

Université de Montréal

**Étude des interactions cellulaires lors de co-cultures:
neutrophiles/synoviocytes et neutrophiles/macrophages (RAW264.7).
Implication des facteurs de croissance dans la survie et les fonctions
cellulaires du neutrophile.**

Par

Mouna Lagraoui

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Immunologie

Juillet, 1999

©Mouna Lagraoui, 1999



W

4

U58

2000

v. 071



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Étude des interactions cellulaires lors de co-cultures:
neutrophiles/synoviocytes et neutrophiles/macrophages (RAW264.7).
Implication des facteurs de croissance dans la survie et les fonctions
cellulaires du neutrophile**

Présentée par:

Mouna Lagraoui

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury:

Président rapporteur du jury: Dr. Jacqueline Lagace

Directeur de recherche: Dr. Lyne Gagnon

Co-directeur de recherche: Dr. Serge Montplaisir

Examineur interne : Dr. Jacques Thibodeau

Examineur externe: Dr. Claire Dubois

Thèse acceptée le:

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) constituent une arme primordiale dans la défense de l'hôte. Ceci, est dû à leur intervention rapide lors des agressions externes. En effet, les PMN sont les premières cellules à être recrutées au site d'infection ou de blessure. Les neutrophiles peuvent avoir différentes cibles notamment, les bactéries, les champignons, les cellules tumorales et les cellules infectées par des virus. La fonction principale des PMN est la phagocytose, leur effet bactéricide fait intervenir des mécanismes oxydatifs et d'autres non oxydatifs. En plus les neutrophiles jouent un rôle clé dans l'inflammation.

Toutefois, les PMN peuvent aussi causer des dommages tissulaires à l'hôte. Effectivement, les neutrophiles sont impliqués dans diverses pathologies liées à des processus d'inflammation chronique. C'est le cas par exemple de certaines maladies autoimmunes telle l'arthrite rhumatoïde. Les lésions tissulaires engendrées par les PMN sont en grande partie dues à la sécrétion de leurs produits cytotoxiques dans le milieu extracellulaire. Les processus destructifs qui ont lieu lors des réactions inflammatoires chroniques sont régulés par diverses cytokines et induits par des effets combinés de médiateurs tels les dérivés d'oxygène et les enzymes protéolytiques.

Comme toutes les autres cellules du système immunitaire, les neutrophiles nécessitent l'intervention de cytokines et de facteurs de croissance pour la modulation de leur survie et leur activation. Ces médiateurs peuvent être sécrétés par les cellules avoisinantes. En effet, les PMN peuvent interagir avec différentes cellules notamment, les lymphocytes, les plaquettes, les cellules endothéliales, les macrophages, et les fibroblastes. Ces communications intercellulaires sont indispensables au bon déroulement de la réponse immunitaire. Tout dérèglement dans ce vaste réseau d'interactions peut s'avérer néfaste pour l'hôte.

Dans cette thèse, nous avons voulu étudier l'impact des interactions cellulaires (neutrophiles/synoviocytes et neutrophiles/macrophages) sur la modulation de la survie et de l'activation des PMN. De même, nous avons voulu élucider certains aspects de l'implication des neutrophiles et des synoviocytes dans des désordres immunopathologiques telle l'arthrite rhumatoïde.

Nous avons d'abord établi des co-cultures; neutrophiles/synoviocytes et neutrophiles/RAW264.7 (lignée macrophagique). Nos résultats ont démontré que ces cocultures entraînaient une augmentation de la survie des PMN ($68\% \pm 4.2$, $72\% \pm 3.3$, $50\% \pm 3.2$). En plus, les milieux conditionnés (MC) générés à partir des cultures des synoviocytes et des RAW264.7 prolongeaient aussi la survie des neutrophiles ($60.7\% \pm 4.6$, $58.5\% \pm 3.44$, $45\% \pm 3.07$). De même, ces MC pouvaient aussi affecter l'activation des PMN en stimulant la respiration oxydative et la phagocytose. Ceci signifie que les synoviocytes et les RAW264.7 sécrètent un ou des facteur (s) soluble (s) capable (s) de moduler la survie et l'activation des PMN. En outre, ce ou ces facteur (s) est (sont) stable (s) à la chaleur et à des traitements enzymatiques. À l'aide d'anticorps monoclonaux nous avons démontré que ce/ces facteur (s) est différent de l'IL-1, l'IL-8, le GM-CSF et du TGF- β 1. Nous avons aussi étudié l'effet du TGF- β 1 sur les neutrophiles. Nous avons alors démontré que le TGF- β 1 est un facteur chimiotactique puissant pour les PMN, ce qui le distingue du facteur sécrété par les synoviocytes, De plus, le TGF- β 1 active les neutrophiles en stimulant la respiration oxydative et la phagocytose.

Afin de mieux caractériser le (s) facteur (s) sécrété (s) par les synoviocytes, nous avons procédé à des techniques de purification. Ainsi, grâce à la centrifugation ultradiérentielle et aux analyses chromatographiques (FPLC) et d'électro-phorèse, nous avons pu obtenir le facteur dans un état semi-pur. Notre étude a démontré que ce facteur a un poids moléculaire approximatif de 240 kD et qu'il active les PMN en stimulant la phagocytose et la respiration oxydative.

En plus, nous avons démontré que la prolongation de la survie des PMN par ce facteur est associée à une diminution de l'apoptose. Effectivement, le facteur sécrété par les synoviocytes réduit significativement la mort cellulaire programmée (PCD) des neutrophiles ($33\% \pm 2$, $45\% \pm 2.5$). Dans le but de comprendre comment ce facteur affecte l'apoptose, nous avons étudié son effet sur l'expression de Bcl-2 et de Fas chez les PMN. Nos résultats ont démontré que l'incubation des neutrophiles avec ce nouveau médiateur entraînait une diminution de l'apoptose, de même qu'une augmentation de l'expression de Bcl-2 au niveau des PMN. Toutefois aucune différence significative n'a été décelée dans l'expression de Fas. Ceci signifie que la diminution d'apoptose observée pourrait être due à une augmentation d'expression de Bcl-2.

Tous les résultats obtenus durant cette étude démontrent que les interactions cellulaires entre les neutrophiles et les synoviocytes jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire. En effet, les synoviocytes sécrètent un facteur qui prolonge la survie et induit l'activation des PMN. Ce phénomène peut être utile pour la réponse immunitaire, mais il peut aussi être néfaste pour l'organisme dans certaines pathologies. Cette étude élucide certains aspects du rôle que peuvent jouer les neutrophiles et les synoviocytes dans des maladies, plus précisément dans le cas de l'arthrite rhumatoïde.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

PAGE	TITRE.....	i
	IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
	SOMMAIRE	iii
	TABLE DES MATIÈRES	vii
	LISTE DES FIGURES.....	xii
	LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
	LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xvi
	REMERCIEMENTS.....	xx
CHAPITRE I		
	INTRODUCTION.....	1
	I. LE NEUTROPHILE.....	4
	1. Ontogénie.....	4
	2. Survie/Apoptose.....	8
	3. Les granules.....	15
	3.1 Les granules primaires.....	15
	3.2 Les granules secondaires.....	16
	3.3 Les granules tertiaires.....	17
	4. Les modulateurs des neutrophiles.....	19
	4.1 Les facteurs produits par les neutrophiles.....	19
	4.1.1 L'interleukine-1 α / β	20
	4.1.2 Le facteur de nécrose tumorale α (TNF α).....	20
	4.1.3 L'interféron α (IFN α).....	21
	4.1.4 L'interleukine-8 (L'IL-8).....	22

4.1.5 L'interleukine-6 (L'IL-6).....	22
4.1.6 Les Colony-Stimulating Factors (CSFs).....	23
4.1.7 Le Transforming Growth Factor β (TGF β).....	24
4.2 Les facteurs de croissance.....	24
4.3 Les facteurs activateurs.....	26
5. Les récepteurs.....	28
5.1 Les récepteurs des facteurs chimioattractants.....	28
5.2 Les récepteurs d'adhésion.....	29
5.2.1 Les intégrines.....	30
5.2.2 Les sélectines.....	30
5.2.3 La superfamille des immunoglobulines (Ig).....	31
5.3 Le récepteur CD44.....	31
5.4 Les récepteurs de Fc γ	32
6. Voie d'activation intracellulaire des neutrophiles.....	33
II. RÔLE DU NEUTROPHILE DANS LA DÉFENSE DE L'HÔTE.....	37
1. La chimiotaxie.....	38
2. La phagocytose.....	41
3. Les mécanismes de lyse.....	41
3.1 Mécanismes de lyse dépendants de l'oxygène.....	41
3.2 Mécanismes de lyse indépendants de l'oxygène.....	45
4. Implication du neutrophile dans l'inflammation.....	47
III. IMMUNOPATHOLOGIE DU NEUTROPHILE.....	48
1. "Adult respiratory distress syndrome" (L'ARDS).....	50
2. L'infarctus myocardique.....	50

3. L'arthrite rhumatoïde.....	51
IV. INTERACTIONS CELLULAIRES.....	52
V. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	53

CHAPITRE II

MATÉRIAL ET MÉTHODES ET RÉSULTATS.....	55
--	----

Article 1:

Lagraoui, M., and Gagnon, Lyne.

Modulation of human neutrophils survival by co-cultures with synoviocytes
and RAW264.7 Macrophage cell line.....55

Article 2:

Lagraoui, M., and Gagnon, L.

Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF- β 1. Cell.
Mol. Biol. 43:313-318. (1997).....80

Article 3:

Lagraoui, M., and Gagnon, L.

Conditioned medium of rat synoviocytes inhibits human neutrophils apoptosis
by enhancing Bcl-2 expression.....86

CHAPITRE III

DISCUSSION.....	104
-----------------	-----

CHAPITRE IV

CONCLUSION GÉNÉRALE.....120

CHAPITRE V

BIBLIOGRAPHIE.....123

ANNEXES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Figure 1:	Développement des cellules sanguines matures à partir de la cellule souche pluripotente.....	6
Figure 2:	Les différents stades de développement du neutrophile.....	7
Figure 3:	Schéma illustrant les principales étapes de la mort cellulaire programmée.....	10
Figure 4:	Schéma simplifié de certaines voies de régulation de l'apoptose	14
Figure 5:	Schéma récapitulatif de la voie de signalisation intracellulaire impliquant les phospholipases: PLA2, PLC et PLD.....	35
Figure 6:	Représentation schématique des principales étapes de la migration des neutrophiles de la circulation sanguine vers le site de lésion	39
Figure 7:	Effet bactéricide de la myéloperoxydase en présence du peroxyde d'hydrogène et de certains halogénures dans le phagolysosome du neutrophile.....	44

CHAPITRE II

ARTICLE 1

Figure 1:	Neutrophil survival in co-culture with RAW264.7 and synoviocytes	68
Figure 2:	Effect of conditioned media on neutrophil survival.....	69
Figure 3:	FPLC profile.....	73
Figure 4:	Effect of fractions on neutrophil phagocytosis	
	4A) Cytometry profile analysis of activated neutrophils.....	74
	4B) Calculated results obtained by cytometry analysis.....	75
Figure 5:	Effect of fractions on neutrophil respiratory burst.....	76
Figure 6:	Native PAGE.....	77
Figure 7:	Effect of fractions on neutrophil apoptosis	

7A) Cytometry profile analysis of apoptotic cells.....	78
7B) Calculated results obtained by cytometry analysis.....	79

ARTICLE 2

Figure 1: Effect of TGF- β 1 on neutrophil chemotaxis.....	82
Figure 2: Effect of TGF- β 1 on neutrophil respiratory burst.....	82
Figure 3: Effect of TGF- β 1 on neutrophil phagocytosis.....	83

ARTICLE 3

Figure 1: Effect of FPLC fractions on neutrophil apoptosis.....	101
Figure 2: Western blot analysis of Bcl-2 Protein in neutrophils incubated with or without fraction (F-2).....	103

CHAPITRE III

Figure 1: Schéma de la structure du TGF- β 1 latent.....	119
--	-----

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Tableau 1:	Les principaux constituants des granules des neutrophiles.....	18
Tableau 2 :	Facteurs de croissance régulant l'hématopoïèse et la survie des PMN.....	25
Tableau 3:	Les principaux facteurs impliqués dans l'activation des PMN.....	27

CHAPITRE II

ARTICLE 1

Table 1:	Effect of neutralizing antibodies on neutrophil survival.....	70
Table 2:	Effect of fractionated conditioned media on neutrophil survival	71
Table 3:	Effect of fractionated conditioned media on neutrophil respiratory burst.....	72

ARTICLE 2

Table 1:	Enhancement of neutrophil survival by TGF- β 1.....	83
----------	---	----

