°C with CpG-DNA (1.6 µg/ml), permeabilized with Permeabilization Buffer (eBioscience), and stained with a R-PE-conjugated anti-human TLR-9 Ab eB72-1665 or a class-matched irrelevant Ab (eBioscience). Neutrophil TLR-9 expression was assessed on a FACScan flow cytometer. In additional experiments, high purity

(>99.9%) neutrophils were lysed as described above, and TLR-9 was detected by western blotting using a mouse anti-human TLR-9 Ab (eBioscience).

Animal experiments - The experiments were performed on conscious chronically catheterized male Wistar rats (CrI:(Wi)BR, Charles River) weighing 300 to 350 g. The Hospital's Animal Care Committee approved the procedures. The animals were housed in individual metabolic cages and catheters were implanted into the abdominal aorta and vena cava as described previously (28). Five days were allowed to complete recovery from surgery. During the experiments, the animals could move freely and have free access to water. Mean arterial blood pressure and heart rate was monitored continuously by a blood pressure analyzer (Micro-Med) with a COBE CDX III pressure transducer. Following baseline hemodynamic measurements, the animals were given a bolus intravenous injection of CpG-DNA (200 µg/kg body weight in 100 µl; n=5), calf thymus DNA (n=4) or their vehicle (n=4). Sixty min later, under isoflurane anesthesia, blood (10-13 ml) was collected by cardiac puncture into heparinized syringes, and then processed to isolate neutrophils with centrifugation through Ficoll-Hypaque following dextran sedimentation as described above. The resulting cell preparations contained >95% neutrophils with cell viability >90%. Absolute red blood cell, white blood cell and platelet counts were performed with a Coulter MicroDiff II automated hematology analyzer. White blood cell differential counts were performed on samples stained with Wright's stain. The percentage of viable and apoptotic neutrophils was assessed by flow cytometry following staining with FITC-conjugated annexin V (BD PharMingen) and

propidium iodide (5 $\mu\text{g/ml}$) immediately upon completing cell isolation and after 2 and 22 h incubation of neutrophil suspensions at 37°C.

Statistical analysis - Results are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons were made by ANOVA using ranks (Kruskal-Wallis test) followed by Dunn's multiple contrast hypothesis test to identify differences between various treatments or by Mann-Whitney U test. P values <0.05 were considered significant for all tests.

3.1.3.4 Results

TLR-9 expression in neutrophils

Western blot analysis of lysates of high purity ($>99.9\%$) human neutrophils revealed the presence of TLR-9 in neutrophils (Fig. 1a). Human peripheral blood mononuclear cells served as a positive control (16), whereas Jurkat J77 T cells (16) and red blood cells served as negative controls (Fig. 1). The presence of TLR-9 in neutrophils was further confirmed by flow cytometry using an R-PE-tagged TLR-9 antibody (Fig. 1b). In this assay, neutrophils were first permeabilized, for TLR-9 is expressed in intracellular vesicles (29). Culture of neutrophils with CpG-DNA for 2 h resulted in a modest increase in TLR-9 staining (Fig. 1b).

CpG-DNA, but not mammalian DNA, prolongs neutrophil survival by delaying apoptosis

As expected, control (untreated) isolated neutrophils developed prominent features of apoptosis, including loss of membrane asymmetry (assessed by annexin V

binding), diminution in cell volume, chromatin condensation, and internucleosomal cleavage of DNA, resulting in hypodiploid nuclei, within 24 h of culture. CpG-DNA effectively suppressed the development of apoptotic morphology, and increased the percentage of viable neutrophils at each of the time points studied (Figs. 2a-c). The apoptosis inhibitory action was concentration-dependent with an EC_{50} value of 170-320 ng/ml (Fig. 2c). The apparent maximum inhibition that can be achieved with CpG-DNA was similar to that seen with 1 μ g/ml LPS (Figs. 2a and 2d). Although considerable proportions of CpG-DNA-treated neutrophils retained a non-apoptotic morphologic appearance after 24 to 48 h in culture, cell viability decreased below 18%, and more than 81% of cells stained positive for annexin V by 72 h. Neither calf thymus DNA nor methylated *E. coli* DNA affected significantly the percentage of viable cells and annexin V binding (Fig. 2d). Likewise, LPS at 0.03 ng/ml (the maximum level of contamination detected in our DNA preparations) was without detectable effect (data not shown). Electrophoretic analysis demonstrated the ability of CpG-DNA to inhibit DNA fragmentation, considered to be a hallmark of apoptosis (Fig. 2e). The effects of 1.6 μ g/ml CpG-DNA were comparable to those of 1 μ g/ml LPS (Fig. 2e).

Endosomal acidification inhibitors block the anti-apoptotic action of CpG-DNA

To test whether endosomal acidification of CpG-DNA is a necessary step for initiating intracellular signaling, neutrophils were cultured in the absence or presence of specific inhibitors previously shown to block endosomal acidification of CpG-DNA, including bafilomycin A, chloroquine, and monensin, which have different

mechanisms of action (30-32). Although these inhibitors by themselves slightly decreased neutrophil viability, they almost completely reversed the apoptosis suppressing action of CpG-DNA (Fig. 3a), indicating the involvement of a pH-dependent step in CpG-DNA signaling. In contrast, these inhibitors had no detectable effects on LPS suppression of neutrophil apoptosis (Fig. 3b).

CpG-DNA induces phosphorylation of BAD via the MAPK kinase/ERK and PI 3-kinase/Akt signaling pathways

To assess the downstream intracellular signaling pathways that mediate the apoptosis-delaying action of CpG-DNA, we studied the activation of several MAP kinases known to regulate neutrophil survival. CpG-DNA induced a transient, time- and concentration-dependent phosphorylation of ERK 1/2 and Akt relative to unstimulated controls (Figs. 4a and 4b). Phosphorylation of both ERK 1/2 and Akt was rapid in onset, reaching a peak within 15 min. The relative degree of ERK 1/2 and Akt phosphorylation induced by LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) is shown for comparison (Fig. 4a).

To confirm the role of Akt and ERK activation in mediating the apoptosis-delaying action of CpG-DNA, we used selective pharmacological inhibitors. Neither the MAPK/ERK kinase inhibitor PD98059, nor the PI 3-kinase (the up-stream regulator of Akt activation) inhibitor wortmannin alone affected development of neutrophil apoptosis, whereas the p38 MAPK inhibitor SB203580 significantly increased the percentage of viable cells, and reduced the percentage of annexin V positive cells and neutrophils exhibiting hypodiploid nuclei ($P < 0.01$ compared with

untreated control) (Fig.4b). Both PD98059 and wortmannin effectively blocked the apoptosis-delaying action of CpG-DNA, albeit complete inhibition was never observed. The effects of PD98059 and wortmannin were not additive (Fig. 4b). Similar results were obtained when another PI 3-kinase inhibitor, LY294002 was used instead of wortmannin (data not shown). Co-treatment of neutrophils with CpG-DNA and SB203580 resulted in a similar degree of suppression of neutrophil apoptotic features than those observed with either CpG-DNA or SB203580 alone (Fig. 4b). Pretreatment of neutrophils with PD98059 inhibited CpG-DNA-induced phosphorylation of ERK 1/2 without affecting Akt phosphorylation, and pretreatment with wortmannin inhibited Akt phosphorylation but did not block ERK 1/2 phosphorylation (Fig.4c).

Next, we studied phosphorylation of BAD, a downstream target for both ERK and Akt. CpG-DNA induced concentration-dependent phosphorylation of BAD at both Ser112 and Ser136 relative to unstimulated control neutrophils (Fig. 4d). PD98059 inhibited CpG-DNA-induced phosphorylation at Ser112, but not at Ser136; wortmannin blocked phosphorylation at Ser136 without affecting phosphorylation at Ser112 (Fig. 4e).

CpG-DNA inhibits disruption of mitochondrial transmembrane potential, cytochrome c release and activation of caspase-3

The $\Delta\Psi_m$ was measured at different time points using the fluorochrome JC-1 and FACS analysis (26). Significant reduction in $\Delta\Psi_m$ was detected in neutrophils undergoing spontaneous apoptosis at 4 h of neutrophil culture. Culture of neutrophils

for 8 and 22 h was associated with further decreases in $\Delta\Psi_m$ (Figs. 5a and 5b). Disruption of $\Delta\Psi_m$ was partially inhibited in the presence of CpG-DNA (Fig. 5b), but not in the presence of calf thymus DNA (data not shown). The inhibitory action of CpG-DNA was concentration-dependent (Fig. 5c), and the apparent maximum inhibition that could be achieved with CpG-DNA was comparable to that of 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (Fig. 5a).

To link changes in $\Delta\Psi_m$ to cytochrome c release, we measured cytochrome c levels in the mitochondrial and cytosolic fractions with a selective ELISA. As expected, cytochrome c was predominantly localized in the mitochondria in freshly isolated neutrophils (Fig. 5d). Culture of neutrophils for 24 h resulted in release of cytochrome c into the cytosol that was markedly attenuated in the presence of CpG-DNA (Fig. 5d). The CpG-DNA inhibition of mitochondrial cytochrome c liberation was comparable to that observed with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (Fig. 5d).

Caspase-3 activity was barely detectable in freshly isolated neutrophils. *In vitro* culture of neutrophils for 24 h resulted in marked increases in caspase-3 activity that were reduced by CpG-DNA in a concentration-dependent fashion with an EC_{50} value of 380 ng/ml (Fig. 5e). Both PD98059 and wortmannin attenuated the caspase-3 inhibitory action of CpG-DNA, though complete reversal was not achieved, not even with the co-administration of PD98059 and wortmannin (Fig. 5f).

Pretreatment of neutrophils with the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK effectively suppressed the development of apoptosis, resulting in significant increases in the number of viable cells as assessed after 24 h of culture (Fig. 6). Although co-treatment with Z-VAD-FMK and CpG-DNA resulted in slightly higher increases in

the number of viable cells, and slightly greater suppression of the percentage of apoptotic cells than CpG-DNA alone, these changes did not reach statistical significance (Fig.6). Z-VAD-FMK and LPS alone suppressed neutrophil apoptosis to a similar degree, and their inhibitory actions were not additive (Fig. 6). Neither Z-FA-FMK (a negative control) nor 0.1% dimethyl sulfoxide (the vehicle of Z-VAD-FMK) produced any detectable effects (Fig.6).

CpG-DNA inhibits neutrophil apoptosis in rats

To investigate whether the neutrophil apoptosis-delaying action of CpG-DNA can be observed *in vivo*, we injected CpG-DNA into conscious rats. Since neutrophils are removed from the circulation upon expression of phosphatidylserine on their surface (an early sign of apoptosis) (1,5), we collected blood by cardiac puncture 60 min after administration of CpG-DNA, and assessed neutrophil viability and apoptosis *ex vivo* immediately upon completing neutrophil isolation, and following 2 and 20 h culture of isolated neutrophils.

Intravenous administration of CpG-DNA into rats resulted in transient 15 to 29 mmHg decreases in mean arterial blood pressure, which were associated with suppression of heart rate (Fig. 7a). Neither mean arterial blood pressure nor heart rate returned to preinjection values within 60 min after CpG-DNA injection. CpG-DNA evoked a slight leukocytosis by increasing the number of circulating neutrophils, but not monocytes and lymphocytes (Fig. 7b). Red blood cell and platelet counts were not affected (Fig. 7b). Injection of calf thymus DNA or vehicle did not evoke any detectable changes in the parameters studied (Fig. 7).

Flow cytometry analysis performed immediately after completing neutrophil isolation revealed slightly higher number of viable neutrophils and a slightly lower percentage of annexin V positive cells in neutrophils isolated from animals that were treated with CpG-DNA than in neutrophils prepared from rats who received either calf thymus DNA or vehicle (Fig. 8). *Ex vivo* culture of isolated neutrophils from vehicle or calf thymus DNA-treated rats resulted in similar time-dependent reductions in cell viability with concomitant increases in the percentage of annexin V positive cells (Fig. 8). By contrast, while cell viability also decreased and the percentage of annexin V positive cells increased with time in neutrophils from CpG-DNA-treated animals, considerably less neutrophils showed signs of apoptosis in this group even after 20 h culture than in the vehicle- or calf thymus DNA-treated group (Fig. 8).

3.1.3.5 Discussion

Progression to apoptosis appears to be the normal default state for circulating neutrophils, whereas prolonged neutrophils survival is required for excessive leukocyte trafficking into injured tissues and amplification of the inflammatory response. Neutrophil survival is contingent upon rescue from programmed cell death by signals from the environment. Here we describe that a novel signal for delaying neutrophil apoptosis is bacterial DNA, and unmethylated CpG motifs in particular.

Consistent with the commitment of neutrophils to apoptosis, CpG-DNA delayed, rather than blocked, apoptosis, resulting in prolonged neutrophil survival as assessed both *in vitro* and *ex vivo*. Our results indicate that unmethylated CpG motifs are responsible for induction of these actions, since methylation of cytosines in CpG

dinucleotides in bacterial DNA completely abolished its apoptosis suppressing activity, and calf thymus DNA did not reproduce the effects of bacterial DNA. CpG dinucleotides are suppressed in mammalian DNA, and are commonly methylated (33). These observations suggest that differences in methylation patterns would enable neutrophils to selectively recognize bacterial DNA, though we cannot exclude a role for inhibitory sequences in mammalian DNA capable of masking stimulatory CpG motifs (34, 35). Furthermore, the CpG-DNA effects were not due to endotoxin contamination, since culture of neutrophils with 0.03 ng/ml LPS (the highest level of LPS detected in our DNA preparations) did not result in detectable effects. Thus, CpG-DNA exerts an anti-apoptotic action similar to those of LPS (2, 4), glucocorticoids (36), GM-CSF (2, 7), structurally modified C-reactive protein (37) or IL-8 (7), and the degree of the CpG-DNA inhibition is comparable to that observed with LPS.

We also observed the neutrophil apoptosis–delaying action of CpG-DNA in rats. Since circulating neutrophils have a short half-life (~12 h), and are rapidly removed from the circulation upon expression of phosphatidylserine (the “eat me” signal for macrophages) on their surface (1, 5), we assessed neutrophil apoptosis *ex vivo*. Intravenous administration of CpG-DNA (200 µg/kg) evoked only modest transient decreases in mean arterial blood pressure, effectively repressed neutrophil apoptosis and prolonged survival. Such changes were already detectable immediately after blood collection and isolation of neutrophils, and became more pronounced following *in vitro* culture of rat isolated neutrophils. Normal rat blood contains less neutrophils than human blood, but the number of neutrophils can rapidly increase in

response to pro-inflammatory stimuli. The slight, but statistically significant elevations of white blood cell count detected at 60 min post-CpG-DNA was most likely due to increases in the number of neutrophils, suggesting that CpG-DNA is capable of mobilizing neutrophils from the bone marrow. It should be noted that a higher percentage of freshly isolated rat neutrophils than human neutrophils stained positive for annexin V. While we do not know whether these reflect species differences or differences in the blood collection procedure, our study documents the anti-apoptotic action of CpG-DNA both in human neutrophils *in vitro* and rat neutrophils *ex vivo* regardless of the differences in the baseline levels of annexin V positive (apoptotic) cells. Our *in vitro* data point to a direct effect of CpG-DNA on neutrophils, though we cannot exclude the possibility that other mechanism(s), e.g. release of cytokines from other cells, might have contributed to its anti-apoptotic action *in vivo*.

Previous studies suggested a requirement for an intracellular pH-dependent step for CpG- DNA-mediated activation of murine monocytes and B lymphoma cells (38). Our results indicate that suppression of human neutrophil apoptosis by CpG-DNA also involves this pathway. Indeed, pretreatment of human neutrophils with bafilomycin A, which inhibits vacuolar H⁺-ATPase (31), chloroquine or the ionophore antibiotic monensin, which accumulate in and increase the pH in endosomes (30, 32, 38, 39) rendered the apoptotic machinery unresponsive to CpG-DNA, but not to LPS. Endosomal acidification of CpG-DNA is thought to be a critical step to initiate intracellular signaling through binding to TLR-9 (15, 16) or the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase (13, 40). Human neutrophils

lack DNA-dependent protein kinase (41), but they do express TLR-9 mRNA (20, 21) and stain positive with an anti-TLR-9 antibody (20). Our flow cytometry and western blot analysis of high purity (>99.9%) neutrophils confirm the presence of TLR-9. Consistent with the weak expression of TLR-9 mRNA in CD4⁺ or CD8⁺ T cells that are generally considered to be negative controls (16), we detected a faint signal for TLR-9 in Jurkat T cells. We also observed an increase in TLR-9 staining following CpG-DNA treatment. The mechanism(s) by which CpG-DNA upregulated expression of its own receptor as well as the functional importance of increased TLR-9 expression remain to be investigated. Interestingly, this action of CpG-DNA resembles to that of GM-CSF (20).

A recent study suggested a TLR-9-independent mechanism for bacterial DNA-induced neutrophil activation (assessed by L-selectin shedding, CD11b upregulation and IL-8 secretion) (21). However, this suggestion was, in part, based on the observation that wortmannin, which was described by these investigators as an inhibitor of TLR-9 signaling, failed to affect neutrophil activation by CpG-DNA. This is not surprising, since numerous studies have documented that these neutrophil responses are not mediated via the PI 3-kinase signaling pathway (27, 37, 42, 43). Moreover, studies on murine macrophages, dendritic cells and human epithelial cells demonstrated CpG- DNA-induced activation of a wide spectrum of kinases, including NF- κ B-inducing kinase, jun-N-terminal kinase, ERK and p38 MAPK (13, 39, 44).

Intracellular acidification is also related to activation of DNA degradation, and bafilomycin A rendered neutrophils insensitive to the anti-apoptotic action of G-

CSF (45). While we cannot exclude the possibility that this mechanism might have contributed to the bafilomycin reversal of the apoptosis-delaying action of CpG-DNA, one should note that CpG-DNA can suppress apoptosis to a much greater degree than G-CSF, indicating involvement of additional mechanisms. Interestingly, endosomal acidification inhibitors did not affect the anti-apoptotic action of LPS. Maintaining intracellular pH above 7.2 did not prevent apoptosis in a cytotoxic T cell line (46). Taken together, these observations would suggest that an intracellular acid pH is not essential for apoptosis. Indeed, apoptotic cells appear to retain a functional Na^+/H^+ -antiport but with an altered set-point (46) that may be modulated differently by various stimuli.

Suppression of neutrophil apoptosis by IL-8 (7), GM-CSF (2) or monomeric C-reactive protein (37) is predominantly mediated through concurrent activation of the ERK and Akt signaling pathways. Transient activation of PI 3-kinase without ERK activation may not be sufficient to delay apoptosis (7). The present study provides two lines of evidence that CpG DNA also utilizes these pathways: (i) culture of neutrophils with CpG-DNA resulted in a rapid phosphorylation of both ERK 1/2 and Akt (the target of PI 3-kinase), and (ii) inhibition of MAPK/ERK kinase with PD98059 or inhibition of PI 3-kinase with wortmannin or LY294002 markedly attenuated, though never fully reversed, the apoptosis-delaying action of CpG-DNA. However, the combination of PD98059 with wortmannin or LY294002 did not produce an additive inhibition, indicating that ERK 1/2 and Akt work in concert to delay neutrophil apoptosis. There is evidence that neither ERK nor Akt interfere with p38 MAPK signaling. Spontaneous neutrophils apoptosis is associated with

phosphorylation of p38 MAPK (37, 47) and subsequent activation of caspase-3. Conversely, the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 partially rescued neutrophils from apoptosis (37, 47). Transient inactivation of p38 MAPK has been suggested to contribute to the early phase of Fas-induced neutrophil apoptosis (48). However, it is unlikely that p38 MAPK represents a survival signal under our experimental conditions, because SB203580 by itself suppressed apoptosis, and the apoptosis delaying actions of SB203580 and CpG-DNA were not additive.

Our results indicate that the MAPKK/ERK and PI 3-kinase/Akt pathways converge on BAD, a member of the Bcl-2 family. Both Akt and ERK can phosphorylate BAD (49, 50). We observed CpG-DNA-induced phosphorylation of BAD at Ser112 and Ser136 through activation of ERK and Akt, respectively. The findings that PD98059 did not block Akt-dependent BAD phosphorylation, whereas wortmannin failed to affect ERK-dependent BAD phosphorylation would argue against a cross communication between these two pathways. Phosphorylated BAD then dissociates from Bcl-2, thereby enhancing the anti-apoptotic effects of the Bcl-2 family proteins. Among other actions, these proteins could prevent mitochondrial membrane potential transition, and consequently loss in $\Delta\Psi_m$ that occurs in cells irreversibly committed to programmed cell death (51-53). Recent evidence indicates that mature neutrophils do contain an unexpectedly large number of mitochondria (54). In this study, we succeeded to demonstrate that CpG-DNA can partially prevent decreases in $\Delta\Psi_m$ and subsequent cytochrome c release occurring during spontaneous neutrophil apoptosis. Moreover, the degree of CpG-DNA reduction of neutrophil apoptosis and inhibition of mitochondrial membrane perturbation was similar.

Preservation of $\Delta\Psi_m$ and attenuation of cytochrome c release by CpG-DNA are consistent with decreased caspase-3 activation as detected in this study. The results from the experiments using the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK and CpG-DNA confirm the importance of CpG-DNA inhibition of caspase-3 activation. These observations indicate that a major mechanism by which CpG-DNA inhibits the neutrophil intrinsic pro-apoptotic machinery is ERK and PI 3-kinase-dependent prevention of mitochondrial dysfunction and repression of caspase-3 activity (Fig. 8).

The present findings could have a profound impact on the way we think about neutrophil survival required for excessive leukocyte recruitment into inflamed tissues. If bacterial DNA is proinflammatory as indicated by the present and previous studies (18, 55), then simply killing bacteria may not be sufficient to counter inflammation. Indeed, DNA from dead bacteria would be still present and could, among other actions, activate neutrophils, promote leukocyte trafficking, and suppress spontaneous neutrophil apoptosis, leading to induction and/or maintaining an inflammatory response. Intriguingly, up to 1% of DNA extracted from the sputum of cystic fibrosis patients is of bacterial origin, and injection of the total DNA isolates to mice evoked inflammatory responses similar to those seen with *E. coli* DNA (18). Furthermore, CpG- DNA may act in synergy with LPS, for example, to induce secretion of interferon- γ (56) or NO (57), and to enhance the toxicity of LPS (56).

In summary, our results demonstrate that unmethylated CpG motifs in bacterial DNA promote neutrophil survival by suppressing the apoptotic machinery. This action is mediated, in part, through concurrent stimulation of the MAPKK/ERK and PI 3-kinase/Akt signaling pathways, leading to prevention of mitochondrial

dysfunction and inhibition of caspase-3 activation. The neutrophil apoptosis-delaying action of CpG-DNA can be observed both *in vitro* and *ex vivo*, and may therefore contribute to prolongation and amplification of the inflammatory response.

3.1.3.6 Acknowledgments

This study was supported by grants MOP-12573 and MOP-64283(to J.G.F.) and Doctoral Research Awards (to J.L. and T.K.) from the Canadian Institutes of Health Research.

3.1.3.7 References

1. Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., and Haslett, J.C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 83, 865-875.
2. Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80, 2012-2020.
3. Whyte, M.K.B., Meagher, L.C., Macdermot, J. and Haslett, C. (1993) Impairment of function of aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.* 150, 5124-5134.
4. Lee, A., Whyte, M.K.B. and Haslett, C. (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.* 54, 283-288.

5. Cox, G., Grossley, J., and 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.
6. Savill, J. (1994) Apoptosis in disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 24, 715-723.
7. Klein, J.B., Rane, M.J., Scherzer, J.A., Coxon, P.Y., Kettritz, R., Mathiesen, J.M., Buridi, A. and McLeish, K.R. (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Immunol.* 164, 4286-4291.
8. Matute-Bello, G., Liles, W.C., Radella, F., Steinberg, K.P., Ruzinski, J.T., Jonas, M., Chi, E.Y., Hudson, L.D. and Martin, T.R. (1997) Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 1969-1977.
9. Keel, M., Ungethum, U., Steckholzer, U., Niederer, E., Hartung, T., Trentz, O. and Ertel, W. (1997) Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during sepsis. *Blood* 90, 3356-3363.
10. Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1998) Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin. Immunol.* 10, 351-353.
11. Underhill, D.M., and Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 103-110.
12. Krieg, A.M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 709-760.

13. Häcker, G., Redecke, V. and Häcker, H. (2002) Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology* 105, 245-251.
14. Krieg, A.M. (2003) CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nature Med.* 9, 831-835.
15. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
16. Bauer, S., Kirschning, C.J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G.B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9237-9242.
17. Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. and Klinman, D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
18. Schwartz, D.A., Quinn, T.J., Thorne, P.S., Sayeed, S., Yi, A.K. and Krieg, A.M. (1997) CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.* 100, 68-73.
19. Weighardt, H., Feterowski, C., Veit, M., Rump, M., Wagner, H. and Holzmann, B. (2000) Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligonucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J. Immunol.* 165, 4537-4543.
20. Hayashi, F., Means, T.K. and Luster, A.D. (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660-2609.

21. Trevani, A.S., Chorny, A., Salamone, G., Vermeulen, M., Gamberale, R., Schettini, J., Raiden, S. and Geffner, J. (2003) Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur. J. Immunol.* 33, 3164-3174.
22. Zouki, C., Beauchamp, M., Baron, C. and Filep, J.G. (1997) Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J. Clin. Invest.* 100, 522-529.
23. Nicoletti, I., Miglioratti, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C.A. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139, 271-279.
24. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39-51.
25. Filep, J.G., Baron, C., Lachance, S., Perreault, C. and Chan, J.S.D. (1996) Involvement of nitric oxide in target-cell lysis and DNA fragmentation induced by murine natural killer cells. *Blood* 87, 5136-5143.
26. Smiley, S.T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T.W., Steele, G.D. and Chen, L.B. (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3671-3675.

27. Zouki, C., Zhang, S.L., Chan, J.S.D. and Filep, J.G. (2001) Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J.* 15, 25-27.
28. Filep, J.G., Delalandre, A. and Beauchamp, M. (1997) Dual role for nitric oxide in the regulation of plasma volume and albumin escape during endotoxin shock in conscious rats. *Circ. Res.* 81, 840-847.
29. Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M. and Wagner, H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 32, 1958-1968.
30. Tonkinson, J.L., and Stein, C.A. (1994) Patterns of intracellular compartmentalization trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells. *Nucleic Acid Res.* 22, 4268-4275.
31. Yoshimori, T., Yamamoto, A., Morijama, Y., Futai, M. and Tashiro, Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17707-17712.
32. Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.
33. Macfarlane, D.E., and Menzel, L. (1998) Antagonism of immunostimulatory CpG-oligonucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J. Immunol.* 160, 1122-1131.

34. Yamada, H., Gursel, I., Takeshita, F., Conover, J., Ishii, K., Gursel, M., Takeshita, S. and Klinman, D. (2002) Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation. *J. Immunol.* 169, 5590-5594.
35. Stacey, K., Young, G., Clark, F., Sester, D., Roberts, T., Naik, S., Sweet, M.J. and Hume, D. (2003) The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *J. Immunol.* 170, 3614-3620.
36. Liles, W.C., Dale, D.C. and Klebanoff, S.J. (1995) Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood* 86, 3181-3188.
37. Khreiss, T., József, L., Hossain, S., Chan, J.S.D., Potempa, L.A. and Filep, J.G. (2002) Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 277, 40775-40781.
38. Yi, A.K., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J. and Krieg, A.M. (1998) CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.* 160, 4755-4761.
39. Häcker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K. and Lipford, G.B. and Wagner, H. (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17, 6230-6240.
40. Chu, W., Gong, X., Li, Z., Takabayashi, K., Ouyang, H., Chen, Y., Lois, A., Chen, D.J., Li, G.C., Karim, M. and Raz, E. (2000) DNA-PKcs is required for

- activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell* 103, 909-918.
41. Sanghavi, D.M., Thelen, M., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L. and Rosen, A. (1998) Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Lett.* 422, 179-184.
42. Capodici, C., Pillinger, M.H., Han, G., Philips, M.R. and Weissmann, G. (1998) Integrin-dependent homotypic adhesion of neutrophils. Arachidonic acid activates Raf-1/Mek/Erk via a 5-lipoxygenase-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 102, 165-175.
43. Pillinger, M.H., Feoktistov, A.S., Capodici, C., Solitar, B., Levy, J., Oei, T.T. and Philips, M.R. (1996) Mitogen-activated protein kinase in neutrophils and enucleate neutrophil cytoplasts: evidence for regulation of cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 271, 12049-12056.
44. Akhtar, M., Watson, J.L., Nazli, A. and McKay, D.M. (2003) Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF- κ B-independent pathway. *FASEB J.* 17, 1319-1321.
45. Gottlieb, R.A., Giesing, H.A., Zhu, J.Y., Engler, R.L. and Babior, B.M. (1995) Cell acidification in apoptosis: Granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5965-5968.
46. Li, J. and Eastman, A. (1995) Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. *J. Biol. Chem.* 270:3203-3211.

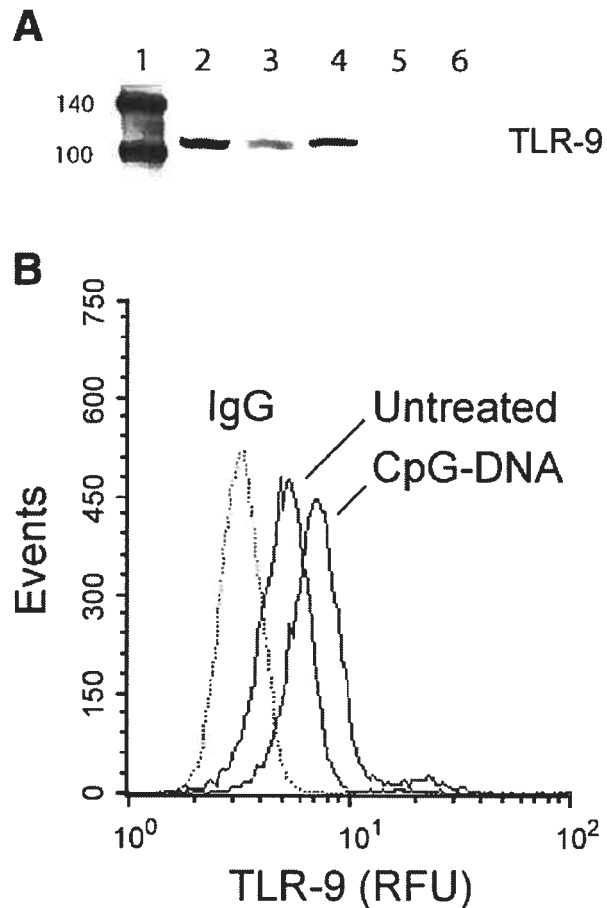
47. Frasch, S.C., Nick, J.A., Fadok, V.A., Bratton, D.L., Worthen, G.S. and Henson, P.M. (1998) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273, 8389-8397.
48. Alvarado-Kristensson, M., Porn-Ares, M.I., Grethe, S., Smith, D., Zheng, L. and Andersson, T. (2002) p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis. *FASEB J.* 16, 129-131.
49. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.
50. Scheid, M.P., Schubert, K.M. and Duronio, V. (1999) Regulation of Bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 31108-31113.
51. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssière, J.L., Petit, P.X. and Kroemer, G. (1995) Reduction of mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 181, 1661-1672.
52. Kroemer, G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.* 3, 614-620.
53. Reed, J.C. (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776.

54. Maiani, N.A., Mul, F.P.J., van Buul, J.D., Roos, D. and Kuijpers, T.W. (2002) Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood* 99, 672-679.
55. Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Häcker, H., Heeg, K. and Wagner, H. (1997) Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 386, 336-337.
56. Cowdery, J.S., Chace, J.H. and Krieg, A.M. (1996) Bacterial DNA induces NK cells to produce interferon-gamma in vivo and increase the toxicity of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 156, 4570-4575.
57. Gao, J.J., Zuvanich, E.G., Xue, Q., Horn, D.L., Silverstein, R. and Morrison, D.C. (1999) Cutting edge: Bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in Raw 264.7 macrophages. *J. Immunol.* 163, 4095-4099.

3.1.3.8 Figures

Figure 1. TLR-9 expression on human neutrophils. (a) Lysates from high purity (>99.9%) neutrophils (CD16⁺, CD3⁻, CD19⁻ and HLA-DR⁻ cells) obtained by dual channel sorting or positive and negative control cells were subjected to western blot analysis with an anti-TLR-9 Ab. Lane 1, molecular weight markers (in kDa); lane 2, human peripheral blood mononuclear cells; lanes

3 and 4, high purity neutrophils prepared from different blood donors; lane 5, Jurkat J77 cells; lane 6, human red blood cells. (b) Neutrophils were incubated with or without CpG-DNA (1.6 µg/ml) for 2 h, then permeabilized and stained with an anti-human TLR-9 Ab or its isotype control (IgG). Immunostaining was analyzed by flow cytometry. The results are representative for three experiments using neutrophils from different donors.



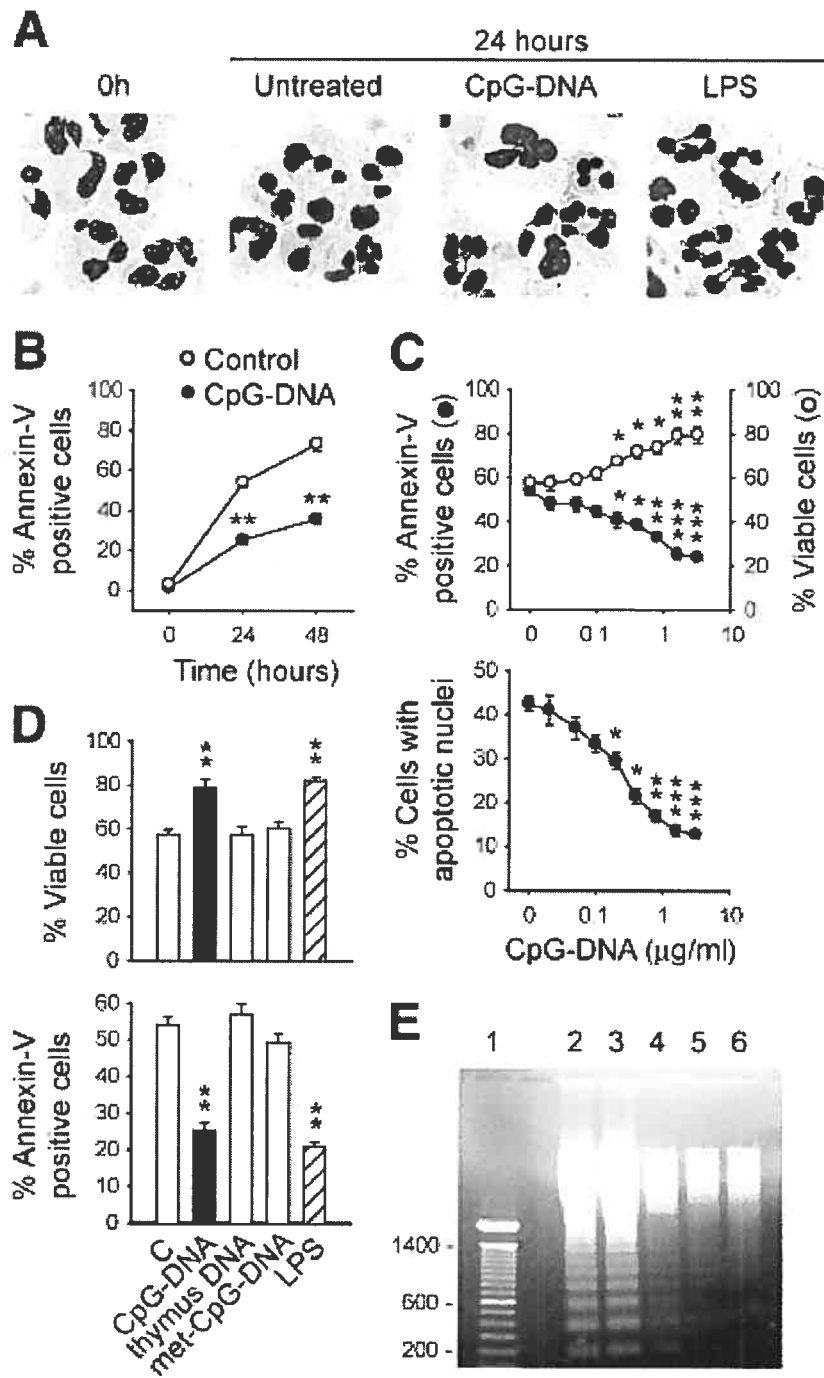


Figure 2. CpG-DNA delays apoptosis of human neutrophils. (a) Morphologic features of neutrophils maintained in suspension culture. Cytospin preparations of neutrophils

were stained immediately after isolation of neutrophils (0 h) or after culture for 24 h in the absence (untreated) or presence of CpG-DNA, calf thymus DNA (both at 1.6 $\mu\text{g/ml}$) or LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) (b-c) Kinetic analysis and concentration dependence of the effects of CpG-DNA on neutrophil viability and development of apoptotic morphology. Aliquots of neutrophils were stained with propidium iodide (to assess viability) or with annexin V, or processed for nuclear DNA content analysis. (d) Neutrophils were cultured for 24 h at 37°C in the absence (untreated) or presence of CpG, calf thymus or methylated bacterial DNA (met-CpG-DNA) (all at 1.6 $\mu\text{g/ml}$) or LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), then stained with propidium iodide or annexin V. Results are the mean \pm SE for five to eight experiments using neutrophils from different blood donors. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (compared with untreated). (e) CpG-DNA attenuates chromatin cleavage in neutrophils maintained in culture for 24 h. Lane 1, DNA kilobase marker standards, and values for selected standards are shown on the left margin; lane 2, unstimulated (control); lane 3, CpG-DNA, 400 ng/ml; lane 4, CpG-DNA, 800 ng/ml; lane 5, CpG-DNA, 1.6 $\mu\text{g/ml}$; lane 7, LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$). The experiments were repeated three times.

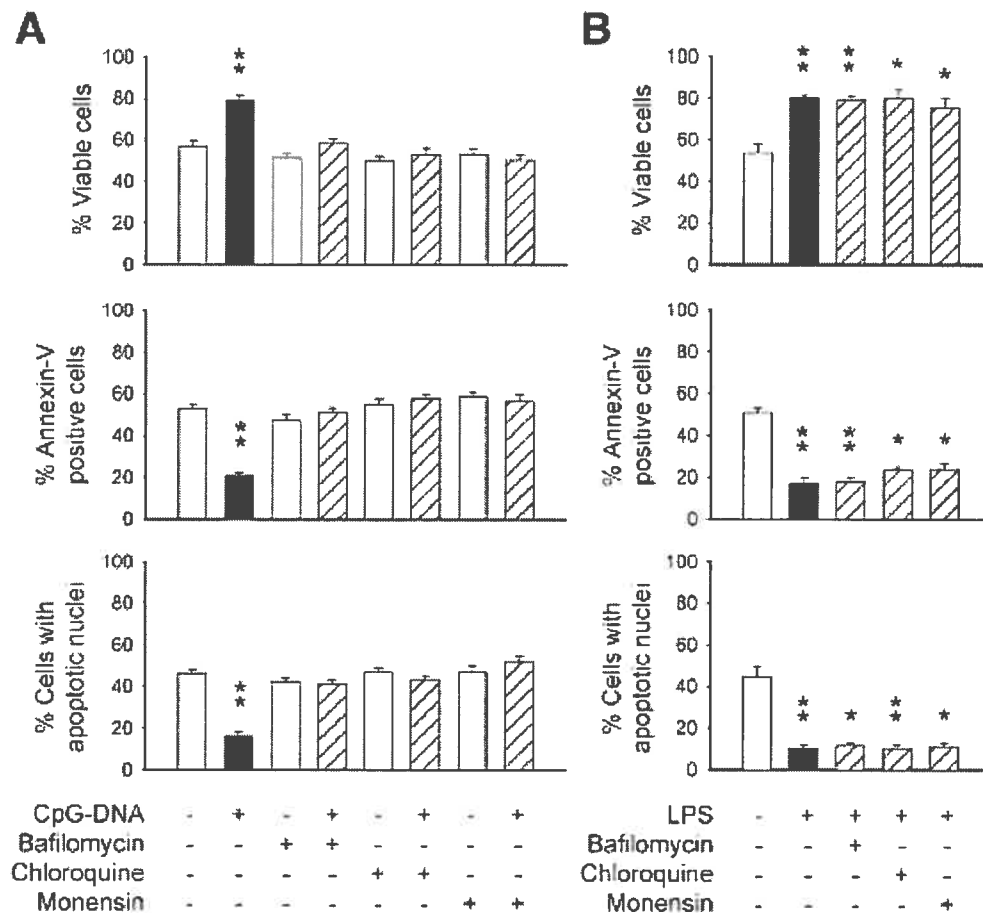


Figure 3. Inhibition of endosomal acidification blocks the anti-apoptotic action of CpG-DNA. Neutrophils were incubated for 20 min with bafilomycin A (30 nM), chloroquine (5 μ g/ml) or monensin (10 μ M) and then cultured for 24 h at 37°C with or without CpG-DNA (1.6 μ g/ml) (a) or LPS (1 μ g/ml) (b). C, control (untreated). Aliquots of neutrophils were stained with propidium iodide (to assess viability) or with annexin V, or processed for nuclear DNA content analysis. Results are the mean \pm SE for six experiments using neutrophils from different donors. *P<0.05; **P<0.01 (vs. untreated).

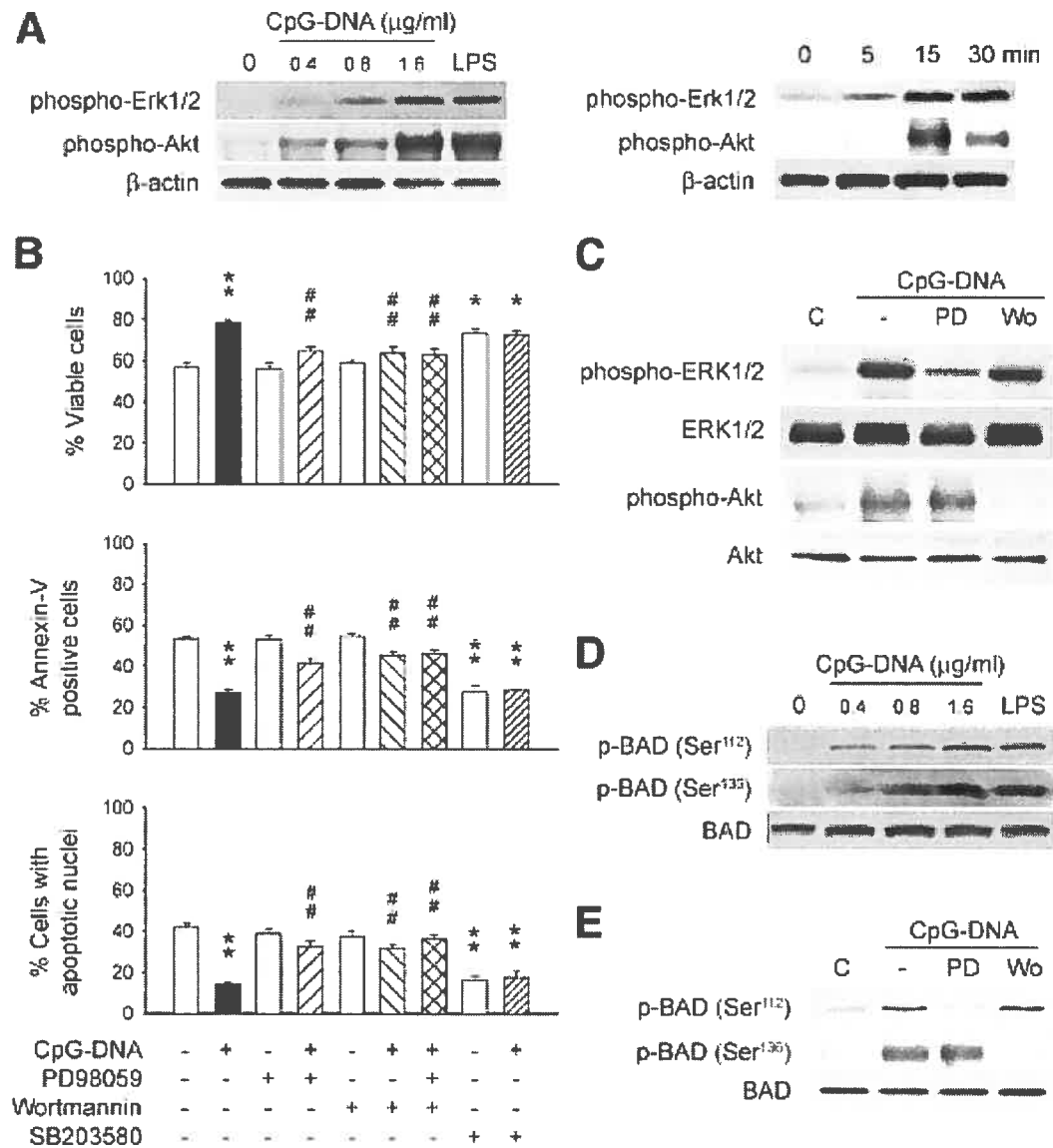


Figure 4. CpG-DNA delays neutrophil apoptosis by activation of the ERK and Akt signaling pathways. (a) Western blot analysis of phosphorylated kinases. Isolated neutrophils were challenged with CpG-DNA (1.6 $\mu\text{g/ml}$) for 15min or with various concentrations of CpG-DNA for the indicated times. Proteins were isolated and probed with phospho-specific Abs, β -actin served as control for equal protein loading. The results are representative of four independent experiments. (b) Inhibition

of MAPK/ERK kinase and PI 3-kinase attenuates the apoptosis delaying action of CpG-DNA. Neutrophils were cultured for 24 h at 37°C in the presence of PD98059 (50 µM), wortmannin (100 nM) or SB203580 (1 µM) with or without CpG-DNA (1.6 µg/ml). Aliquots of neutrophils were stained with propidium iodide (to assess viability) or with annexin V, or processed for nuclear DNA content analysis. Results are the mean±SE for six experiments using neutrophils from different donors.

*P<0.05; **P<0.01 (vs. untreated); ##P<0.01 (compared with CpG-DNA-treated). (c)

Inhibition of CpG-DNA-induced ERK and Akt phosphorylation by PD98059 or wortmannin, respectively. The experiments were repeated four times. (d-e) CpG-DNA-induced phosphorylation of BAD. Neutrophils were challenged with various concentrations of CpG-DNA for 20 min (d) or were preincubated with PD98059, wortmannin or SB203580 for 15 min, and then challenged with CpG-DNA (1.6 µg/ml) for 15 min (e). Proteins were then isolated and probed sequentially with phospho-specific antibodies and their appropriate control. C, control (untreated). The experiments were repeated four times.

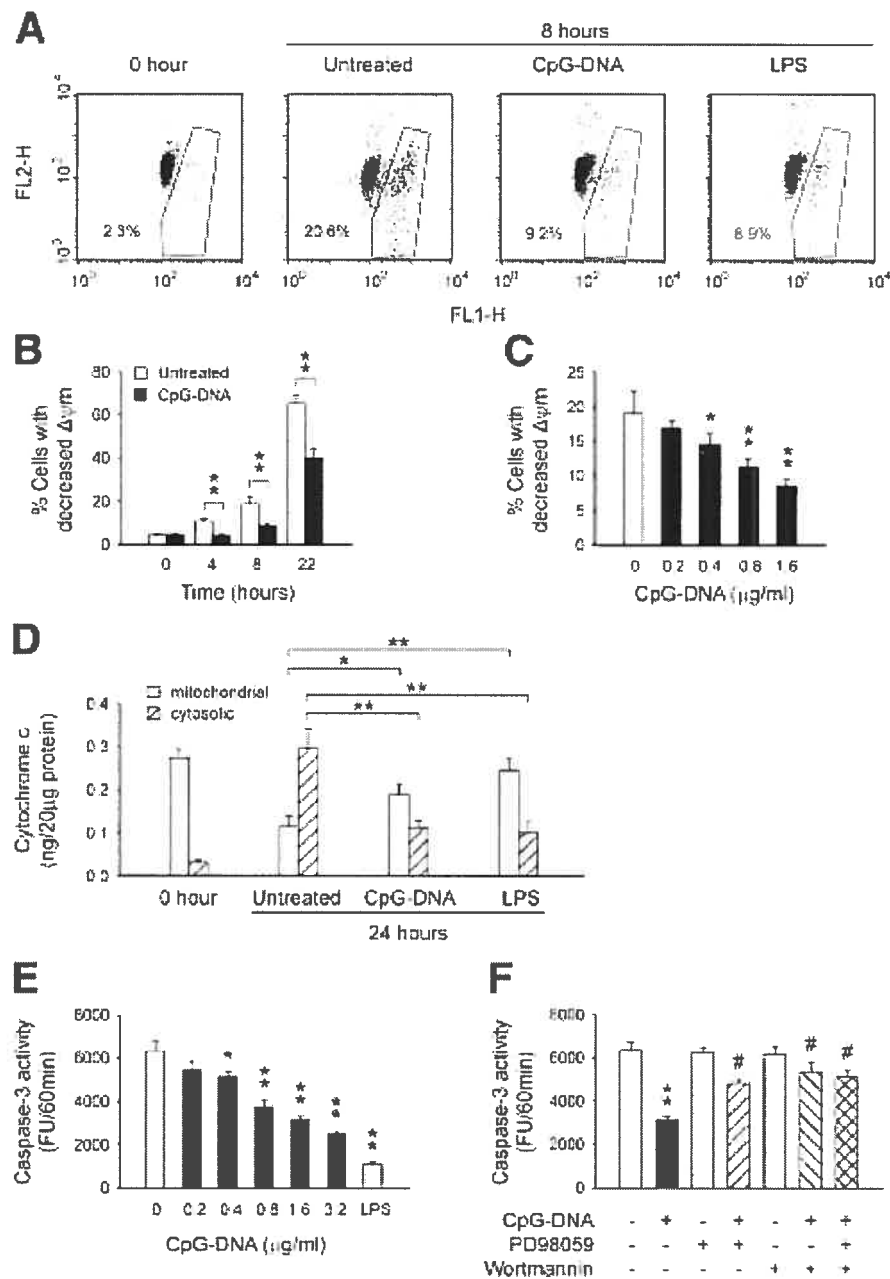


Figure 5. CpG-DNA attenuates disruption of $\Delta\Psi_m$, cytochrome c release and activation of caspase-3. Neutrophils were incubated with or without CpG-DNA for the indicated times, then aliquots of 10^5 cells were incubated for 15 min with JC-1 (10 $\mu\text{g/ml}$), and analyzed by cytofluorometry. (a) Representative plots. The

percentages of representative plots reflect the reduction in $\Delta\Psi_m$, 0 h refers to staining immediately after isolation of neutrophils. The effect of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) is shown for comparison. **(b)** Time-dependency of the effect of CpG-DNA (1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on $\Delta\Psi_m$. **(c)** Concentration-dependent effects of CpG-DNA on $\Delta\Psi_m$ assessed after 8 h incubation. The results are the mean \pm SE of six experiments. **(d)** Mitochondrial and cytosolic cytochrome c levels in freshly isolated (0 h) neutrophils and in neutrophils cultured for 24 h in the absence or presence of CpG-DNA (1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The results are the mean \pm SE of four to seven experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. **(e)** Concentration-dependent inhibition of caspase-3 activity. Caspase-3 activity was determined using Ac-DEVD-AMC as a substrate and expressed as fluorescence units (FU). No fluorescence was detected in the presence of Ac-DEVD-aldehyde, an inhibitor of caspase-3 activity. **(f)** Reversal of the CpG-DNA effect on caspase-3 activity by PD98059 (50 μM) and wortmannin (100 nM). Values are the mean \pm SE of five independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (vs. untreated); # $P < 0.05$ (vs. CpG DNA-treated)

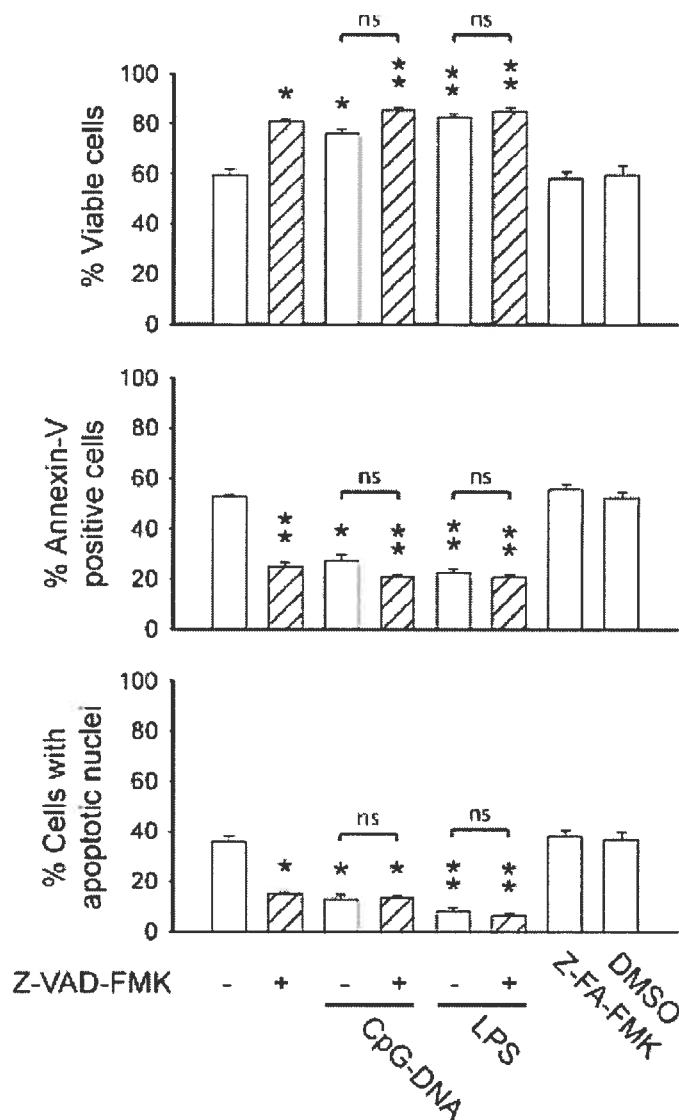


Figure 6. Effects of pan-caspase inhibition on neutrophil apoptosis. Neutrophils were incubated for 20 min with Z-VAD-FMK (20 μ M), Z-FA-FMK (20 μ M) or their vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.1%) and then cultured for 24 h at 37°C with or without CpG-DNA (1.6 μ g/ml) or LPS (1 μ g/ml). Aliquots of neutrophils were stained with propidium iodide (to assess viability) or with annexin V, or processed for nuclear DNA content analysis. Results are the mean \pm SE for six experiments using neutrophils from different donors. * P <0.05; ** P <0.01 (vs. untreated).

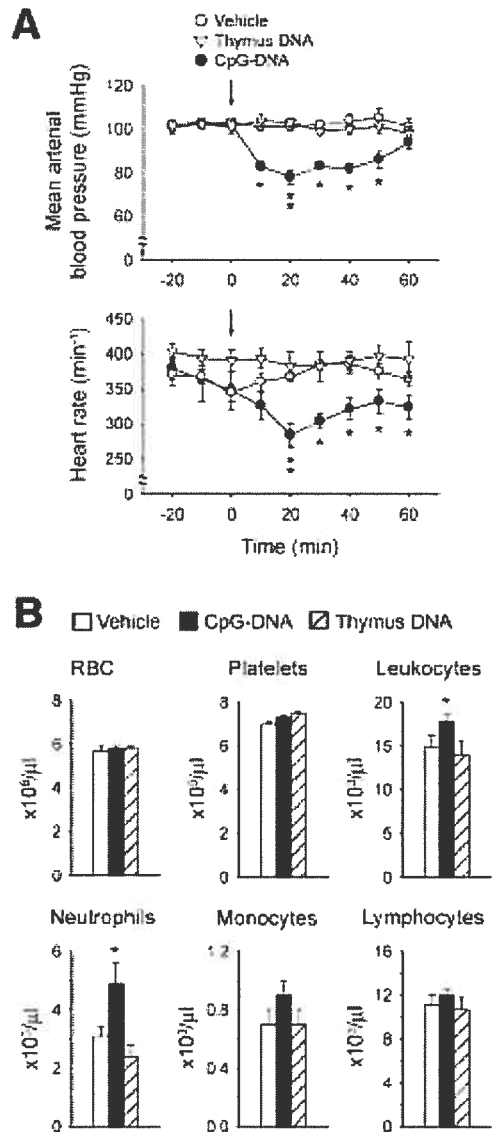


Figure 7. Effects of CpG-DNA on hemodynamic parameters and blood cells in conscious rats. CpG-DNA, calf thymus DNA (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or their vehicle was injected intravenously at 0 min (arrow). (a) Effects on mean arterial blood pressure and heart rate. (b) Effects on blood cells. At sixty min post-DNA injection, under light anesthesia, blood was collected via cardiac puncture, and blood cell counts and leukocyte differential counts were determined. Values are the mean \pm SE of four to five animals per group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (vs. vehicle).

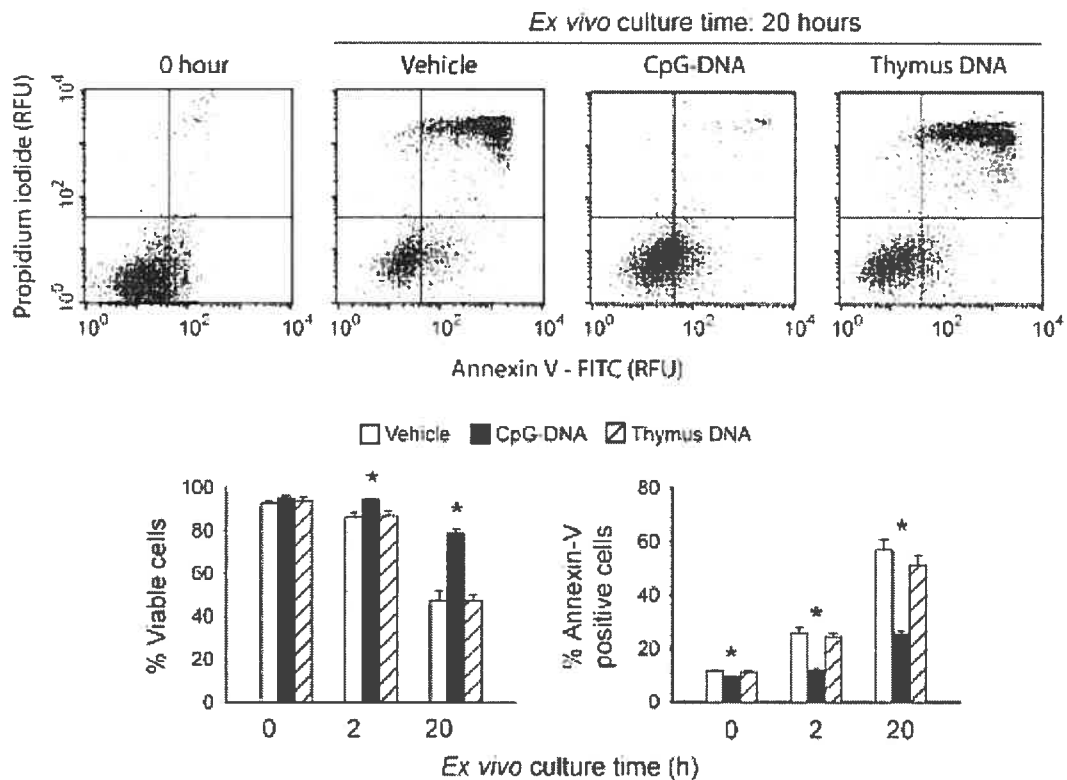


Figure 8. CpG-DNA delays apoptosis of rat neutrophils *ex vivo*. Conscious chronically catheterized rats were given an intravenous injection of CpG-DNA, calf thymus DNA (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or their vehicle. Sixty min later, blood was collected by cardiac puncture under light anesthesia, and neutrophils were isolated. Cell viability and annexin V binding were assessed immediately upon completing neutrophil isolation (0 h), and at 2 and 20 h *ex vivo* culture. (a) Representative scatter plots. (b) Values are the mean \pm SE (n=4 for vehicle and thymus DNA-treated; n=5 for CpG-DNA treated). * $P < 0.05$ (compared with vehicle or thymus DNA).

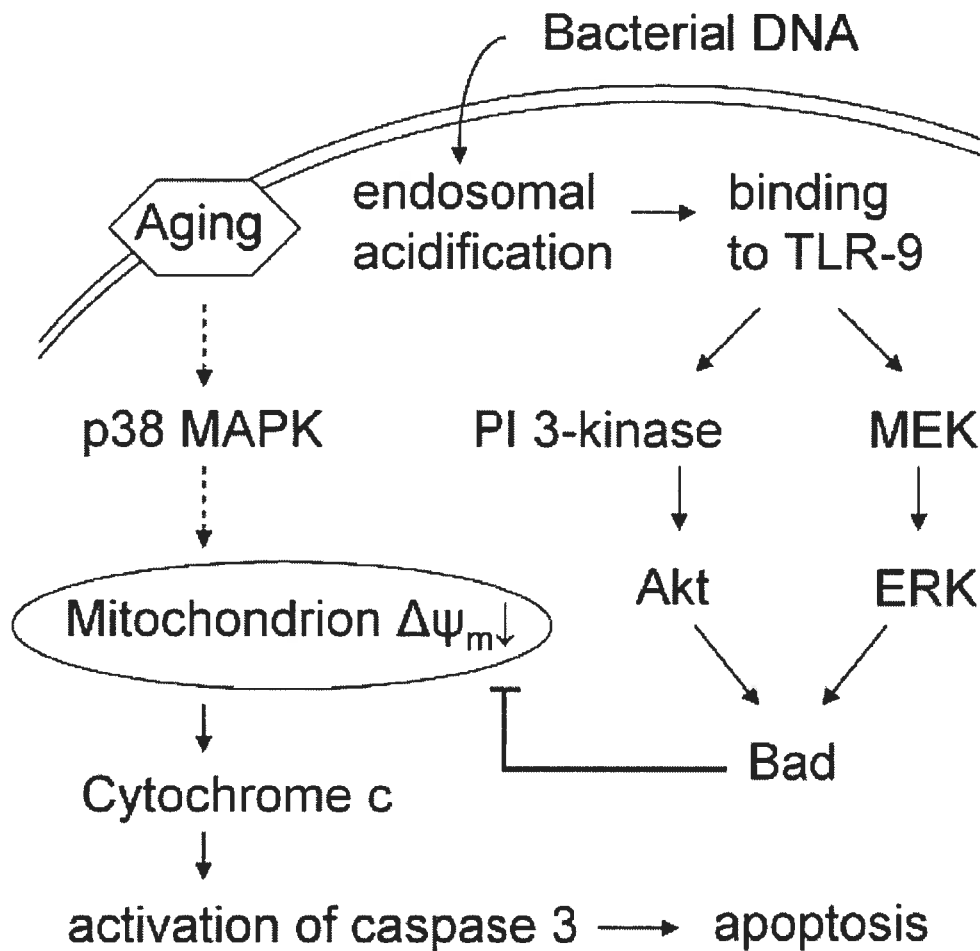


Figure 9. Proposed mechanism for the apoptosis delaying action of bacterial DNA in human neutrophils. See text for details. Broken arrows indicate yet undefined pathways.

3.2 Chapitre II (Article 2)

József L, Khreiss T, El Kebir D and Filep JG. (2006) Activation of Toll-like Receptor-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. *J Immunol.* 176: 1195-1202.

3.2.1 Contribution des auteurs

Levente József et Tarek Khreiss (* co-premier auteurs)

Dans ce projet j'ai travaillé en collaboration étroite avec Tarek Khreiss, étudiant au grade de Ph.D. dans le laboratoire du Dr. Filep. Ensemble, nous avons mis au point et effectué toutes les expériences décrites dans l'article. De plus, j'ai analysé tous les résultats découlant de cet article et j'ai contribué à la rédaction de l'article.

Driss El Kebir

Étant un étudiant post-doctoral, Driss El Kebir a supervisé la mise au point de certaines techniques expérimentales. Il a également été d'une grande aide au niveau intellectuelle tout au long de l'avancement de mon projet.

Dr. Janos G. Filep

Étant mon directeur de recherche, Dr. Janos G. Filep, m'a guidé et m'a supervisé durant toutes les étapes du projet.

3.2.2 Introduction générale du chapitre II (article 2)

L'IL-8 joue un rôle primordial dans le recrutement et l'activation des neutrophiles lors de l'inflammation. L'ONOO⁻ fonctionne en tant que messager intracellulaire induisant l'activation des facteurs de transcription NF-κB et AP-1, responsables de la production de cytokines, incluant l'IL-8, dans les neutrophiles humains. Dans ce présent chapitre, nous avons examiné l'impact de l'ADN bactérien sur la production de l'interleukine-8 dans les neutrophiles humains.

Nous avons trouvé que l'ADN-CpG promeut la formation d'ONOO⁻ en augmentant la production de NO et du superoxyde dans les neutrophiles humains. L'ONOO⁻ induit l'accumulation nucléaire des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 et augmente leur liaison à l'ADN et par conséquent induit l'expression du gène IL-8 et la sécrétion de la protéine. Cette production d'IL-8 est attribuable à une action directe de l'ADN-CpG sur les neutrophiles puisque l'effet de l'ADN bactérien persiste dans les préparations de neutrophiles de haute pureté (>99.9%).

Ces résultats identifient la signalisation ONOO⁻-dépendante en tant que mécanisme important dans l'induction des réponses des neutrophiles, incluant la production d'IL-8 en réponse à l'ADN bactérien. La formation accrue d'ONOO⁻ représente un mécanisme par lequel l'ADN-CpG peut contribuer à la prolongation et l'amplification de la réponse inflammatoire.

Article 2**3.2.3 Activation of Toll-like Receptor-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils¹**

Levente József*, Tarek Khreiss*, Driss El Kebir, and János G. Filep²

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4;

* L.J. and T.K. contributed equally to this work.

Running title: CpG-DNA induces peroxynitrite signaling in human neutrophils

²Address for correspondence: Dr. János G. Filep

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 boulevard de l'Assomption,

Montréal, Québec, Canada H1T 2M4

Phone: (514) 252-3400 ext. 4662; FAX: (514) 252-3430

E-mail: [REDACTED]

Key words: Neutrophils, Bacterial, Cytokines, Nitric Oxide, Signal Transduction

3.2.3.1 Abstract

Bacterial DNA, containing unmethylated CpG motifs is emerging as an important regulator of functions of human neutrophil granulocytes (PMN). These motifs are recognized by toll-like receptor-9. Recent studies indicate that peroxynitrite (ONOO⁻) may function as an intracellular signal for the production of IL-8, one of the key regulators of leukocyte trafficking in inflammation. In this study, we investigated whether CpG-DNA could induce ONOO⁻ signaling in human PMN. Human whole blood, isolated PMN (purity >95%) and high purity (>99%) PMN respond to CpG-DNA, but not to calf thymus DNA, with secretion of IL-8 and, to a lesser extent, IL-6 and TNF. Methylation of cytosines in CpG-DNA resulted in a complete loss of activity. Endosomal acidification inhibitors bafilomycin A and chloroquine inhibited CpG-DNA-induced cytokine release from PMN. CpG-DNA-induced IL-8 mRNA expression and release was also blocked by the NO synthase inhibitor L-NAME. CpG-DNA evoked concomitant increases in intracellular superoxide and NO levels, leading to enhanced ONOO⁻ formation, and consequently to nuclear accumulation of c-Fos and NF-κB. Pharmacological inhibition of NF-κB activation attenuated ~75% of CpG-DNA-evoked IL-8 release. These results identify ONOO⁻-dependent activation of NF-κB and c-Fos as an important mechanism that mediate PMN responses, including IL-8 gene expression and release, to bacterial DNA, and unmethylated CpG motifs in particular. Enhanced ONOO⁻ formation represents a mechanism by which bacterial DNA may contribute to prolongation and amplification of the inflammatory response.