ARTICLE 3

Table 1:	Effect of fraction 2 (F-2) from rat synoviocytes heated and fractionated conditioned medium on Fas protein expression.....	102
----------	--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA:	Acide arachidonique
Ac:	Anticorps
ADCC:	Cytotoxicité cellulaire dépendant d'Ac
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
Bcl-2:	B cell lymphoma/leukemia-2
BPI:	Bacterial permeability increasing protein
CD:	Classe de différenciation
CFU:	Colony forming unit
C5a:	Peptide du complément (Anaphylatoxine)
C3b:	Peptide du complément (Opsonine)
CR:	Récepteur du complément
CrmA:	Cytokine response modifier A
DAG:	Diacylglycérol
DD:	Death domain
ENA-78:	Epithelial Neutrophil Activating Peptide-78
FADD:	Fas-associating protein with death domain
Fc:	Fragment c de l'immunoglobuline
FcR:	Récepteur du fragment Fc
FMLP:	N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
G-CSF:	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GEMM:	Granulocytes, Erythrocytes, Monocytes, Megakaryocytes
GM-CSF:	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GRO:	Growth-related oncogene
GTPase:	Guanidine triphosphatase
HOCl:	Acide hypochlorique
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
Hsp:	Heat-shock protein (Protéines de stress)
IAP:	Inhibitor of apoptosis
ICAM:	Intercellular adhesion molecule
ICE:	Interleukin1 β -converting enzyme

IFN:	Interféron
IL:	Interleukine
IP3 :	Inositol triphosphate
LFA-1:	Leucocyte function-associated antigen-1
LTB ₄ :	Leucotriène B ₄
Mac-1:	Macrophage antigen-1
M-CSF:	Macrophage-Colony Stimulating Factor
Mk:	Megakaryocytes
MPO:	Myélopéroxydase
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NK:	Natural killer (Cellules tueuses naturelles)
NO:	Monoxyde d'azote
O ₂ ⁻ :	Superoxide anion
OCL ⁻ :	Hypochlorite
OH:	Radical hydroxyl
PA:	Acide phosphatidique
PAF:	Platelet-activating factor
PC:	Phosphatidylcholine
PCD:	Programmed cell death
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PE:	Phosphatidyléthanolamine
PECAM-1:	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PF-4:	Platelet factor 4
PGE ₂ :	Prostaglandine E ₂
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC:	Protéine kinase C
PL:	Phospholipase
PMA:	Phorbol myristate acétate
PTK:	Protéines tyrosines kinases
RIP:	Receptor-interacting protein
SOD:	Superoxyde dismutase
TGF-β1:	Transforming growth factor-β 1

TNF:	Tumor necrosis factor ou facteur de nécrose des tumeurs
TNFR-1:	Récepteur de type 1 du TNF
TRADD:	TNFR-1-associated death domain protein
VCAM-1:	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA:	Very late antigen

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Si toutes les conditions favorables ont été réunies pour que je parvienne au terme de ce long cheminement, c'est grâce à mes chers parents, Aicha et Ahmed, qui m'ont témoigné un indéfectible amour et dont la confiance et l'encouragement continus m'ont permis de poursuivre des études graduées, je dis sincèrement merci.

J'adresse un merci tout particulier à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet. Je tiens à exprimer plus particulièrement ma reconnaissance envers:

- *Le Dr. Lyne Gagnon, professeur associé, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal et directeur de mon projet de doctorat pour la confiance et les excellents conseils qu'elle m'a offerts pendant la direction de ce travail;*
- *Le Dr. Serge Montplaisir, professeur titulaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal et co-directeur de mon projet de doctorat pour ses précieux conseils et sa disponibilité;*

Je m'en voudrais de passer sous silence le solide soutien de la compagnie Biochem Pharma Inc, qui m'a soutenu financièrement et matériellement tout au long de ce projet et qui m'a permis d'acquérir une bonne expérience scientifique parmi ses chercheurs. Merci pour tout.

*A mes chers Parents
Ahmed et Aicha*

CHAPITRE I
INTRODUCTION

Introduction

Généralités

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre l'infection par les microorganismes et dans les réactions inflammatoires. En effet, ces cellules peuvent participer directement à l'induction, la régulation et l'expression de la réponse immunitaire spécifique, en même temps qu'elles assurent l'immunité non spécifique. Les neutrophiles représentent 60 à 70% des leucocytes du sang, et sont caractérisés par un noyau multilobé et des granules cytoplasmiques. Ces derniers sont groupés en 3 catégories, les granules primaires (azurophiles), les granules secondaires (spécifiques) et les granules tertiaires. Les granules contiennent des enzymes et des protéines qui participent à plusieurs fonctions de ces cellules. Les PMN se différencient à partir de cellules souches myéloïdes selon un tronc commun avec les lymphocytes/macrophages (GM-CFU). Ensuite, ils se différencient en lignées indépendantes (G-CFU) sous l'influence d'un ensemble de cytokines, en particulier l'IL-3, le GM-CSF à l'état basal, le G-CSF et l'IL-8 lors des stimulations d'origine périphérique. La demi-vie des neutrophiles ayant quitté la moëlle osseuse est de l'ordre de 4 à 10 heures. C'est pourquoi, ils ont un taux de renouvellement très élevé afin de maintenir un nombre stable de neutrophiles circulants. Un adulte normal génère approximativement 10^{11} neutrophiles par jour (Smith, 1994).

Les neutrophiles constituent une arme indispensable à la défense contre les microorganismes à réplification extracellulaire, principalement les bactéries et les levures. Ils interviennent aussi dans les lésions tissulaires des réactions immunopathologiques mettant en jeu le complément et les anticorps. La principale fonction des PMN est la phagocytose, laquelle s'accomplit selon différentes étapes. Effectivement, avant d'aboutir à l'élimination du pathogène, les neutrophiles doivent migrer au site d'infection en réponse à un signal

chimiotactique généré dans le tissu affecté. Ce signal peut être induit par des facteurs produits par les cellules ou par les bactéries. Les principaux agents chimiotactiques sont; FMLP, LTB₄, C5a, IL-8, ENA-78, GRO α , β et γ , PF-4, PDGF, et le TGF β 1. Une fois au site d'infection, les PMN commencent le processus de phagocytose. Ceci peut se faire directement ou bien par l'intermédiaire des récepteurs du complément CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) et du fragment Fc (CD32 et CD64). En effet, ces récepteurs permettent la fixation des particules opsonisées par le complément et les anticorps et leur destruction de façon très efficace par les neutrophiles.

La mort intracellulaire des microorganismes implique généralement l'initiation du processus de la respiration oxydative avec la libération des métabolites oxygénés toxiques tel l'hypochlorite (OCL⁻), le superoxide anion (O₂⁻), le radical hydroxyl (OH), et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). D'autres mécanismes de destruction des pathogènes peuvent intervenir aussi lors d'une infection. C'est le cas des peptides sécrétés à partir des granules contenus dans les phagosomes. La dégranulation constitue un processus de bactéricidie indépendant de l'oxygène. En effet les granules cytoplasmiques des neutrophiles contiennent des enzymes et des protéines qui peuvent être fatales pour de nombreuses bactéries. Parmi ces protéines et enzymes, on cite: les défensines, les protéines cationiques, la BPI (bacterial permeability increasing protein), le lysozyme, la lactoferrine, les hydrolases acides (protéases, nucléases), la cathepsine G ainsi que la collagénase. Toutes ces molécules sont capables de participer d'une façon très efficace à la lutte contre les infections mais malheureusement certaines d'entre elles sont capables aussi d'altérer sérieusement les tissus de l'hôte.

L'accumulation et l'activation des neutrophiles dans les tissus sont contrôlées. Ceci a pour but de permettre au processus inflammatoire de se dérouler normalement sans causer des dommages tissulaires. Toutefois, il peut arriver que le mécanisme de contrôle faille à sa tâche entraînant ainsi une réponse exagérée ou

illimitée des neutrophiles activés. En conséquence, ceci peut induire des dommages tissulaires qui peuvent être néfastes pour l'hôte.

Plusieurs facteurs de croissance et cytokines peuvent agir sur les neutrophiles et affecter ainsi tant leur survie que leur recrutement et/ou activation. Parmi ces facteurs on cite, le GM-CSF, le G-CSF, l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-8, PDGF, GRO_{α} , TGF- β 1, ENA-78. Ces cytokines peuvent être sécrétées dans le microenvironnement des neutrophiles au site inflammatoire par les cellules avoisinantes ou par les neutrophiles eux même. En effet, lors d'une réaction inflammatoire, les PMN peuvent interagir avec différents types de cellules notamment, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les macrophages, les synoviocytes, les fibroblastes et les lymphocytes. Les interactions directes ou indirectes avec ces cellules permettent aux neutrophiles d'accomplir efficacement leur tâche de phagocytes.

L'action des cellules avoisinantes est très importante, puisqu'elle permet d'induire et de réguler le processus inflammatoire. Cet effet sur les neutrophiles peut se manifester de différentes manières. Effectivement, par le biais des cytokines et des facteurs de croissance sécrétés dans le microenvironnement des neutrophiles, les cellules avoisinantes peuvent, soit induire une augmentation de survie, soit au contraire déclencher le processus d'apoptose. De plus, elles peuvent entraîner une augmentation ou une inhibition du recrutement et de l'activation des PMN. Ceci est dans le but de contrôler le processus inflammatoire et de lui permettre de se dérouler dans de bonnes conditions pour une meilleure protection de l'hôte contre les réactions immunopathologiques.

I- Le neutrophile

1- Ontogénie

Les neutrophiles, comme la plupart des autres cellules du système immunitaire, ont une origine hématopoïétique. L'hématopoïèse correspond à un processus physiologique spontané dont le bon déroulement et la régulation dépendent des interactions qui ont lieu dans la zone médullaire. Ce processus se déroule suivant différentes étapes qui aboutissent à la différenciation et la maturation cellulaire. Durant ces différents stades d'hématopoïèse, les cellules subissent des modifications phénotypiques et commencent à exprimer certaines molécules membranaires. De plus, elles acquièrent certaines propriétés fonctionnelles. L'hématopoïèse est contrôlée par les cytokines et les facteurs de croissance qui sont libérés dans le microenvironnement médullaire. En effet, ces cytokines et facteurs de croissance peuvent stimuler très activement l'hématopoïèse lors d'un processus de défense contre une agression externe. Ceci entraîne une activation des cellules souches myéloïdes permettant ainsi une augmentation de la production des cellules nécessaires à la réponse immunitaire correspondante.

La différenciation des neutrophiles se fait à partir des cellules souches myéloïdes selon une voie commune avec les lymphocytes/macrophages: GM-CFU (Granulocytes/Macrophages- Colony-Forming Unit) (Gordon, 1994). Puis, ils se différencient en lignées indépendantes; G-CFU (Granulocytes-Colony Forming-Unit) (figure1). Ces dernières se différencient à leur tour en neutrophiles matures. Les différents stades de développement du neutrophile donnent naissance successivement aux : myéloblastes, promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, les cellules bandes et enfin aux polymorphonucléaires neutrophiles (figure2). Au cours de son développement, le neutrophile acquiert progressivement ses propriétés fonctionnelles notamment l'expression des récepteurs membranaires, l'apparition progressive des différents granules, la capacité de migrer et de détruire les agents pathogènes. Ainsi, un neutrophile dont la maturation est

complétée, doit être capable de quitter la circulation sanguine et entrer dans les tissus où sa présence est requise.

Ces étapes de différenciation sont contrôlées par un ensemble de cytokines dont on cite les principales; l'IL-3, le GM-CSF, le G-CSF (Cairo, 1991a; Campbell *et al.*, 1992; Smith, 1994; Vancheri *et al.*, 1991). Effectivement, le GM-CSF peut être synthétisé et sécrété par divers types de cellules notamment les lymphocytes T, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Le GM-CSF stimule la prolifération des cellules souches (les CFU-GM), augmente le métabolisme oxydatif des neutrophiles, la chimiotaxie, la dégranulation ainsi que l'ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) (Wong *et al.*, 1985). Le G-CSF peut être produit par différentes cellules dont les monocytes et les macrophages constituent une source majeure; il peut être aussi produit par les cellules endothéliales et les fibroblastes. Il stimule la prolifération des cellules souches (les CFU-G) et augmente la chimiotaxie et l'ADCC des neutrophiles (Welt *et al.*, 1987). L'IL-3 produite principalement par les lymphocytes T, agit surtout à des stades précoces de la différenciation et augmente la prolifération des précurseurs myéloïdes (Yang *et al.*, 1986).

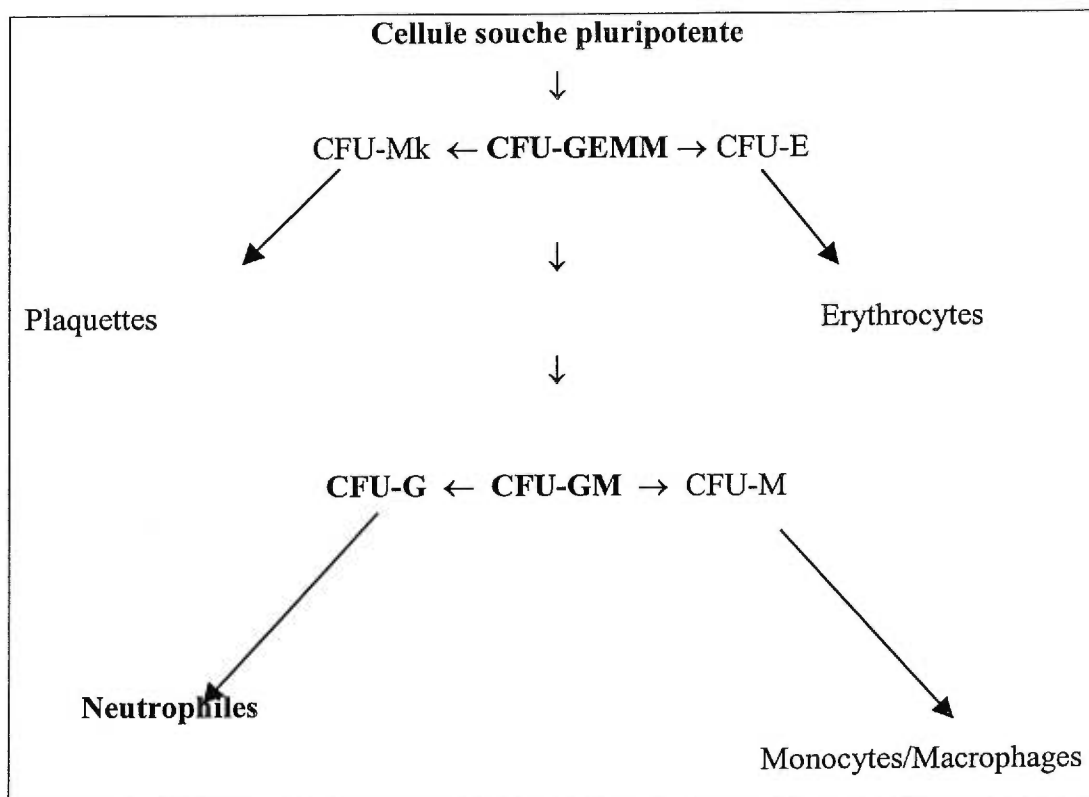


Figure 1. Développement des cellules sanguines matures à partir de la cellule souche pluripotente. CFU-GEMM (Colony-Forming Unit for Granulocytes, Erythrocytes, Monocytes, and Megakaryocytes), CFU-Mk (colony-forming unit for megakaryocytes), CFU-E (colony-forming unit for erythrocytes), CFU-GM (colony-forming unit for granulocytes and monocytes), CFU-G (colony-forming unit for granulocytes), CFU-M (colony-forming unit for monocytes).

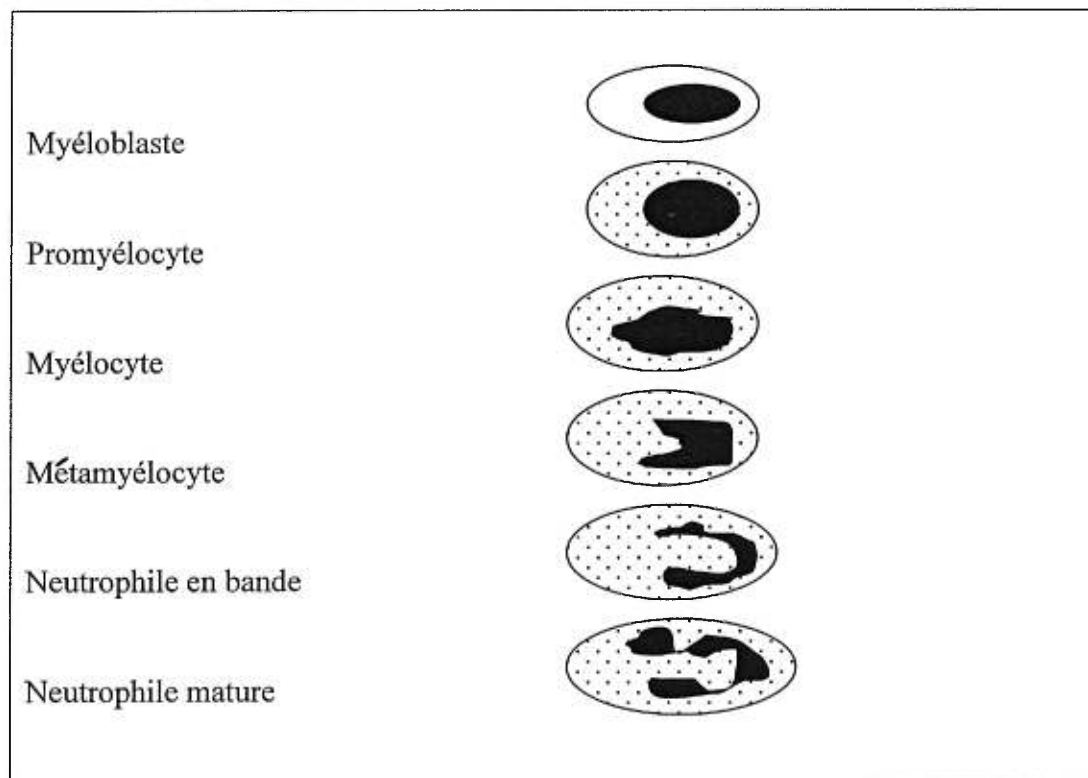


Figure 2. Les différents stades de développement du neutrophile. À partir du stade G-CFU, les cellules se différencient successivement en myéloblastes, promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, neutrophiles en bande et neutrophiles matures.

2- Survie / Apoptose

Les neutrophiles ont une durée de vie limitée, leur demi-vie dans la circulation sanguine est de 4 à 10 heures (Smith, 1994). Cette limite de survie explique le taux élevé de renouvellement de ces cellules. En effet, un adulte normal peut produire approximativement 10^{11} neutrophiles par jour qui vont quitter la moëlle osseuse pour se rendre dans la circulation sanguine. La survie des neutrophiles est régulée par différentes cytokines et facteurs de croissance notamment l'IL-2, l'IL-6, le GM-CSF, le G-CSF, le TGF β_1 (Adachi *et al.*, 1993a,1993b, et 1994; Cairo *et al.*, 1991b et 1991c; Colotta *et al.*, 1992; Lagraoui et Gagnon, 1996; Pericle *et al.*, 1994).

Après une période limitée, et en absence de facteurs de croissance appropriés les neutrophiles meurent. Cette mort cellulaire peut se faire dans certains cas par nécrose mais dans la plupart du temps par apoptose (mort cellulaire programmée : PCD) (Cox, 1995; Grigg *et al.*, 1991; Pericle *et al.*, 1994; Whyte *et al.*, 1993). Les cellules qui ont entamé l'apoptose vont être reconnues et phagocytées par les macrophages, et ce, afin de protéger les tissus avoisinants des dommages qui peuvent être causés par le contenu des neutrophiles (Savill *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1993). Effectivement, la mort des PMN par nécrose peut être très néfaste pour les tissus de l'hôte. La nécrose peut être induite par différents facteurs tel les poisons, les agents infectieux et le manque d'oxygène. Ce type de mort cellulaire se caractérise par un gonflement de la membrane cellulaire, laquelle se rompt et entraîne la libération du contenu des granules dans le milieu extracellulaire.

Les granules des neutrophiles contiennent une grande variété de dérivés et d'enzymes lytiques. Ces substances toxiques, quand elles sont sécrétées à l'extérieur de la cellule endommagent les tissus environnants et déclenchent une réaction inflammatoire. Toutefois, dans les conditions normales le contenu des granules sert à protéger l'organisme contre les agressions externes notamment contre l'invasion des microorganismes et ce, sans nuire aux tissus de l'hôte.

La mort cellulaire programmée est donc un processus qui sert à éviter l'autodestruction de l'organisme par ses propres cellules. L'apoptose est un phénomène biologique essentiel à la résolution des processus inflammatoires (Colotta et al., 1992; Haslett, 1992; Savill et al., 1989). Les principales caractéristiques de ce phénomène sont: la disparition des microvillosités et la rétraction en sphère de la cellule, la condensation de la chromatine qui se fragmente par la suite, ainsi que la formation de corps apoptotiques grâce aux invaginations de la membrane cytoplasmique (Figure3). Les corps apoptotiques ainsi formés vont être phagocytés par les macrophages (Savill et al., 1989; Savill, 1992; Meszaros et al., 1999).

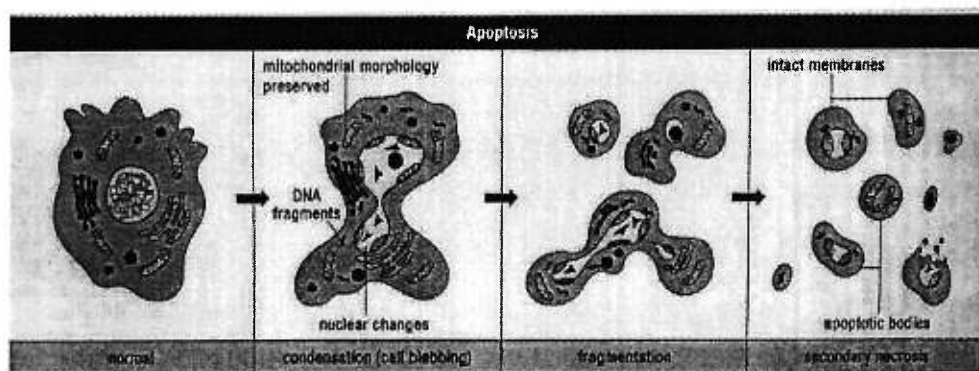


Figure 3. Schéma illustrant les principales étapes de la mort cellulaire programmée. Les caractéristiques fondamentales de l'apoptose sont: 1) la rétraction en sphère de la cellule, 2) la condensation et la fragmentation de la chromatine, 3) la formation des corps apoptotiques. (Figure provenant du catalogue de Boehringer Mannheim, apoptosis and cell proliferation, 2nd edition, 1998).

Plusieurs médiateurs d'inflammation peuvent réguler le phénomène d'apoptose. Parmi ces facteurs; le GM-CSF, le G-CSF, l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, le FMLP, le C5a et le LPS inhibent l'apoptose des PMN (Biffl et al., 1995; Brach et al., 1992; Yamamoto et al., 1993). Des études ont démontré que l'IL-2 inhibe la PCD des neutrophiles en activant la synthèse de nouvelles protéines et d'ARN (Pericle et al., 1994). D'autres mécanismes peuvent aussi réguler l'apoptose, telle l'interaction des molécules Fas/Apo-1 et les récepteurs du TNF (TNFR) avec leurs ligands respectifs (FasL) et le TNF, qui induisent l'apoptose via un signal de transduction. En outre, la famille de Bcl-2 est aussi impliquée dans la modulation de la PCD (Biancone et al., 1997; Halaas et al., 1998; Itoh et al., 1993; Liles et al., 1996). Ainsi, Bcl-2 et Bcl-x_L inhibent l'apoptose alors que Bcl-x_S et Bax l'induisent (Yang *et al.*, 1995). Fas/Apo-1 appartient à la famille de TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), et son ligand (FasL) est un membre de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) (Itoh et al., 1993). La protéine Fas est exprimée sur plusieurs types cellulaires alors que l'expression de son ligand (FasL) est plus limitée (Conrad Liles et al., 1996). L'importance biologique du système Fas/ FasL a été démontrée lors des études des lymphocytes T et plus précisément lors des études de la délétion clonale des lymphocytes T autoreactives. Fas L peut induire la mort cellulaire de deux façons: autocrine et paracrine. Ainsi, l'interaction de FasL avec Fas à la surface cellulaire induit un signal de transduction qui peut entraîner le suicide des lymphocytes T d'une façon autocrine. En outre, les lymphocytes T cytotoxiques utilisent FasL comme molécule effectrice de la mort cellulaire dans leur stratégies de destruction des cellules cibles, agissant ainsi d'une manière paracrine (Conrad Liles et al., 1996). Bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) est un protooncogène qui encode pour une protéine mitochondriale, laquelle inhibe l'apoptose (Carson et al., 1994; Raff et al., 1993; Reed et al., 1991; Schneider et al., 1997; Silvermann et al., 1993). Cette protéine peut inhiber l'apoptose de différentes façons notamment: son action antioxydante sur les dérivés oxygénés et son pouvoir d'inhibition de certaines protéases à cystéine (Martinou, 1995; Zamzami et al., 1998). Par ailleurs, il existe

un homologue de Bcl-2: la protéine A1 et qui est aussi impliquée dans le processus de la PCD. Cette molécule est exprimée par différentes cellules notamment: les neutrophiles (Chuang et al., 1998; Orlofsky et al., 1999). L'expression de A1 peut être induite dans les cellules endothéliales par certaines cytokines inflammatoires telles l'IL-1 β et le TNF- α (Karsan et al., 1996a). Différentes études ont démontré que A1 peut inhiber la mort cellulaire programmée de certains types cellulaires tels les neutrophiles et les cellules endothéliales (Hamasaki et al., 1998; Karsan et al., 1996b).

À ces modulateurs s'ajoute la famille des caspases (Cysteinyll Aspartate-specific Proteinase) ou ICE- protéases (Interleukin1 β - Converting enzyme- like protéases : ICE-like proteases). Ces dernières jouent un rôle important dans le processus d'apoptose (Alnemri et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1995; Muzio et al., 1996). En effet, différentes études ont démontré que l'activation des caspases induit l'apoptose. Les caspases sont des protéases à cystéine qui sont caractérisées par leur spécificité de clivage après les résidus d'acide aspartique (Cohen, 1997; Nicholson et Thornberry, 1997). Ces protéines sont synthétisées sous forme de proenzymes inactifs. Elles sont activées suite au clivage au niveau de sites spécifiques contenant l'acide aspartique. L'activation des caspases peut se dérouler selon une cascade de protéolyse. Ainsi, certaines caspases peuvent être activées par d'autres caspases, de même que par d'autres protéases qui ont la même spécificité. De plus, certaines caspases peuvent être activées par autoprotéolyse. L'activation des caspases durant l'apoptose entraîne le clivage des substrats cellulaires, notamment la poly (ADP-ribose) polymérase et les lamines. Ceci, précipite les changements morphologiques qui ont lieu au cours de la PCD.