3.2.3.2 Introduction

Mammalian innate immune cells detect the presence of bacteria through toll-like receptors (TLR) that recognize pathogen-associated molecular patterns (1). Bacterial DNA contains short sequences of nonmethylated CpG dinucleotides that are at least 20-fold more common in bacterial than vertebrate DNA (2). In eukaryotic DNA these CpG motifs are suppressed and mostly methylated (2). Bacterial DNA (CpG-DNA) is recognized by TLR-9 expressed in both immune and non-immune cells (3,4). Although human neutrophils (PMN) do express TLR-9 mRNA and protein (5-7), surprisingly little is known about the impact of TLR-9 signaling on PMN functions. Intratracheal instillation of CpG-DNA results in PMN accumulation in the lower airways in mice (8). Consistent with enhanced PMN trafficking, CpG-DNA induces IL-8 release (5), triggers L-selectin shedding and upregulation of CD11b/CD18 on the surface of isolated PMN (6), enhances PMN phagocyte activity (5) and rescues PMN from constitutive apoptosis (7). Bacterial DNA was detected in the absence of bacteria in tissues of patients with chronic inflammatory conditions, including cystic fibrosis (8) and unstable coronary angina (9). Such pathological conditions are also characterized by increased nitrotyrosine formation (10-12), widespread PMN activation (13) or persisting PMN trafficking into inflamed tissues (14). The elevation in nitrotyrosine may reflect local formation of reactive nitrogen species, in particular peroxynitrite (ONOO^-) (15). High micromolar concentrations of ONOO^- are cytotoxic (16). However, at much lower concentrations, ONOO^- may activate intracellular signaling pathways that modulate PMN responses. Indeed, ONOO^- promotes PMN adhesion to endothelial cells through ERK-dependent up-regulation of

surface expression of CD11b/CD18 on PMN (17). ONOO⁻ functions as an intracellular messenger to induce activation of the transcription factors nuclear NF- κ B and AP-1, leading to enhanced expression and production of cytokines, including IL-8, in human leukocytes challenged with LPS, TNF- α or IL-1 β (18-20). IL-8 plays a pivotal role in recruitment and activation of neutrophils and monocytes in various experimental models of inflammation (21-23).

In this study, we investigated whether bacterial DNA, and unmethylated CpG motifs in particular, induces formation of ONOO⁻ in human PMN, and whether ONOO⁻ signaling events mediate primary cytokine responses in PMN.

3.2.3.3 Materials and Methods

Materials

E. coli DNA (strain B) and calf thymus DNA (Sigma-Aldrich) were purified by extraction with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, vol/vol/vol) and ethanol precipitation. Heat-denatured (single-stranded) genomic DNA was used in all experiments. For some experiments, *E. coli* DNA was treated for 16 h at 37°C with CpG methylase SssI (2U/ μ g DNA) in NE Buffer 2 supplemented with 160 μ M S-adenosylmethionine (New England Biolabs). Methylated DNA was purified as above. All DNA preparations contained <5 ng LPS per mg DNA by *Limulus* assay.

Cell isolation and stimulation

Venous blood (anticoagulated with sodium heparin, 50 U/ml) was obtained from healthy volunteers who had denied taking any medication for at least 2 weeks. The Clinical

Research Committee approved the experimental protocols. PMN were isolated as described (17). The PMN preparations (purity and viability routinely >95%) contained <1.2% monocytes (neutral red-positive or CD14^{high} cells). In some experiments, high purity PMN were prepared by immunomagnetic depletion of monocytes, T and B cells using a mouse anti-human CD14 mAb, anti-CD3 mAb and anti-CD19 mAb and Dynabeads pan mouse IgG (DynaL Biotech) according to the manufacturer's instructions. This procedure yielded PMN purity >99% with <0.4% cells staining positive for HLA-DR (assessed by flow cytometry) without affecting cell viability.

Whole blood aliquots, isolated PMN or high purity PMN (5×10^6 cells/ml) in sterile microcentrifuge tubes were placed on a rotator, pre-incubated for 20-30 min with inhibitors of endosomal acidification, NO synthesis, or NF- κ B activation as indicated, and then challenged with CpG-DNA, methylated bacterial DNA (met-CpG-DNA) or calf thymus DNA at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. At the designated time points, the plasma was harvested, and stored at -20°C for later cytokine analysis. Cells were processed as described below.

TLR-9 expression

Freshly isolated PMN were permeabilized with Permeabilization Buffer (eBioscience), and stained with an R-PE-conjugated anti-human TLR-9 Ab eB72-1665, or a class-matched irrelevant Ab (eBioscience). Neutrophil TLR-9 expression was assessed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). PMN, defined as CD16⁺, CD3⁻, CD19⁻ and HLA-DR⁻ cells, were gated at purity >99.9%

Measurements of cytokine secretion and transcripts

Levels of IL-8, TNF- α and IL-6 in plasma or culture medium were determined by selective EIAs (OptEIA, BD Biosciences). Intra-assay and interassay coefficients of variation were typically <4% and <6%, respectively. Transcripts for IL-8 and GAPDH were assayed with the Direct Protect kit (Ambion) as described previously (18).

Measurement of NO and superoxide

Intracellular formation of NO, and superoxide was monitored simultaneously by flow cytometry following incorporation of 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF, 5 μ M, Clontech) and dihydroethidine (5 μ M, Molecular Probes) into PMN as described (24).

Expression of NO synthase isoforms

Total RNA was isolated from 1×10^7 PMN using TriZol reagent, and cDNA was prepared with Superscript reverse transcriptase (Invitrogen). The following primers were used for subsequent PCR analysis: human inducible NOS (iNOS), sense 5'-TCTCTCGGCCACCTTTGATGAG-3' and antisense 5'-GGTTGCATCCAGCTTGACCAG-3'; human endothelial NOS (eNOS), sense 5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3', and antisense 5'-CCGAGCCCGAACACACAGAAC-3'; human neuronal NOS, sense 5'-CTTCTGGCAACAGCGGCAATTTG-3' and antisense 5'-TGGACTCAGATCTAAGGCGGTTG-3'; β -actin, sense 5'-ATGCCATCCTGCGTCTGGAC-3' and antisense 5'-AGCATTGCGGTGCACGATGG-3' (25). The resultant PCR products were 412

bp, 421 bp, 458 bp and 500 bp, respectively and were electrophoresed on 1.2 % agarose and stained with ethidium bromide.

Detection of peroxynitrite

Intracellular ONOO⁻ formation was monitored as NO-dependent fluorescence of rhodamine, an oxidation product of dihydrorhodamine 123 (DHR 123) (26). The NO synthase blocker-inhibitable proportion of DHR 123 oxidation can be attributed to ONOO⁻, because ONOO⁻ readily oxidizes DHR 123, while NO does not (26). DHR 123 (20 μM, Molecular Probes) was added to some samples during the last 60 min of incubation in the presence or absence of L-NAME (1 mM), an inhibitor of NO synthases, and fluorescence was analyzed with a flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson) (18). In additional experiments, PMN extracts (prepared as in Ref. 17) were analyzed for the presence of nitrotyrosine, a 'fingerprint' of ONOO⁻ (15) by an enzyme immunoassay (Cayman Chemicals) using nitrotyrosine as standard (24). The detection limit of the assay was 2 ng/ml. Intra-, and interassay coefficients of variation were typically <6%.

Nuclear factor-κB and c-Fos

Intranuclear, DNA bound, NF-κB/p65 and c-Fos were measured with a flow cytometry assay (19, 24) and were used as an estimate of transcription factor activity in the cell. In brief, leukocyte nuclei prepared with the Cycletest Plus DNA reagent kit (Becton Dickinson) were stained with rabbit polyclonal anti-human NF-κB/p65, NF-κB/p50 or c-Fos antibodies, or with normal rabbit IgG (to assess non-specific binding of IgG to

nuclei) and then with FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody (all from Santa Cruz Biotechnology) and propidium iodide. Singlet PMN nuclei were gated using the doublet-discrimination module and fluorescence intensity was analysed with a FACScan flow cytometer using the CellQuest Pro software.

In additional experiments, PMN nuclear extracts were prepared with the TransFactor Extraction kit (BD Biosciences). Binding of NF- κ B/p65 to the immobilized κ B consensus sequence GGGGTATTTCC was quantified with an ELISA (Mercury TransFactor NF- κ B p65 kit, BD Biosciences) using 15 μ g nuclear extracts. Binding is expressed as optical density following correction with binding to the mutant sequence GGCATAGGTCC.

Neutrophil viability

PMN viability was assessed by flow cytometry immediately after staining with propidium iodide (0.5 μ g/ml).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons were made by ANOVA using ranks (Kruskal-Wallis test) followed by Dunn's multiple contrast hypothesis tests to identify differences between various treatments. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

3.2.3.4 Results

TLR-9 expression in human neutrophils

Intracellular flow cytometry on high purity (>99.9%) PMN confirmed the presence of TLR-9 (Fig. 1). In this assay, PMN were first permeabilized, for TLR-9 is predominantly expressed in intracellular vesicles (27), and stained with an R-phycoerythrin-tagged anti-TLR-9 antibody.

CpG-DNA induces IL-8, IL-6 and TNF- α secretion

Whole blood samples or isolated PMN were challenged with CpG-DNA, and the concentrations of selected cytokines in the plasma or culture medium were measured. To minimize the autocrine and paracrine stimulation that contributes to elevated cytokine levels (28), the duration of the study was limited to 4 h. In whole blood, CpG-DNA induced IL-8 release in a concentration-dependent fashion (Fig. 2A). CpG-DNA also stimulated, albeit to a considerably lesser extent, IL-6 and TNF- α production. CpG-DNA evoked potent IL-8 production by isolated PMN, but induced only minimal secretion of IL-6 and almost no detectable release of TNF- α (Fig. 2A). To address the potentially confounding influence of contaminating mononuclear cells, monocytes in particular, in standard PMN preparations, the experiments were repeated using high purity PMN (containing <0.4% HLA-DR-positive cells). High purity PMN released comparable amounts of IL-8, but markedly less IL-6 in response to CpG-DNA, as reflected by a marked increase in the IL-8 to IL-6 ratio (Fig. 2B)

Neither calf thymus, nor methylated *E. coli* DNA (met-CpG-DNA) produced detectable increases in IL-8 and IL-6 production (Fig. 3). Stimulation of PMN with 0.02

ng/ml LPS (the maximum concentration equivalent to that detected in our DNA preparations) for 4 h failed to evoke significant cytokine release (data not shown).

Pretreatment of PMN with the endosomal acidification inhibitors bafilomycin A (29) or chloroquine (30) almost completely inhibited CpG-DNA-induced IL-8 and IL-6 production (Fig. 3), indicating that endosomal acidification of CpG-DNA is a necessary step for initiating intracellular signaling for cytokine production. Inhibition of NO synthesis with L-NAME effectively suppressed production of IL-8 without affecting IL-6 release (Fig. 3). The inhibitory actions of bafilomycin A and L-NAME were concentration-dependent (Fig. 3).

We next investigated whether CpG-DNA induction of IL-8 production and its inhibition by L-NAME occur at the level of transcription. Results shown in Fig. 4 confirmed those obtained for protein synthesis, with CpG-DNA inducing concentration-dependent increases in IL-8 mRNA, with a 1.8-fold maximum increase observed at 1.6 $\mu\text{g/ml}$. While L-NAME alone had no detectable effect on IL-8 mRNA expression (data not shown), it attenuated ~77% of CpG-DNA (1.6 $\mu\text{g/ml}$)-induced increase (Fig. 4B).

Induction of O_2^- , NO and peroxynitrite formation in PMN

We used flow cytometry to monitor simultaneously intracellular formation of O_2^- and NO in PMN 4 h post-CpG-DNA. CpG-DNA induced concentration-dependent increases in dihydroethidine and DAF fluorescence, indicating enhanced formation of O_2^- and NO, respectively (Fig. 5). These changes occurred parallel with marked increases in L-NAME-inhibitable rhodamine fluorescence (Fig. 5), indicating ONOO⁻-mediated oxidation of DHR123. L-NAME (1 mM) reduced 98% of NO formation detected by

DAF fluorescence (data not shown). Addition of the NO donor spermine NONOate (0.5 mM) to L-NAME-treated PMN restored DHR123 oxidation (rhodamine fluorescence in RFU, control: 13 ± 2 ; CpG-DNA: 44 ± 3 ; L-NAME+CpG-DNA: 19 ± 2 ; spermine NONOate+L-NAME+CpG-DNA: 41 ± 3 , $n=5$, $P > 0.1$ compared with CpG-DNA). To provide further evidence for ONOO⁻ formation, we quantified PMN nitrotyrosine content. PMN exposed to CpG-DNA contained significantly higher amounts of nitrotyrosine than unchallenged cells, and the increases coincided with increases in NO-dependent DHR123 oxidation (Fig. 5).

To identify the NOS isoform(s) responsible for increased NO production, we performed RT-PCR on cDNA prepared from freshly isolated PMN and from PMN challenged with CpG-DNA for 2 or 4 h. These assays resulted in amplification of eNOS mRNA, but not neuronal NOS and iNOS (Fig. 6). CpG-DNA did not appear to increase the expression of eNOS mRNA (Fig. 6).

CpG-DNA induces nuclear accumulation of c-Fos and NF- κ B in PMN

CpG-DNA mobilized NF- κ B/p65 and c-Fos to the nucleus (i.e. the increased fluorescence represents increased amounts of NF- κ B or c-Fos bound to DNA), and this mobilization was attenuated by L-NAME (Fig. 7A and B). Immunostaining was completely prevented by preincubation of the antibodies with the appropriate blocking peptides (Fig. 7A). The effect of CpG-DNA on the nuclear translocation of NF- κ B/p65 and c-Fos proteins was rapid; near maximum changes were detectable within 10 min (Fig. 7C and E). Nuclear accumulation of NF- κ B/p65 peaked at around 30 min after addition of CpG-DNA, then the staining with the antibodies gradually

decreased (Fig. 7B). The actions of CpG-DNA were concentration-dependent (Fig. 7B). Similar changes were observed with staining PMN nuclei with NF- κ B/p50 (data not shown). Cycloheximide (35 μ M) did not affect the nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and c-Fos (data not shown). To confirm these observations, we prepared PMN nuclear extracts and assessed DNA binding by NF- κ B/p65 with an ELISA. CpG-DNA evoked time and concentration-dependent increases in DNA binding by NF- κ B/p65 that coincided with changes observed in the flow cytometry assay (Fig. 7D).

We next examined whether the increased nuclear accumulation of NF- κ B correlates with induction of IL-8 production. Preincubation of PMN with pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) or gliotoxin, inhibitors of NF- κ B activation (31, 32) attenuated up to ~75% of CpG-DNA-induced nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and IL-8 production in a concentration-dependent fashion (Fig. 8). None of these inhibitors affected significantly CpG-DNA-induced DHR 123 oxidation (data not shown), indicating that they did not scavenge peroxynitrite.

CpG-DNA and neutrophil viability

Since increased NO and ONOO⁻ formation may be associated with changes in cell survival (15,16), we studied the impact of CpG-DNA on PMN viability. Consistent with our previous study (7), after 4 h *in vitro*, CpG-DNA slightly increased the percentage of viable PMN from 88 \pm 2% to 93 \pm 2 % (n=5, P<0.05), whereas thymus DNA or methylated CpG-DNA was without effect (PMN viability was 89 \pm 2% and 90 \pm 2%, respectively, n=5, both P>0.1 vs. untreated).

3.2.3.5 Discussion

The present study provides evidence that a novel mechanism by which bacterial DNA and nonmethylated CpG motifs in particular, may affect PMN responses and the inflammatory process is inducing ONOO⁻ formation. This is associated with increased nuclear accumulation of NF- κ B, and subsequent induction of IL-8 gene expression and production. Since recent studies have increasingly pointed to the pivotal role of IL-8 in directing leukocyte traffic into inflamed areas, our observations bear directly on the mechanism for the pro-inflammatory actions of bacterial DNA.

Among the cytokines measured from CpG-DNA-stimulated PMN, IL-8 is the most abundant. In comparison, CpG-DNA induced a modest secretion of IL-6 and a very little production of TNF- α . In whole blood, CpG-DNA evoked release of IL-8 and to a lesser degree IL-6 and TNF- α , indicating that leukocytes other than PMN also respond to CpG-DNA to release cytokines. Comparison of plasma and culture medium IL-8 levels indicates that approximately 70% of IL-8 release was of PMN origin in whole blood. A controversy exists on the ability of PMN to produce IL-6. We found that high purity (>99%) PMN released considerably less, though still detectable amounts of IL-6 than standard PMN preparations. IL-8 release was only slightly affected by depletion of mononuclear cells, confirming the ability of PMN to produce IL-8. Furthermore, L-NAME suppression of IL-8, but not IL-6 release suggests existence of different signaling mechanisms for cytokine production. Our results demonstrate that CpG-DNA is potent activator of key responses of leukocytes in amplifying the inflammatory response in whole blood and in a culture milieu that is biologically relevant. Thus, our results enhance earlier findings with intestinal epithelial cells (33)

and PMN (5), and confirm the ability of CpG-DNA to regulate production of IL-8 and other pro-inflammatory cytokines in human PMN. By contrast, human PMN were reported to synthesize IL-8 in response to a class A CpG-oligonucleotide (GGTGCATCGATGCAGGGGGG) only if pretreated with GM-CSF (5). Although the biological actions of this oligonucleotide have not been fully characterized, short CpG oligonucleotides are generally less potent immunostimulators than *E. coli* DNA (2,34).

Our results indicate that differences in methylation patterns would enable PMN to selectively recognize bacterial DNA. Methylation of cytosines in CpG dinucleotides in bacterial DNA completely abolished its actions, and calf thymus DNA did not reproduce the effects of bacterial DNA. The CpG-DNA effects were not due to endotoxin contamination, since culture of PMN with 0.02 ng/ml LPS (the highest level of LPS detected in our DNA preparations) did not result in detectable effects. Endosomal acidification of bacterial DNA is a critical step to initiate intracellular signaling through binding to TLR-9 (30, 35). Human PMN do express TLR-9 mRNA (5,6) and stain positive with anti-TLR-9 antibodies (5,7, and the present study). Bafilomycin A, which inhibits vacuolar H⁺-ATPase (29) and chloroquine, which accumulates in and increases the pH in endosomes (30) rendered PMN unresponsive to CpG-DNA, consistent with signaling through TLR-9.

It is unclear why CpG-DNA selectively promotes IL-8 synthesis in PMN, although it has been known that PMN have a limited protein synthesis profile (36). One possibility is that CpG-DNA preferentially activates intracellular signaling pathways required for IL-8 synthesis. Indeed, CpG-DNA-induced IL-8 gene and protein expression in PMN was markedly inhibited by L-NAME, indicating an NO-dependent

mechanism. Albeit NO formation is a prerequisite for induction of IL-8 release, NO by itself evokes a very modest IL-8 release from human leukocytes (18). By contrast, ONOO⁻ formed in the reaction of NO with superoxide is a potent inducer IL-8 expression, and it mediates LPS, IL-1 β and TNF- α -stimulated IL-8 gene expression (18-20). Our present results demonstrate that CpG-DNA also activates this pathway. Indeed, CpG-DNA evoked simultaneous formation of O₂⁻ and NO, as monitored by dihydroethidium and diaminofluorescein fluorescence, respectively. We detected dihydroethidium fluorescence in unstimulated PMN. However, this fluorescence was not due to O₂⁻, for dihydroethidium undergoes significant oxidation in resting leukocytes, possibly through the uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation (37). Resting PMN do not release detectable amounts of superoxide as measured by the ferricytochrome C reduction assay (24). Our RT-PCR analysis points toward eNOS as the source for CpG-DNA-stimulated NO production, for only eNOS-specific products were amplified in unchallenged and CpG-DNA-treated PMN. Augmented NO formation was likely due to enhanced eNOS activity, for CpG-DNA did not induce detectable increases in eNOS mRNA in our RT-PCR assay. These observations are consistent with previous findings (38), though others failed to detect eNOS mRNA in human PMN (39). The reasons for this apparent discrepancy are not known, but it might be attributed to various amounts of contaminating cells or may reflect differences in the assays used to detect eNOS. We could not detect iNOS mRNA in PMN challenged with CpG-DNA for up to 4 h. While iNOS positive PMN have been shown in tissue samples and exudates (25), in vitro at least 16 h exposure of human PMN to LPS or cytokines is

required for iNOS expression (40). Whether CpG-DNA is capable of inducing iNOS expression in PMN after prolonged incubation periods remains to be investigated.

Parallel with increases in O_2^- and NO production, CpG-DNA also enhanced ONOO⁻ formation. We monitored intracellular ONOO⁻ formation as NO-dependent oxidation of DHR 123 to rhodamine and measured nitration of protein tyrosine residues, and obtained consistent results with these two assays. A significant portion of rhodamine fluorescence in CpG-DNA-stimulated leukocytes can be attributed to ONOO⁻, because it depends on NO-related species, for it can be inhibited by L-NAME, whereas NO *per se* does not oxidize DHR 123 (26). Further, the NO donor spermine NONOate restored DHR 123 oxidation in L-NAME-treated PMN, indicating that the effect of L-NAME in the DHR 123 assay was not due to inhibition of assembly of the NADPH oxidase. The nitration reactions have been attributed to the interaction of ·NO with O_2^- at a rate constant of $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 to form ONOO⁻ (15). There is evidence that the nitration yield may be increased via the formation of the nitrosoperoxycarbonate anion from physiologic concentrations of CO₂ and bicarbonate, thereby enhancing the reactivity of ONOO⁻ (41). Although nitrotyrosine formation is considered as a specific “fingerprint” of ONOO⁻ (15), myeloperoxidase-dependent tyrosine nitration has also been reported (42), indicating that nitrotyrosine may rather serve as an indicator of “reactive nitrogen species”. Intriguingly, in human PMN, ONOO⁻ appears to be the predominant mechanism for tyrosine nitration (43). Although a controversy exists whether ONOO⁻ is capable of tyrosine nitration at physiological pH (reviewed in Ref. 44), our previous results with exogenous ONOO⁻ clearly indicate the existence of such reaction in human PMN (24). These reactions represent important

pathways by which CpG-DNA may modulate the oxidative chemistry of NO, O₂⁻ and ONOO⁻.

The IL-8 gene contains *cis*-regulatory elements for NF-κB, AP-1 and NF-IL-6 (45). Of these transcription factors, NF-κB plays a key role in the induced expression of IL-8 (46). Accordingly, we found that CpG-DNA stimulates nuclear accumulation of NF-κB, DNA binding by NF-κB/p65 and induces IL-8 gene transcription. In human PMN, the dominant form of NF-κB induced by CpG-DNA appears to be a p50/p65 heterodimer, consistent with findings in murine macrophages, but not B cells where CpG-DNA activates the p50/c-Rel heterodimer (2). The low amounts of NF-κB/p65 DNA-binding activities detected in the nuclei of unstimulated PMN (24, 47, and the present study) likely contribute to constitutive expression of transcripts encoding κB-dependent genes. PDTC or gliotoxin effectively blocked nuclear accumulation of NF-κB/p65 and inhibited ~75% of IL-8 release. We also observed CpG-DNA induction of nuclear accumulation of c-Fos, a finding consistent with the role of AP-1 in the enhancement of IL-8 gene expression (45). However, human PMN express c-Jun at a very low level and many PMN agonists failed to evoke c-Jun expression (48). It remains to be determined whether CpG-DNA could induce c-Jun expression or whether CpG-DNA-induced c-Fos and low levels of c-Jun could form AP-1 in quantities sufficient to regulate IL-8 gene transcription. Consistent with suppression of ONOO⁻ formation and IL-8 mRNA and protein expression, L-NAME effectively inhibited nuclear accumulation of NF-κB and c-Fos. The mechanism by which ONOO⁻ increases nuclear binding of NF-κB is not fully understood. The positive correlation of phosphorylation and nitration of tyrosine residues in IκB-α

with NF- κ B translocation (20) would suggest that CpG-DNA through increasing ONOO⁻ formation might have induced nitration of I κ B- α . Recently, bacterial DNA was reported to evoke epithelial IL-8 production independent of the NF- κ B pathway (33). Thus, the mechanism of CpG-DNA-induced IL-8 expression may also be cell specific.

The present findings may have relevance to chronic inflammatory diseases. If bacterial DNA is proinflammatory as indicated by the present and previous results (8) then simply killing bacteria may be insufficient to fully suppress the inflammatory response. Indeed, DNA from dead bacteria would be still present, even when bacteria cannot be detected by standard microbiological techniques, and could trigger PMN responses. This possibility is supported by detection of bacterial DNA under pathological conditions that are also associated with nitrosative stress and PMN activation and/or accumulation (8-12). Thus, strategies would have to be developed to degrade bacterial DNA, to block its receptors and/or stimulatory effects.

In summary, the current study provides evidence for CpG-DNA activation of ONOO⁻ signaling in human PMN, which underlies IL-8 gene expression and IL-8 production. Increased ONOO⁻ formation is also consistent with increased cytotoxicity. These are important addition to the bioactivity profile of bacterial DNA. Combined with previous observations of CpG-DNA upregulation of β_2 integrin expression on PMN (6) and suppression of PMN apoptosis (7), bacterial DNA and unmethylated CpG motifs in particular, emerges as a potent regulator of PMN functions, and thereby may contribute to aggravation and maintenance of the inflammatory response.

3.2.3.6 References

1. Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257-263.
2. Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 709-760.
3. Bauer, S., C. J. Kirschning, H. Häcker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G. B. Lipford. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9237-9242.
4. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2002. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.
5. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102: 2660-2669.
6. Trevani A. S., A. Chorny, G. Salamone, M. Vermeulen, R. Gamberale, J. Schettini, S. Raiden, and J. Geffner. 2003. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur. J. Immunol.* 33: 3164-3174.
7. József, L., T. Khreiss, and J. G. Filep. 2004. CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J.* 18: 1776-1778.
8. Schwartz, D. A., T. J. Quinn, P. S. Thorne, S. Sayeed, A.-K. Yi, and A. M. Krieg. 1997. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.* 100: 68-73.

9. Lehtiniemi, J., P. J. Karhunen, S. Goebeler, S. Nikkari, and S. T. Nikkari. 2005. Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. *Eur. J. Clin. Invest.* 35: 13-16.
10. Balint, B., S. A. Kharitonov, T. Hanazawa, L. E. Donnelly, P. L. Shah, M. E. Hodson, and P. J. Barnes. 2001. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 17: 1201-1207.
11. Kooy, N. W., S. J. Lewis, J. A. Royall, Y. Z. Ye, D. R. Kelly, and J. S. Beckman. 1997. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit. Care Med.* 25: 812-819.
12. Shishehbor, M. H., R.J. Aviles, M. L. Brennan, X. Fu, M. Goormastic, G. L. Pearce, N. Gokce, J. F. Keaney, M. S. Penn, D. L. Sprecher, J. A. Vita, and S. L. Hazen. 2003. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 289: 1675-1680.
13. Buffon, A., L. M. Biasucci, G. Liuzzo, G. D'Onofrio, F. Crea, and A. Maseri. 2002. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N. Engl. J. Med.* 347: 5-12.
14. Koehler, D. R., G. P. Downey, N. B. Swezey, A. K. Tanswell, and J. Hu. 2004. Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 31: 377-81.

15. Beckman, J. S., and W. H. Koppenol. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 271: C1424-C1437.
16. Szabó, C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 140-141: 105-112.
17. Zouki, C., S. L. Zhang, J. S. D. Chan, and J. G. Filep. 2001. Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J.* 15: 25-27.
18. Filep, J. G., M. Beauchamp, C. Baron, and Y. Paquette. 1998. Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* 161: 5656-5662.
19. Zouki, C., L. József, S. Ouellet, Y. Paquette, and J. G. Filep. 2001. Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 69: 815-824.
20. Matata, B. M., M. Galinanes. 2002. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 277: 2330-2335.
21. Mulligan, M. S., M. L. Jones, M. A. Bolanowski, M. P. Baganoff, C. L. Deppeler, D. M. Meyers, U. S. Ryan, and P. A. Ward. 1993. Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. *J. Immunol.* 150: 5585-5595.

22. Harada, A., N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1994. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 56: 559-564.
23. Gerszten, R. E., E. A. Garcia-Zepeda, Y. C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. J. Gimbrone, Jr, A. D. Luster, F. W. Luscinskas, and A. Rosenzweig. 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718-723.
24. József, L., C. Zouki, N. A. Petasis, C. N. Serhan, and J. G. Filep. 2002. Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13266-13271.
25. Wheeler, M. A., S. D. Smith, G. Garcia-Cardena, C. F. Nathan, R. M. Weiss, and W.C. Sessa. 1997. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 99: 110-116.
26. Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Rad. Biol. Med.* 16: 149-156.
27. Ahmad-Nejad, P., H. Häcker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 32: 1958-1968.
28. DeForge, L. E., J. S. Kenney, M. L. Jones, J. S. Warren, and D. G. Remick. 1992. Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated

- human whole blood. Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J. Immunol.* 148: 2133-2141.
29. Yoshimori, T., A. Yamamoto, Y. Morijama, M. Futai, and Y. Tashiro. 1991. Bafilomycin A, a specific inhibitor of vacuolar type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266: 17707-17712.
30. Yi, A. K., R. Tuetken, T. Redford, M. Waldschmidt, J. Kirsch, and A. M. Krieg. 1998. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.* 160: 4755-4761.
31. Schreck, R., B. Meier, D. N. Mannel, W. Dröge, and P. A. Baeuerle. 1992. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* 175: 1181-1194.
32. Pahl, H. L., B. Krauss, K. Schulze-Osthoff, T. Decker, E. B. Traenckner, M. Vogt, C. Myers, T. Parks, P. Warring, A. Muhlbacher, A. P. Czernilofsky, and P. A. Baeuerle. 1996. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription NF-kappaB. *J. Exp. Med.* 183: 1829-1840.
33. Ahtar, M., J. L. Watson, A. Nazli, and D. M. McKay. 2003. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent NF-kB-independent pathway. *FASEB J.* 17: 1319-1321.

34. Roberts, T. L., J. A. Dunn, T. D. Terry, M. P. Jennings, D. A. Hume, M. J. Sweet, and K. J. Stacey. 2005. Differences in macrophage activation by bacterial DNA and CpG-containing oligonucleotides. *J Immunol* 175: 3569-3576.
35. Häcker, G., V. Redecke, and H. Häcker. 2002. Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology* 105: 245-251.
36. Jack, R.M., and D. T. Fearon. 1988. Selective synthesis of mRNA and proteins by human peripheral blood neutrophils. *J. Immunol.* 140: 4286-4293.
37. Rothe, G., and G. Valet. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidin and 2',7'-dichlorofluorescin. *J. Leukoc. Biol.* 47: 440-448.
38. Schmidt, H.H.H.W., R. Seifert, and E. Böhme. 1989. Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating-factor and leukotriene B₄. *FEBS Lett.* 244: 357-360.
39. Wallerath, T., I. Gath, W. E. Aulitzky, J. S. Pollock, H. Kleinert, and U. Förstermann. 1997. Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb. Haemostasis.* 77:163-167.
40. Evans, T. J., L. D. K. Buttery, A. Carpenter, D. R. Springall, J. M. Polak, and J. Cohen. 1996. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible

- nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9553-9558.
41. Gow, A., D. Duran, S.R. Thom, and H. Ischiropoulos. 1996. Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* 333: 42-48.
 42. Eiserich, J.P., M. Hristova, C. E. Cross, A. D. Jones, B. A. Freeman, B. Halliwell, and A. van der Vliet. 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidant by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391: 393-397.
 43. Galinanes, M., and B. M. Matata. 2002. Protein nitration is predominantly mediated by peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leukocytes. *Biochem. J.* 367: 467-473.
 44. Reiter, C.D., R. J. Teng, and J. S. Beckman. 2000. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 275: 32460-32466.
 45. Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima. 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 56: 554-558.
 46. Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima. 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 265: 21128-21133.

47. McDonald, P.P., A. Bald, and M. A. Cassatella. 1997. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 89: 3421-3433.
48. Cloutier, A., T. Ear, O. Borissevitch, P. Larivée, and P. P. McDonald. 2003. Inflammatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-terminal kinase /AP-1 signaling cascade in human neutrophils. *J Immunol* 171: 3751-3761.

Footnotes

¹This study was supported by grants MOP-12573 and MOP-64283 (to J. G. F.) and Doctoral Research Awards (to J. L. and T. K.) from the Canadian Institutes of Health Research

²Address correspondence and reprint requests to Dr. János G. Filep

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 boulevard de l'Assomption,

Montréal, Québec, Canada H1T 2M4

Phone: (514) 252-3400 ext. 4662; FAX: (514) 252-3430

E-mail: [REDACTED]

³Abbreviations used in this paper: TLR-9, toll-like receptor-9; CpG-DNA, bacterial DNA; met-CpG-DNA, methylated bacterial DNA; PMN, polymorphonuclear leukocytes; DAF, 4,5-diaminofluorescein diacetate; NOS, nitric oxide synthase; eNOS, endothelial NOS; iNOS, inducible NOS; DHR 123, dihydrorhodamine 123; RFU, relative fluorescence units

3.2.3.7 Figures

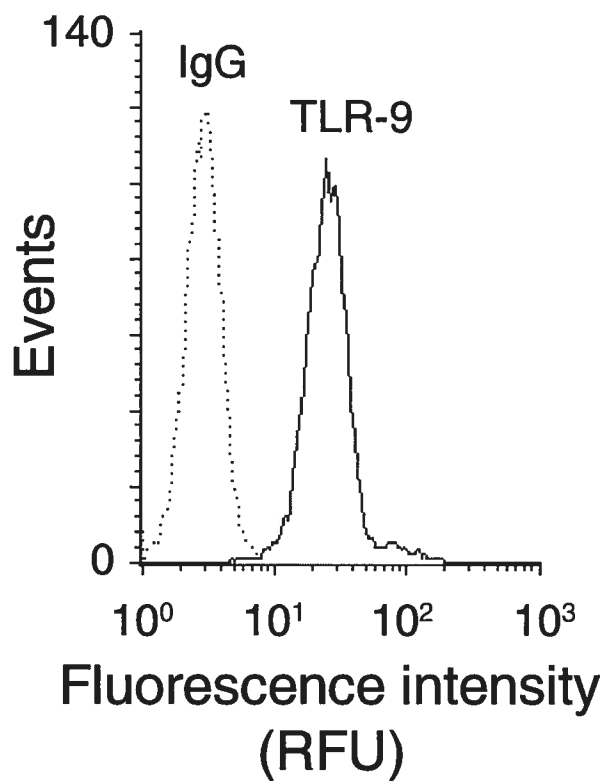


Figure 1. TLR-9 expression in human neutrophils. Freshly isolated PMN were permeabilized and stained with an anti-human TLR-9 Ab or an isotype control (IgG). PMN (defined as CD16⁺, CD3⁻, CD19⁻ and HLA-DR⁻ cells, purity >99.9%) were gated and immunostaining was analyzed by flow cytometry. The results are representative for four experiments using PMN from different donors.

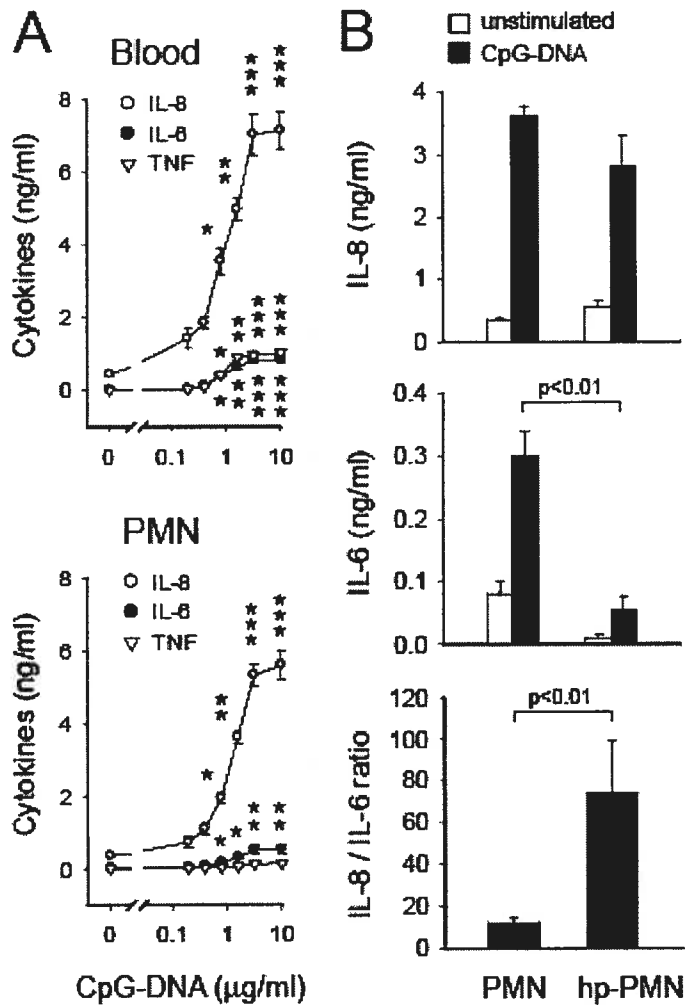


Figure 2. CpG-DNA stimulation of IL-8, IL-6 and TNF release. (A) Isolated PMN (5×10^6 cells/ml, purity >95%) or whole blood samples or (B) high purity PMN (hp-PMN, 5×10^6 cells/ml, purity >99%) were challenged with CpG-DNA at 37°C for 4 h. Secreted cytokines were detected by selective EIAs. Values are the mean \pm SEM for four to six experiments with different donor cell preparations. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. unstimulated.

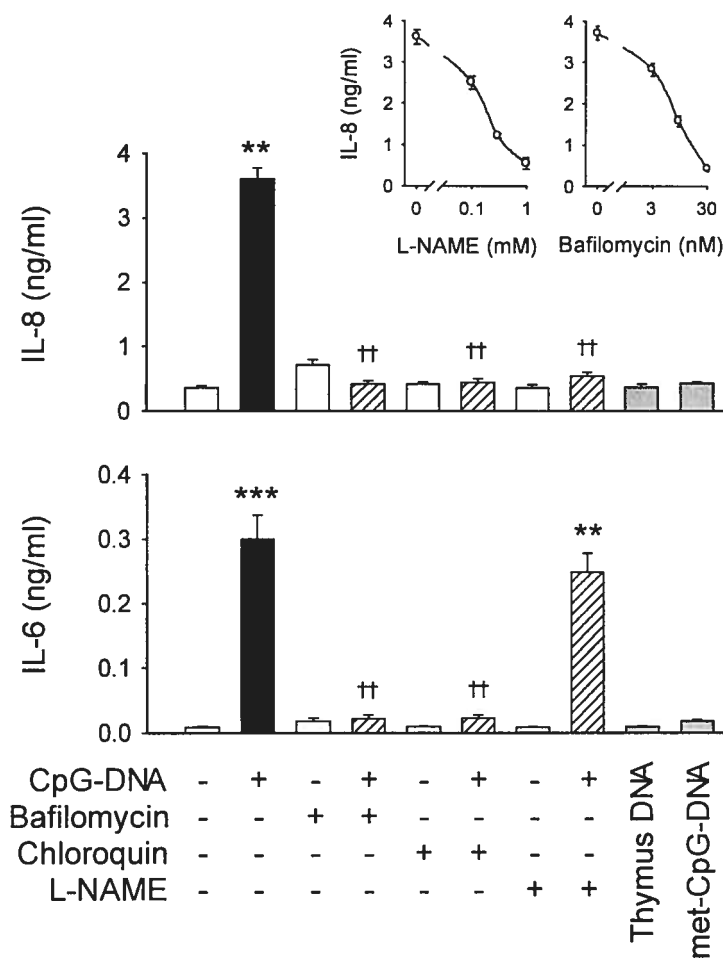


Figure 3. Inhibition of endosomal acidification and NO synthesis blocks CpG-DNA-induced IL-8 release. PMN were incubated for 20 min with bafilomycin A (30 nM), chloroquine (5 μ g/ml) or L-NAME (1 mM) and then challenged with CpG-DNA, calf thymus DNA or methylated bacterial DNA (met-CpG-DNA) (all at 1.6 μ g/ml). Inserts show the concentration-dependent inhibitory actions of L-NAME and bafilomycin A. Values are the mean \pm SEM for four to six experiments with different donor cell preparations. ** P <0.01; *** P <0.001 vs. unstimulated; †† P <0.01 vs. CpG-DNA.

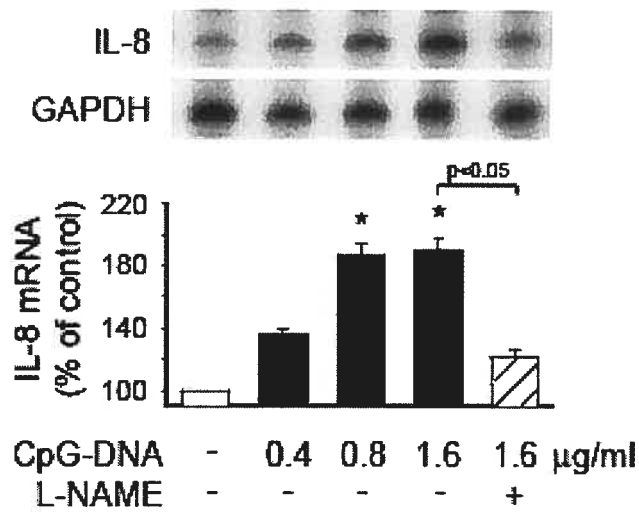


Figure 4. CpG-DNA-induced IL-8 mRNA expression and its inhibition by L-NAME. PMN were incubated for 20 min with L-NAME (1 mM) and challenged with CpG-DNA for 4 h at 37°C. (A) Representative RNase protection assay using probes for IL-8 and GAPDH. (B) Densitometry analysis of autoradiographs of the samples probed for IL-8 and GAPDH. The IL-8 results are expressed as percentage of control (unstimulated) after normalization with the GAPDH values. The results represent means \pm SEM of blots from four experiments with different blood donors. * $P < 0.05$ vs. untreated.

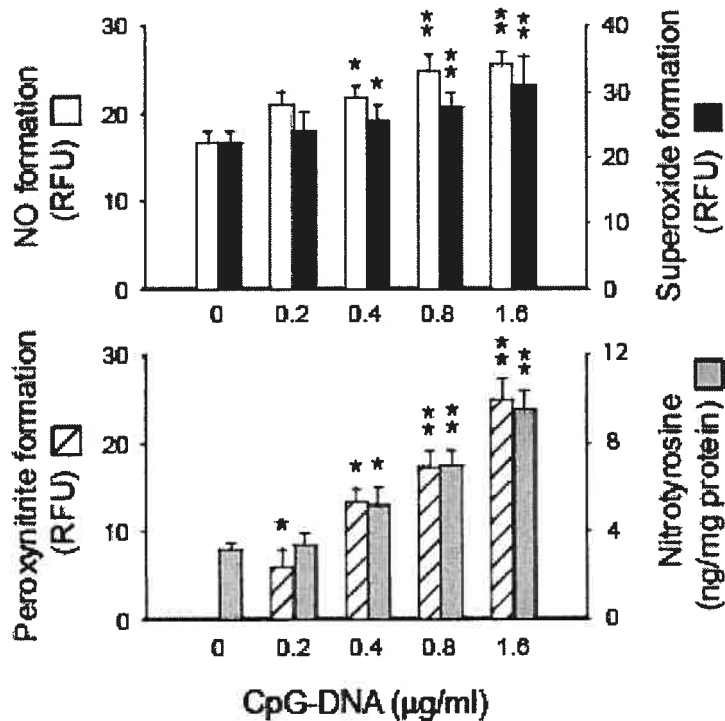


Figure 5. CpG-DNA induces formation of superoxide, NO and ONOO⁻ in PMN. PMN were challenged with CpG-DNA at 37°C for 4 h. Intracellular formation of superoxide and NO was monitored simultaneously using dihydroethidine (5 µM) and diaminofluorescein (DAF, 5 µM), respectively, and is expressed as RFU. ONOO⁻ formation was assessed as L-NAME (1 mM)-inhibitable oxidation of DHR123 to rhodamine, and is expressed as RFU. Values are means ± SEM (n=5-8). *P<0.05, **P<0.01 vs. unstimulated.

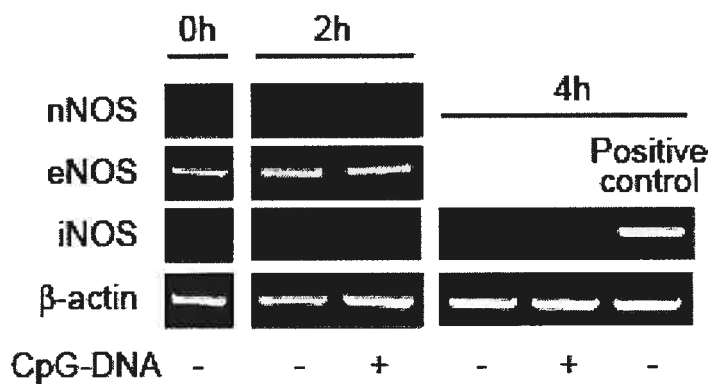


Figure 6. Effect of CpG-DNA on expression of NOS isoforms. Freshly isolated PMN (0 h) or PMN incubated without or with CpG-DNA (1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2 and 4 h, were harvested for RNA preparation. RT-PCR was performed with specific primers for human nNOS, iNOS, eNOS and β -actin. The PCR products were resolved on a 1.2% agarose gel by electrophoresis and stained with ethidium bromide. RNA isolated and amplified from human chondrocytes stimulated with IL-1 β for 4 h. served as a positive control for iNOS. The results are representative for four independent experiments using PMN from different donors.

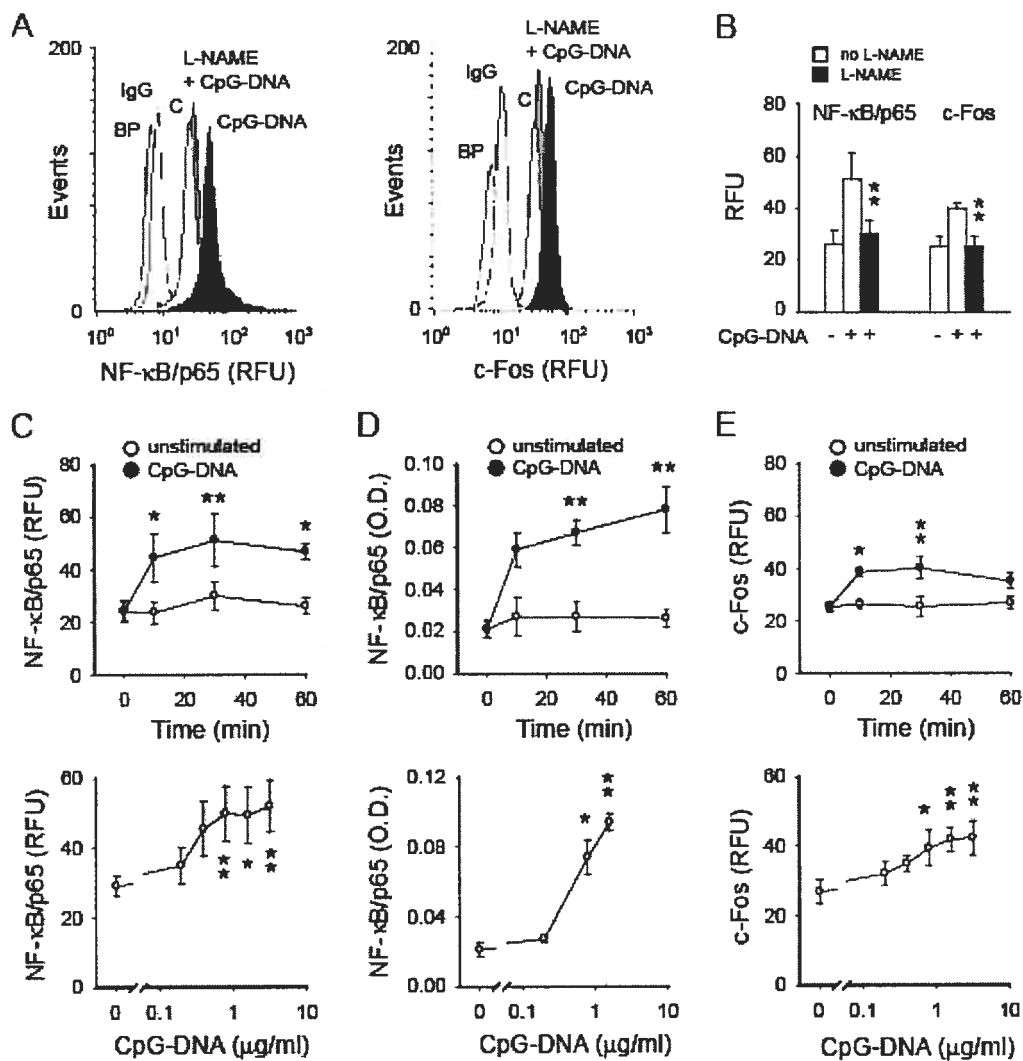


Figure 7. CpG-DNA stimulates nuclear accumulation of NF- κ B and c-Fos. PMN were incubated without or with CpG-DNA (1.6 μ g/ml) for the indicated times, or with various concentrations of CpG-DNA for 30 min in the absence or presence of L-NAME (1 mM). PMN nuclei or nuclear extracts were prepared for immunostaining and NF- κ B DNA binding assay, respectively as described in Methods. (A) Representative fluorescence histograms of singlet nuclei of PMN after staining for NF- κ B/p65 (left panel) or c-Fos (right panel). Also shown is the staining of nuclei prepared from PMN incubated with vehicle as controls (curves labeled C) and staining with normal rabbit

IgG followed by FITC-labeled anti-rabbit IgG antibody (curves labeled IgG). As a negative control, antibodies were preincubated for 2 h with the appropriate blocking peptide (curves labeled BP) before addition to nuclei. (B) L-NAME inhibits nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and c-Fos. Time and concentration-dependent actions of CpG-DNA on nuclear accumulation of NF- κ B/p65 (C) or binding to DNA (D). DNA binding of NF- κ B was detected with ELISA using an immobilized κ B consensus sequence, and is expressed as optical density. (E) Effects of CpG-DNA on nuclear accumulation of c-Fos. The results are means \pm SEM of four to five experiments with different blood donors. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. unstimulated.

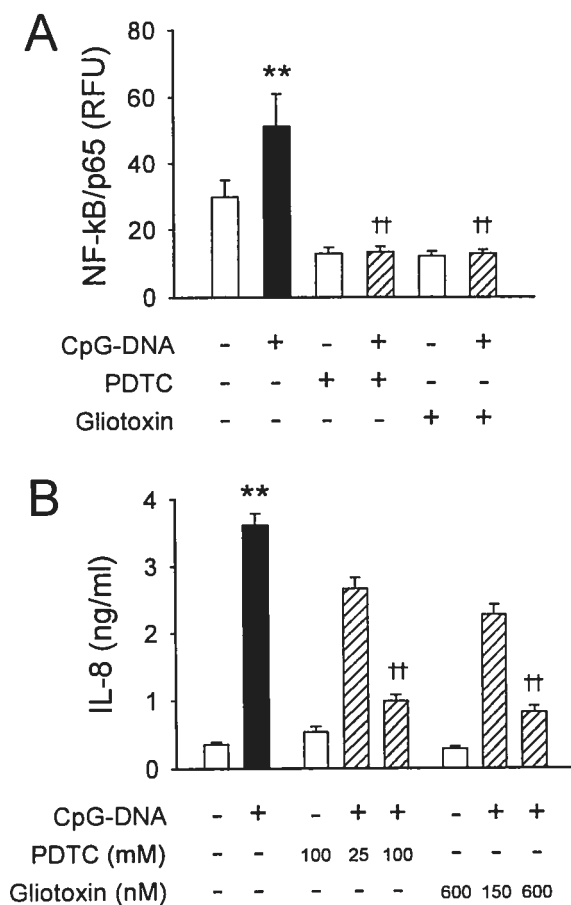


Figure 8. PDTC and gliotoxin suppress CpG-DNA-induced nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and IL-8 release. PMN were incubated with PDTC (25 or 100 μ M) or gliotoxin (150 or 600 nM) and then challenged with CpG-DNA (1.6 μ g/ml) (A) for 30 min to assess nuclear accumulation of NF- κ B/p65 by flow cytometry or (B) for 4 h to measure IL-8 release by EIA. Values are means \pm SEM (n=5). **P < 0.01 vs. untreated; ††P < 0.01 vs. CpG-DNA.

3.3 Chapitre III (Article 3)

József L, Filep JG. (2003) Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. *Free Radic Biol Med.* 35: 1018-1027.

3.3.1 Contribution des auteurs

Levente József

Dans ce projet j'ai mis au point et effectué toutes les expériences décrites dans l'article. De plus, j'ai analysé tous les résultats découlant de cet article et j'ai contribué à la rédaction de l'article.

Dr. János G. Filep

Étant mon directeur de recherche, Dr. János G. Filep, m'a guidé et m'a supervisé durant toutes les étapes du projet.

3.3.2 Introduction générale du chapitre III (article 3)

La formation de l'ONOO⁻ est accrue lors de la réponse inflammatoire. De plus en plus d'évidences indiquent que l'ONOO⁻ régule des voies de signalisation intracellulaires qui contrôlent les réponses inflammatoires. La signalisation d'ONOO⁻ est impliquée dans la synthèse de cytokines, incluant l'IL-8, dans les neutrophiles humains. Dans ce présent chapitre, nous avons examiné si la sélénométhionine, la sélénocystéine, et l'ebesen peuvent contrer la signalisation d'ONOO⁻ et par conséquent réduire l'expression du gène et la sécrétion d'IL-8 dans les leucocytes du sang humain.

Nous avons trouvé que l'incubation des échantillons de sang totale humain avec l'ebesen, la sélénométhionine, ou la sélénocystéine a comme conséquence une réduction marquée de l'expression du gène et la production d'IL-8 des leucocytes humains, induits par l'ONOO⁻ exogène ou par le LPS, via l'inhibition de l'activation de NF-κB et d'AP-1.

Ces résultats documentent la capacité des composés contenant du sélénium à réguler la production de cytokines proinflammatoires dans les leucocytes du sang totale, un milieu qui est biologiquement approprié, et suggèrent également que les composés synthétiques contenant du sélénium comme l'ebesen pourraient offrir des possibilités thérapeutiques intéressantes pour contrer la signalisation de l'ONOO⁻ et ainsi atténuer la réponse inflammatoire et limiter les dommages liés à celle-ci.

Article 3**3.3.3 Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF- κ B and AP-1 activation, and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes**

Levente József and János G. Filep

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department of Medicine,
University of Montréal, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4

Acknowledgment: This work was supported by a grant to J.G.F. from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-12573).

Address for correspondence: Dr. János G. Filep

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 boulevard de l'Assomption

Montréal, Québec, Canada H1T 2M4

Phone: (514) 252-3400 ext. 4662; FAX: (514) 252-3430

E-mail: 

Running title: Selenoproteins and ONOO⁻ signaling in leukocytes

Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF- κ B and AP-1 activation, and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes

3.3.3.1 Abstract

A growing body of evidence indicates that the powerful oxidant peroxynitrite (ONOO⁻) may function as an intracellular signal for production of proinflammatory cytokines, such as interleukin-8 (IL-8) in human leukocytes. In this study, we investigated whether selenomethionine, selenocysteine, and the synthetic organoselenium compound ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2h)-one) could inhibit ONOO⁻-mediated IL-8 gene expression in human leukocytes in whole blood. At micromolar concentrations, ebselen, selenomethionine, and selenocysteine effectively prevented nuclear accumulation of activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor κ B (NF- κ B) evoked by exogenous ONOO⁻, in both polymorphonuclear and mononuclear leukocytes, and inhibited IL-8 gene and protein expression. The inhibitory actions of selenium-containing molecules were concentration-dependent (EC₅₀ values: 8.0–13.2 μ M) and were not shared by their sulphur analogs methionine and cystine. Furthermore, ebselen, selenomethionine, and selenocysteine markedly reduced LPS-evoked intracellular ONOO⁻ formation in leukocytes, resulting in 36–66% decreases in nuclear accumulation of AP-1 and NF- κ B in both polymorphonuclear and mononuclear leukocytes and inhibition of IL-8 mRNA expression and IL-8 release. These findings indicate that selenium-containing compounds can effectively oppose ONOO⁻ signaling in leukocytes and suggest a role for selenium-containing molecules as potential modifiers of inappropriate leukocyte trafficking under pathological conditions associated with enhanced ONOO⁻ formation.

Key words: peroxynitrite, interleukin-8 gene expression, NF- κ B, AP-1, ebselen, selenomethionine, selenocysteine, leukocytes, inflammation

3.3.3.2 Introduction

Enhanced production of peroxynitrite (ONOO^-), formed in the reaction of NO with superoxide, is a hallmark of a variety of inflammatory pathologies [1 and 2]. The cytotoxic actions of ONOO^- have been widely described. However, recent evidence indicates a role for ONOO^- in the modulation of intracellular signaling pathways that regulate inflammatory responses, including leukocyte activation and trafficking. In particular, scavenging of ONOO^- by uric acid decreases leukocyte invasion into the nervous system in a mouse model of allergic encephalomyelitis and prevents the development of the disease [3 and 4], though studies on NO synthase-deficient mice suggest a dual role for NO, and probably ONOO^- , in this disease [5]. Treatment of rats with an ONOO^- decomposition catalyst reduces neutrophil infiltration and tissue injury to the distal ileum evoked by ischemia/reperfusion [6].

ONOO^- may promote leukocyte recruitment through the activation of at least two distinct mechanisms. ONOO^- upregulates surface expression of CD11b/CD18 on human neutrophils through activation of the Ras/Raf-1/MEK/ERK signaling cascade, resulting in enhanced neutrophil adhesion to endothelial cells [7]. Furthermore, ONOO^- functions as an intracellular messenger to mediate interleukin-8 (IL-8) gene expression in lipopolysaccharide- (LPS), tumor necrosis factor- α - (TNF- α), and IL-1 β -stimulated human leukocytes [8 and 9] through activation of the transcription factors NF- κ B and AP-1 [9 and 10]. IL-8 plays a pivotal role in recruitment and activation of neutrophils [11, 12 and 13] and monocytes [14] in various experimental models of acute inflammation [15, 16 and 17]. Agents that inhibit ONOO^- signaling and subsequent IL-8 production may, therefore, have potent anti-inflammatory properties.

Selenium-containing amino acids, plasma selenoprotein P, and synthetic low molecular weight organoselenium compounds, such as ebselen, react with ONOO^- with high second-order rate constants in the range of 2×10^2 to $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [18, 19, 20 and 21]. These selenium-containing compounds prevent proteins from oxidation and

nitration [19 and 20] and protect against DNA damage caused by ONOO^- [18]. Glutathione peroxidase, a tetrameric enzyme containing selenocysteine at the active center of each subunit [22], reduces ONOO^- to nitrite and protects against ONOO^- -mediated oxidations [23]. Ebselen has been reported to mimic glutathione peroxidase [24]. These observations led to the suggestion that, like glutathione peroxidase, other proteins containing selenocysteine or selenomethionine may function as a peroxynitrite reductase [23].

In the present experiments, we studied the impact of selenocysteine, selenomethionine, and ebselen on LPS-stimulated peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation, and IL-8 gene and protein expression in human leukocytes.

3.3.3.3 Materials and Methods

Reagents

Ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)one), selenomethionine, selenocysteine, methionine, cystine, L-NAME, and LPS (*E. coli* serotype O111:B4) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) and propidium iodide were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Peroxynitrite and a pH-neutralized negative control solution that contains the same concentrations of nitrite, H_2O_2 , and NaCl as the ONOO^- stock solution were obtained from Alexis (San Diego, CA, USA). A 4 μl aliquot of one of these solutions was added to some blood samples, and its effects were investigated.

Experimental design

Venous blood (anticoagulated with sodium heparin, 50 U/ml; white blood cell counts: 4500 and 9500 cells/ μl) was obtained from nonsmoking, healthy volunteers (male and female, 24–56 years) who had denied taking any medicaments for at least 2 weeks before the experiments. The Clinical Research Committee approved the

experimental protocols. Whole blood aliquots (400 μ l) in sterile microcentrifuge tubes were placed on a rotator, preincubated for 15 min with one of the selenium-containing compounds in the absence or presence of the NO synthase inhibitor L-NAME (1 mM), and then challenged with LPS (1 μ g/ml) or ONOO⁻ (80 μ M) at 37°C in 95% air/5% CO₂. In another set of experiments, isolated neutrophils (prepared as in [7]) were resuspended at 5×10^6 cells/ml in Hanks' balanced salt solution containing 0.1% bovine serum albumin and challenged with ONOO⁻ (80 μ M) in the absence and presence of one of the selenium-containing compounds. At the designated time point, the plasma was harvested, diluted 1:5 with RPMI 1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) containing 1% fetal bovine serum, and stored at -20°C for later cytokine analysis. Cells were processed as described below.

Assessment of intracellular peroxynitrite formation

For detection of intracellular ONOO⁻ formation, DHR 123 (final concentration of 20 μ M) was added to some samples 60 min before the end of incubation in the absence or presence of L-NAME (1 mM), an inhibitor of NO synthases. The NO synthase blocker-inhibitable fluorescence of rhodamine, an oxidation product of DHR 123, was assessed as a marker of ONOO⁻ formation [8 and 25]. Following lysis of erythrocytes, polymorphonuclear granulocytes, monocytes, and lymphocytes were gated by their forward and side scatter characteristics, and single-color fluorescence was analyzed by a flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), as described previously [8].

Measurement of IL-8

Plasma concentrations of IL-8 were determined using a highly selective ELISA (BioSource International, Camarillo, CA, USA). The detection limit of the assay was 10

pg/ml. Intra- and interassay coefficients of variation were typically < 3% and < 5%, respectively.

IL-8 RNase protection assay

For samples used in RNase protection assays, 50 μ l blood were mixed with an equal volume of lysis/denaturation solution (Ambion, Austin, TX, USA) and stored at -20°C for later processing. The cDNA templates for the human IL-8 and GAPDH probes and antisense mRNA probes were synthesized and the RNase protection assay was performed with the Direct Protect kit (Ambion) on aliquots of whole blood, as described previously [8]. Densitometric analysis of the bands corresponding to the IL-8- and GAPDH-protected fragments was performed using a digital image analysis system (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA). The results were normalized to represent equivalent RNA loading in each lane based on the intensity of the GAPDH bands.

Nuclear factor- κ B and AP-1

Intranuclear, DNA-bound NF- κ B/p65 and AP-1/c-Fos were measured with a flow cytometric assay [9 and 26] and were used as estimates of NF- κ B and AP-1 activity in the cell, respectively. This assay allows simultaneous quantification of DNA-bound transcription factors in polymorphonuclear (PMN) and mononuclear leukocyte populations in whole blood. Following incubation of blood samples with or without stimulus, red blood cells were lysed and leukocyte nuclei were prepared for immunostaining using the Cycletest Plus DNA reagent kit (Becton Dickinson). Nuclei were first stained with affinity-purified, rabbit polyclonal antihuman NF- κ B/p65 or c-Fos antibodies or with normal rabbit IgG (to assess nonspecific binding of IgG to leukocyte nuclei) and then with FITC-conjugated antirabbit IgG antibody (all from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and propidium iodide. The samples

were then analyzed with a FACScan flow cytometer. Acquisition was performed using the saved settings obtained with the DNA Quality Control Particles kit (Becton Dickinson). Singlet cell nuclei were gated by using the doublet-discrimination module and were visualized on an FSC/SSC dot-plot. Fluorescence intensity for both PMN and mononuclear cell nuclei was analyzed using the CellQuest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Fluorescence intensity (RFU) was expressed as $RFU = RFU_{\text{experimental}} - RFU_{\text{control}}$, where $RFU_{\text{experimental}}$ and RFU_{control} are the fluorescence intensities of nuclei incubated with one of the polyclonal antibodies and normal rabbit IgG, respectively, followed by staining with an FITC-labeled antirabbit IgG antibody.

Leukocyte viability

Following 24 h culture of blood samples, leukocytes were prepared as described above, and staining with propidium iodide (0.5 $\mu\text{g/ml}$) was analyzed by flow cytometry [8].

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons were made by ANOVA using ranks (Kruskal-Wallis test) followed by Dunn's multiple contrast hypothesis test, to identify differences between various treatments, or by the Wilcoxon signed rank test and the Mann-Whitney U test for paired and unpaired observations, respectively. Values of $p < .05$ were considered significant for all tests.

3.3.3.4 Results

Inhibition of ONOO⁻ and LPS-induced IL-8 production and IL-8 mRNA expression by selenium-containing compounds

Initial experiments showed that the addition of authentic ONOO⁻ to human whole blood evoked increases in IL-8 production in a time- and concentration-dependent manner, as assessed at 4 and 24 h post-ONOO⁻ administration (Fig. 1). Since ONOO⁻ at 80 μ M evoked similar increases in IL-8 as those observed with 1 μ g/ml LPS [7], this concentration of ONOO⁻ was used in subsequent experiments. Peroxynitrite-induced increases in IL-8 production were reduced by ebselen, selenomethionine, and selenocysteine in a concentration-dependent fashion with EC₅₀ values of 8.0, 11.5, and 13.2 μ M, respectively (Fig. 1B). By contrast, methionine or cysteine did not produce significant inhibition (Figs. 1B and 1C). Apparent maximum inhibition was observed at \sim 100 μ M, with ebselen and selenomethionine being virtually equally potent inhibitors; whereas, on a molar basis, selenocysteine appeared to be a somewhat less potent inhibitor than either ebselen or selenomethionine (Fig. 1B). None of the selenium-containing compounds by themselves affected IL-8 production. IL-8 levels were 3.91 ± 0.42 , 4.23 ± 0.38 , and 3.84 ± 0.33 ng/ml in the presence of ebselen, selenomethionine, and selenocysteine, respectively, compared with 4.14 ± 0.36 ng/ml in control samples following 24 h culture ($n = 5$, $p > .1$).

Incubation of isolated neutrophils with ONOO⁻ (80 μ M) for 4 h increased IL-8 production from 0.72 ± 0.08 to 4.98 ± 0.74 ng/ml ($n = 4$, $p < .05$), which was reduced to 0.96 ± 0.09 , 0.96 ± 0.08 , and 1.06 ± 0.09 ng/ml in the presence of ebselen, selenomethionine, and selenocysteine, respectively ($n = 4$, all $p < .05$ compared with ONOO⁻ alone).

LPS gave increases, as expected, in IL-8 production assessed at 4 and 24 h post-LPS administration (Fig. 2). All three selenium-containing compounds markedly,

although never completely, inhibited LPS-induced increases in IL-8 production (Fig. 2). Once again, ebselen and selenomethionine appeared to be somewhat more potent inhibitors than selenocysteine (Fig. 2).