Par ailleurs, les caspases peuvent être inhibées par différentes substances, notamment le CrmA (cytokine response modifier A). C'est un facteur du virus cowpox, il facilite l'infection virale en inhibant la réponse inflammatoire de l'hôte et l'apoptose. Le CrmA peut inhiber les caspases 1 et 3. Un autre inhibiteur des caspases est représenté par la p35; une protéine de 35 kDa du baculovirus. La

p35 inhibe les caspases 1-4. En outre, le XIAP; un membre de la famille IAP (inhibitor of apoptosis) peut aussi inhiber certaines caspases telles les caspases 3 et 7. Contrairement à la p35 et le CrmA, le XIAP est un suppresseur endogène de la mort cellulaire programmée. On dénombre au moins dix membres dans la famille des caspases.

La première protéase qui a été identifiée est la caspase-1 ou ICE. C'est une protéase qui clive le précurseur inactif de l'IL-1 β (pro-IL-1 β , 31kD) au niveau du site Asp-116-Ala-117. Ceci entraîne la génération de la forme mature et active de l'IL-1 β (17kD). Cette cytokine joue un rôle clé dans l'inflammation. Des études ont démontré que Bcl-2 inhibe la PCD grâce à son activité antioxydante et à son effet inhibiteur sur les protéases à cystéine ICE (Martinou, 1995). Le phénomène d'apoptose est un processus complexe, il fait intervenir différents mécanismes de régulation telle l'action des cytokines et des facteurs de croissance de même que celle des protooncogènes (figure 4). C'est un mécanisme physiologique essentiel qui permet d'éliminer les neutrophiles du site d'inflammation, et de résoudre ainsi efficacement les réactions inflammatoires.

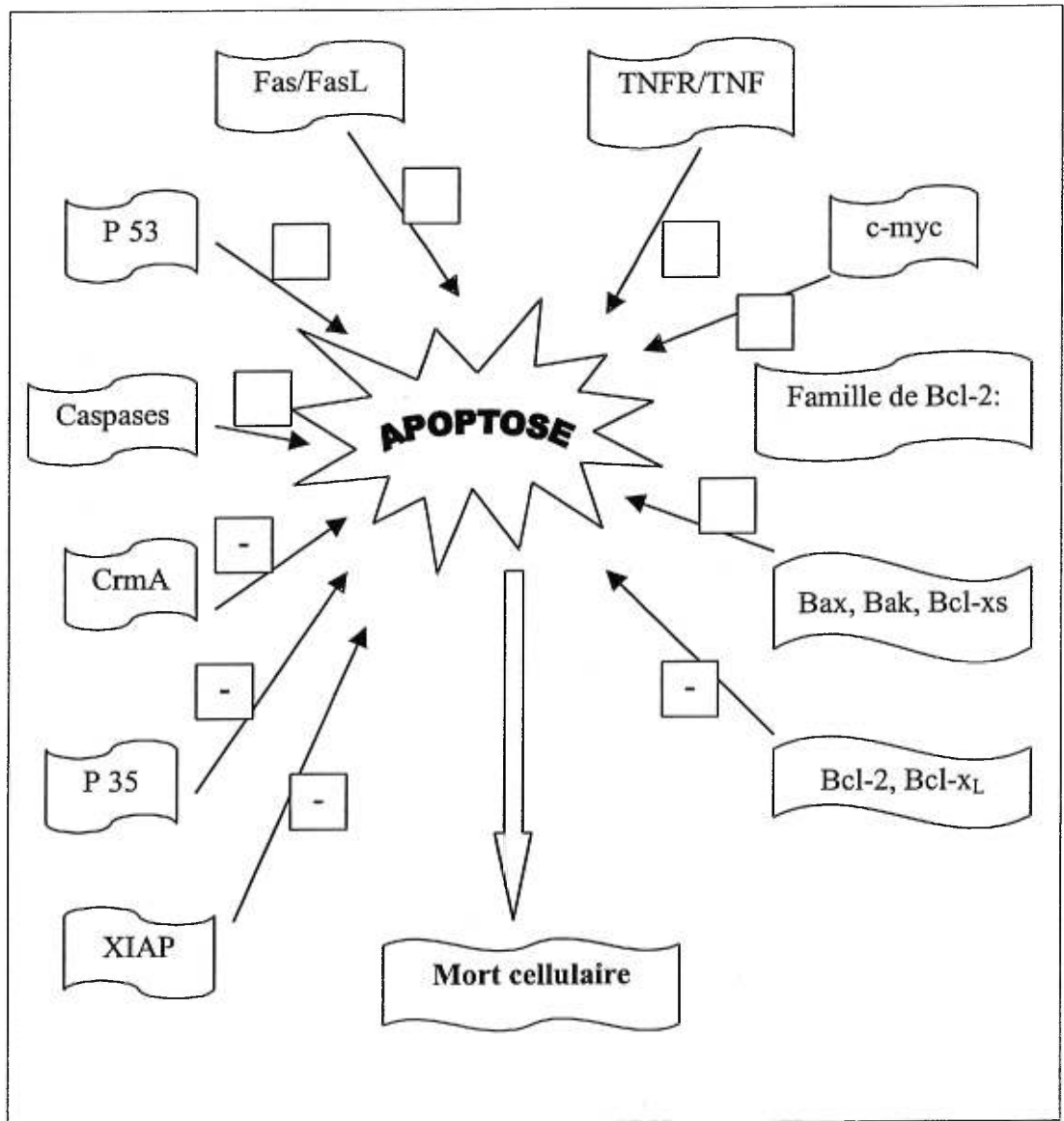


Figure 4. Schéma simplifié de certaines voies de régulation de l'apoptose.

3- Les granules

Les PMN présentent deux principaux mécanismes de bactéricidie. Le premier est un mécanisme dépendant de l'oxygène. Il fait intervenir des enzymes comme la myéloperoxydase des lysosomes et entraîne la production de dérivés toxiques de l'oxygène tel l'acide hypochloreux. Le second mécanisme est indépendant de l'oxygène. Il met en jeu des enzymes telles les hydrolases acides. Ces deux voies de bactéricidie ont un outil commun. Ce dernier est représenté par les granules. Effectivement, les granules contiennent une grande variété d'enzymes qui peuvent être utilisées par l'un ou l'autre des mécanismes de bactéricidie. (tableau-1)

Les granules des neutrophiles sont groupés en trois classes; les granules primaires ou azurophiles, les granules secondaires ou spécifiques et les granules tertiaires. Ces trois classes se distinguent entre elles par leur contenu et par leur ordre d'apparition chez les neutrophiles.

3-1 Les granules primaires (azurophiles)

Les granules primaires sont les premiers à se former chez le neutrophile au cours de son développement et sa différenciation. Elles renferment différentes enzymes dont on cite les principales; les hydrolases acides, les protéinases neutres, et les protéines cationiques.

Les hydrolases acides agissent à pH acide et sont représentées par différentes enzymes. Parmi ces dernières, il y a les cathepsines B et D qui peuvent dégrader la fibronectine ainsi que d'autres glycoprotéines de la matrice extracellulaire. En plus, la cathepsine D a un effet bactéricide. (Barrett et al., 1982; Ichimanu et al., 1990; Lesser et al., 1992; Trabandt et al., 1991).

Les protéinases neutres ont une activité optimale à pH neutre. Elles sont représentées par la myéloperoxydase, l'élastase et la cathepsine G. Cette dernière peut être bactéricide. L'élastase et la cathepsine G peuvent dégrader des protéines

de la matrice extracellulaire telles l'élastine et le collagène. Elles peuvent aussi cliver certaines protéines tel le complément et les immunoglobulines. La myéloperoxydase a un effet bactéricide très efficace. En effet, cette enzyme en présence du peroxyde d'hydrogène et d'halogénures tels l'iode et le chlore, induit la production de dérivés toxiques d'oxygène tel l'acide hypochlorique. (Christensen et Rothstein., 1985; Heck et al., 1990; Suter et al., 1988; Takahashi et al., 1988; Travis, 1988).

Les protéines cationiques agissent à pH alcalin. Dans ce groupe, on cite trois principales protéines; le lysozyme, la protéine BPI (bacterial permeability increasing protein) et les défensines. Le lysozyme est un agent bactéricide pour certaines bactéries, notamment les Gram+. Son effet bactéricide est dû à sa capacité de dégrader certaines parois bactériennes. La protéine BPI a aussi une activité bactéricide puisqu'elle peut fixer le LPS des bactéries Gram- et perforer leur membrane. Les défensines quant à elles accomplissent leur bactéricidie en dégradant les peptidoglycanes des bactéries Gram+. (Elsbach et Weiss., 1985; Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1985; Thomas et Lehrer., 1988).

3-2 Les granules secondaires (spécifiques)

Les granules secondaires sont spécifiques aux neutrophiles. Elles apparaissent après les granules azurophiles; au stade myélocyte du neutrophile. Elles contiennent différentes protéines dont les principales sont : le lysozyme qui a un effet bactéricide, la lactoferrine qui chélate le fer et bloque ainsi l'activité des enzymes bactériennes dépendantes du fer, et la collagénase qui est une métalloprotéinase. Elle peut être activée par des oxydants tel l'acide hypochlorique et dégrader le collagène. (Bullen et al., 1991; Ellison et Giehl, 1991; Netzel-Arnett et al., 1991; Weiss et peppin., 1986; Woessner, 1991).

3-3 Les granules tertiaires

Les granules tertiaires renferment divers constituants. Le mieux caractérisé de ces derniers est la gélatinase. Cette dernière est une metalloprotéinase qui, comme la collagénase, peut être activée par des oxydants lui permettant ainsi de dégrader le collagène. (Beaulieu et al., 1987; Murphy et al., 1982, 1991; Senior et al., 1991).

Tableau-1. Les principaux constituants des granules des neutrophiles.

Granules	Constituants
Primaires (azurophiles)	Myéloperoxydase β -Glucosaminidase α -Mannosidase Neuraminidase Estérase Cathepsine D Cathepsine G Elastase BPI Défensines Lysosyme
Secondaires (spécifiques)	Collagénase Lactoferrine Flavoprotéines Lysosyme Protéine de liaison de la vitamine B12 Récepteur de C3b Récepteur de peptides formylés Cytochrome b558
Tertiaires	Gelatinase Récepteurs de C3b Récepteurs de la laminine

Quelques principaux constituants des granules des neutrophiles (résumé modifié de Johnson et al., 1992).

4- Modulateurs des neutrophiles

Les PMN sont capables de synthétiser et sécréter plusieurs cytokines et facteurs de croissance. En plus, ils peuvent produire différents médiateurs d'inflammation. La synthèse et la libération de ces facteurs par les neutrophiles peuvent être induites par divers stimulus, telles les endotoxines et plusieurs cytokines notamment le $TNF\alpha$ et le GM-CSF (Dahinden et al., 1988; McColl et al., 1991; McDonald et al., 1993). Une fois libérées, ces cytokines vont agir sur le neutrophile lui-même (action autocrine) ou sur des cellules avoisinantes (action paracrine). Afin d'agir sur les cellules cibles, ces facteurs doivent d'abord interagir avec des récepteurs spécifiques. Ces interactions déclenchent généralement, un ensemble d'événements intracellulaires dépendants les uns des autres. Parmi ces événements on cite: l'induction de la synthèse de nouvelles cytokines, le déclenchement de signaux de mouvements cellulaires, l'activation d'enzymes membranaires ainsi que plusieurs autres effets physiologiques.

En plus de l'action de leurs propres médiateurs, les neutrophiles peuvent subir l'action de nouveaux facteurs produits par différentes cellules. Ces cytokines et facteurs de croissance sont libérés suite à une stimulation. Ils jouent un rôle important dans les interactions cellulaires lors des réponses immunitaires.

4-1 Les facteurs produits par les neutrophiles

Les principales cytokines et facteurs de croissance produits par les neutrophiles sont : l'IL-1 α et β (Interleukine-1 α et β), le $TNF\alpha$ (Tumor necrosis factor α), l'IL-6, IFN α (Interféron α), le TGF β (Transforming growth factor β), l'IL-8 ainsi que les CSFs (Colony-stimulating factors).

4-1-1 *L'interleukine-1 α et β*

L'IL-1 est représentée par deux protéines, l'IL-1 α et l'IL-1 β . Ces deux polypeptides présentent approximativement 25% d'homologie au niveau de leurs acides aminés et se lient aux mêmes récepteurs. Leur précurseur de 31 kDa, est clivé par des enzymes présentes aux sites inflammatoires telles la collagénase et l'élastase. Ce clivage donne naissance à des protéines ayant un poids moléculaire approximatif de 17 kDa. L'IL-1 présente deux types de récepteurs; le premier de poids moléculaire de 80 kDa désigné comme récepteur de type I (IL-1RtI), le second a un poids moléculaire de 68 kDa et est nommé récepteur de type II (IL-1RtII).