To determine whether the selenium-containing compounds inhibited IL-8 at the transcriptional level, we investigated IL-8 mRNA expression. Results shown in Fig. 3 confirmed those obtained for protein synthesis, with ONOO^- (80 μM) inducing approximately a 2-fold increase of IL-8 mRNA, which was markedly, though never completely, inhibited by ebselen, selenomethionine, and selenocysteine. Likewise, LPS induced on average a 2.2-fold increase in IL-8 mRNA expression, which was suppressed by 40–55% in the presence of ebselen, selenomethionine, or selenocysteine (Fig. 4).

Inhibition of LPS-induced peroxynitrite formation by selenium-containing compounds

To provide evidence that selenium-containing molecules modulate ONOO^- formation, we assessed intracellular rhodamine fluorescence 4 h after LPS administration when the highest level of DHR 123 oxidation can be detected [8]. The NO synthase blocker-inhibitable proportion of DHR 123 oxidation can be attributed to ONOO^- , because ONOO^- oxidizes DHR 123 whereas NO does not [25]. LPS evoked 2- to 3-fold increases in rhodamine fluorescence in PMN, monocytes, and lymphocytes, which were reduced by ebselen, selenomethionine, and selenocysteine (Fig. 5). Neither methionine nor cysteine produced significant reductions in rhodamine fluorescence (data not shown). LPS-evoked increases in rhodamine fluorescence were also suppressed by L-NAME (Fig. 5), indicating that a large proportion of DHR 123 oxidation was due to enhanced ONOO^- formation [8 and 25]. However, no additive inhibition was observed with a combination of selenium-containing molecules and L-NAME (Fig. 5).

Inhibition of nuclear accumulation of AP-1 and NF- κ B

To assess nuclear binding of AP-1 and NF- κ B, leukocyte nuclei were prepared from whole blood and the resulting PMN and mononuclear fractions were analyzed by immunostaining (Fig. 6A). ONOO⁻, as expected, evoked nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and c-Fos (i.e., the increased fluorescence represents increased amounts of NF- κ B and AP-1 bound to DNA), and this was attenuated by ebselen (Fig. 6B). Immunostaining was completely blocked by preincubation of the antibodies with the appropriate blocking peptides. Selenomethione and selenocysteine, albeit to a lesser degree, produced similar inhibition to that observed with ebselen in both PMN and mononuclear cells (Fig. 6C). Likewise, stimulation of leukocytes in the presence of ebselen, selenomethionine, or selenocysteine gave quantitatively similar results with respect to the extent of inhibition of LPS-evoked nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and AP-1/c-Fos in both PMN and mononuclear cells (Fig. 7). Preincubation of blood samples with 35 μ M cycloheximide had no detectable effect on LPS-stimulated nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and c-Fos (data not shown). Furthermore, the selenium-containing compounds by themselves did not affect immunostaining of nuclei for NF- κ B/p65 and AP-1/c-Fos in unchallenged cells (data not shown).

Selenium-containing compounds and leukocyte viability

None of the selenoproteins tested significantly affected leukocyte viability. For instance, $70 \pm 3\%$, $69 \pm 4\%$, $67 \pm 3\%$, and $68 \pm 4\%$ of neutrophils stained

negative for propidium iodide following 24 h incubation with vehicle (control), ebselen, selenomethionine, or selenocysteine (all at 100 μ M), respectively (n=6, p>.1).

3.3.3.5 Discussion

In this report, we describe that a novel mechanism by which selenoproteins may affect the inflammatory response is via the attenuation of ONOO⁻-mediated nuclear accumulation of the transcription factors NF- κ B and AP-1 and subsequent suppression of IL-8 gene expression and IL-8 production in human leukocytes. Since recent studies have increasingly pointed to the critical role of IL-8 in directing leukocyte migration into inflamed areas, our observations bear directly on the mechanism for the anti-inflammatory actions of selenoproteins.

Selenium is an essential biological trace element in mammals and is incorporated into selenoproteins most frequently in the form of selenocysteine, which is encoded in mRNA by the codon UGA [27]. Mammalian selenoproteins such as glutathione peroxidase carry out a variety of catalytic functions, many of which are redox reactions [22]. There is evidence that glutathione peroxidase and probably other selenium-containing proteins function as ONOO⁻ reductase [20, 21 and 23]. Indeed, ebselen, selenomethionine, and selenocysteine protected against ONOO⁻-induced single-strand breaks in plasmid DNA [18] and ONOO⁻-mediated oxidation and nitration reactions [20 and 23].

Here we have shown that the incubation of human whole blood samples with ebselen, selenomethionine, or selenocysteine resulted in a marked reduction of exogenous ONOO⁻ as well as LPS-induced IL-8 mRNA expression and protein release from human leukocytes, via the inhibition of NF- κ B and AP-1 activation. These results document the capability of selenoproteins to regulate proinflammatory cytokine production in leukocytes in whole blood, a milieu that is biologically relevant. However, the inhibitory action of selenium-containing compounds does not require the presence of

blood elements, for they also inhibited 90–95% of ONOO⁻-stimulated IL-8 release from isolated neutrophils. Furthermore, these selenium-containing molecules retain bioactivity for at least 24 h after their bolus addition to blood samples, as evidenced by the marked reduction of IL-8 release 24 h post-ONOO⁻ or post-LPS, without affecting leukocyte viability. Thus, our results confirm and enhance earlier findings on selenoprotein scavenging of ONOO⁻ [20 and 23] and demonstrate the ability of ebselen, selenomethionine, and selenocysteine to interfere with ONOO⁻ signaling regardless of whether authentic ONOO⁻ was added to the samples as a bolus or whether ONOO⁻ was produced intracellularly over a longer period of time in response to LPS (see below). The slight differences in the inhibitory potency of seleno-compounds most likely reflect differences in physicochemical parameters such as hydrophobic interactions.

In our study, the maximum degree of inhibition was achieved with selenoproteins at a concentration (100 μM) considerably higher than physiological levels. Selenomethionine is distributed randomly in the methionine pool, whereas selenocysteine is present in stoichiometric amounts in selenoproteins [28]. Some selenoproteins may accumulate on the cell surface (e.g., selenoprotein P binds to endothelial cells [19]), suggesting that their local concentrations may be significantly higher than those detected in the plasma. In addition, at pharmacological concentrations, small organoselenium compounds, such as ebselen, are attractive candidates as therapeutic agents to enhance defense against ONOO⁻.

In addition to scavenging exogenous ONOO⁻ (added as a bolus to the samples), selenoproteins at the same concentrations also effectively reduced LPS-induced IL-8 production. Bacterial LPS is one of the most potent stimuli for IL-8 expression in most cell types, including human leukocytes [29]. There is evidence that this action of LPS is predominantly mediated via increased ONOO⁻ formation in human leukocytes [8 and 30]. The present results suggest that inhibition of LPS-induced IL-8 expression by ebselen, selenomethionine, and selenocysteine was due, at least in part, to the

attenuation of intracellular ONOO^- formation. We have used NO-dependent oxidation of DHR 123 to rhodamine to monitor intracellular ONOO^- formation [8, 30 and 31]. Although this assay does not allow quantitation of ONOO^- , it is specific because NO per se does not oxidize DHR 123, whereas ONOO^- does so readily [25 and 31].

A significant portion of rhodamine fluorescence in LPS-stimulated leukocytes can be attributed to ONOO^- because it depends on an NO-related species, i.e., it can be inhibited by L-NAME. The lack of additive inhibitory actions of selenoproteins and L-NAME on DHR 123 oxidation would suggest that these compounds inhibited the same reaction, namely, the ONOO^- -dependent oxidation. In human neutrophils, LPS-stimulated DHR 123 oxidation appears to correlate with nitration of tyrosine residues [30]. Although nitrotyrosine is widely considered as a specific "fingerprint" of ONOO^- [2], some studies reported additional, peroxidase-mediated pathways of tyrosine nitration [32 and 33]. However, the relative contribution of ONOO^- and myeloperoxidase to tyrosine nitration vary considerably even in neutrophilic inflammation models [33]. Interestingly, tyrosine nitration in human leukocytes appears to be due to ONOO^- [34].

Consistent with previous reports, we detected nuclear accumulation of NF- κ B and AP-1 in response to ONOO^- and LPS in both PMN and mononuclear leukocytes by using a flow cytometric assay [9, 10 and 30]. While this assay allows simultaneous detection of nucleus-bound transcription factors in both PMN and mononuclear leukocytes without prior isolation of these cells, nuclei from monocytes and lymphocytes cannot be distinguished. Therefore, the quantities of transcription factors present in neutrophils and monocytes cannot be compared. Also in keeping with previous studies [9, 30, 35 and 36], we detected NF- κ B/p65 and c-Fos DNA-binding activities in the nuclei of unstimulated PMN and mononuclear cells, and this was not attributable to cytosolic contamination of the nuclei.

Although the significance of these observations is unclear, the presence of NF- κ B in the nucleus of unstimulated cells has been proposed to contribute to constitutive expression of transcripts encoding κ B-dependent genes. Of interest, ebselen, selenomethionine, and selenocysteine failed to affect the nuclear presence of NF- κ B in unchallenged cells, indicating the existence of a mechanism distinct from that inducing NF- κ B translocation after cell stimulation. Our results showed that both authentic ONOO⁻ and LPS-induced nuclear accumulation of NF- κ B and AP-1 can be prevented to a similar degree by ebselen, selenomethionine, and selenocysteine, albeit the relative contribution of these transcription factors to the induction of IL-8 gene expression cannot be deduced from the present study. The molecular mechanisms by which authentic or intracellularly formed ONOO⁻ evoke increases in nuclear accumulation of NF- κ B or AP-1 are not fully understood. Since nitration of tyrosine residues in I κ B α correlates with NF- κ B translocation in monocytes [10], it is possible that selenocompounds might have prevented ONOO⁻-induced I κ B α activation, leading to decreased nuclear accumulation of NF- κ B. Likewise, selenite supplementation increased glutathione peroxidase activity and reversed NF- κ B activation by TNF- α in A549 human epithelial cells [37]. On the other hand, albumin or immunoglobulin G enriched in selenomethionine prepared from the plasma of human volunteers after 28 d of dietary supplementation of selenomethionine failed to protect against ONOO⁻ [28].

The reasons for this apparent controversy are not readily apparent. It is possible that the *in vivo* ONOO⁻ reductase potency of selenomethionine-containing proteins differs from those of selenocysteine-containing proteins, such as glutathione peroxidase [23] and selenoprotein P [19], despite the similar ONOO⁻-scavenging potency of selenomethionine and selenocysteine *in vitro* ([20] and the present study). The biological functions of many selenoproteins present *in vivo* are still unknown, and their selectivity towards the inhibition of IL-8 production remains to be investigated.

Given the pivotal role of NF- κ B in the regulation of the expression of a wide range of proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and enzymes, the inhibition of NF- κ B has been proposed as a promising approach to reduce inflammatory responses [38 and 39] and might contribute to the anti-inflammatory actions of aspirin and other salicylates [40, 41 and 42]. Of interest, the inhibition of ONOO⁻ signaling by ebselen, selenomethionine, and selenocysteine resembles the inhibitory action of native and aspirin-triggered lipoxin A4 on IL-8 production by human leukocytes [30]. However, unlike selenoproteins, lipoxins suppress ONOO⁻ formation by inhibiting superoxide formation [30]. Decreased ONOO⁻ formation is also consistent with reduced cytotoxicity and with the attenuation of ONOO⁻ signaling [7, 9 and 10]. Clearly, further studies are required to identify the molecules whose expression or production can be altered by selenium-containing compounds.

These experiments permit us to suggest a novel mechanism for the anti-inflammatory effects of selenoproteins: ebselen, selenomethionine, and selenocysteine attenuate IL-8 gene expression and IL-8 production in human leukocytes by preventing ONOO⁻-mediated activation of NF- κ B and AP-1. These observations are important additions to the bioactivity profile of these compounds and would suggest that selenoproteins may function as an endogenous "stop signal" for leukocyte recruitment into inflamed tissues. Our results also suggest that selenium-containing compounds such as ebselen may have a therapeutic potential in diseases associated with increased ONOO⁻ formation, including neurodegenerative diseases, acute lung injury, atherosclerosis, ischemia/reperfusion, bacterial infections, and chronic inflammation.

List of abbreviations:

AP-1, activator protein-1

DHR 123, dihydrorhodamine 123

IL-8, interleukin-8

IgG, immunoglobulin G

LPS, lipopolysaccharide

NF- κ B, nuclear factor κ B

PMN, polymorphonuclear leukocytes

RFU, relative fluorescence units

3.3.3.6 References

- [1] Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. M.; Freeman, B. M. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1620-1624; 1990.
- [2] Beckman, J. S.; Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* **271**:C1424-C1437; 1996.
- [3] Hooper, D. C.; Scott, G. S.; Zborek, A.; Mikheeva, T.; Kean, R.B.; Koprowski, H.; Spitsin, S. V. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J.* **14**:691-698; 2000.
- [4] Kean, R. B.; Spitsin, S. V.; Mikheeva, T.; Scott, G. S.; Hooper, D. C. The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *J. Immunol.* **165**:6511-6518; 2000.

- [5] D.O. Willenborg, M.A. Staykova and W.B. Cowden, Our shifting understanding of the role of nitric oxide in autoimmune encephalomyelitis: a review. *J. Neuroimmunol.* **100** (1999), pp. 21–35
- [6] Cuzzocrea, S.; Misko, T.P.; Costantino, G.; Mazzon, E.; Micali, A.; Caputi, A. P.; MacArthur, H.; Salvemini, D. Beneficial effects of peroxynitrite decomposition catalyst in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *FASEB J.* **14**:1061-1072; 2000.
- [7] Zouki, C.; Zhang, S.-L.; Chan, J. S. D.; Filep, J. G. Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J.* **15**:25-27; 2001.
- [8] Filep, J. G.; Beauchamp, M.; Baron, C.; Paquette, Y. Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* **161**:5656-5662; 1998.
- [9] Zouki, C.; József, L.; Ouellet, S.; Paquette, Y.; Filep, J. G. Peroxynitrite mediates cytokine- induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **69**:815-824; 2001
- [10] Matata, B.M.; Galinanes, M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor- κ B DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **277**:2330-2335; 2002.
- [11] Luster, A. D. Chemokines- chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* **338**:436-445; 1998.
- [12] Huber, A.R.; Kunkel, S. L.; Todd, R. F. III; Weiss, S. J. Regulation of transendothelial migration by endogenous interleukin-8. *Science* **254**:99-102; 1991.
- [13] Detmers, P. A.; Lo, S. K.; Olsen, E. E.; Walz, A.; Baggiolini, M.; Cohn, Z. A. Neutrophil-activating protein-1/interleukin-8 stimulates the binding of leukocyte

- adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J. Exp. Med.* **171**:1155-1162; 1990.
- [14] Gerszten, R. E.; Garcia-Zepeda, E. A.; Lim, Y.C.; Yoshida, M.; Ding, H. A.; Gimbrone, M. J. Jr.; Luster, A. D.; Luscinskas, F. W.; Rosenzweig, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **398**:718-723; 1999.
- [15] Harada, A.; Sekido, N.; Akahoshi, T.; Wada, T.; Mukaida, N.; Matsushima, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **56**:559-564; 1994.
- [16] Yokoi, K.; Mukaida, N.; Harada, A.; Watanabe, Y.; Matsushima, K. Prevention of endotoxemia-induced acute respiratory distress-like lung injury in rabbits by a monoclonal antibody to IL-8. *Lab. Invest.* **76**:375-384; 1997.
- [17] Mulligan, M. S.; Jones, M. L.; Bolanowski, M. A.; Baganoff, M. P.; Deppeler, C. L.; Meyers, D. M.; Ryan, U. S.; Ward, P. A. Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. *J. Immunol.* **150**:5585-5595; 1993.
- [18] Roussyn, I.; Briviba, K.; Masumoto, H.; Sies, H. Selenium-containing compounds protect DNA from single-strand breaks caused by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**:216-218; 1996.
- [19] Arteel, G.E.; Moister, V.; Oubrahim, H.; Briviba, K.; Abel, J.; Sies, H. Protection of selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol. Chem.* **379**:1201-1205; 1998.
- [20] Briviba, K.; Roussyn, I.; Sharov, V. S.; Sies, H. Attenuation of oxidation and nitration reactions of peroxynitrite by selenomethionine, selenocystine and ebselen. *Biochem. J.* **319**:13-15; 1996.
- [21] Masumoto, H.; Sies, H. The reaction of ebselen with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**:262-267; 1996.

- [22] Flohé, L. The selenoprotein glutathione peroxidase. In: Dolphin, D.; Poulson, R.; Abramovic, A., eds. *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*. New York: John Wiley & Sons; 1989: 643-731.
- [23] Sies, H.; Sharov, V.; Klotz, L. O.; Briviba, K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new functions for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **272**:27812-27817; 1997.
- [24] Müller, A.; Cadenas, E.; Graf, P.; Sies, H. A novel biologically active seleno-organic compound- Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (ebselen). *Biochem. Pharmacol.* **33**:3235-3239; 1984.
- [25] Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman J. S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Rad. Biol. Med.* **16**:149-156; 1994.
- [26] Foulds, S. Novel flow cytometric method for quantifying nuclear binding of the transcription factor nuclear factor kappa B in unseparated human monocytes and polymorphonuclear cells. *Cytometry* **29**:182-186; 1997.
- [27] Berry, M. J.; Banu, L.; Chen, Y. Y.; Mandel, S. J.; Kieffer, J. D.; Harney, J. W.; Larsen, P. R. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiododinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* **353**:273-276;1991.
- [28] R.J. Hondal, A.K. Motley, K.E. Hill and R.F. Burk, Failure of selenomethionine residues in albumin and immunoglobulin G to protect against peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **371** (1999), pp. 29–34.
- [29] DeForge, L.; Kenney, J. S.; Jones, M. L.; Warren, J. S.; Remick, D. G. Biphasic production of IL-8 in LPS-stimulated human whole blood: separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-TNF and anti-IL-1 antibodies. *J. Immunol.* **148**:2133-2141; 1992

- [30] József, L.; Zouki, C.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N.; Filep, J. G. Lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:13266-13271; 2002.
- [31] Tarpey, M. M.; Fridovich, I. Methods of detection of vascular reactive species. Nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ. Res.* **89**:224-236; 2001.
- [32] Eiserich, J. P.; Hristova, M.; Cross, C. E.; Jones, A. D.; Freeman, B. A.; Halliwell, B.; van der Vliet, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**:393-397; 1998.
- [33] Brennan, M. L.; Wu, W.; Fu, X.; Shen, Z.; Song, W.; Frost, H.; Vadseth, C.; Narine, L.; Lankiewicz, E.; Borchers, M. T.; Lusic, A. J.; Lee, J. J.; Lee, N. A.; Abu-Soud, H. M.; Ischiropoulos, H.; Hazen, S. L. A tale of two controversies. Defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* **277**:17415-17427; 2002.
- [34] Galinanes, M.; Matata, B. M. Protein nitration is predominantly mediated by a peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leukocytes. *Biochem. J.* **367**:467-473; 2002.
- [35] McDonald, P. P.; Bald, A.; Cassatella, M. A. Activation of the NF- κ B pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* **89**:3421-3433; 1997.
- [36] Griffin, G. E.; Leung, K.; Folks, T. M.; Kunkel, S.; Nabel, G. J. Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- κ B. *Nature* **339**:70-73; 1990.

- [37] Jeong, D.-W.; Yoo, M.-H.; Kim, T. S.; Kim, J.-H.; Kim, I. Y. Protection of mice from allergen-induced asthma by selenite. Prevention of eosinophil infiltration by inhibition of NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **277**:17871-17876; 2002.
- [38] Lewis, A. J.; Manning, A. M. New targets for anti-inflammatory drugs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:489-494; 1998.
- [39] Yamamoto, Y.; Gaynor, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappa B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* **107**:135-142, 2001.
- [40] Kopp, E.; Gosh, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* **265**: 956-959; 1994.
- [41] Bayon, Y.; Alonso, A.; Sanchez-Crespo, M. 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal and its main metabolite 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid, are potent inhibitors of nuclear factor kappaB activation. *Br. J. Pharmacol.* **126**:1359-1366; 1999.
- [42] Pierce, J. W.; Read, M. A.; Ding, H.; Luscinskas, F. W.; Collins, T. Salicylates inhibit I κ B- α phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J. Immunol.* **156**:3961-3969;1996.

3.3.3.7 Figures

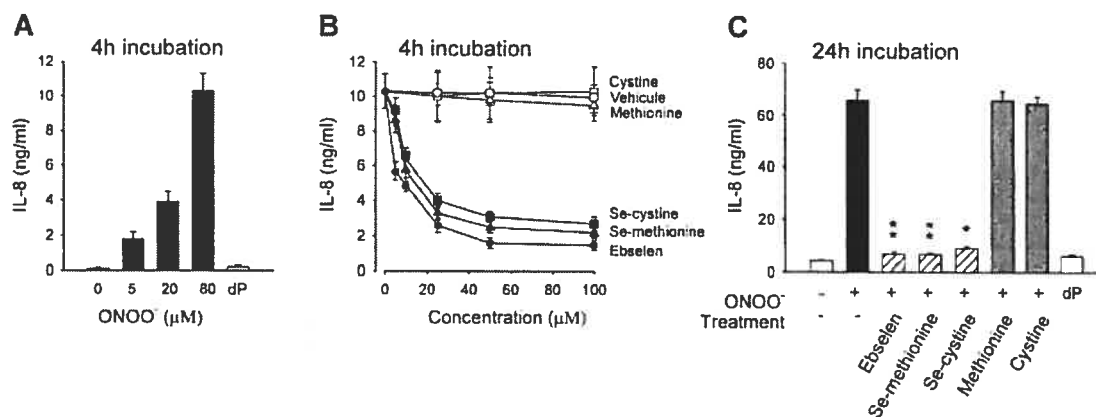


Figure 1. Selenium-containing compounds attenuated peroxynitrite-induced IL-8 production. Human whole blood samples were incubated with vehicle (unstimulated), ebselen, selenomethionine, selenocysteine, methionine, or cysteine for 15 min and then challenged with ONOO⁻ for (A and B) 4 or (C) 24 h. (A) Concentration-dependent effect of ONOO⁻. Decomposed peroxynitrite (dP) was used as a negative control. (B) Concentration-dependent inhibition of ONOO⁻ (80 μM) stimulated IL-8 production by ebselen, selenomethionine (Se-methionine), or selenocysteine (Se-cysteine). (C) Effects of selenium-containing compounds (all at 100 μM). Values are mean ± SEM of duplicate determinations for five to six experiments with different donor cell preparations. **p* < .05; ***p* < .01 (vs. ONOO⁻).

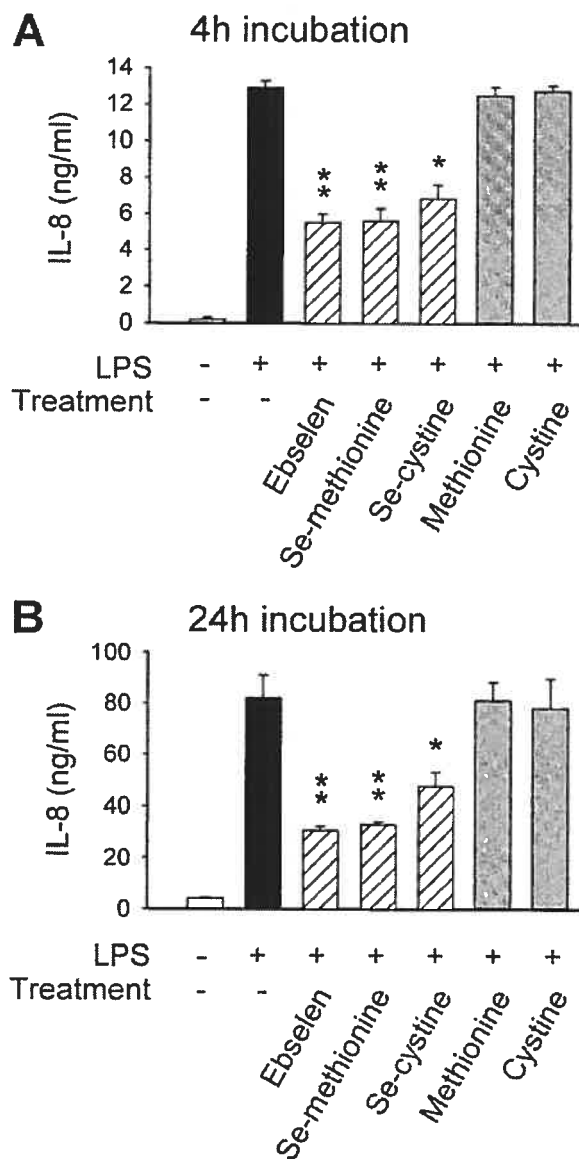


Figure 2. Selenium-containing compounds inhibited LPS-stimulated IL-8 production. Blood samples were incubated with ebselen, selenomethionine (Se-methionine), selenocysteine (Se-cystine), methionine, or cysteine (all at 100 μ M) for 15 min then challenged with LPS (1 μ g/ml) for (A) 4 or (B) 24 h at 37°C. Values are mean \pm SEM of duplicate determinations for five to six experiments with different donor cell preparations. * p < .05; ** p < .01 (vs. LPS).

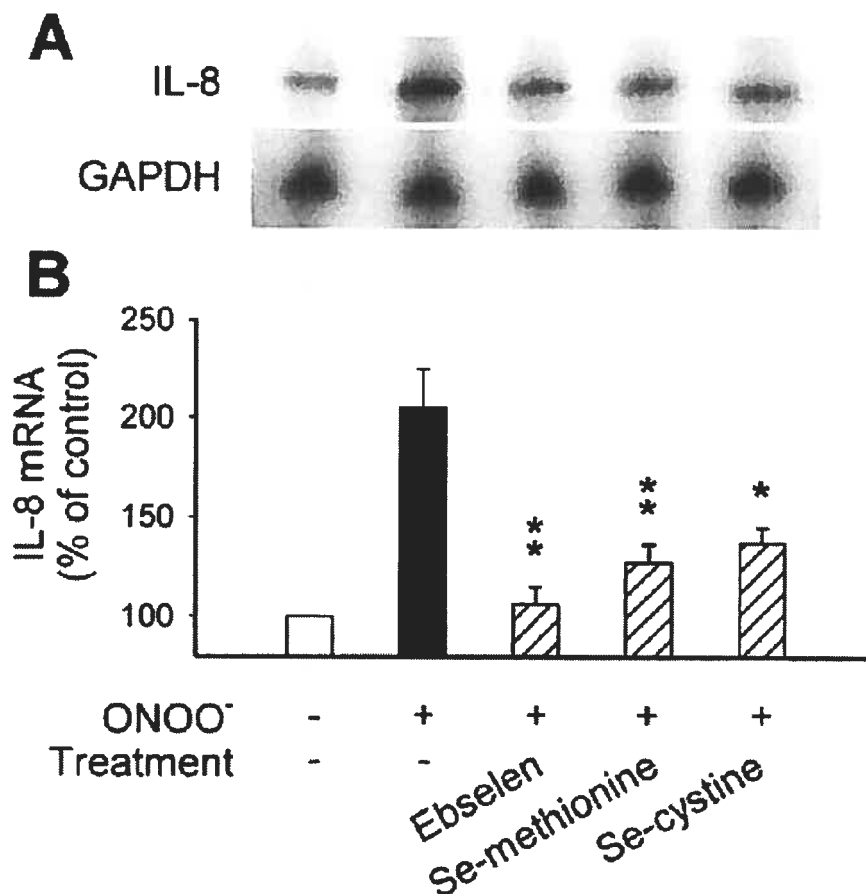


Figure 3. Selenium-containing compounds inhibited ONOO⁻-stimulated IL-8 mRNA expression. Blood samples were incubated for 15 min with ebselen, selenomethionine (Se-methionine), or selenocysteine (Se-cysteine), all at 100 μ M, and then challenged with ONOO⁻ (80 μ M) for 4 h at 37°C. (A) Representative RNase protection assay using probes for IL-8 and GAPDH. (B) Densitometric analysis of autoradiographs of the samples probed for IL-8 and GAPDH. The IL-8 results were adjusted based on the GAPDH values to represent equivalent RNA loading in each lane, and the results were then expressed as a percentage of the band obtained from blood incubated with vehicle (control). The results represent means \pm SEM of blots from five experiments with different blood donors. * p < .05; ** p < .01 (vs. ONOO⁻).

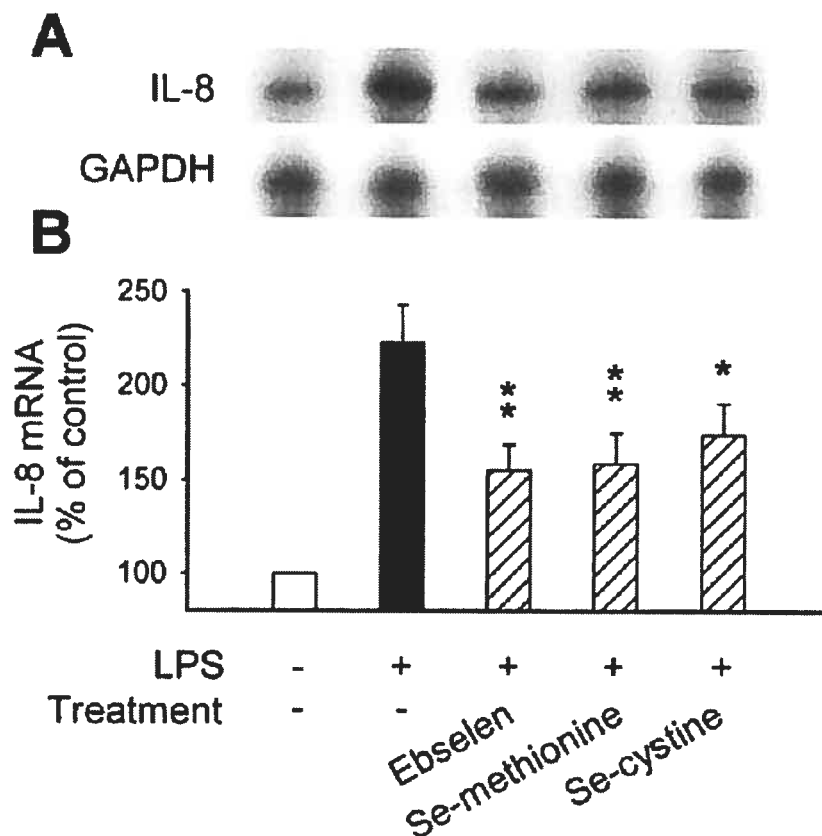


Figure 4. Selenium-containing compounds inhibited LPS-stimulated IL-8 mRNA expression. Blood samples were incubated for 15 min with ebselen, selenomethionine (Se-methionine), or selenocysteine (Se-cysteine), all at 100 μ M, and then challenged with LPS (1 μ g/ml) for 4 h at 37°C. (A) Representative RNase protection assay using probes for IL-8 and GAPDH. (B) Densitometric analysis of autoradiographs of the samples probed for IL-8 and GAPDH. The IL-8 results were adjusted based on the GAPDH values to represent equivalent RNA loading in each lane, and the results were then expressed as a percentage of the band obtained from blood incubated with vehicle (control). The results represent means \pm SEM of blots from five experiments with different blood donors. * p < .05; ** p < .01 (vs. LPS).

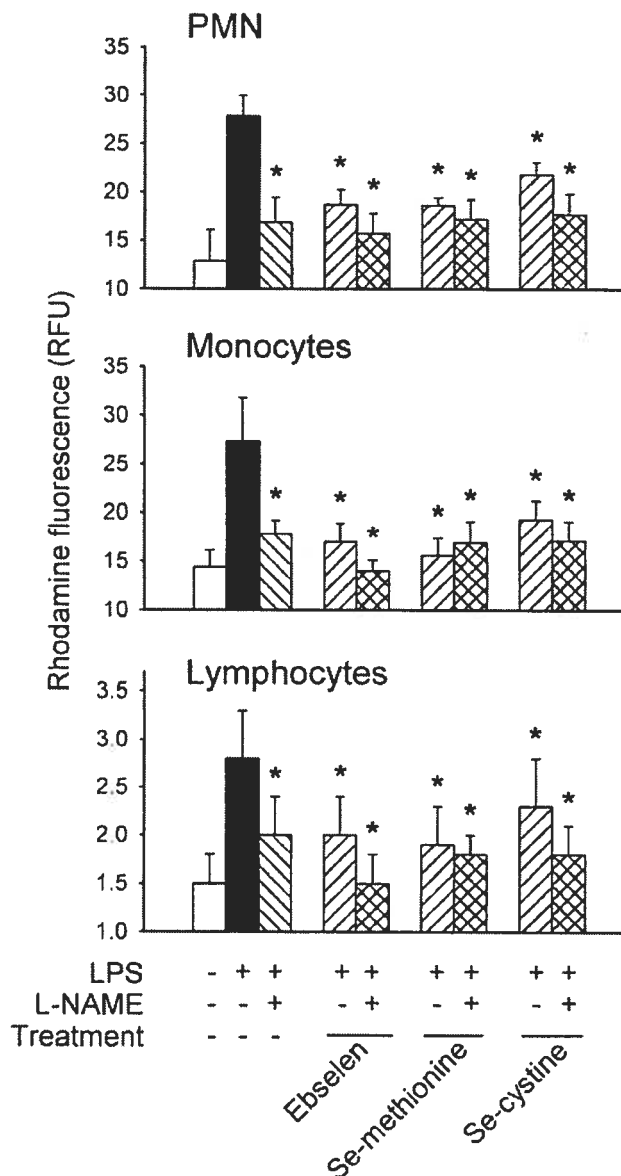


Figure 5. Selenium-containing compounds inhibited LPS-induced oxidation of DHR 123 to rhodamine in human leukocytes. Blood samples were preincubated with vehicle or ebselen, selenomethionine (Se-methionine), or selenocysteine (Se-cysteine), all at 100 μ M, in the absence or presence of L-NAME (1 mM) as indicated, and then challenged with LPS at 37°C for 4 h. DHR 123 (20 μ M) was added during the last 60 min of the incubation period. Intracellular rhodamine fluorescence is expressed as RFU. Values are means \pm SEM ($n = 4$). $*p < .05$ (vs. LPS).