L'IL-1 peut être produite par différents types de cellules, notamment les fibroblastes, les monocytes, les macrophages, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les cellules gliales et les neutrophiles (Dinarello, 1991). La production de l'IL-1 par les neutrophiles peut être induite par divers agents. Parmi ces derniers on cite; les lipopolysaccharides (LPS), les particules inertes tel les microcristaux, ainsi que certaines cytokines tel le TNF α et le GM-CSF (Dinarello, 1991).

L'IL-1 est fortement impliquée dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Elle peut agir sur différentes cibles cellulaires tels les fibroblastes dont elle induit la prolifération et la sécrétion de l'IL-6, la collagénase et les prostaglandines. Chez les cellules endothéliales, l'IL-1 induit la libération du TNF et l'expression des molécules d'adhésion. Son action sur les monocytes et les neutrophiles se traduit par l'induction de la sécrétion de plusieurs cytokines telles l'IL-8 et l'IL-1. En outre, elle peut agir en synergie avec le GM-CSF sur les précurseurs hématopoïétiques en induisant la prolifération cellulaire. (Akira et al., 1990; Dinarello, 1991; Lindemann et al., 1988; Raines et al., 1989; Tiku et al., 1986;).

4-1-2 *Le facteur de nécrose tumorale α (TNF α)*

Le TNF α ou cachectine peut être produit par une variété de cellules comprenant les monocytes, les macrophages, les lymphocytes activés, les cellules

NK (Natural Killer), les cellules endothéliales, et les neutrophiles. Ces derniers peuvent sécréter le TNF α suite à une stimulation par le LPS (Akira et al., 1990).

Le poids moléculaire du TNF α sous des conditions dénaturantes est de 17 kDa. Il existe deux types de récepteurs pour le TNF: le type A ou type α (TNFR-II) ayant un poids moléculaire de 75kDa, et le type B ou type β (TNFR-I) dont le poids moléculaire est de 55kDa. Ces deux récepteurs peuvent être présents séparément ou ensemble sur une même cellule. Ils peuvent lier aussi bien le TNF α que le TNF β .

Comme l'IL-1, le TNF- α est un médiateur pro-inflammatoire. Il agit sur une grande variété de cellules. Ainsi, il peut agir sur les lymphocytes T et induire leur prolifération, la production de l'IL-2 et l'apparition des récepteurs de l'IL-2. Le TNF- α est un puissant activateur des macrophages. Son action se traduit par l'induction de la production de PGE2, IL-1, IL-6, IL-8, et l'IL-10, et la libération des lysozymes. Le TNF- α affecte aussi les neutrophiles en les activant. Il stimule la dégranulation, la production du peroxyde d'hydrogène, la synthèse des leucotriènes et la libération de l'acide arachidonique. (Akira et al., 1990; Atkinson et al., 1988; Dipersio et al., 1988; McColl et al., 1990; Richter et al., 1989; Roubin et al., 1987).

4-1-3 L'interféron α

La famille de l'IFN α consiste en 24 sous-types dont les gènes présentent 95% d'homologie entre eux. L'IFN α a un poids moléculaire approximatif de 16 kDa. Il peut être produit par différentes cellules notamment les lymphocytes, les monocytes, les macrophages (Pestka, 1983 et 1986). De même, les neutrophiles peuvent synthétiser et sécréter l'IFN α suite à une stimulation par le G-CSF.

Deux récepteurs de l'IFN α ont été identifiés. Un récepteur qui est apparemment spécifique pour l'IFN α de sous-type B (IFN α B). Il est appelé le récepteur de l'IFN α B (IFN α BR) et a un poids moléculaire de 95-110kDa. Le deuxième récepteur a un poids moléculaire approximatif de 102 kDa, il peut lier l'IFN α et l'IFN β , il est désigné comme récepteur de l'IFN α/β (IFN α/β R).

L'INF- α est caractérisé principalement par son activité antivirale, il a aussi un effet antitumoral. De plus, il peut stimuler l'activité des macrophages et des cellules NK. (Samuel, 1991; Shirafuji et al., 1990).

4-1-4 L'interleukine-8

L'IL-8 ou NAP-1 (neutrophil activating protein-1), appartient à la famille des chémokines qui sont caractérisées par leur faible poids moléculaire. Cette famille comprend deux groupes de chémokines: le groupe α ou C-X-C et le groupe β ou C-C. L'IL-8 fait partie du groupe C-X-C et a un poids moléculaire de 8 kDa. Plusieurs cellules peuvent sécréter l'IL-8 tel est le cas des monocytes, macrophages, cellules NK, fibroblastes, cellules endothéliales, lymphocytes T, et des neutrophiles (Oppenheim et al., 1991).

L'IL-8 induit son activité biologique en se fixant sur ses récepteurs spécifiques. Ces derniers sont représentés par deux types. Le récepteur de type I, A ou α est spécifique pour l'IL-8, alors que le type II, B ou β peut lier l'IL-8, le GRO et le MIP-2 (Oppenheim., 1991).

L'IL-8 peut agir sur différents types de cellules mais les neutrophiles constituent sans nul doute sa cible privilégiée. L'IL-8 exerce un puissant pouvoir chimiotactique sur les PMN. L'IL-8 est un activateur des neutrophiles, elle stimule la dégranulation et la production du LTB₄ et du superoxyde anion. De plus, l'IL-8 augmente l'expression des molécules d'adhésion CD11b/CD18 et CD11c/CD18 et par suite l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales. Comme l'IL-1, l'IL-8 joue un rôle important lors des réactions inflammatoires. (Bazzoni et al., 1991; Carveth et al., 1989; Detmers et al., 1990; Oppenheim et al., 1991; Peveri et al., 1988; Schall et al., 1991; Schroeder et al., 1989).

4-1-5 L'interleukine-6

L'IL-6 est une protéine multifonctionnelle qui peut être produite par une grande variété de cellules tel les fibroblastes, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et B, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les ostéoblastes de même que par les neutrophiles (Akira et al., 1990).

Le poids moléculaire de l'IL-6 est de 26 kDa. Son récepteur existe sous forme d'un complexe constitué de deux glycoprotéines membranaires. La glycoprotéine de 80 kDa constitue la protéine récepteur qui lie l'IL-6 (IL-6R), alors que la glycoprotéine de 130 kDa (gp130) est responsable du signal de transduction.

L'IL-6 affecte de nombreuses cibles cellulaires, notamment les lymphocytes B chez qui elle peut induire la production des immunoglobulines. Elle est aussi impliquée dans la génération des lymphocytes T cytotoxiques (Akira et al., 1990; Okada et al., 1988)⁹. De plus, elle peut agir en synergie avec d'autres cytokines telles l'IL-3, le G-CSF, le M-CSF et le GM-CSF lors de l'hématopoïèse et par la suite affecter différents stades de la différenciation des cellules de la moelle osseuse. L'IL-6 fait aussi partie des médiateurs pro-inflammatoires. Elle accroît la production des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes. Ainsi elle peut induire la génération de la serum amyloid A (SAA), la C-réactive protéine (CR), l'haptoglobuline, l' α -1 anti-chymotrypsine, le fibrinogène, et l' α -1 anti-trypsin. (Akira et al., 1990; Cicco et al., 1990; Gauldie et al., 1987; Hirano et al., 1986; Ikebuchi et al., 1987; Kawano et al., 1988; Lotz et al., 1988; Okada et al., 1988; Van Damme et al., 1987).

4-1-6 Les Colony-Stimulating Factors

Les CSFs ont été caractérisés par leur habilité de stimuler la formation des colonies à partir des cellules progénitrices. Le G-CSF et le M-CSF peuvent être produits par les neutrophiles ainsi que par d'autres types cellulaires notamment, les monocytes et les fibroblastes. La production du G-CSF et du M-CSF par les neutrophiles peut être induite après une stimulation au GM-CSF. Ces deux cytokines ont respectivement des poids moléculaires de 21 kDa et 90 kDa. Elles agissent sur les cellules cibles après interaction avec leurs récepteurs spécifiques (Fukunaga et al., 1990; Sherr, 1990).

Le G-CSF stimule la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices des granulocytes plus spécialement des neutrophiles. De même, il prolonge la survie des PMN matures et accroît leurs capacités fonctionnelles. Le M-CSF stimule la survie, la prolifération et la différenciation des mononucléaires phagocytes. Il est aussi impliqué dans la régulation des cellules reproductrices

femelles et dans la différenciation des ostéoclastes. (Daiter et Pollard., 1992; Demetri et Griffin., 1991; Lindemann et al., 1989; Roth et Stanley., 1992; Stanley et al., 1983; Yoshida et al., 1990).

4-1-7 *Le Transforming Growth Factor β*

Le TGF β est un facteur de croissance dont l'action varie suivant les cellules cibles. Il peut être sécrété par différentes cellules telles les plaquettes qui constituent sa source majeure. Les neutrophiles sont aussi capables de produire du TGF β . Son poids moléculaire, sous conditions dénaturantes est de 25 kDa. Il présente trois types de récepteur; type I, type II et type III (bêta-glycan). Leurs poids moléculaires respectifs sont de; 53 kDa, 70-85 kDa et 250-350 kDa (Miyazono et al., 1993).

Le TGF- β 1 est impliqué dans divers processus biologiques, il peut affecter la croissance et la différenciation d'une grande variété de cellules. De plus, il peut induire la synthèse et la sécrétion de plusieurs protéines de la matrice extracellulaire, de même que la production de certains inhibiteurs des protéases tel le TIMP (Tissue inhibitor of metalloprotease). Il stimule l'expression de certaines molécules d'adhésion et de certains récepteurs de surface. En outre, le TGF- β 1 peut prolonger la survie des neutrophiles et stimuler leurs fonctions incluant la phagocytose et la génération du peroxyde d'hydrogène (Lagraoui et Gagnon., 1997). Il exerce aussi un pouvoir chimiotactique important sur les PMN. (Fava et al., 1991; Grotendorst et al., 1989; Hooper., 1991; Lagraoui et Gagnon., 1997; Massagué., 1990; Sporn et al., 1987; Suzuki et al., 1994).

4-2 *Les facteurs de croissance*

Plusieurs cytokines et facteurs de croissance peuvent moduler la survie des neutrophiles. Parmi ces facteurs on cite, le GM-CSF, le G-CSF, l'IL-2, l'IL-3, et le TGF β 1. (tableau-2)

Tableau-2. Facteurs de croissance régulant l'hématopoïèse et la survie des PMN.

<i>Facteurs</i>	<i>Cellules / lignées cibles</i>
GM-CSF	CFU-GEMM, CFU-GM, Neutrophile
G-CSF	CFU-G, Neutrophile
M-CSF	Cellule souche pluripotente
IL-6	Cellule souche pluripotente, CFU- GEMM, CFU-GM
IL-3	Cellule souche pluripotente, CFU-GEMM, CFU-GM
IL-2	Neutrophile
TGF- β 1	Neutrophile

CFU-GEMM : Colony-forming unit for granulocytes, erythrocytes, monocytes, and megakaryocytes. G :Granulocytes, M : monocytes, GM : Granulocytes et monocytes. CSF : Colony-Stimulating Factor, TGF- β 1 : Transforming Growth Factor β 1, IL : Interleukine.

Références: (Gordon, 1994; Lagraoui et Gagnon., 1997; Pericle et al., 1994)

4-3 Les facteurs activateurs

L'activation des neutrophiles est une étape importante lors d'une réponse immunitaire. Elle nécessite l'intervention d'une grande variété de cytokines. L'interaction de ces cytokines avec leurs récepteurs déclenche une cascade d'événements physiologiques. Parmi ces derniers on cite; l'induction de la synthèse de nouvelles cytokines, le chimiotactisme, la dégranulation, l'activation des enzymes. Un grand nombre de cytokines sont impliquées dans l'activation des neutrophiles incluant; l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le $\text{TNF}\alpha$, le $\text{TGF}\beta 1$, GRO, l'ENA-78, le PDGF, le PAF, le NAP-2 et le PF-4. (tableau-3)

Tableau-3. Les principaux facteurs impliqués dans l'activation des neutrophiles.

<i>Facteurs</i>	<i>Principales actions sur le neutrophile</i>
IL-1	↑ la respiration oxydative et la dégranulation
IL-6	Activation de la NADPH oxydase
TNF- α	↑ de la respiration oxydative, la Dégranulation, l'adhésion, et la production de HOCl.
IL-8	Chimiotactisme, ↑ la respiration oxydative et la dégranulation.
NAP-2	Chimiotactisme et ↑ la dégranulation.
PAF	Chimiotactisme et accumulation.
PF-4	Chimiotactisme
PDGF	Chimiotactisme, ↑ la phagocytose et la dégranulation.
LTB4	Chimiotactisme
GRO $\alpha/\beta/\gamma$	Chimiotactisme
C5a	Chimiotactisme, ↑ la dégranulation et la production du superoxyde.
ENA-78	Chimiotactisme et ↑ la dégranulation.
TGF- β 1	Chimiotactisme, ↑ la respiration oxydative et la phagocytose.
GM-CSF	↑ L'adhésion, la respiration oxydative, l'ADCC et la dégranulation.
G-CSF	↑ l'ADCC, le chimiotactisme et la dégranulation.

Références: (Adachi et al., 1993a; Ahuja et al., 1992; Ahuja et Murphy., 1996 Bickel, 1993; Brach et al., 1992; Cairo, 1991a; Cairo et al., 1991b; Carolan et

Casale., 1990; Cox et al., 1992; Haskill et al., 1990; Koch et al., 1994; Lagraoui et Gagnon., 1997; Parekh et al., 1994; Rathanaswami et al., 1993; Sullivan et al., 1987; Walz et Baggiolini., 1990; Walz et al., 1991; Weisbart et al., 1986; Welt et al., 1987; Wong et al., 1985; Yang et al., 1986)

5- Les récepteurs

Les neutrophiles sont fortement impliquées dans la défense de l'hôte contre les microorganismes. En effet, ces cellules sont les premières à arriver au site d'infection. Elles sont relayées par la suite par d'autres cellules tel les macrophages et les lymphocytes. Les neutrophiles utilisent différents mécanismes de lutte anti-infectieuse et leur action se déroule en différentes étapes. Tout d'abord, les PMN répondent à un signal chimioattractant généré par d'autres cellules ou par l'agent infectieux. Ensuite ils quittent la circulation sanguine pour se rendre au site d'infection. Une fois dans le tissu lésé, les neutrophiles activés commencent leur travail de phagocytes. Ils sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines qui vont activer les autres cellules immunitaires. Ils sont à leur tour stimulés par divers facteurs et cytokines libérés par les cellules avoisinantes. Ce processus de défense nécessite une variété d'interactions entre les PMN et différentes molécules intervenant lors de l'infection. Effectivement, afin d'interagir avec ces molécules, les neutrophiles mettent en jeu un ensemble de récepteurs. Ces derniers, après interaction avec leurs ligands, induisent des signaux intracellulaires qui vont moduler l'activité des neutrophiles. Les principaux récepteurs présents sur les neutrophiles sont représentés surtout par trois groupes majeurs: les récepteurs des facteurs chimiotactiques, les récepteurs d'adhésion et les récepteurs des fragments Fc.

5-1 Les récepteurs des facteurs chimioattractants

Les facteurs chimiotactiques interviennent lors des premières étapes de la réponse des neutrophiles. Ils attirent ces cellules au niveau du site de la blessure.

Ils peuvent être représentés par des cytokines ou par d'autres facteurs tel le complément ou des dérivés bactériens.

Les cytokines qui ont un pouvoir chimioattractant sur les cellules sont appelées chemokines. Dans l'attraction des PMN au site d'infection, on retrouve surtout la famille des chemokines C-X-C. Ces dernières sont l'IL-8, GRO α , ENA-78, NAP-2 et PF-4 (Ahuja et al., 1992; Ahuja et Murphy., 1996; Haskill et al., 1990; Walz et Baggiolini., 1990; Walz et al., 1991).

D'autres molécules peuvent avoir un effet chimioattractant sur les neutrophiles. Parmi ces molécules on note, les peptides du complément ou anaphylatoxines surtout le C5a, les dérivés bactériens tel le FMLP (formyl-met-leu-phe), le PAF, le PDGF, et le TGF- β (Bickel, 1993; Lagraoui et Gagnon., 1997; Parekh et al., 1994).

Les facteurs chimiotactiques induisent leurs signaux cellulaires lors de leur interaction avec leurs récepteurs. Ces derniers sont caractérisés par la présence de sept régions transmembranaires et trois boucles extracellulaires. Ces récepteurs membranaires sont associés aux protéines G. (Amatruda et al., 1993; Beckmann et al., 1991; Boulay et al., 1990; Nakamura et al., 1991; Rollins et al., 1991).

5-2 Les récepteurs d'adhésion

Les récepteurs d'adhésion jouent un rôle important dans la migration des cellules, la réponse immunitaire et la communication intercellulaire. Ce sont des protéines transmembranaires qui permettent soit des interactions directes cellule-cellule ou indirectes à travers la matrice extracellulaire. Il existe quatre grandes familles de molécules d'adhésion; la superfamille des immunoglobulines Ig (CAM : intercellular adhesion molecules), les cadhérines, les intégrines et les sélectines. Dans le cas des neutrophiles, on note une importante implication de trois de ces grandes familles; les intégrines, les sélectines et la superfamille des immunoglobulines.

5-2-1 Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines membranaires. Elles participent à l'adhérence intercellulaire et à celle entre cellule et matrice extracellulaire. Cette famille se divise en deux sous-familles; la sous-famille $\beta 2$ ou CD11/CD18 et la sous-famille $\beta 1$ ou VLA (very late antigen). C'est la sous-famille $\beta 2$ qui est fortement impliquée dans les fonctions des neutrophiles (Diacovo *et al.*, 1996). Dans ce groupe, la chaîne $\beta 2$ (CD18) est commune alors que la chaîne α peut varier (CD11). En effet, il existe différentes chaînes α , lesquelles sont : αL (CD11a), αM (CD11b) et αX (CD11c) (Arnaout *et al.*, 1988; Corbi *et al.*, 1987, 1988a; Larsen *et al.*, 1989). Les deux principales molécules de cette sous-famille sont; la molécule CD11a/CD18 ou LFA1 (leukocyte function antigen) qui peut se lier à ICAM1, ICAM2 et ICAM3 de la superfamille des Ig et la molécule CD11b/CD18 ou MAC1 ou Mo1. Cette dernière peut se lier à la molécule ICAM-1, aux peptides du complément tels le C3bi et le C4b, de même qu'à d'autres molécules tel le fibrinogène et le LPS (Altieri *et al.*, 1988; Beller *et al.*, 1982; Wright *et al.*, 1988).

5-2-2 Les sélectines

La famille des sélectines est impliquée dans l'adhérence des cellules à l'endothélium vasculaire. Elle contient trois membres : les sélectines E, L, et P. La sélectine E, exprimée sur les cellules endothéliales induit l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (Dobrina *et al.*, 1989). Son expression est induite après stimulation par l'IL-1, le $TNF\alpha$ et/ou le LPS (Bevilacqua *et al.*, 1987; Pober *et al.*, 1986a). La sélectine P est exprimée au niveau des plaquettes (dans les granules α) (Hsu-Lin., 1984) et des cellules endothéliales (dans les corps de Weibel-Palade) (McEver *et al.*, 1989). L'activation de ces cellules par l'héparine, la thrombine ou les radicaux oxygénés induit la translocation de la sélectine P à la surface des cellules (Hattori *et al.*, 1989; Patel *et al.*, 1991; Toothill *et al.*, 1990). Cette sélectine permet aussi l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (Geng *et al.*, 1990). La sélectine L est présente sur tous les leucocytes. Elle est impliquée

dans leur adhérence à l'endothélium et dans la migration des PMN au niveau des tissus (Jutila et al., 1989; Kishimoto et al., 1991; Smith et al., 1991a; Watson et al., 1991).

5-2-3 La superfamille des immunoglobulines Ig

Cette famille est constituée de différentes protéines dont la plupart sont membranaires. On cite dans ce groupe : ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) et PECAM-1 (CD31). Ce sont surtout les molécules ICAM qui sont fortement impliquées dans l'adhésion des neutrophiles. En effet, les molécules ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) et ICAM-3 (CD50) peuvent se lier à la molécule LFA-1 de la famille des intégrines. De même, ICAM-1 peut se lier à l'intégrine Mac-1, mais avec une faible affinité comparé à LFA-1 (Diamond et al., 1990; Smith et al., 1989). L'interaction avec ces ligands, induit la migration des neutrophiles vers les tissus à travers l'endothélium.

ICAM-1 est exprimée par une grande variété de cellules notamment les leucocytes, les fibroblastes, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Son expression par les cellules peut être augmentée après stimulation par certaines cytokines tel l'IL-1, le TNF et l'IFN γ (Dustin et al., 1986; Pober et al., 1986b). ICAM-2 est présente sur les cellules endothéliales, les lymphocytes et les monocytes (Staunton et al., 1989). Par contre, elle existe en faible quantité sur les neutrophiles (De Fougerolles et al., 1991). La molécule ICAM-3 est exprimée sur tous les leucocytes incluant les neutrophiles (Fawcett et al., 1992; Vazeux et al., 1992).

5-3 Les récepteurs CD44

CD44 est une protéine transmembranaire sulfatée et acide, ayant un poids moléculaire de 90 kD. Cette protéine présente différentes isoformes, elle reconnaît l'hyaluronate présent dans les matrices extracellulaires et l'endothélium des veinules post-capillaires (Aruffo et al., 1990; Miyake et al., 1990). Ce récepteur

est exprimé sur les lymphocytes, les granulocytes, les cellules épithéliales et les fibroblastes.

5-4 Les récepteurs de Fc γ

Les récepteurs de Fc γ se lient de façon spécifique à certaines régions des fragments Fc des immunoglobulines. Ils jouent un rôle important dans plusieurs fonctions des neutrophiles notamment, la dégranulation, la réaction oxydative et l'ADCC. Il existe trois types de récepteurs Fc γ , I, II et III (Fanger et al., 1989; Unkeless et al., 1989). Le récepteur Fc γ RI (CD64) présente une haute affinité et a un poids moléculaire de 72 kD. Il est exprimé sur les monocytes et peut être induit sur les éosinophiles et les neutrophiles après stimulation par l'IFN γ (Wardlaw et Walsh., 1994). L'interaction du Fc γ RI avec son ligand induit un signal d'activation qui entraîne une réaction oxydative. Le récepteur Fc γ RII (CD32) a un poids moléculaire de 40 kD. Il est de faible affinité et est présent sur différentes cellules incluant les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les plaquettes et les cellules B. Le Fc γ RII est impliqué dans plusieurs fonctions des neutrophiles tel la liaison des complexes immuns, la dégranulation, la réaction oxydative et la phagocytose (Kimberly et al., 1990; Tosi et Berger, 1988). Le récepteur Fc γ RIII (CD16) présente aussi une faible affinité et a un poids moléculaire de 50-70 kD. Il est exprimé sur les neutrophiles et les cellules NK, il peut être induit sur les monocytes et les éosinophiles après stimulation par l'IFN γ (Wardlaw et Walsh., 1994). De même, le GM-CSF et l'IFN γ peuvent accroître l'expression de ce récepteur chez les PMN (Buckle et Hogg, 1989). Il existe deux isoformes de CD16; le CD16-1 et le CD16-2 (Ravetch et Perussia, 1989; Scallon et al., 1989). Le CD16-1 est exprimé sur les neutrophiles et est fixé sur leur membrane par une liaison PIG (phosphatidyl-inositol-glycan). Le CD16-2 est une protéine transmembranaire exprimée sur les cellules NK. Le récepteur CD16-1 permet la liaison des complexes immuns et est impliqué dans le processus de la dégranulation (Kimberly et al., 1990; Tosi et Berger, 1988).

6- Voie d'activation intracellulaire des neutrophiles.

La modulation de l'activité cellulaire nécessite des interactions entre ligands et récepteurs. Ces interactions induisent des signaux intracellulaires qui vont provoquer tout un remaniement moléculaire au sein des cellules. Ceci met en jeu plusieurs processus de phosphorylation et déphosphorylation des protéines. Il existe différentes voies de signalisations au niveau membranaire. Certaines voies font intervenir les protéines tyrosine kinase (PTK) (Gutkind et Robbins, 1989; Perlmutter et al., 1988), c'est le cas par exemple des cytokines qui peuvent impliquer durant leur action des PTK membranaires ou cytoplasmiques. D'autres voies mettent en jeu les protéines G et induisent l'activation des protéines kinases C (PKC) (Huang, 1989; Pontremoil et al., 1990). Cette voie intervient lors de l'interaction des facteurs chimiotactiques avec leurs récepteurs.

Dans le cas du neutrophile, la présence de récepteurs des facteurs chimiotactiques entraîne la mise en jeu de la voie des protéines G. En effet, ces récepteurs présentent sept régions transmembranaires et trois boucles extracellulaires et sont associés aux protéines G. L'activation de cette voie engendre des changements importants au niveau de la production des seconds messagers. Parmi ces derniers on cite, l'inositol triphosphate (IP_3), le Ca^{2+} , l'AMPc, le diacylglycérol (DAG), l'acide arachidonique (AA) et l'acide phosphatidique (PA) (Di Virgilio et al., 1990; Omann et al., 1987; Reibman et al., 1990; Traynor-Kaplan, 1990). La production de ces seconds messagers est induite par l'activation des phospholipases. Cette activation a lieu après interaction entre récepteurs associés aux protéines G et facteurs chimiotactiques (figure 5). Les phospholipases impliquées sont; la phospholipase A_2 (PLA_2) qui induit la production de l'acide arachidonique (AA) par hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) et/ou de la phosphatidyléthanolamine (PE) (Lambeth, 1988), la phospholipase C (PLC) qui génère le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP_3) par hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP_2) (Lambeth, 1988; Traynor-Kaplan, 1990), la phospholipase D (PLD) qui entraîne

la production de l'acide phosphatidique (PA) et la choline par hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) (Agwu et al., 1989; Agwu et al., 1991; Kanaho et al., 1991; Mullmann et al., 1990) . L'activation de ces phospholipases, PLA2, PLC et PLD, engendre des signaux intracellulaires qui affectent différentes fonctions du neutrophile. Les fonctions influencées par cette activation sont, l'adhésion, l'agrégation, la chimiotaxie, la libération du contenu des granules ainsi que l'activation de la réaction oxydative.