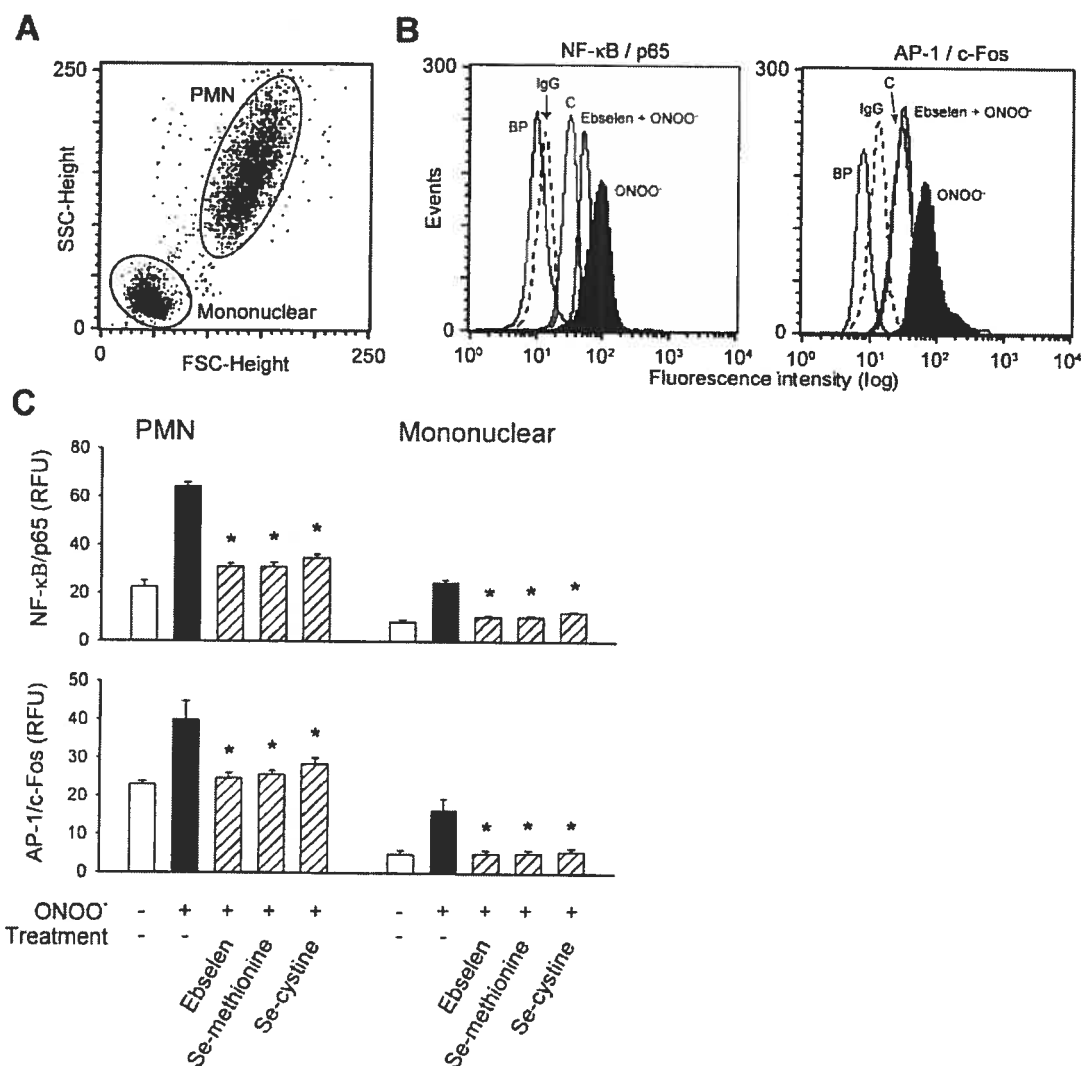


Figure 6. Selenium-containing compounds inhibited peroxynitrite-induced nuclear accumulation of NF- κ B and AP-1 in PMN and mononuclear leukocytes. Whole blood samples were incubated for 15 min with vehicle (control) or ebselen, selenomethionine (Se-methionine), or selenocysteine (Se-cysteine), all at 100 μ M, and then for 30 min with ONOO⁻ (80 μ M) at 37°C. Leukocyte nuclei were prepared for immunostaining as described in Materials and Methods. (A) Acquisition of leukocyte nuclei using CellQuest Pro software with the doublet-discriminating module activated. (B) Representative fluorescence histograms of singlet nuclei of PMN after staining with NF- κ B/p65 (left) or AP-1/c-Fos (right). Also shown is the staining of nuclei prepared from

blood incubated with vehicle as controls (curves labeled C) and staining with normal rabbit IgG followed by FITC-labeled antirabbit IgG antibody (curves labeled IgG). As a negative control, antibodies were preincubated for 2 h with the appropriate blocking peptide (curves labeled BP) before addition to the nuclei. (C) Comparison of the inhibitory effects of ebselen, selenomethionine, and selenocysteine. The results are means \pm SEM of four experiments with different blood donors. * $p < .05$ (vs. ONOO⁻).

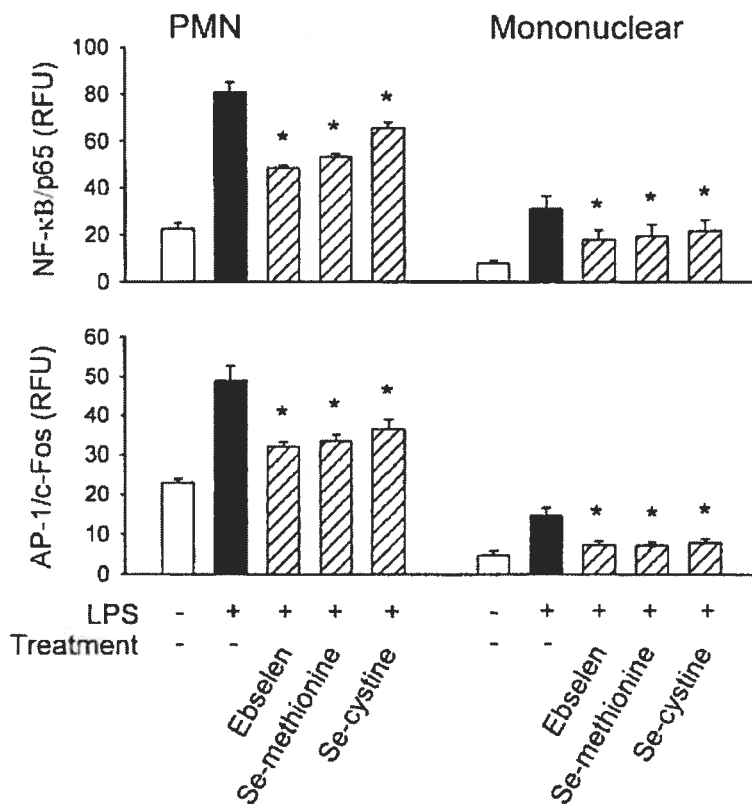


Figure 7. Selenium-containing compounds inhibited LPS-induced nuclear accumulation of NF- κ B/p65 and AP-1/c-Fos in PMN and mononuclear leukocytes. Whole blood samples were incubated for 15 min with vehicle (control), selenomethionine (Se-methionine), or selenocysteine (Se-cysteine), all at 100 μ M, and then for 30 min with LPS (1 μ g/ml) at 37°C. Leukocyte nuclei were prepared for immunostaining as described in Materials and Methods. The results are means \pm SEM of four experiments with different blood donors. * p < .05 (vs. LPS).

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

Nos études identifient de nouveaux mécanismes par lesquels l'ADN bactérien peut induire et amplifier la réponse inflammatoire. Nous avons démontré, *in vitro* et *ex vivo*, que l'ADN-CpG est un signal de survie pouvant atténuer la mort cellulaire programmée des neutrophiles humains, prolongeant ainsi leur survie. Parallèlement, l'ADN bactérien induit la sécrétion de l'interleukine-8 en activant la signalisation ONOO⁻-dépendante des neutrophiles. Selon ces observations, nous pouvons affirmer que l'ADN-CpG est capable de réguler l'intensité et la durée de la réponse inflammatoire. Nous avons également établi que les composés contenant du sélénium peuvent contrer la signalisation du ONOO⁻ et, par conséquent, réduire la sécrétion d'IL-8, accentuant ainsi le potentiel de cette voie de signalisation comme cible thérapeutique pour atténuer l'inflammation.

Nos travaux démontrent que les neutrophiles humains semblent posséder toute la machinerie nécessaire pour répondre à l'ADN bactérien via sa voie classique de signalisation par son récepteur TLR-9. Les neutrophiles humains expriment l'ARNm et la protéine du TLR-9 (Hayashi et al, 2003; Trevani et al, 2003). L'analyse, par cytométrie en flux intracellulaire et par immunobouvardage de type « western », effectuée avec des préparations de neutrophiles de grande pureté (>99,9%) confirme la présence du TLR9. Consistent avec l'expression faible de l'ARNm TLR9 dans les cellules T CD4⁺ ou CD8⁺, généralement considérées comme des contrôles négatives (Bauer et al, 2001), nous avons détecté un faible signal pour TLR9 dans les cellules T Jurkat. Nous avons également observé une augmentation du marquage au TLR9 après traitement avec l'ADN-CpG. Le mécanisme par lequel l'ADN-CpG augmente

l'expression de son propre récepteur ainsi que l'importance fonctionnelle de cette augmentation de l'expression du TLR9 restent à être étudiés.

Une étude récente a suggéré un mécanisme indépendant du TLR9 pour l'activation des neutrophiles induite par l'ADN bactérien (évaluée par la perte de la L-selectine, la hausse de CD11b et de la sécrétion de l'IL-8; Trevani et al, 2003). Cependant, cette suggestion a été basée en partie sur l'observation que le wortmannin, qui a été décrit par ces investigateurs comme inhibiteur de la signalisation par le TLR9, n'a pas affecté l'activation des neutrophiles par l'ADN-CpG. Ceci n'est pas étonnant, puisque de nombreuses études ont documenté que ces réponses des neutrophiles n'impliquent pas la signalisation via la PI3-kinase (Zouki et al, 2001; Khreiss et al, 2002; Capodici et al, 1998; Pillinger et al, 1996). D'ailleurs, des études sur des macrophages murins, des cellules dendritiques et épithéliales humaines ont démontré l'activation d'une gamme étendue de kinases, y compris la kinase induisant le NF- κ B, la kinase jun-N-terminale, l'ERK et le p38 MAPK en réponse de l'ADN-CpG (Häcker et al, 2002; Häcker et al, 1998; Akhtar et al, 2003).

Nos résultats indiquent également que les actions de l'ADN-CpG sur les neutrophiles humains, c'est-à-dire, la suppression de l'apoptose et l'induction de la production d'IL-8, nécessitent au préalable une acidification endosomale de l'ADN bactérien, qui est une étape critique pour induire la signalisation intracellulaire suite à la liaison au TLR9 (Yi et al, 1998; Hemmi et al, 2000; Bauer et al, 2001; Roberts et al, 2005). En effet, le traitement préalable des neutrophiles humains avec la bafilomycine A, qui inhibe l'ATPase vacuolaire (Yoshimori et al, 1991), la chloroquine, ou le monensin, qui s'accumule dans les endosomes et augmente leur pH

(Tonkinson et Stein, 1994; Bird, 1986; Yi et al, 1998; Häcker et al, 1998), rend les neutrophiles insensible à l'ADN-CpG, mais pas au LPS, consistant encore une fois avec une signalisation via le TLR9.

Finalement, nos résultats indiquent que ce sont les motifs de CpG nonméthylés qui sont responsables de l'induction de ces actions, puisque la méthylation des cytosines de l'ADN bactérien supprime complètement l'activité anti-apoptotique, et l'ADN de thymus de veau ne reproduit pas les effets de l'ADN bactérien. Les séquences CpG sont supprimées dans l'ADN des mammifères et sont généralement méthylées (Macfarlane et Menzel, 1998). Ces observations, bien que nous ne puissions pas exclure un rôle pour les séquences inhibitrices dans l'ADN de mammifère qui pourraient masquer les motifs de CpG stimulatrices (Yamada et al, 2002; Stacey et al, 2003), suggèrent que les différences dans les motifs de méthylation permettent aux neutrophiles d'identifier sélectivement l'ADN bactérien. Tel que mentionné précédemment, la reconnaissance spécifique de l'ADN bactérien se fait par sa liaison au TLR-9 et tous les résultats présentés en-dessous sont consistant avec une telle signalisation.

La progression vers l'apoptosis semble être l'état normal pour les neutrophiles en circulation, tandis que la survie prolongée de neutrophiles est nécessaire pour l'accumulation massive des leucocytes dans les tissus enflammés et l'amplification de la réponse inflammatoire. La survie des neutrophiles dépend de l'allègement de la mort cellulaire programmée par des signaux de l'environnement inflammatoire. Dans un premier temps, nous avons démontré que l'ADN bactérien, et en particulier les motifs de CpG nonméthylés, est un facteur anti-apoptotique des neutrophiles.

Conformément avec l'engagement des neutrophiles à l'apoptose, l'ADN-CpG retarde, plutôt que bloque, l'apoptose et résulte dans le prolongement de la survie des neutrophiles comme démontré *in vitro* et *ex vivo*. Ainsi, l'ADN-CpG exerce une action anti-apoptotique semblable à celle du LPS (Colotta et al, 1992, Lee et al, 1993), des glucocorticoides (Liles et al, 1995), du GM-CSF (Colotta et al, 1992; Klein et al, 2000), de la protéine C-réactive structurellement modifiée (Khreiss et al, 2002) ou de l'IL-8 (Klein et al, 2000), et le degré de l'inhibition de l'ADN-CpG est comparable à celui observé avec le LPS.

Nous avons également observé une diminution de l'apoptose des neutrophiles chez les rats suite au traitement avec de l'ADN-CpG. Puisque les neutrophiles en circulation ont une demi vie courte (~12h), et sont rapidement éliminés de la circulation suite à l'expression de la phosphatidylsérine à leur surface (Savill et al, 1989, Cox et al, 1995), nous avons évalué l'apoptose *ex vivo*. L'administration intraveineuse de l'ADN-CpG (200 µg/kg) a provoqué des diminutions modestes et passagères de la tension artérielle moyenne, a efficacement réprimé l'apoptose des neutrophiles et a prolongé leur survie. De tels changements étaient déjà observables juste après la collecte de sang et l'isolement des neutrophiles et sont devenus plus évidents suite à la culture *in vitro* des neutrophiles de rat isolés. Le sang normal de rat contient moins de neutrophiles que le sang humain, mais le nombre de neutrophiles peut rapidement augmenter en réponse aux stimuli pro-inflammatoires. Les hausses légères, mais statistiquement significatives du nombre de leucocytes du sang détecté à 60 minutes post-ADN-CpG étaient très probablement dues aux augmentations du nombre de neutrophiles, suggérant que l'ADN-CpG peut mobiliser les neutrophiles de

la moelle osseuse. Il est à noter que le pourcentage de neutrophiles fraîchement isolés qui sont marqués positivement avec l'annexine-V est plus élevé chez les neutrophiles de rats que les neutrophiles humains. Bien que nous ne savons pas si cela reflète les différences d'espèces ou des différences du procédé de collecte de sang, notre étude documente l'action anti-apoptotique de l'ADN-CpG sur les neutrophiles humains in vitro et les neutrophiles de rat ex vivo indépendamment des différences du niveau basale de cellules positif à l'annexine-V (c.-à-d., les cellules apoptotiques). Les données in vitro suggèrent un effet direct de l'ADN-CpG sur les neutrophiles, bien que nous ne puissions pas exclure la possibilité que d'autres mécanismes, par exemple, la libération de cytokines par d'autres cellules, pourrait avoir contribué à son action anti-apoptotique in vivo.

La suppression de l'apoptose des neutrophiles par l'IL-8 (Klein et al, 2000), le GM-CSF (Colotta et al, 1992), ou la protéine C-réactive monomérique (Khreiss et al, 2002) est principalement régulée par l'activation concourante des voies de signalisation ERK et AKT. L'activation passagère de la PI3-kinase sans activation d'ERK peut ne pas être suffisante pour transitoire l'apoptose (Klein et al, 2000). La présente étude fournit deux lignes d'évidence que l'ADN-CpG utilise également ces voies: (1) la culture des neutrophiles avec de l'ADN-CpG a comme conséquence une phosphorylation rapide d'ERK1/2 et d'AKT (la cible de la PI3-kinase), et (2) l'inhibition de la voie de ERK avec PD98059 ou l'inhibition de la voie AKT avec le wortmannin ou le LY294002 ont nettement atténué, bien que jamais entièrement renversée, l'action anti-apoptotique de l'ADN-CpG. Cependant, la combinaison de PD98059 avec le wortmannin ou le LY294002 n'a pas produit une inhibition additive,

témoignant qu'ERK1/2 et AKT travaillent de concert à retarder l'apoptose des neutrophiles. Des évidences indiquent que ni ERK ni AKT n'interfèrent avec la signalisation de la p38 MAPK. L'apoptose spontanée des neutrophiles est associée à la phosphorylation de p38 MAPK (Khreiss et al, 2002; Frasch et al, 1998) et l'activation de la caspase-3. Réciproquement, l'inhibiteur spécifique SB203580 de p38 MAPK peut partiellement renverser l'apoptose des neutrophiles (Khreiss et al, 2002; Frasch et al, 1998). L'inactivation transitoire de p38 MAPK a été suggérée pour contribuer à la phase initiale de l'apoptose des neutrophiles induit par Fas (Alvarado-Kristensson et al, 2002). Cependant, il est peu probable que p38 MAPK représente un signal de survie dans nos conditions expérimentales, parce que le SB203580 lui-même supprime l'apoptose et les actions inhibitrices de l'apoptose de SB203580 et de l'ADN-CpG ne sont pas additives.

Nos résultats indiquent que les voies ERK et AKT convergent sur BAD, un membre de la famille Bcl-2. ERK, ainsi qu'AKT, peuvent phosphoryler BAD (Yang et al, 1995; Scheid et al, 1999). Nous avons observé la phosphorylation ADN-CpG-induite de BAD sur la Ser112 et la Ser136 suite à l'activation d'ERK et d'AKT, respectivement. Le fait que PD98059 ne bloque pas la phosphorylation de BAD AKT-dépendante, tandis que le wortmannin n'affecte pas la phosphorylation de BAD ERK-dépendante, argumente contre une interdépendance de ces deux voies. Le BAD phosphorylé est séquestré de Mcl-1 (et probablement aussi d'A1), augmentant de ce fait les effets anti-apoptotiques des protéines de la famille Bcl-2. Entre autres, ces protéines pourraient empêcher la transition du potentiel de la membrane mitochondriale, et par conséquent la perte de $\Delta\Psi_m$ qui se produit dans les cellules

irréversiblement induites vers la mort cellulaire programmée (Zamzami et al, 1995; Kroemer, 1997; Reed, 1997). Des évidences récentes indiquent que les neutrophiles matures contiennent un nombre plus important que prévue de mitochondries (Maianski et al, 2002). Dans cette étude, nous avons démontré que l'ADN-CpG peut partiellement empêcher la diminution du $\Delta\Psi_m$ et la libération subséquente du cytochrome c qui se produisent durant l'apoptose spontanée des neutrophiles. D'ailleurs, le degré de réduction de l'apoptose des neutrophiles et de l'inhibition de la perturbation de la membrane mitochondriale par l'ADN-CpG était semblable. La conservation du $\Delta\Psi_m$ et l'atténuation de la libération du cytochrome c par l'ADN-CpG sont conformes avec la diminution de l'activation de la caspase-3 détectée dans cette étude. Les résultats des expériences utilisant l'inhibiteur Z-VAD-FMK et l'ADN-CpG confirment l'importance de l'inhibition de l'activation de la caspase-3 par l'ADN-CpG. Ces observations indiquent qu'un mécanisme important par lequel l'ADN-CpG inhibe la machinerie intrinsèque pro-apoptotique des neutrophiles est via la prévention ERK- et AKT-dépendant de la dérégulation mitochondriale et la répression de l'activité de la caspase-3 (figure 1).

L'inhibition incomplète de l'action anti-apoptotique de l'ADN-CpG par la combinaison de PD98059 avec le wortmannin ou le LY294002, suggère l'implication de mécanismes additionnels à celle de l'inactivation de BAD par les voies de signalisation ERK et AKT. L'existence de mécanismes additionnels tels que l'induction de l'expression ou l'augmentation de la stabilité de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 ont également été rapportés à contribuer à l'inhibition de

l'apoptose spontanée des neutrophiles (Francois et al, 2005; Bouchard et al, 2004). Si ces mécanismes contribuent aux actions de l'ADN-CpG demeure encore à être étudié.

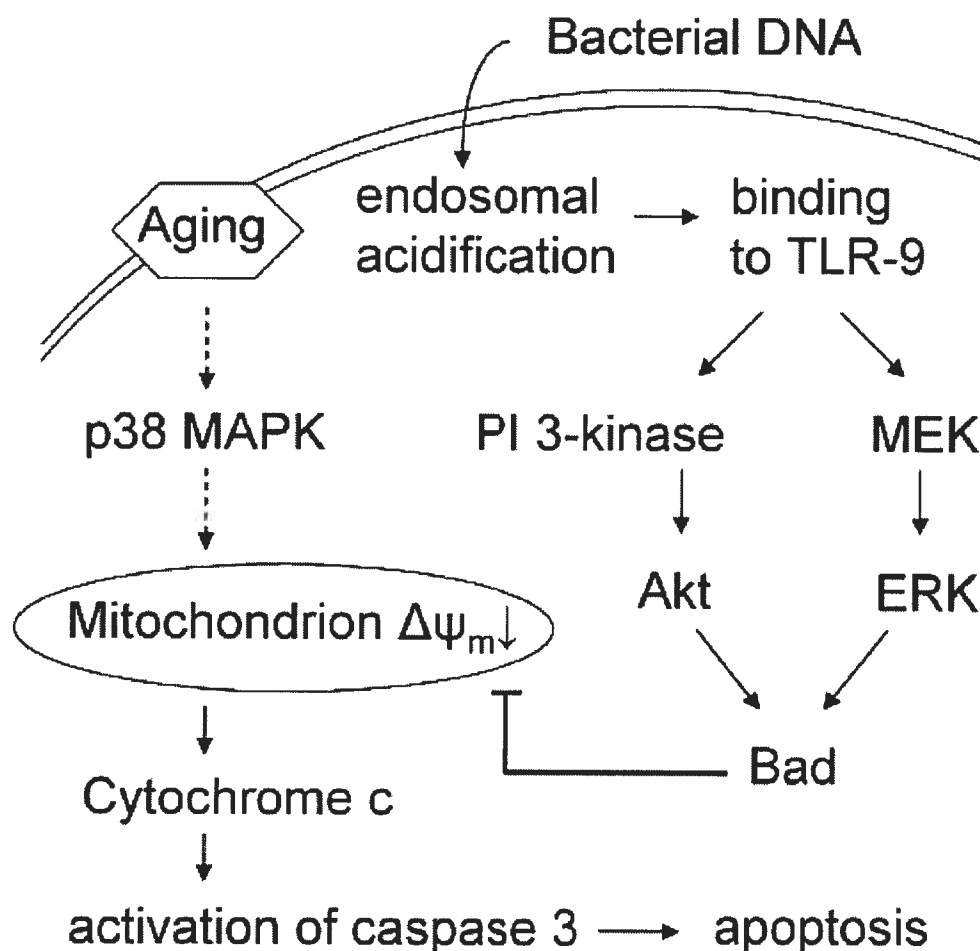


Figure 1. Mécanisme proposé pour l'action anti-apoptotique de l'ADN bactérien dans les neutrophiles humains. Voir le texte pour les détails. Tirée de Jozsef et al, 2004.

En résumé, nos résultats démontrent que les motifs CpG non-méthylés de l'ADN bactérien favorisent la survie des neutrophiles en supprimant la machinerie apoptotique. Cette action est engendrée, en partie, par la stimulation concourante des voies de signalisation ERK et AKT, menant à la prévention de la dérégulation

mitochondriale et l'inhibition de l'activation de la caspase-3. L'action anti-apoptotique de l'ADN-CpG sur les neutrophiles peut être observée *in vitro* et *ex vivo*, et peut donc contribuer à la prolongation et l'amplification de la réponse inflammatoire.

Nous avons également découvert qu'un nouveau mécanisme par lequel l'ADN bactérien, et les motifs CpG non-méthylés en particulier, peut affecter les réponses des neutrophiles et le processus inflammatoire est par l'induction de la formation d'ONOO⁻. Ceci est associé à une accumulation nucléaire de NF- κ B et l'induction de la production d'IL-8. Puisque des études récentes révèlent un rôle de plus en plus considérable de l'IL-8 dans le trafic des leucocytes, en particulier des neutrophiles, vers les régions enflammées, nos observations portent directement sur les mécanismes impliqués dans les actions pro-inflammatoires de l'ADN bactérien.

Parmi les cytokines mesurées à partir de neutrophiles stimulés par l'ADN-CpG, l'IL-8 est la plus abondante. En comparaison, l'ADN-CpG induit une sécrétion modeste d'IL-6 et une faible production de TNF- α . Dans le sang total, l'ADN-CpG a provoqué la sécrétion d'IL-8, et à un plus faible degré, l'IL-6 et le TNF- α , indiquant que les leucocytes autres que des neutrophiles répondent également à l'ADN-CpG quant à la production de cytokines. La comparaison des niveaux d'IL-8 dans le plasma et dans le milieu de culture indique qu'approximativement 70% de l'IL-8 sécrétée dans le sang total originait des neutrophiles. Une polémique existe sur la capacité des neutrophiles à produire de l'IL-6. Nous avons constaté que dans les préparations de haute pureté (>99%) les neutrophiles libèrent considérablement moins, mais en quantités discernables, d'IL-6 que les préparations standards de neutrophiles (pureté ~95%), tandis que la sécrétion d'IL-8 a seulement été légèrement

affecté par l'élimination des cellules mononucléaires, confirmant la capacité des neutrophiles de produire d'IL-8. De plus, la suppression de la sécrétion d'IL-8 par l'inhibiteur non-sélectif des synthèses du NO, le L-NAME, mais pas celle d'IL-6, suggère l'existence de différents mécanismes de signalisation pour la production de cytokines. Nos résultats démontrent que l'ADN-CpG est un activateur efficace des principales réponses des leucocytes responsables de l'amplification de la réponse inflammatoire, dans le sang entier et dans un milieu de culture biologiquement approprié. Ainsi, nos résultats appuient les résultats obtenus auparavant avec des cellules épithéliales intestinales (Ahtar et al, 2003) et des neutrophiles (Hayashi et al, 2003), et confirment la capacité de l'ADN-CpG à réguler la production d'IL-8 et d'autres cytokines pro-inflammatoires. En revanche, il a été démontré que les neutrophiles humains synthétisent de l'IL-8 en réponse à un oligonucléotide-CpG de classe A (GGTGCATCGATGCAGGGGGG), mais seulement lorsque traité préalablement avec le GM-CSF (Hayashi et al, 2003). Bien que les actions biologiques de cet oligonucléotide n'aient pas été entièrement caractérisées, les oligonucléotides-CpG courts sont habituellement des immunostimulateurs moins efficaces que l'ADN de *E. coli* (Krieg, 2002; Roberts et al, 2005).

Il n'est pas clair pourquoi l'ADN-CpG favorise sélectivement la synthèse de l'IL-8 dans les neutrophiles, bien que les neutrophiles ont un profil limité de synthèse de protéines (Häcker et al, 2002). Une possibilité est que l'ADN-CpG active préférentiellement les voies de signalisation intracellulaires exigées pour la synthèse d'IL-8. En effet, l'expression du gène et la production d'IL-8 induit par l'ADN-CpG ont été nettement inhibés par le L-NAME, indiquant un mécanisme dépendant de NO.

Quoique la formation de NO soit un préalable à l'induction de la libération de l'IL-8, NO, par elle-même, n'évoque qu'une sécrétion très modeste d'IL-8 des leucocytes humains (Filep et al, 1998). En revanche, l'ONOO⁻ formé par la réaction de NO avec le superoxyde est un inducteur efficace de l'expression de l'IL-8, et canalise l'expression d'IL-8 induite par le LPS, IL-1 β et le TNF- α (Filep et al, 1998; Zouki et al, 2001; Matata et Galinanes, 2002). Nos résultats actuels démontrent que l'ADN-CpG active également cette voie. En effet, l'ADN-CpG évoque la formation simultanée du superoxyde et du NO, tel que observé par la fluorescence du dihydroéthidium et de la diamino fluorescein, respectivement. Nous avons détecté une fluorescence du dihydroéthidium dans les neutrophiles non stimulés. Cependant, cette fluorescence n'était pas due au superoxyde, puisque le dihydroéthidium subit une oxydation significative dans les leucocytes au repos, probablement due au désaccouplement de la phosphorylation oxydante mitochondriale (Jack et Fearon, 1988). Les neutrophiles au repos ne libèrent pas de quantités discernables de superoxyde tel que mesurées par la réduction du ferrocyclochrome C (József et al, 2002). Notre analyse de RT-PCR pointe vers l'eNOS comme source de production de NO en réponse à l'ADN-CpG, car seule les produits eNOS-spécifiques ont été amplifiés dans les neutrophiles témoins et traités avec l'ADN-CpG. L'augmentation de la production de NO était probablement due à l'activation de eNOS puisque l'ADN-CpG n'a pas semblé augmenter l'ARNm d'eNOS. Ces observations sont conformes avec des résultats précédents (Rothe et al, 1990), bien que d'autres n'aient pas détecté l'ARNm d'eNOS dans les neutrophiles humains (Schmidt et al, 1989). La raison de cette différence apparente n'est pas connue, mais elle pourrait être

attribuable à la quantité de cellules contaminantes ou peut refléter des différences dans les analyses employées pour détecter l'eNOS. Nous n'avons pu détecter l'ARNm d'iNOS dans les neutrophiles stimulés avec l'ADN-CpG jusqu'à 4h. Tandis que des neutrophiles positifs pour le iNOS ont été démontrés dans les échantillons de tissu et d'exsudats (Wheeler et al, 1997), *in vitro*, il faut au moins 16h d'exposition des neutrophiles humains au LPS ou cytokines pour l'expression d'iNOS (Wallerath et al, 1997). Si l'ADN-CpG est capable d'induire l'expression d'iNOS dans les neutrophiles après des périodes d'incubation prolongées demeure à être étudié.

En parallèle avec les augmentations de la production de NO et du superoxyde, l'ADN-CpG a également augmenté la formation d'ONOO⁻. Nous avons observé la formation intracellulaire d'ONOO⁻ via l'oxydation NO-dépendante du DHR123 en rhodamine et par la nitration des résidus de tyrosine dans les protéines, et avons obtenu des résultats conformes avec ces deux analyses. Une partie significative de la fluorescence de la rhodamine dans les leucocytes stimulés par l'ADN-CpG peut être attribuée au ONOO⁻, car elle dépend d'une espèce NO-connexes, puisqu'il peut être inhibé par le L-NAME, tandis que le NO n'oxyde pas le DHR123 (Kooy et al, 1994). De plus, la spermine NONOate, un donneur de NO, peut reconstituer l'oxydation du DHR123 dans les neutrophiles traités avec le L-NAME, indiquant que l'effet du L-NAME dans l'analyse DHR123 n'était pas dû à l'inhibition de l'assemblage de la NADPH oxydase. Les réactions de nitration ont été attribuées à l'interaction de NO avec le superoxyde à une constante de vitesse de $10 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à pH 7,4 pour former le ONOO⁻ (Kissner et al, 1998). Le rendement de nitration peut être augmenté par l'intermédiaire de la formation de l'anion de nitrosoperoxy carbonate à partir de

concentrations physiologiques de CO₂ et du bicarbonate, augmentant de ce fait la réactivité du ONOO⁻ (Evans et al, 1996). Bien que la formation de nitrotyrosine soit considérée comme "empreinte spécifique" d'ONOO⁻ (Beckman et Koppenol, 1996), la nitration myeloperoxydase dépendante de tyrosine a été également rapportée (Eiserich et al, 1998), indiquant que le nitrotyrosine peut plutôt servir d'indicateur d'espèce réactive d'azote. Curieusement, dans les neutrophiles humains, l'ONOO⁻ semble être le mécanisme prédominant pour la nitration de tyrosine (Galinas et Matata, 2002). Bien qu'une polémique existe à savoir si le ONOO⁻ est capable de la nitration de tyrosine à pH physiologique (Reiter et al, 2000), nos résultats précédents avec l'ONOO⁻ exogène indiquent clairement l'existence d'une telle réaction dans les neutrophiles humains (József et al, 2002). Ces réactions représentent des voies importantes par lesquelles l'ADN-CpG peut moduler la chimie oxydante de NO, du superoxyde et du ONOO⁻.

Le gène *IL-8* contient les éléments régulateurs pour NF- κ B, AP-1 et NF-IL-6 (Reiter et al, 2000). De ces facteurs de transcription, NF- κ B joue un rôle principal dans l'induction de l'expression d'*IL-8* (Mukaida et al, 1994). En conséquence, nous avons constaté que l'ADN-CpG stimule l'accumulation nucléaire de NF- κ B, la liaison de l'ADN par NF- κ B/p65 et l'induction de la transcription du gène *IL-8*. Dans les neutrophiles humains, la forme dominante de NF- κ B induite par l'ADN-CpG semble être l'hétérodimère p50/p65, fidèle aux résultats dans les macrophages murins, mais pas les cellules B où l'ADN-CpG active l'hétérodimère p50/c-Rel (Krieg, 2002). La faible activité de liaison à l'ADN de NF- κ B/p65 détectées dans les noyaux des neutrophiles non stimulés (József et al, 2002; Mukaida et al, 1990; et la présente

étude) contribue probablement à l'expression constitutive des gènes κ B-dépendants. Le PDTC ou le gliotoxin bloquent fortement l'accumulation nucléaire de NF- κ B/p65 et inhibent à ~75% la sécrétion d'IL-8. Nous avons également observé, en réponse à l'ADN-CpG, une accumulation nucléaire de c-Fos, un résultat conforme au rôle d'AP-1 dans le perfectionnement de l'expression du gène IL-8 (Reiter et al, 2000). Cependant, les neutrophiles humains expriment c-Jun à un niveau très bas et plusieurs agonistes des neutrophiles n'évoquent pas une expression de c-Jun (Cloutier et al, 2003). Il reste à déterminer si l'ADN-CpG peut induire l'expression de c-Jun ou si le c-Fos induit par l'ADN-CpG et les faibles niveaux de c-Jun pourraient former AP-1 à des quantités suffisantes pour régler la transcription du gène *IL-8*. Le mécanisme par lequel l'ONOO⁻ augmente la liaison nucléaire de NF- κ B n'est pas entièrement compris. La corrélation positive de la phosphorylation et la nitration des résidus de tyrosine dans I κ B-a avec la translocation de NF- κ B (Matata et Galinanes, 2002) suggérerait que l'ADN-CpG en augmentant la formation d'ONOO⁻ pourrait avoir induit la nitration d'I κ B-a. Récemment, il a été rapporté que l'ADN bactérien induit la production de l'IL-8 à partir des cellules épithéliales indépendamment de la voie NF- κ B (Ahtar et al, 2003). Ainsi, le mécanisme d'induction de l'expression d'IL-8 par l'ADN-CpG peut également être spécifique aux cellules.

En résumé, nous avons démontré que l'ADN bactérien induit la formation d'ONOO⁻, menant à l'accumulation nucléaire de NF- κ B et d'AP-1 et l'induction de l'expression de l'ARNm et de la protéine IL-8 chez les neutrophiles humains (figure 2).

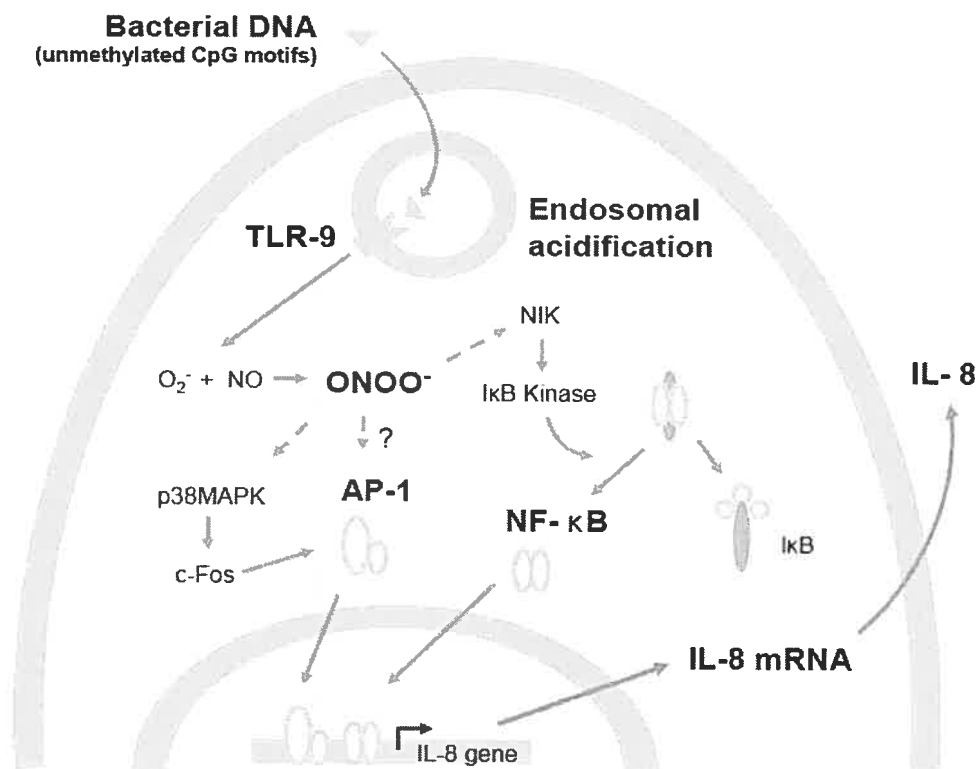


Figure 2. Mécanisme proposé pour l'induction de la signalisation ONOO⁻-dépendante menant à l'expression de l'IL-8 en réponse à l'ADN bactérien chez les neutrophiles humains. Voir le texte pour les détails.

Ces observations soulèvent la possibilité que l'inhibition de la formation et/ou des actions d'ONOO⁻ pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique à l'atténuation de la production IL-8 induit par des composantes bactériennes et par conséquent du recrutement/activation des neutrophiles aux sites inflammatoires.

En effet, un nouveau mécanisme par lequel les sélénoprotéines peuvent affecter la réponse inflammatoire est via l'atténuation de la signalisation du ONOO⁻ qui médie l'accumulation nucléaire des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 et l'expression du gène et la production d'IL-8 dans les leucocytes humains. Puisque des études récentes révèle un rôle de plus en plus considérable de l'IL-8 dans le trafic des

leucocytes vers les régions enflammées, nos observations portent directement sur les mécanismes impliqués dans les actions anti-inflammatoires des sélénoprotéines.

Le sélénium est un élément biologique essentiel dans les mammifères et est incorporé aux sélénoprotéines le plus fréquemment sous forme de sélénocystéine, qui est codé dans l'ARNm par le codon UGA (Berry et al, 1991). Les sélénoprotéines de mammifères tels que la peroxydase de glutathion effectuent une variété de fonctions catalytiques, dont beaucoup sont les réactions redox (Flohé, 1989). Évidemment, la peroxydase de glutathion et d'autres protéines contenant du sélénium fonctionnent probablement comme réductases d'ONOO⁻ (Briviba et al, 1996; Masumoto and Sies, 1996; Sies et al, 1997). En effet, l'ebeselen, la sélénométhionine, et la sélénocystéine protègent contre les coupures simple brin de l'ADN de plasmide induits par l'ONOO⁻ (Roussyn et al, 1996) et contre les réactions d'oxydation et de nitration du ONOO⁻ (Briviba et al, 1996; Sies et al, 1997).

Ici nous avons démontré que l'incubation des échantillons de sang total humain avec l'ebeselen, la sélénométhionine, ou la sélénocystéine a eu comme conséquence une réduction marquée de l'expression du gène et la production d'IL-8 des leucocytes humains, induits par l'ONOO⁻ exogène ou par le LPS, via l'inhibition de l'activation de NF- κ B et d'AP-1. Ces résultats démontrent la capacité des sélénoéoprotéines à réguler la production de cytokines pro-inflammatoires dans les leucocytes du sang total, un milieu qui est biologiquement approprié. Cependant, l'action inhibitrice des composés contenant du sélénium n'exige pas la présence des éléments du sang, parce qu'ils empêchent 90-95% de la sécrétion de l'IL-8 induite par l'ONOO⁻ dans les neutrophiles isolés. De plus, ces molécules contenant du sélénium

maintiennent leur bioactivité pour au moins 24 h après leur addition aux échantillons de sang, tel que démontré par la réduction marquée de la sécrétion d'IL-8 post-ONOO⁻ ou post-LPS, sans affecter la viabilité des leucocytes. Ainsi, nos résultats confirment et renforcent les résultats précédents sur l'élimination du ONOO⁻ par les sélénoprotéines (Briviba et al, 1996; Sies et al, 1997) et démontrent la capacité de l'ebesen, de la sélénométhionine, et la sélénocystéine à interférer avec la signalisation du ONOO⁻ indépendamment du fait que cela origine du ONOO⁻ ajouté aux échantillons ou du ONOO⁻ produit intracellulairement sur une plus longue période en réponse au LPS (voir ci-dessous). Les légères différences dans le pouvoir inhibiteur des composés contenant du sélénium reflètent très probablement les différences dans les paramètres physico-chimiques tels que les interactions hydrophobes.

Dans notre étude, le degré maximum d'inhibition a été réalisé avec les sélénoprotéines à une concentration (100µM) considérablement plus haut que les niveaux physiologiques. La sélénométhionine est distribuée aléatoirement dans le pool de méthionine, tandis que la sélénocystéine est présente à des quantités stochiométriques dans les sélénoprotéines (Hondal et al, 1999). Quelques sélénoprotéines peuvent s'accumuler sur la surface des cellules (par exemple, la liaison des sélénoprotéine P aux cellules endothéliales (Arteel et al, 1998)), suggérant que leurs concentrations locales pourraient être sensiblement plus élevées que celles détectées dans le plasma. En outre, à des concentrations pharmacologiques, les petits composés d'organosélénium, comme l'ebesen, sont des candidats attrayants comme agents thérapeutiques pour augmenter la défense contre l'ONOO⁻.

En plus de l'élimination du ONOO^- exogène (ajouté aux échantillons), les sélénoprotéines, aux mêmes concentrations, ont également inhibé de façon importante la production d'IL-8 induite par le LPS. Le LPS bactérien est un des stimuli le plus efficace pour l'expression d'IL-8 dans la plupart des types cellulaires, y compris les leucocytes humains (DeForge et al, 1992). Évidemment cette action de LPS est principalement négociée via la formation accrue d' ONOO^- dans les leucocytes humains (Filep et al, 1998; Zouki et al, 2001; József et al, 2002). Les résultats actuels suggèrent que l'inhibition de l'expression d'IL-8 induite par le LPS par l'ebsele, la sélénométhionine, et la sélénocystéine sont reliés, au moins en partie, à l'atténuation de la formation intracellulaire du ONOO^- , détectée par l'oxydation NO-dépendante du DHR123 en rhodamine (Filep et al, 1998; József et al, 2002; Tarpey et Fridovich, 2001).

Tel que mentionné auparavant, une partie significative de la fluorescence de la rhodamine dans les leucocytes stimulés au LPS peut être attribuée à l' ONOO^- parce qu'elle dépend d'une espèce NO-connexes, c.-à-d., elle peut être inhibée par le L-NAME. Le fait que l'inhibition de l'oxydation du DHR123 par les sélénoprotéines et le L-NAME ne soit pas additive suggère que ces composés inhibent la même réaction, à savoir, l'oxydation ONOO^- dépendante.

De façon conforme aux rapports précédents, nous avons détecté, par cytométrie en flux une accumulation nucléaire de NF- κ B et d'AP-1 en réponse à l' ONOO^- et au LPS dans les neutrophiles et les leucocytes mononucléaires (Zouki et al, 2001a; Matata et Galinanes, 2002; József et al, 2002). Tandis que cette analyse permet la détection simultanée des facteurs de transcription nucléaires dans les

neutrophiles et les leucocytes mononucléaires sans isolement antérieur de ces cellules, les noyaux des monocytes et des lymphocytes ne peuvent pas être distingués. Par conséquent, les quantités de facteurs de transcription relatifs dans les neutrophiles et les monocytes ne peuvent pas être comparées. De plus, en accord avec les études précédentes (Zouki et al, 2001a; József et al, 2002; McDonald et al, 1997; Griffin et al, 1990), nous avons détecté NF- κ B/p65 et c-Fos dans les noyaux de PMN et de cellules mononucléaires non stimulées, et ce n'était pas attribuable à la contamination cytosolique des noyaux.

Bien que la signification de ces observations soit peu claires, il a été proposé que la présence de NF- κ B dans le noyau des cellules non stimulées contribue à l'expression constitutive des gènes κ B-dépendants. Curieusement, l'ebesen, la sélénométhionine, et la sélénocystéine n'ont pas affecté la présence nucléaire de NF- κ B dans les cellules non stimulées, indiquant l'existence d'un mécanisme distinct de celui induisant la translocation de NF- κ B après stimulation des cellules. Nos résultats ont démontré que l'accumulation nucléaire, induit par l'ONOO⁻, de NF- κ B et d'AP-1 peut être inhibée à un degré similaire par l'ebesen, la sélénométhionine, et la sélénocystéine, quoique la contribution relative de ces facteurs de transcription à l'induction de l'expression du gène IL-8 ne peut pas être déduite de la présente étude. Puisque la nitration des résidus de tyrosine dans I κ Ba corrèle avec la translocation de NF- κ B dans les monocytes (Matata et Galinanes, 2002), il est possible que les composés de sélénium pourraient avoir inhibé l'activation d'I κ Ba induit par le ONOO⁻, menant à la diminution de l'accumulation nucléaire de NF- κ B. Aussi, la supplémentation de sélénite a augmenté l'activité de la peroxydase de glutathion et a

renversé l'activation de NF- κ B par le TNF- α dans les cellules A549 épithéliales humaines (Jeong et al, 2002). D'autre part, l'albumine ou l'immunoglobuline G enrichie en sélénométhionine préparée à partir du plasma de volontaires humains suite à 28 jours de supplémentation diététique en sélénométhionine n'offre aucune protection contre l'ONOO⁻ (Hondal et al, 1999). Les raisons de cette polémique apparente ne sont pas tout à fait évidentes. Il est possible que *in vivo* le pouvoir de réductase d'ONOO⁻ des protéines contenant de la sélénométhionine diffère de celui des protéines contenant de la sélénocystéine, telles que la peroxydase de glutathion (Sies et al, 1997) et la sélénoprotéine P (Arteel et al, 1998), en dépit du pouvoir d'élimination du ONOO⁻ semblable de la sélénométhionine et de la sélénocystéine *in vitro* (Briviba et al, 1996 et la présente étude). Les fonctions biologiques de plusieurs de sélénoprotéines présentes *in vivo* sont toujours inconnu, et leur sélectivité envers l'inhibition de la production d'IL-8 reste à étudier.

Etant donné le rôle critique de NF- κ B dans la régulation de l'expression d'un éventail de cytokines, de molécules d'adhésion, et d'enzymes pro-inflammatoires, l'inhibition de NF- κ B a été proposée en tant qu'une approche prometteuse pour réduire les réponses inflammatoires (Lewis et Manning, 1998; Yamamoto et Gaynor, 2001) et pourrait contribuer aux actions anti-inflammatoires de l'aspirine et d'autres salicylates (Kopp et Gosh, 1994; Bayon et al, 1999; Pierce et al, 1996). Il est à noter que l'inhibition de la signalisation du ONOO⁻ par l'ebesen, la sélénométhionine, et la sélénocystéine ressemble à l'action inhibitrice des lipoxines A₄ natives et induites par l'aspirine sur la production d'IL-8 par les leucocytes humains (József et al, 2002). Cependant, à la différence des sélénoprotéines, les lipoxines suppriment la formation

du ONOO⁻ en empêchant la formation de superoxyde (József et al, 2002) et en augmentant la formation et/ou le biodisponibilité du NO (Jozsef et al, 2002; Paul-Clark et al 2004; Filep et al, 2005). La formation diminuée du ONOO⁻ est également conforme avec la cytotoxicité réduite et l'atténuation de la signalisation du ONOO⁻ (Zouki et al, 2001a; Zouki et al, 2001b; Matata et Galinanes, 2002). Clairement, d'autres études sont nécessaires pour identifier les molécules dont l'expression ou la production peut être altérée par les composés contenant du sélénium.

Ces expériences nous permettent d'imaginer un nouveau mécanisme pour les effets anti-inflammatoires des sélénoprotéines: l'ebsele, la sélénométhionine, et la sélénocystéine atténuent l'expression du gène et la production d'IL-8 dans les leucocytes humains en empêchant l'activation de NF-κB et d'AP-1 induit par l'ONOO⁻ (figure 3).

Les observations présentées dans cette thèse sont des additions importantes au profil de bioactivité de l'ADN bactérien et suggèrent que les séquences CpG nonméthylés pourraient fonctionner en tant que signaux d'initiation, de maintien et d'amplification de la réponse inflammatoire médiée par les neutrophiles.

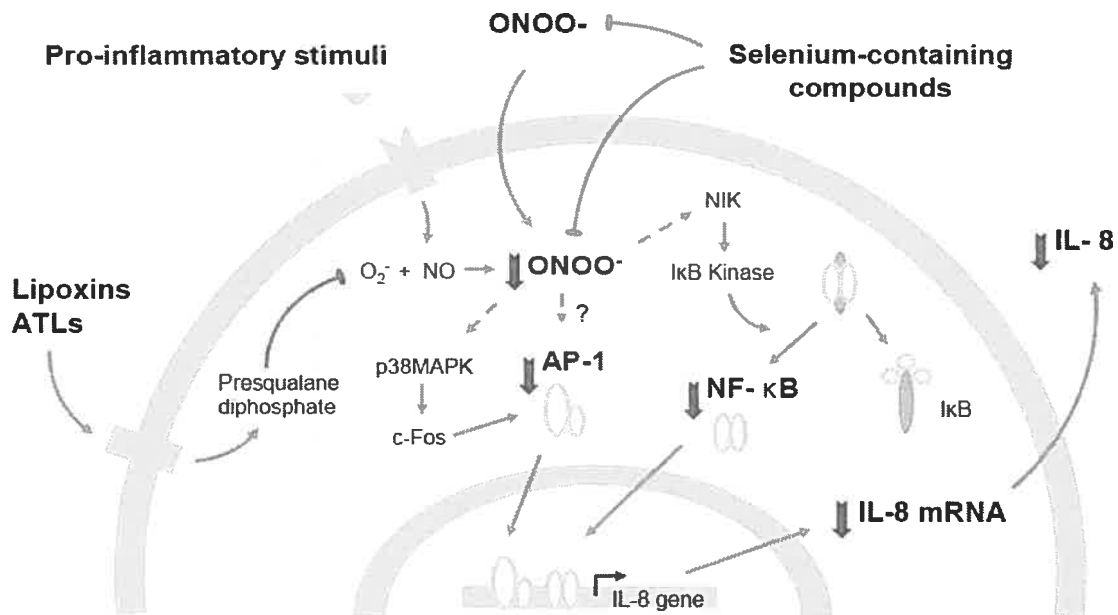


Figure 3. Représentation schématique de l'inhibition de la signalisation de l' $ONOO^-$ dans les neutrophiles humains. Les stimuli pro-inflammatoires augmentent la production intracellulaire du superoxyde et du NO, menant à la formation d' $ONOO^-$. L' $ONOO^-$ exogène peut également diffuser à l'intérieur des neutrophiles et activer NF- κ B et AP-1. La translocation nucléaire de NF- κ B et d'AP-1 induit l'expression du gène IL-8 et la sécrétion de la protéine. Les composés contenant du sélénium et les ATL/LXA₄ inhibent efficacement cette voie par l'élimination directe de l' $ONOO^-$ exogène et endogène ou en empêchant sa formation via l'inhibition de la production du superoxyde, respectivement. À la différence des composés contenant du sélénium, les ATL/LXA₄ n'offrent aucune protection contre l' $ONOO^-$ exogène. Les flèches cassées indiquent des mécanismes non identifiés.

La pertinence de ces résultats est évidente pour de multiples maladies inflammatoires. Si l'ADN bactérien est proinflammatoire comme indiqué par les résultats actuels et précédents (Schwartz et al, 1997) alors détruire simplement les bactéries peut être insuffisant pour supprimer entièrement la réponse inflammatoire. En effet, l'ADN des bactéries mortes serait encore présent, même lorsque les bactéries ne peuvent pas être détectées par des techniques microbiologiques standard, et pourraient, parmi d'autres actions, activer les neutrophiles, prolonger leur survie en retardant l'apoptose spontanée et favoriser, par l'induction de la production d'IL-8, la

mobilisation des leucocytes. Par conséquent, l'ADN bactérien peut déclencher et/ou maintenir et même amplifier la réponse inflammatoire. Cette possibilité est soutenue par la détection de l'ADN bactérien dans les conditions pathologiques, tels que l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde et d'autres arthrites, la pancréatite aiguë, la maladie de Crohn et la cirrhose (Frances et al, 2005; de Madaria et al, 2005; Ryan et al, 2004; Coutinho et al, 2000; van der Heijden et al, 2000) qui sont également associées à un stress nitrosatif et à l'activation et/ou l'accumulation des neutrophiles (Schwartz et al, 1997; Lehtiniemi et al, 2005; Balint et al, 2001; Kooy et al, 1997; Shishehbor et al, 2003). Une étude récente a démontré que l'ADN bactérien contribue de manière significative à la perpétuation de l'inflammation intestinale chronique (Obermeier et al, 2005). De plus, l'ADN-CpG peut agir en synergie avec le LPS, par exemple, dans l'induction de la sécrétion de l'interféron- γ (Cowdery et al, 1996) ou du NO (Gao et al, 1999), ainsi que pour augmenter la toxicité du LPS (Cowdery et al, 1996).

Nos résultats suggèrent également que les composés contenant du sélénium comme l'ebesen pourraient offrir des possibilités thérapeutiques intéressantes pour contrer la signalisation de l'ONOO⁻ et ainsi atténuer la réponse inflammatoire et limiter les dommages reliés à celle-ci.

Basé sur ces données, nous proposons le modèle illustré à la figure 4. Des stimuli pro-inflammatoires tels que le l'ADN bactérien, ou d'autres composantes des bactéries reconnus par les cellules du système immunitaire innée, induisent la formation de ONOO⁻ et l'induction subséquente de la production d'IL-8 dans les neutrophiles humains. L'IL-8 sécrété promeut le recrutement additionnel de

neutrophiles qui s'accumulent dans le tissu enflammé. Les composantes bactériennes peuvent également activer les neutrophiles et prolonger leur survie, leur permettant ainsi de combattre effectivement et éliminer les pathogènes envahissants. Cependant, une activation excessive et/ou prolongée des neutrophiles peut être néfaste pour l'hôte et engendrer des conditions pathologiques. Les composés contenant du sélénium tel que l'ebesen ou encore les lipoxines peuvent contrer la signalisation de l'ONOO⁻. Ces observations soulèvent la possibilité que l'utilisation de ces agents pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique pour atténuer la production d'IL-8 induit par des stimuli pro-inflammatoires, réduisant ainsi le recrutement et l'activation des leucocytes au site de l'inflammation. Cette intervention serait bénéfique pour traiter les maladies inflammatoires associées à un dommage tissulaire médié par les neutrophiles, tel que le sepsis, le syndrome détresse respiratoire aigu, la fibrose cystique, les dommages coronaires aigus, les syndromes d'ischémie-réperfusion, les désordres inflammatoires de l'intestin et l'arthrite rhumatoïde ou la survie prolongé des neutrophiles, la production d'IL-8 et la présence d'ADN bactérien sont des facteurs importants.

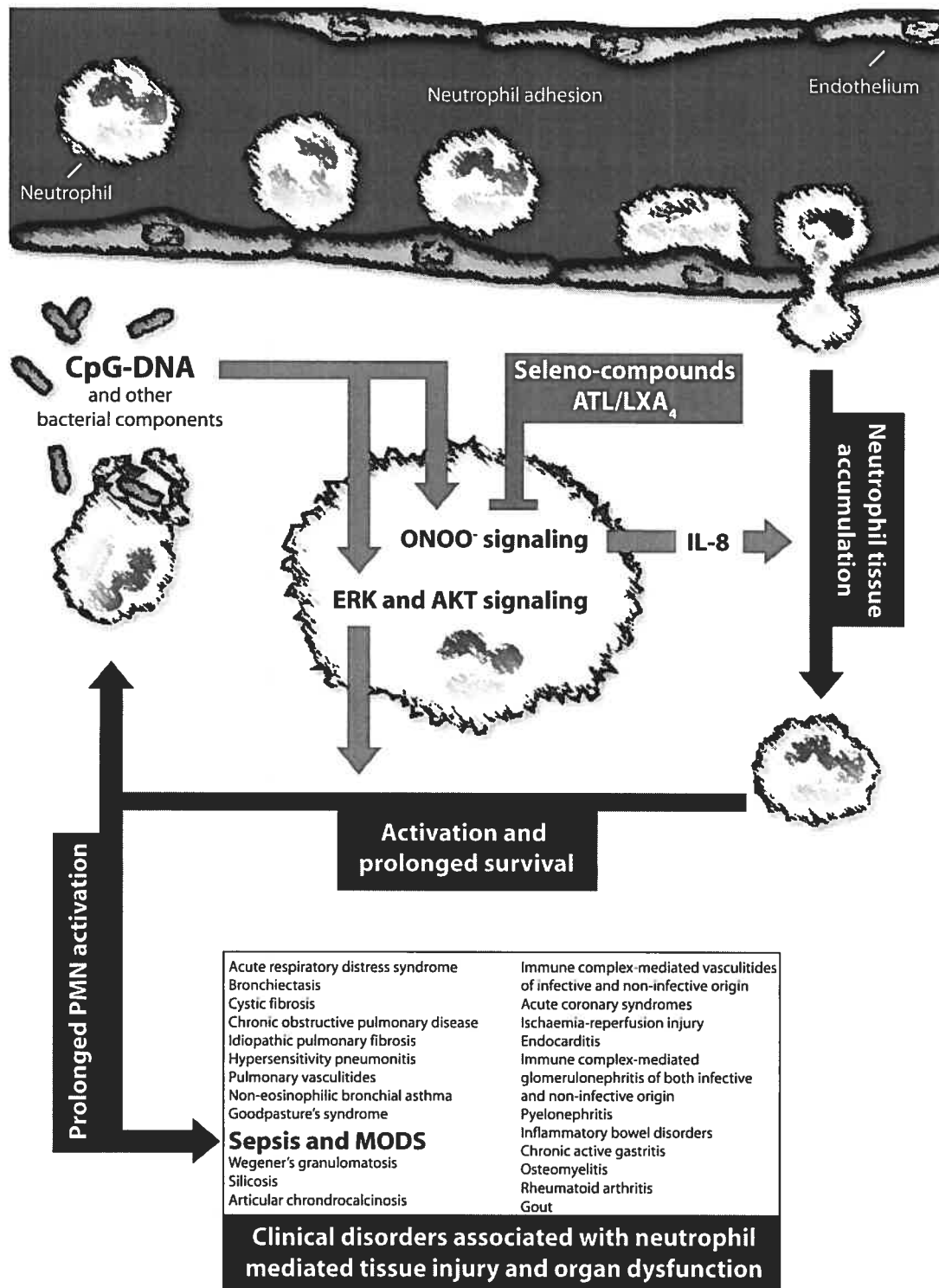


Figure 4 : Liens proposés entre l'ADN bactérien, les neutrophiles et les maladies inflammatoires. La présence persistante de l'ADN-CpG alimente et amplifie une réponse inflammatoire qui mène au développement de multiples conditions pathologiques. L'ONOO⁻ peut également activer la voie de signalisation ERK de façon directe. ATL, 15-*epi*-lipoxine A₄ induit par l'aspirine. Voir le texte pour les détails.

V. CONCLUSIONS

Ces études dévoilent que l'ADN bactérien, et les motifs CpG non-méthylés en particulier, peuvent moduler la durée et l'amplitude de la réponse inflammatoire. L'ADN-CpG prolonge la survie des neutrophiles en retardant l'apoptose spontanée et induit la sécrétion de l'IL-8, un régulateur clé du trafic des neutrophiles au site enflammé. Nos observations indiquent également que cibler la signalisation de l'ONOO⁻ est d'intérêt thérapeutique pour atténuer l'inflammation.

- 1) Les neutrophiles humains expriment le récepteur pour l'ADN-CpG, le TLR9.

La signalisation intracellulaire est initiée exclusivement par l'ADN bactérien contenant des motifs CpG non-méthylés et requiert une maturation endosomale de l'ADN-CpG bactérien. La méthylation des cytosines de l'ADN bactérien supprime complètement ses activités et l'ADN de thymus de veau ne reproduit pas les effets de l'ADN bactérien.

- 2) L'ADN-CpG induit la stimulation concourante des voies de signalisation d'ERK et d'AKT, menant à la phosphorylation de BAD sur les résidus Ser112 et Ser136, respectivement, à la prévention de la dérégulation mitochondrial et de la libération du cytochrome c et, par conséquent, à l'inhibition de l'activation de la caspase-3. On peut observer cette action inhibitrice de l'ADN-CpG sur l'apoptose spontanée des neutrophiles humains *in vitro* ainsi que des neutrophiles de rat *ex vivo*.

- 3) L'ADN-CpG induit l'augmentation concomitante de la production de NO et du superoxyde menant à la formation accrue d'ONOO⁻ et par conséquent l'activation des facteurs de transcriptions NF-κB et AP-1. Cette activation des

facteurs de transcription, en particulier du NF- κ B, est responsable en grande partie de l'expression du gène et la sécrétion de l'interleukine-8 chez les neutrophiles humains.

- 4) La sécrétion de l'IL-8 résulte d'une action directe de l'ADN bactérien sur les neutrophiles humains. La comparaison des niveaux d'IL-8 dans le plasma et dans le milieu de culture indique qu'approximativement 70% de l'IL-8 sécrétée dans le sang total était d'origine des neutrophiles. Également, dans les préparations de haute pureté (>99%) les neutrophiles libèrent considérablement moins d'IL-6 que les préparations standard de neutrophiles, tandis que la sécrétion d'IL-8 reste quasiment inchangée par l'épuisement des cellules mononucléaires, confirmant la capacité des neutrophiles de produire l'IL-8.
- 5) Les composés contenant du sélénium, ebselen, sélénométhionine et sélélocystéine inhibent effectivement la signalisation de l'ONOO⁻ résultant dans l'inhibition de l'accumulation nucléaire de NF- κ B et AP-1 résultant dans la diminution de l'expression du gène et la production d'IL-8.

Ainsi nos résultats indiquent que l'ADN bactérien est capable d'initier, maintenir et amplifier la réponse inflammatoire en prolongeant la survie des neutrophiles et induisant la production d'IL-8 via la signalisation ONOO⁻-dépendante. L'inhibition de l'action ou de la formation de l'ONOO⁻ pourrait représenter une cible potentielle thérapeutique pour traiter certaines pathologies reliées à l'inflammation, incluant le sepsis et ses séquelles.

VI. DIRECTIONS FUTURES

Ces études démontrent que l'ADN bactérien, contenant des motifs CpG non-méthylés, émerge tant que régulateur important des fonctions des neutrophiles. Par ces actions pro-inflammatoires sur les neutrophiles humains, l'ADN-CpG contribue au maintien et l'amplification de la réponse inflammatoire qui lorsque dérégulé et excessive mène à des dommages tissulaires liés aux neutrophiles contribuant de manière significative à la pathogénie de nombreuses maladies. Ces études confirment également que l'ONOO⁻ est un joueur important dans l'expression d'IL-8 induit par les composantes bactériennes tel que le LPS ou encore comme démontré ici, l'ADN-CpG. Bien que ces observations améliorent la compréhension des interactions des neutrophiles avec les pathogènes, plusieurs étapes du mécanisme inflammatoire restent à élucider.

Avant tout, la mise en oeuvre des expériences dans un modèle animal déficient en TLR9 aiderait à confirmer si ce dernier est effectivement responsable des actions de l'ADN-CpG chez les neutrophiles humains.

Bien qu'on ait démontré *ex vivo* que l'ADN-CpG est capable de prolonger la survie des neutrophiles, il serait intéressant d'effectuer des expériences plus poussées afin de voir si cet effet est une action directe *in vivo*.

Ultimement, il serait intéressant de mettre au point un modèle animal de choc septique et voir si l'intervention contre l'ADN-CpG ou la signalisation ONOO⁻-dépendante sous-jacentes peut avoir un impact positif sur la survie des animaux.

Egalement, il serait important de détecter spécifiquement la formation de l'ONOO⁻ et quantifier ce dernier *in vivo* afin de confirmer que c'est bien l'ONOO⁻ et non pas des composés apparentés qui serait responsable des actions associées au ONOO⁻.

De plus, il faudrait étudier quelles sont les étapes qui mènent à l'activation des facteurs de transcription suite à l'induction d'une augmentation de la production d'ONOO⁻. Il faudrait déterminer si ONOO⁻ est capable lui-même d'activer directement ces facteurs de transcription ou sinon déterminer quels sont les intermédiaires qui relie ces deux événements.

L'ONOO⁻ nitrosyle plusieurs protéines intracellulaires. L'identité et la fonction de ces protéines restent inconnues en ce moment, donc il serait intéressant de les identifier. Nous rapportons aussi que l'ONOO⁻ active NF- κ B qui est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes, incluant les cytokines, molécules d'adhésion et enzymes. De ce fait, il serait intéressant de vérifier quels gènes sont régulés par l'ONOO⁻ via ce facteur de transcription. Présentement, nous sommes en train d'étudier les voies de signalisation intracellulaires qui pourraient mener à l'activation de NF- κ B.

VII. LISTE DE PUBLICATIONS 2002-2006

1. **József L**, Khreiss T, Fournier A, Chan JS, Filep JG. (2002) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol.* 135: 1167-1174.
2. Khreiss T, **József L**, Hossain S, Chan JS, Potempa LA, Filep JG. (2002) Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J Biol Chem.* 277: 40775-40781.
3. **József L**, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. (2002) Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 13266-13271.
4. **József L**, Filep JG. (2003) Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. *Free Radic Biol Med.* 35: 1018-1027.
5. **József L**, Khreiss T, Filep JG. (2003) Nitrosative/peroxidative stress as an intracellular signalling mechanism: A role for peroxynitrite. *Recent Res Devel Biochem.* 4: 97-111. (Review)
6. Khreiss T, **József L**, Chan JSD, Filep JG. (2004) Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal.* 16: 801-810.
7. Khreiss T, **József L**, Potempa LA, Filep JG. (2004) Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation* 109: 2016-2022.
8. **József L**, Khreiss T, Filep JG. (2004) CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J.* 18: 1776-1778.
9. Khreiss T*, **József L***, Potempa LA, Filep JG. (2004) Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* 110: 2713-2720. * Co-first author.
10. Filep JG, Khreiss T, **József L**. (2005) Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in neutrophil adhesion and signal transduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73: 257-262. Invited contribution to a special issue.
11. Khreiss T*, **József L***, Potempa LA, Filep JG. (2005) Loss of Pentameric Symmetry in C-Reactive Protein Induces Interleukin-8 Secretion Through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. *Circ Res.* 97: 690-697. * Co-first author.
12. **József L**, Khreiss T, El Kebir D and Filep JG. (2006) Activation of Toll-like Receptor-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. *J Immunol.* 176: 1195-1202.