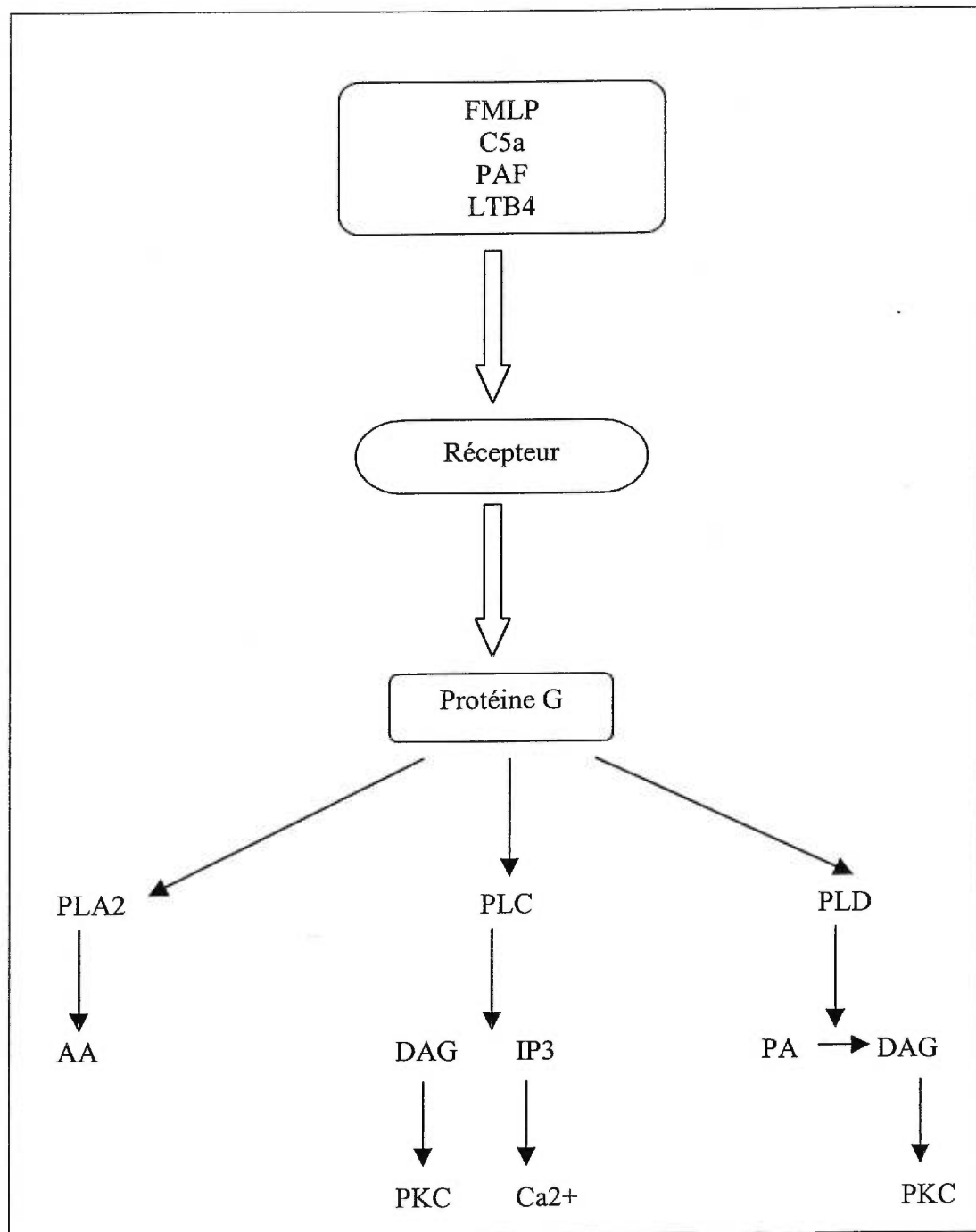


Figure 5. Schéma récapitulatif de la voie de signalisation intracellulaire impliquant les phospholipases: PLA2, PLC et PLD. L'interaction des facteurs chimiotactiques avec leurs récepteurs associés aux protéines G induit l'activation des phospholipases. Une fois activées, ces phospholipases vont alors participer à

la formation des seconds messagers tels le DAG, l'IP₃, le PA, l'AA. Ces remaniements moléculaires vont permettre la mobilisation calcique et l'activation de la PKC.

Les protéines G ont une activité GTPase et sont représentées par deux classes distinctes. La classe des protéines G hétérotrimériques qui sont constituées de sous unités; α , β et γ et la classe des protéines G monomériques appelées aussi les protéines G à faible poids moléculaire ou la superfamille *ras* (Bourne et al., 1990). Les deux classes de protéines G sont impliquées dans les signaux intracellulaires engendrés lors de la chimiotaxie (Bokoch, 1990). Les protéines G entraînent l'activation de la phospholipase C. Ceci engendre la conversion du PIP₂ en IP₃ et DAG (Lambeth, 1988; Traynor-Kaplan, 1990). L'IP₃ à son tour induit la mobilisation du calcium intracellulaire des mitochondries et du réticulum endoplasmique. L'IP₄, dérivé de l'IP₃ permet l'ouverture d'un canal calcique membranaire qui va engendrer un influx du calcium dans la cellule (Di virgilio et al., 1990; Wymann et al., 1987). Ceci entraîne une augmentation du calcium intracellulaire et par suite l'activation d'un ensemble de protéines et /ou enzymes qui dépendent du calcium telles la calmoduline et la calcineurine (phosphatase 2B) (Huang, 1989). Le DAG peut activer la protéine- kinase C (PKC). Cette dernière est alors transloquée du cytoplasme vers la membrane et est impliquée dans l'activation de certaines protéines tyrosine kinases cytoplasmiques (PTK).

Tous ces remaniements moléculaires induits suite à l'interaction entre facteurs chimiotactiques et récepteurs, influencent l'activité des neutrophiles. L'activation des PKC peut stimuler ces cellules comme elle peut au contraire déclencher un rétrocontrôle négatif sur elles. Effectivement, les PKC activées peuvent induire en plus des signaux positifs des signaux négatifs qui vont influencer l'état d'activation des neutrophiles. Ces signaux négatifs peuvent affecter différentes étapes, notamment l'expression ou l'affinité du récepteur, le couplage protéine G – PLC, la synthèse de l'IP₃ ainsi que la mobilisation calcique. Ceci place le neutrophile activé dans un état réfractaire temporaire vis à vis d'un second signal.

II- Rôle du neutrophile dans la défense de l'hôte

La défense de l'organisme contre les maladies infectieuses repose sur deux processus majeurs; l'immunité non spécifique (naturelle ou innée) et l'immunité spécifique (acquise). L'immunité naturelle constitue la première étape de protection de l'hôte contre les agressions. Elle met en jeu différentes cellules notamment les neutrophiles, les macrophages et les cellules NK (cellules tueuses). L'immunité spécifique entre en jeu en cas d'échec de l'immunité naturelle. Elle déclenche alors une réaction spécifique dirigée contre le germe en question. D'autres cellules seront alors impliquées dans ce processus tel les lymphocytes T et les lymphocytes B. De plus, ces cellules vont garder une mémoire de l'agent infectieux et prévenir ainsi toute réinfection ultérieure par le même pathogène. Ces deux processus majeurs de l'immunité se complètent dans leurs actions. En effet, les macrophages présentent les antigènes aux lymphocytes T. En outre les lymphocytes T sécrètent des cytokines qui vont stimuler les cellules phagocytaires. De même, les anticorps produits par les lymphocytes B jouent un rôle important dans l'identification des cellules cibles par les phagocytes.

Les neutrophiles jouent un rôle fondamental dans cette défense de l'hôte. Ces cellules peuvent intervenir dans différentes infections. Elles ont une grande variété de cibles tel les bactéries, les champignons, les cellules tumorales et les cellules infectées par des virus. Les PMN sont les premières cellules à être recrutées au site d'infection. Avant de pouvoir exercer leur rôle de phagocytes, ces cellules doivent passer par différentes étapes. Elles subissent l'action de divers médiateurs solubles sécrétés dans leur environnement. En plus, elles vont interagir avec d'autres cellules telles les plaquettes, les cellules endothéliales et les lymphocytes T. Cette interaction peut se faire directement par un contact cellule-cellule ou indirectement via les facteurs solubles libérés dans le milieu.

Une fois activés, les neutrophiles vont alors pouvoir exercer leurs différentes fonctions incluant, la migration au niveau du site inflammatoire, la production de

réactifs oxygénés, la dégranulation et la phagocytose. Les différentes activités des PMN sont régulées par une grande variété de médiateurs et cytokines. Ces derniers, vont induire soit une activation soit une inhibition de ces cellules selon le stade de la réponse immunitaire. À ces médiateurs s'ajoutent d'autres facteurs qui peuvent faciliter la tâche des neutrophiles tels les anticorps et certains dérivés du complément. Ils interviennent dans le phénomène de l'opsonisation, laquelle joue un rôle important dans la phagocytose. Elle facilite l'identification et la capture des cellules cibles par les neutrophiles (Hill et al., 1984; Proctor et al., 1984; Sawyer et al., 1989).

1- Chimiotaxie

Lors d'une réaction inflammatoire, les neutrophiles quittent la circulation sanguine vers le site de l'inflammation. Cette migration est générée grâce à différents signaux chimiotactiques. Ces derniers peuvent être, des dérivés bactériens tel le FMLP, des peptides du complément tels le C5a, des facteurs cellulaires tels le LTB₄ et le PAF ou des chémokines (C-X-C) tels l'IL-8 et GRO $\alpha/\beta/\gamma$. L'interaction de ces facteurs avec leurs récepteurs associés aux protéines G induit un signal de transduction. Ce dernier met en jeu un ensemble de remaniements moléculaires notamment, l'activation des phospholipases, la formation de l'IP₃, la mobilisation calcique et l'activation des protéines kinase C. Ces signaux entraînent une réorganisation du cytosquelette, laquelle aboutit à un déplacement améboïde orienté des neutrophiles (Howard et Oresajo, 1985; Watts et al., 1991). Ce déplacement s'effectue selon un gradient précis; les cellules vont migrer vers les plus fortes concentrations des facteurs chimiotactiques. Lors de la migration, les cellules subissent des modifications morphologiques. Tout d'abord, il y a formation de lamellipodes en tête des cellules, ensuite les noyaux se déplacent vers l'arrière (Cassimeris et Zigmond, 1990; Devreotes et Zigmond, 1988; Singer et Kupfer, 1986). En plus, il se forme en queue des cellules un prolongement cellulaire dit uropode. L'ensemble de ces changements morphologiques va permettre aux neutrophiles de quitter la circulation sanguine.

Cette migration à travers les cellules endothéliales se fait selon des mouvements améboïdes, c'est ce qu'on appelle la diapédèse (figure 6).

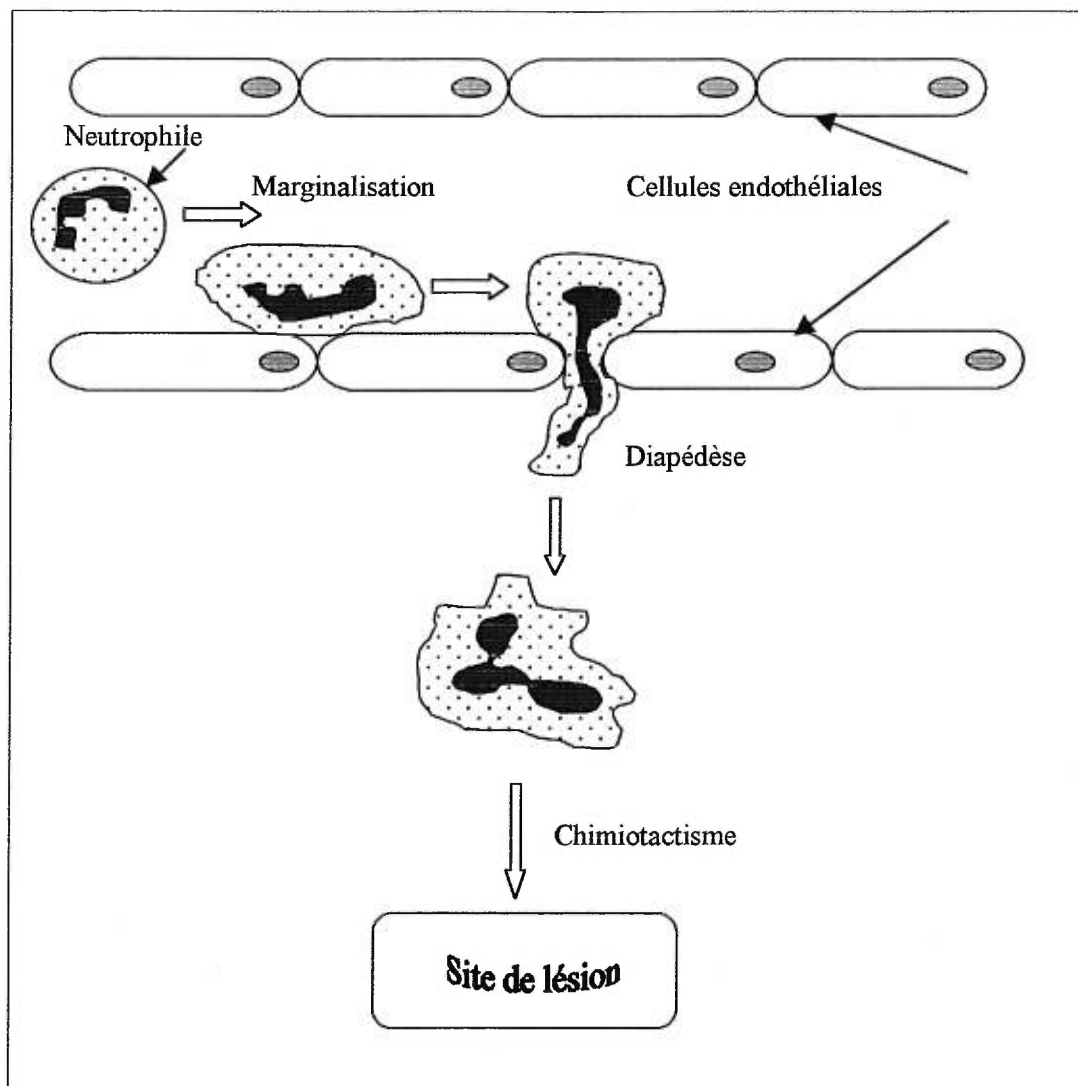


Figure 6. Représentation schématique des principales étapes de la migration des neutrophiles de la circulation sanguine vers le site de lésion.