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. 9: 423–432.
- Aderem A, Ulevitch RJ. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406: 782-787.
- Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol*. 32: 1958-1968.
- Ahtar, M., J. L. Watson, A. Nazli, and D. M. McKay. 2003. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent NF- κ B-independent pathway. *FASEB J*. 17: 1319-1321.
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett*. 487: 318-322.
- Akhtar, M., Watson, J.L., Nazli, A. and McKay, D.M. (2003) Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF- κ B-independent pathway. *FASEB J*. 17, 1319-1321.
- Alon R, Fuhlbrigge RC, Finger EB, Springer TA. (1996) Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J Cell Biol*. 135: 849-865.
- Alvarado-Kristensson, M., Porn-Ares, M.I., Grethe, S., Smith, D., Zheng, L. and Andersson, T. (2002) p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis. *FASEB J*. 16, 129-131.
- Alvarez B, Radi R. (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*. 25: 295-311.
- Angus DC, Wax RS. (2001) Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*. 29 Suppl): S109-S116.
- Arteel GE, Moister V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H. (1998) Protection of selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem*. 379: 1201–1205.
- Ashkenazi A, Dixit VM. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281: 1305–1308.

Aulak KS, Miyagi M, Yan L, West KA, Massillon D, Crabb JW, Stuehr DJ. (2001) Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 12056-12061.

Babior BM. (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*. 64: 959-966.

Babior BM. (1999) NADPH Oxidase: an update. *Blood*. 93: 1464-1476.

Baggiolini M, Dewald B, Walz A (1992) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. In « inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates » (JI Gallin, IM Goldstein and R Snyderman, eds.) *Raven Press, New York* 247-263.

Bainton DF, Farquhar MG. (1966) Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell. Biol.* 28: 277-301

Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow: origin and content of azurophil and specific granules. *J Exp Med*. 134: 907-934.

Baldwin AS Jr (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683.

Baldwin ET, Weber IT, St. Charles R, Xuan JC, Appella E, Yamada M, et al. (1991) Crystal structure of interleukin-8 : symbiosis of NMR and crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 502-506.

Balint, B., S. A. Kharitonov, T. Hanazawa, L. E. Donnelly, P. L. Shah, M. E. Hodson, and P. J. Barnes. 2001. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 17: 1201-1207.

Barnes PJ, Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-1071.

Barry M, Heibei JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC. (2000) Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol*. 20: 3781-3794.

Basu S, et al. (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappaB pathway. *Int Immunol* 12:1539-1546.

Bauer, S., Kirschning, C.J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G.B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9237-9242.

Bayon Y, Alonso A, Sanchez-Crespo M. (1999) 4-Trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal and its main metabolite 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid, are potent inhibitors of nuclear factor κ B activation. *Br J Pharmacol.* 126: 1359–1366.

Beckman JS, Koppenol WH. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* 271: C1424–C1437.

Belaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. (2000) Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289: 1185–1188.

Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, Shapiro SD. (1998) Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* 4: 615–618

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24: 528-533.

Bernofsky C. (1991) Nucleotide chloramines and neutrophil-mediated cytotoxicity. *FASEB J.* 5: 295-300.

Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. (1991) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353: 273–276.

Bird AP (1987) CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet.* 3: 342-347.

Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.

Blach-Olszewska Z. (2005) Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 53: 245-253.

Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell.* 11: 529–541.

Bokoch GM. (1995) Chemoattractant signalling and leukocyte activation. *Blood.* 86: 1649–1660.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 85: 803–815.

Borregaard N, Cowland JB. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89: 3503–3521.

Bouchard A, Ratthe C, Girard D. (2004) Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J. Leukoc. Biol.* 75: 893-900.

Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM. (2001) Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *Embo J.* 20: 998-1009.

Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lankiewicz E, Borchers MT, Lusic AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL. (2002) A tale of two controversies. Defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 277: 17415-17427.

Briviba K, Roussyn I, Sharov VS, Sies H (1996) Attenuation of oxidation and nitration reactions of peroxynitrite by selenomethionine, selenocysteine, and ebselen. *Biochem J.* 319: 13-15.

Brown S, et al. (2002) Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418:200-203.

Brown SB, Savill J. (1999) Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J. Immunol.* 162: 480-485.

Burns AR, Bowden RA, Abe Y, Walker DC, Simon SI, Entman ML, Smith CW. (1999) P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *J Leukoc Biol.* 65: 299-306.

Byrne A, et al. (2002) Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 168:1968-1977.

Campbell EJ, Campbell MA, Owen CA. (2000) Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: Quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. *J. Immunol.* 165: 3366-3374.

Capodici, C., Pillinger, M.H., Han, G., Philips, M.R. and Weissmann, G. (1998) Integrin-dependent homotypic adhesion of neutrophils. Arachidonic acid activates Raf-1/Mek/Erk via a 5-lipoxygenase- dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 102, 165-175.

Cassatella MA. (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.* 73: 369-509.

Castro L, Rodriguez M, Radi R (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 269: 29409-29415.

- Chanock SJ, El Benna J, Smith RM, Babior BM. (1994) The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269: 24519–24522.
- Chen WJ, et al. (2001) TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14:715-725.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 8: 705–711.
- Chu, W., Gong, X., Li, Z., Takabayashi, K., Ouyang, H., Chen, Y., Lois, A., Chen, D.J., Li, G.C., Karim, M. and Raz, E. (2000) DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell* 103, 909-918.
- Clark JM, Vaughan DW, Aiken BW, Kagan HM. (1980) Elastase-like enzymes in human neutrophils localized by ultrastructural cytochemistry. *J Cell Biol.* 84: 102-119.
- Cleveland DW, Yen TJ (1989) Multiple determinants of eukaryotic mRNA stability. *New Biol* 1 : 121-126.
- Clifford DP, Repine JE. (1982) Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria. *Mol Cell Biochem.* 49: 143-149.
- Cloutier, A., T. Ear, O. Borissevitch, P. Larivée, and P. P. McDonald. 2003. Inflammatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-terminal kinase /AP-1 signaling cascade in human neutrophils. *J Immunol* 171: 3751-3761.
- Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wiczorek M, Kroona H, Leimer AH, Cheronis J. (1999) Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6261–6266.
- Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 420: 885-891.
- Colditz I, Zwahlen R, Dewald B, Baggiolini M (1989) In vivo inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. *Am J Pathol* 134: 755-760.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80, 2012-2020.
- Coutinho MS, Nakamae FJ, Menezes ME. (2000) Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. Identification of bacterial DNA in the arterial wall. *Arq Bras Cardiol.* 74: 119-128.

Cowdery, J.S., Chace, J.H. and Krieg, A.M. (1996) Bacterial DNA induces NK cells to produce interferon-gamma in vivo and increase the toxicity of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 156, 4570-4575.

Cox, G., Grossley, J., and 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.

Daigle I, Simon HU. (2001) Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 126: 147-156.

Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004) Cell death: critical control points. *Cell.* 116: 205-219.

de Madaria E, Martinez J, Lozano B, Sempere L, Benlloch S, Such J, Uceda F, Frances R, Perez-Mateo M. (2005) Detection and identification of bacterial DNA in serum from patients with acute pancreatitis. *Gut.* 54:1293- 1297.

Deforge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG (1992) Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 90: 2123-2129.

Deforge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. (1993). Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 268: 25568-25576.

DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura N, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM (1998): Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J. Clin. Invest.* 101: 455–463.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17: 2215–2223.

Downey GP, Doherty DE, Schwab B 3rd, Elson EL, Henson PM, Worthen GS. (1990) Retention of leukocytes in capillaries: role of cell size and deformability. *J Appl Physiol.* 69: 1767-1778.

Dransfield I, Stocks SC, Haslett C. (1995) Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood.* 85: 3264-3273.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102: 33–42.

- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman AB, Halliwell B, van der Vliet A. (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391: 393–397.
- El Bekay R, Alvarez M, Monteseirin J, Alba G, Chacon P, Vega A, Martin-Nieto J, Jimenez J, Pintado E, Bedoya FJ, Sobrino F. (2003) Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood*. 102: 662–671.
- Elsbach P. (1998) The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J. Leukocyte Biol.* 64: 14–18.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 20: 929–935.
- Evans, T. J., L. D. K. Buttery, A. Carpenter, D. R. Springall, J. M. Polak, and J. Cohen. 1996. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9553-9558.
- Fadok Va, et al. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207-2216.
- Fadok VA, et al. (1998) CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol* 161:6250-6257.
- Fadok VA, et al. (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Diff* 5:551-562.
- Fadok VA, et al. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405:85-90.
- Fadok VA, et al. (2001) Loss of phospholipids asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 276:1071-1077.
- Fadok VA, et al. (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108:957-962.
- Fasch SC, et al. (2000) Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase C δ . *J Biol Chem* 275:23065-23073.
- Faurschou M, Borregaard N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5: 1317-1327.

- Fecho K, Cohen PL. (1998) Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *J Leukoc Biol.* 64: 373-383.
- Filep JG, Beauchamp M, Baron C, Paquette Y. (1998) Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* 161: 5656-5662.
- Filep JG, Khreiss T, Jozsef L. (2005) Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in neutrophil adhesion and signal transduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73: 257-262.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10: 76-100.
- Flohé L. (1989) The selenoprotein glutathione peroxidase. In: D. Dolphin, R. Poulson and A. Abramovic, Editors, *Glutathione: chemical, biochemical, and medical aspects*, John Wiley & Sons, New York. 643-731.
- Foxman EF, Kunkel EJ, Butcher EC. (1999) Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation. *J Cell Biol.* 147: 577-588.
- Franc NC (2002) Phagocytosis of apoptotic cells in mammal, *Caenorhabditis* and *Drosophila melanogaster*: molecular mechanisms and physiological consequences. *Front Biosci* 7:d1298-d1313.
- Frances R, Rodriguez E, Munoz C, Zapater P, De la ML, Ndongo M, Perez-Mateo M, Such J. (2005) Intracellular cytokine expression in peritoneal monocyte/macrophages obtained from patients with cirrhosis and presence of bacterial DNA. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 17: 45-51.
- Francois S, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi F, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. (2005) Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1 and phosphorylated BAD. *J. Immunol.* 173: 3633-3642.
- Frasch, S.C., Nick, J.A., Fadok, V.A., Bratton, D.L., Worthen, G.S. and Henson, P.M. (1998) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273, 8389-8397.
- Fuortes M, Melchior M, Han H, Lyon GJ, Nathan C. (1999) Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J Clin Invest.* 104: 327-335.

- Galinanes M, Matata BM. (2002) Protein nitration is predominantly mediated by a peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leukocytes. *Biochem J.* 367: 467–473.
- Gallucci S, et al. (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5:1249-1255.
- Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. (1990) Defensins. *Eur. J. Haematol.* 44: 1–8.
- Ganz T, Weiss J. (1997) Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol.* 34: 343–354.
- Gao YK, et al. (1998) Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med* 188:887-896.
- Gao, J.J., Zuvanich, E.G., Xue, Q., Horn, D.L., Silverstein, R. and Morrison, D.C. (1999) Cutting edge: Bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in Raw 264.7 macrophages. *J. Immunol.* 163, 4095-4099.
- Goto M, Washio T, Tomita M. (2000) Causal analysis of CpG suppression in the *Mycoplasma* genome. *Microb Comp Genomics* 5: 51–58.
- Gottlieb, R.A., Giesing, H.A., Zhu, J.Y., Engler, R.L. and Babior, B.M. (1995) Cell acidification in apoptosis: Granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5965-5968.
- Gow, A., D. Duran, S.R. Thom, and H. Ischiropoulos. 1996. Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* 333: 42-48.
- Green DR, et al. (2000) Gone but not forgotten. *Nature* 405:28-29.
- Greenberg S, Grinstein S. (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 14: 136-145.
- Greenstein S, Barnard J, Zhou K, Fong M, Hendey B. (2000) Fas activation reduces neutrophil adhesion to endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 68: 715-722.
- Gregory CD, et al. (2004) The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *J Immunol* 113:1-14.
- Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ. (1990) Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- κ B. *Nature* 339: 70–73.
- Grinstein S, Nanda A, Lukacs G, Rotstein O. (1992) V-ATPases in phagocytic cells. *J Exp Biol.* 172: 179-192.

Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem.* 274: 1156–1163.

Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang WJ, Demaurex N, Woodside M, Tsai O, Grinstein S. (1997) Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na⁺/H⁺ exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and vacuolar-type H⁺-atpases. *J Biol Chem.* 272: 29810-29820.

Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17: 6230-6240.

Häcker G, Redecke V, Häcker H. (2002) Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology* 105, 245-251.

Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17, 6230-6240.

Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* 166: 15-19.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 92: 3007-3017.

Hanayama R, et al. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417:182-187.

Happel KI, Nelson S, Summer W. (2004) The lung in sepsis: fueling the fire. *Am J Med Sci.* 328: 230-237.

Hart PD, Young MR. (1991) Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *J Exp Med.* 174: 881-889.

Hartmann J, Sceppek S, Lindau M. (1995) Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules. *J Physiol.* 483: 201-209.

Hayashi F, Means TK, Luster AD. (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 102: 2660-2669.

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. (2003) The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol.* 33: 2987-2997.

Heine H, Ulmer AJ. (2005) Recognition of bacterial products by toll-like receptors. *Chem Immunol Allergy.* 86: 99-119.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.

Henson PM, et al. (2001) Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11:R795-R805.

Henson PM, et al. (2001) The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:627-633.

Hofman P. (2004) Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 3:1-9.

Hoffman PR, et al. (2001) Phosphatidylserin (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 155:649-659.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 284: 1313-1318.

Hondal RJ, Motley AK, Hill KE, Burk RF. (1999) Failure of selenomethionine residues in albumin and immunoglobulin G to protect against peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 371: 29-34.

Hopkins PA, Sriskandan S. (2005) Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol.* 140: 395-407.

Huber AR, Kunkel SL, Todd RF III, Weiss SJ (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254: 99-102.

Imler JL, Hoffmann JA. (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* 11: 304-311.

Iovine NM, Elsbach P, Weiss J. (1997) An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10973-10978.

Jack, R.M., and D. T. Fearon. 1988. Selective synthesis of mRNA and proteins by human peripheral blood neutrophils. *J. Immunol.* 140: 4286-4293.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20: 197-216.

- Jeong DW, Yoo MH, Kim TS, Kim JH, Kim IY. (2002) Protection of mice from allergen-induced asthma by selenite. Prevention of eosinophil infiltration by inhibition of NF- κ B activation. *J Biol Chem.* 277: 17871–17876.
- Jiang X, Wang X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 73: 87-106.
- József L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. (2002) Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13266–13271.
- József L, Khreiss T, El Kebir D, Filep JG. (2006) Activation of TLR-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. *J Immunol.* 176: 1195-1202.
- József L, Filep JG. (2003) Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. *Free Radic Biol Med.* 35: 1018-1027.
- József L, Khreiss T, Filep JG. (2004) CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J.* 18: 1776-1778.
- József L, Khreiss T, Filep JG. (2003) Nitrosative/peroxidative stress as an intracellular signalling mechanism: A role for peroxynitrite. *Recent Res Devel Biochem.* 4: 97-111.
- Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270: 16483-16486.
- Karin M, Hunter T (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation : signal transmission from cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 5: 747-757.
- Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-246.
- Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. (1997) Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 6939–6942.
- Khreiss T, József L, Hossain S, Chan JSD, Potempa LA, Filep JG. (2002) Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 277, 40775-40781.
- Kimbrell DA, Beutler B. (2001) The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet.* 2: 256-267.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579–5588.

Kitayama J, Carr MW, Roth SJ, Buccola J, Springer TA. (1997) Contrasting responses to multiple chemotactic stimuli in transendothelial migration: heterologous desensitization in neutrophils and augmentation of migration in eosinophils. *J Immunol.* 158: 2340-2349.

Klein, J.B., Rane, M.J., Scherzer, J.A., Coxon, P.Y., Kettritz, R., Mathiesen, J.M., Buridi, A. and McLeish, K.R. (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Immunol.* 164, 4286-4291.

Klinman DM, Takeshita F, Gursel I, Leifer C, Ishii KJ, Verthelyi D, Gursel M. (2002) CpG DNA: recognition by and activation of monocytes. *Microbes Infect.* 4: 897-901.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275: 1132–1136.

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 16: 149–156.

Kooy, N. W., S. J. Lewis, J. A. Royall, Y. Z. Ye, D. R. Kelly, and J. S. Beckman. 1997. Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit. Care Med.* 25: 812-819.

Kopp E, Gosh S. (1994) Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265: 956–959.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 278: 294-298.

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 374: 546-549.

Krieg AM. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* 20: 709-760.

Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. (1998) Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 631–636.

- Kroemer, G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.* 3, 614-620.
- Kunsch C, Rosen CA (1993) NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 13: 6137-6146.
- Lakshminarayanan V, Beno DW, Costa RH, Roebuck KA (1997) Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 272: 32910-32918.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 5: 190-198.
- Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT. (2004) Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res.* 10: 406-412.
- Le Y, Li B, Gong W, Shen W, Hu J, Dunlop NM, Oppenheim JJ, Wang JM. (2000) Novel pathophysiological role of classical chemotactic peptide receptors and their communications with chemokine receptors. *Immunol Rev.* 177: 185-194.
- Lee, A., Whyte, M.K.B. and Haslett, C. (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.* 54, 283-288.
- Lehtiniemi, J., P. J. Karhunen, S. Goebeler, S. Nikkari, and S. T. Nikkari. 2005. Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries. *Eur. J. Clin. Invest.* 35: 13-16.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86: 973-983.
- Lemke G, et al. (2003) Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr Opin Immunol* 15:31-36.
- Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, Raffeld M (1991) Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activating protein-1. *J Invest Dermatol* 96: 690-694.
- Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. (2004) Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol.* 6: 443-450.

- Lewis AJ, Manning AM. (1998) New targets for anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Chem Biol.* 3: 489–494.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94: 491–501.
- Li LY, Luo X, Wang X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412: 95–99.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91: 479–489.
- Li X, Steeber DA, Tang ML, Farrar MA, Perlmutter RM, Tedder TF. (1998) Regulation of L-selectin-mediated rolling through receptor dimerization. *J Exp Med.* 188: 1385-1390.
- Li, J. and Eastman, A. (1995) Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. *J. Biol. Chem.* 270:3203-3211.
- Liles, W.C., Dale, D.C. and Klebanoff, S.J. (1995) Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood* 86, 3181-3188.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86: 147–157.
- Lowell CA, Berton G. (1999) Integrin signal transduction in myeloid leukocytes. *J Leukoc Biol.* 65: 313-320.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94: 481–490.
- Macfarlane DE, Manzel L. (1998) Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol.* 160: 1122-1131.
- Maianski, N.A., Mul, F.P.J., van Buul, J.D., Roos, D. and Kuijpers, T.W. (2002) Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood* 99, 672-679.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 142: 117-127.

- Masumoto H, Sies H. (1996) The reaction of ebselen with peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 9: 262–267.
- Matata BM, Galinanes M. (2002) Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor κ B DNA binding activity. *J Biol Chem.* 277: 2330–2335.
- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol.* 171: 3154-3162.
- Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ (1988) Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 167: 1883-1893.
- McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. (1997) Activation of the NF- κ B pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 89: 3421–3433.
- McEver RP, Cummings RD. (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest.* 100(11 Suppl): S97-S103.
- McKenzie SE, Schreiber AD. (1998) Fc gamma receptors in phagocytes. *Curr Opin Hematol.* 5: 16-21.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388: 394-397.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A (1997) IKK-1 and IKK-2 : cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278: 860-866.
- Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA (1994) Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. *Chem Biol Interact* 91: 91-100.
- Moffat OD, et al. (1999) Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. *J Immunol* 162:6800-6810.
- Moodley Y, et al. (2003) Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Path* 162:771-779.
- Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MR, Edwards SW. (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol.* 70: 783-792.

Mukaida N, Hishinuma AA, Zachariae CO, Oppenheim JJ, Matsushima K (1991) Regulation of human interleukin 8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for interleukin-8. *Adv Exp Med Biol* 305: 31-38.

Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima. 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 56: 554-558.

Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima. 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 265: 21128-21133.

Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 178: 449-460.

Murphy PM, Tiffany HL (1991) Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253: 1280-1283.

Nagata K, et al. (1996) Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271:30022-30027.

Nanda A, Brumell JH, Nordstrom T, Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N, Rotstein OD, Grinstein S. (1996) Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺-ATPases. *J Biol Chem.* 271:15963-15970.

Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, Hedrich HJ, Aschenbrenner E, Schlegelberger B, Rogler G, Scholmerich J, Falk W. (2005) CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 129: 913-927.

Ogden CA, et al. (2001) C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 194:781-795.

Ohkuro M, Ogura-Masaki M, Kobayashi K, Sakai M, Takahashi K, Nagasawa S. (1995) Effect of iC3b binding to immune complexes upon the phagocytic response of human neutrophils: synergistic functions between Fc gamma R and CR3. *FEBS Lett.* 373: 189-192.

Okamoto S, Mukaida N, Yasumoto K, Rice N, Ishikawa Y, Horiguchi H, Murakami S, Matsushima K (1994) The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK 506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization. *J Biol Chem* 269: 8582-8589.

Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene « intercrine » cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9: 617-648.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Shroeder L, Aderem A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 13766-13771.

Packer MA, Porteous CM, Murphy MP. (1996) Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite. *Biochem Mol Biol Int.* 40: 527-534.

Parente L, et al. (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res* 53:125-132.

Patel KD, Moore KL, Nollert MU, McEver RP. (1995) Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *J Clin Invest.* 96: 1887-1896.

Paul-Clark MJ, Van Cao T, Moradi-Bidhendi N, Cooper D, Gilroy DW. (2004) 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. *J Exp Med.* 200: 69-78.

Pelletier M, Ratthe C, Girard D. (2002) Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase-1/2.

Peppin GJ, Weiss SJ. (1986) Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4322–4326.

Perkins ND, Schmid RM, Duckett CS, Leung K, Rice NR, Nabel GL (1992) Distinct combinations of NF-kappa B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1529-1533.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1644: 83-94.

Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T. (1996) Salicylates inhibit I κ B α phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol.* 156: 3961–3969.

Pillinger, M.H., Feoktistov, A.S., Capodici, C., Solitar, B., Levy, J., Oei, T.T. and Philips, M.R. (1996) Mitogen-activated protein kinase in neutrophils and enucleate neutrophil cytoplasts: evidence for regulation of cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 271, 12049-12056.

- Pitt A, Mayorga LS, Stahl PD, Schwartz AL. (1992) Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest.* 90: 1978-1983.
- Rajaratnam K, Sykes BD, Kay CM, Dewald B, Geiser T, Baggiolini M, et al. (1994) Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 264 : 90-92.
- Reed, J.C. (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776.
- Reiter, C.D., R. J. Teng, and J. S. Beckman. 2000. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 275: 32460-32466.
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 14250-14255.
- Renshaw SA, Timmons SJ, Eaton V, Usher LR, Akil M, Bingle CD, Whyte MK. (2000) Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor. *J Leukoc Biol.* 67: 662-668.
- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. (2003) The enigma of sepsis. *J Clin Invest.* 112: 460-467.
- Roberts TL, Dunn JA, Terry TD, Jennings MP, Hume DA, Sweet MJ, Stacey KJ. (2005) Differences in macrophage activation by bacterial DNA and CpG-containing oligonucleotides. *J Immunol.* 175: 3569-3576.
- Roebuck KA. (1999) Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res.* 19: 429-438.
- Roger C, Bone MD (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med.* 115: 457-469.
- Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, Kornbluth RS, Richman DD, Carson DA, Raz E. (1997) Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med.* 3: 849-854.
- Roos D, De Boer M, Kuribayashi F, Weening RS, Segal AW, Ahlin A, Nemet K, Hossle JP, Bernatowska-Matuskiewicz H, Middleton-Price H. (1996): Mutations in the
- Rothe, G., and G. Valet. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidin and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leukoc. Biol.* 47: 440-448.
- Roussyn I, Briviba K, Masumoto H, Sies H. (1996) Selenium-containing compounds protect DNA from single-strand breaks caused by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 330: 216-218.

Ryan P, Kelly RG, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, Shanahan F. (2004) Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol.* 99: 1539-1543.

Sanghavi, D.M., Thelen, M., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L. and Rosen, A. (1998) Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Lett.* 422, 179-184.

Santos-Beneit AM, Mollinedo F. (2000) Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc Biol.* 67: 712-724.

Sauter B, et al. (2000) Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191:423-434.

Savill J, et al. (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2:965-975.

Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., and Haslett, J.C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 83, 865-875.

Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 177: 195-203.

Scheel-Toellner D, Wang KQ, Webb PR, Wong SH, Craddock R, Assi LK, Salmon M, Lord JM. (2004) Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 32: 461-464.

Scheid MP, Duronio V. (1998) Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23: 7439-7444.

Scheid, M.P., Schubert, K.M. and Duronio, V. (1999) Regulation of Bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 31108-31113.

Schlegel RA, et al. (2001) Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* 8:551-563.

Schmidt, H.H.H.W., R. Seifert, and E. Böhme. 1989. Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating-factor and leukotriene B₄. *FEBS Lett.* 244: 357-360.

Schroder JM (1989) The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J Exp Med* 170: 847-863.

Schroder JM, Mrowietz U, Morita E and Christophers E (1987) Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin-1 activity. *J Immunol* 139: 3473-3483.

Schwartz DA, Quinn TJ, Thorne PS, Sayeed S, Yi AK, Krieg AM. (1997) CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.* 100: 68-73.

Segal AW. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 23: 197-223.

Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. (1995) Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J. Immunol.* 154: 4157-4165.

Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ. (2000) Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J. Immunol.* 165: 4165-4173.

Shishehbor, M. H., R.J. Aviles, M. L. Brennan, X. Fu, M. Goormastic, G. L. Pearce, N. Gokce, J. F. Keaney, M. S. Penn, D. L. Sprecher, J. A. Vita, and S. L. Hazen. 2003. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 289: 1675-1680.

Sies H, Sharov V, Klotz LO, Briviba K. (1997) Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem.* 272: 27812-27817.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9- dependent manner. *J Cell Biol.* 144: 281-292.

Slee EA, Keogh SA, Martin SJ. (2000) Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ.* 7: 556-565.

Sligh JE Jr, Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL. (1993) Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 8529-8533.

Somersan S, et al. (2001) Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol* 155:501-504.

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, Wagner H. (1997) Bacterial DNA causes septic shock. *Nature*. 386: 336-337.

Spicer SS, Hardin JH. (1969) Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules. A review. *Lab Invest*. 20: 488-497.

Springer TA. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 76: 301-314.

Stacey KJ, Blackwell JM. (1999) Immunostimulatory DNA as an adjuvant in vaccination against *Leishmania major*. *Infect. Immun*. 67: 3719-3726.

Stacey, K., Young, G., Clark, F., Sester, D., Roberts, T., Naik, S., Sweet, M.J. and Hume, D. (2003) The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *J. Immunol*. 170, 3614-3620.

Stegmaier M, Borges E, Berger J, Schwarz H, Vestweber D. (1997) The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci*. 110: 687-694.

Stein B, Baldwin AS Jr., Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P (1993) Cross-coupling of NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 12: 3879-3891.

Stein D, Roth S, Vogelsang E, Nusslein-Volhard C. (1991) The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell*. 65: 725-735.

Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS. (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*. 274: 8359-8362.

Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*. 273: 27084-27090.

Stewart M, Hogg N. (1996) Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem*. 61: 554-561.

Streiter RM, Koch AE, Antony VB, Fick RB Jr, Standiford TJ, Kunkel SL (1994) The immunopathology of chemotactic cytokines: The role of interleukin-8 and monocytes chemoattractant protein-1. *J Lab Clin Med* 123: 183-197.

Stuart LM, et al. (2002) Inhibitory effects of apoptotic-cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic-cell maturation. *J Immunol* 168:1627-1635.

Sugita N, Kimura A, Matsuki Y, Yamamoto T, Yoshie H, Hara K (1998) Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Prophyromonas gingivalis*. *Inflammation* 22: 253-267.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397: 441-446.

Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*. 103: 645-654.

Tada K, et al. (2003) Tethering of apoptotic cells to phagocytes through binding of CD47 to Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1. *J Immunol* 171:5718-5726.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 21: 335-376.

Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM. (2001) Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol*. 2001 167: 3555-3558.

Tapping RI, Tobias PS. (2003) Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *J. Endotoxin Res.* 9: 264-268.

Tarpey MM, Fridovich I. (2001) Methods of detection of vascular reactive species. Nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res*. 89: 224-236.

Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R (1995) Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys* 319: 491-497.

Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*. 281: 1312-1316.

Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S. (1999) How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis*. 52:1-11.

Tonkinson, J.L., and Stein, C.A. (1994) Patterns of intracellular compartmentalization trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells. *Nucleic Acid Res*. 22, 4268-4275.

Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, Raiden S, Geffner J. (2003) Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur J Immunol.* 33: 3164-3174.

Tu L, Delahunty MD, Ding H, Luscinskas FW, Tedder TF. (1999) The cutaneous lymphocyte antigen is an essential component of the L-selectin ligand induced on human vascular endothelial cells. *J Exp Med.* 189: 241-252.

Umata T, Moriyama Y, Futai M, Mekada E. (1990) The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase. *J Biol Chem.* 265: 21940-21945.

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 401: 811-815.

Urban BC, et al. (2001) A role for CD36 in the regulation of dendritic-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8750-8755.

Van Damme J, Rampart M, Conings R, Decock B, Van Osselaer N, Willems J, Billau A (1990) The neutrophil-activating proteins (NAP) interleukin-8 and β -thromboglobuline : In vitro and in vivo comparison of NH₂-terminally processed forms. *Eur J Immunol* 20: 2113-2118.

Van Den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. (2000) Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96: 2673-2681.

van der Heijden IM, Wilbrink B, Tchetverikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP, Breedveld FC, Tak PP. (2000) Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum.* 43: 593-598.

van Deurs B, Holm PK, Sandvig K. (1996) Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells. *Eur J Cell Biol.* 69: 343-350.
Van Uden J, Raz E. (2000) Introduction to immunostimulatory DNA sequences. *Springer Semin Immunopathol.* 22: 1-9.

Vandivier RW, et al. (2002) Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol* 169:3978-3986.

- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102: 43–53.
- Verhoven B, et al. (1995) Mechanisms of phosphatidyleserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* **182**:1597-1601.
- Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J*. 366: 689-704.
- Villunger A, O'Reilly LA, Holler N, Adams J, Strasser A. (2000) Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes. *J Exp Med*. 192: 647-658.
- Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. (2003) TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv*. 3: 466-477.
- Wagner H. (1999) Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol*. 73: 329-368.
- Wallerath, T., I. Gath, W. E. Aulitzky, J. S. Pollock, H. Kleinert, and U. Förstermann. 1997. Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb. Haemostasis*. 77:163-167.
- Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. 10: 2859–2869.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292: 727–730.
- Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B. (2000) Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligonucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J. Immunol*. 165: 4537-4543.
- Weinrauch Y, Abad C, Liang NS, Lowry SF, Weiss J. (1998) Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A2. *J. Clin. Invest*. 102: 633–638.
- Weiss J, Inada M, Elsbach P, Crowl RM. (1994) Structural determinants of the action against *Escherichia coli* of a human inflammatory fluid phospholipase A2 in concert with polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem*. 269: 26331–26337.

Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST. (1985) Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 227: 747-749.

Weiss SJ, Peppin GJ. (1986) Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. Characteristics, regulation and potential function in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 35: 3189-3197.

Wentworth P Jr, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Janda KD, Babior BM, Eschenmoser A, Lerner RA. (2002) Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science.* 298: 2195-2199.

Wheeler, M. A., S. D. Smith, G. Garcia-Cardena, C. F. Nathan, R. M. Weiss, and W.C. Sessa. 1997. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 99: 110-116.

Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. (1993) Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol.*150: 5124-5134.

Witko-Sarsat V, Cramer EM, Hieblot C, Guichard J, Nusbaum P, Lopez S, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L (1999) Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: Evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* 94: 2487-2496.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 80: 617-653.

Yamada, H., Gursel, I., Takeshita, F., Conover, J., Ishii, K., Gursel, M., Takeshita, S. and Klinman, D. (2002) Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation. *J. Immunol.* 169, 5590-5594.

Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. (1992) Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol.* 148: 4072-4076.

Yamamoto Y, Gaynor RB. (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 107: 135-142.

Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW Jr, Kaufmann SH, Yonehara S, Yamamoto K, Uchiyama T, Sasada M. (1999) Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood.* 93: 674-685.

Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science.* 288: 874-877.

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-291.

Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. (1998) CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol.* 160: 4755-4761.

Yoshimori T, Yamamoto A, Morijama Y, Futai M, Tashiro Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17707-17712.

Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ (1987) Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL-1). *J Immunol* 139: 788-793.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssière, J.L., Petit, P.X. and Kroemer, G. (1995) Reduction of mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 181, 1661-1672.

Zarembek K, Elsbach P, Shin-Kim K, Weiss J. (1997) p15s (15-kD antimicrobial proteins) are stored in the secondary granules of rabbit granulocytes: Implications for antibacterial synergy with the bactericidal/permeability-increasing protein in inflammatory fluids. *Blood* 89: 672-679.

Zhang H, Tay PN, Cao W, Li W, Lu J. (2002) Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett.* 532: 171-176.

Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K. (1998) CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol.* 160: 3627-3630.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 90: 405-413.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. (1999) An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 274: 11549-11556.

Zouki C, József L, Ouellet S, Paquette Y, Filep JG. (2001) Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. *J Leukoc Biol.* 69: 815-824.

Zouki C, Zhang SL, Chan JSD, Filep JG. (2001) Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J.* 15: 25–27.