La migration des neutrophiles nécessite aussi leur interaction avec l'endothélium. En effet, l'exposition des PMN aux facteurs chimiotactiques ou activateurs tels le PMA, LPS ou TNF, augmente leur capacité d'adhésion à l'endothélium. Ceci se fait suite à l'activation des cellules endothéliales et à l'augmentation d'expression des molécules d'adhésion concernées. Ces interactions entre neutrophiles et cellules endothéliales mettent en jeu différentes molécules d'adhésion. Ces dernières se répartissent en trois classes: la superfamille des immunoglobulines, les intégrines et les sélectines. Les principales molécules impliquées sont les intégrines (LFA1 et Mac1) (Myones et al., 1988), les sélectines (sélectine P, sélectine E) (Bevilacqua et al., 1987; Geng et al., 1990) et de la super-famille des immunoglobulines (ICAM1, ICAM2). Les intégrines LFA1 et Mac1 présents sur les neutrophiles interagissent avec leur ligands ICAM au niveau des cellules endothéliales (Diamond et al., 1990). LFA1 peut se lier à ICAM1 et ICAM2, alors que Mac1 ne peut se lier qu'à ICAM1. Les sélectines (P et E) des cellules endothéliales interagissent avec des oligosaccharides sialylés Lewis présents à la surface des PMN (Lowe et al., 1990; Phillips et al., 1990; Springer et Lasky, 1991; Walz et al., 1990).

Tous ces événements qui interviennent lors de la migration des neutrophiles au site inflammatoire sont contrôlés par plusieurs cytokines tel l'IL-1, l'IL-8, l'IFN γ , le TNF et le TGF β 1. Ces dernières régulent les différentes étapes de cette migration notamment, le recrutement des PMN au site de l'inflammation, la réorganisation du cytosquelette et l'expression des molécules d'adhésion.

Une fois au site inflammatoire, les neutrophiles entrent en contact avec leur cible. Ceci peut se faire soit par contact direct entre la paroi de la cible et la membrane du PMN, ou bien via des opsonines. L'interaction directe entre cible et neutrophile met en jeu des récepteurs non spécifiques qui peuvent reconnaître certaines lectines sur le microorganisme. Les opsonines se fixent sur la cible tout en se liant aux récepteurs membranaires des neutrophiles. Les principales molécules qui interviennent dans ce phénomène d'opsonisation sont: le dérivé du complément C3bi et les anticorps IgG. Le C3bi interagit avec l'intégrine

(CD11b/CD18, CR3) alors que les anticorps IgG peuvent interagir avec les récepteurs Fc γ ; CD32 ou CD64 (Beller et al., 1982; Fanger et al., 1989). Après la capture de la cible, les neutrophiles procèdent à la phagocytose et la destruction de l'agent pathogène.

2- La phagocytose

La phagocytose est un processus qui permet l'internalisation et l'ingestion de la cible. L'interaction entre le neutrophile et l'agent infectieux via le complexe ligand-récepteur, induit la formation de pseudopodes. Ces derniers entourent la cible et fusionnent, formant ainsi une vacuole de phagocytose appelée phagosome. Cette étape s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène et de la production d'acide lactique. Les lysosomes présents dans les PMN fusionnent à leur tour avec les phagosomes et forment un phagolysosome. Les particules phagocytées, vont être détruites par différents mécanismes de lyse adoptés par les neutrophiles (Thomas et Lehrer., 1988; Sawyer et al., 1989).

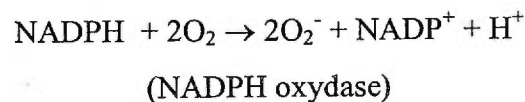
3- Mécanismes de lyse

Les neutrophiles peuvent détruire l'agent infectieux selon deux voies principales. La première est basée sur des mécanismes dépendants de l'oxygène. La seconde met en jeu des mécanismes indépendants de l'oxygène.

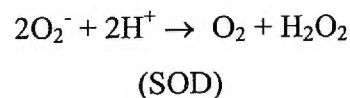
3-1 Mécanismes de lyse dépendant de l'oxygène.

Ce processus nécessite l'intervention de diverses enzymes tel la NADPH oxydase, la myéloperoxydase (MPO) et la NO synthase (figure 7). Il entraîne la production de réactifs oxygénés et nitriques, lesquels sont toxiques pour une grande variété de microorganismes. Ces mécanismes oxydatifs sont activés dès

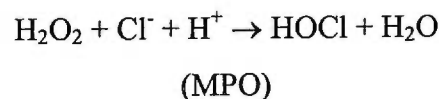
que le processus de la phagocytose est amorcé. Les principaux réactifs produits lors de ces événements sont: le superoxyde anion (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles (OH^\bullet), l'acide hypochlorique (HOCl) et le monoxyde d'azote (NO). Le premier dérivé oxygéné qui se forme est l' O_2^- . Il est généré sous l'action de la NADPH oxydase, laquelle induit la transformation de l'oxygène moléculaire en O_2^- via l'apport d'électrons libres (Cohen et al., 1988; Klebanoff et Walterdorff, 1990; Thomas et Lehrer, 1988; Weiss, 1989).



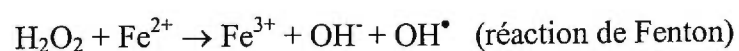
Le superoxyde anion néoformé se transforme en présence de la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

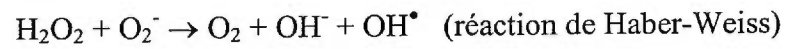


H_2O_2 en présence d'halogénures tel le chlore, l'iode et le brome entraîne la production de l'acide hypochlorique sous l'action de la myéloperoxydase (MPO).

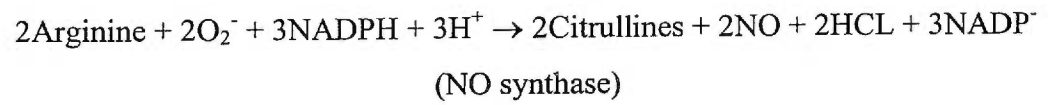


En plus, le peroxyde d'hydrogène peut entraîner la production de radicaux hydroxyles. Ceci peut s'effectuer suivant deux types de réaction; la réaction de Fenton et la réaction de Haber-Weiss. Le type de réaction est déterminé par le genre de réactifs mis en jeu. Dans le cas du fer c'est la réaction de Fenton, alors que le superoxyde anion implique la réaction de Haber-Weiss.





Le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé à partir de la L-arginine en présence de la NO-synthase.



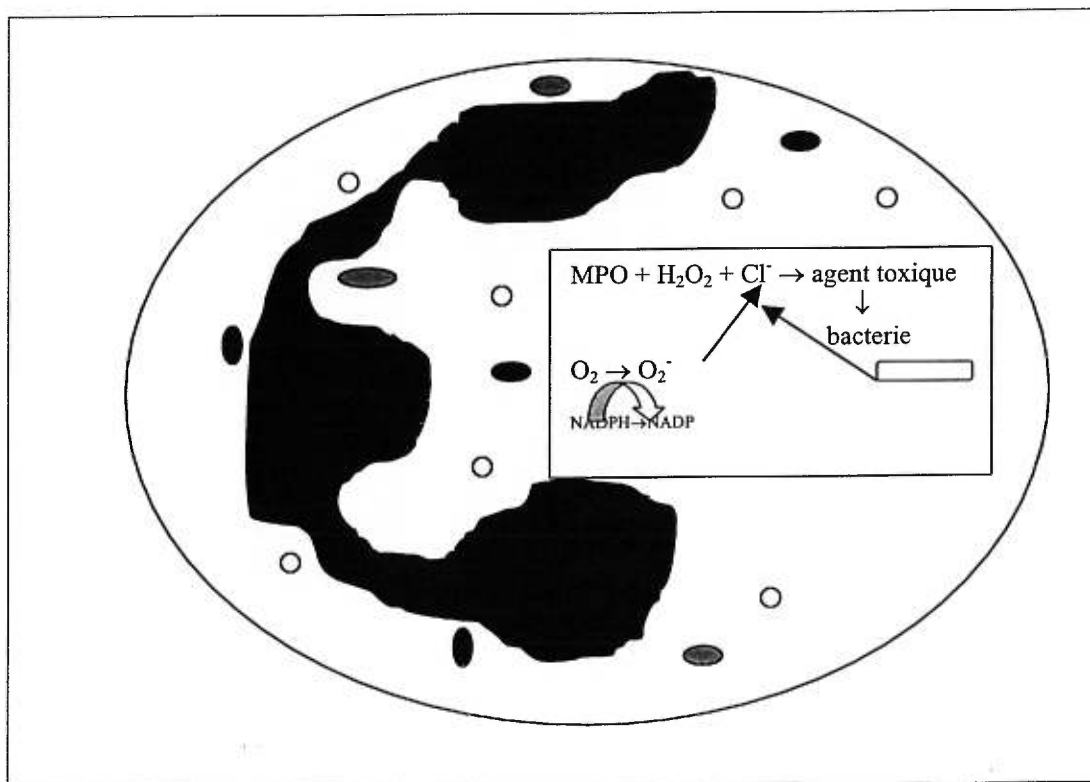


Figure 7. Effet bactéricide de la myéloperoxydase (MPO) en présence du peroxyde d’hydrogène (H_2O_2) et de certains halogénures dans le phagolysosome du neutrophile. La réaction de la MPO avec les halogénures et le H_2O_2 entraîne la formation de dérivés oxygénés et nitriques qui sont toxiques pour une grande variété d’agents pathogènes.

Tous ces dérivés oxygénés qui se forment lors de ce processus oxydatif jouent un rôle fondamental dans la défense de l'hôte contre plusieurs agents infectieux. Leurs effets toxiques affectent plusieurs aspects physiologiques de la cible. Ils provoquent une variété d'altérations qui peuvent toucher les glycanes, les protéines, les lipides et les acides nucléiques. De plus, ils sont impliqués dans l'amplification du processus inflammatoire. Effectivement, ils induisent la synthèse de l'IL-1 et du TNF α et des médiateurs lipidiques (prostaglandines et leucotriènes). Ils activent également certains facteurs de transcription tel le NF κ B. En outre, ils induisent les protéines hsp (heat shock proteins) et diminuent le Bcl-2 avec déclenchement de la mort cellulaire (Revillard, 1994).

L'importance de ces mécanismes oxydatifs dans la défense de l'hôte, peut être illustrée par l'exemple des patients atteints de CGD (Chronic Granulomatous Disease) ou ceux qui présentent un déficit en MPO (Segal, 1988). Ces patients peuvent être sujets à différentes infections. La déficience de l'activité de la NADPH oxydase et de la MPO, entraîne une diminution du pouvoir bactéricide des phagocytes.

La toxicité de ces réactifs oxygénés peut être très néfaste pour l'hôte, elle est fortement impliquée dans plusieurs immunopathologies. Toutefois, les cellules de l'hôte possèdent des moyens de défense contre les effets néfastes de ces dérivés. Ces mécanismes de protection sont appelés des ``scavengers``. Ils sont représentés principalement par; le glutathion (GSH) dans le cytosol, la vitamine E dans la membrane, la catalase qui dégrade l'H₂O₂ et la taurine qui neutralise l'HOCl. La protéine Bcl-2 est impliquée aussi dans ces processus de protection anti-oxydants (Revillard, 1994).

3-2 Mécanismes de lyse indépendants de l'oxygène.

Les granules cytoplasmiques des neutrophiles contiennent une grande variété de polypeptides et d'enzymes hydrolytiques. Ces derniers sont capables de détruire efficacement plusieurs pathogènes. Parmi les principaux facteurs impliqués dans ce mécanisme de lyse on cite, les protéases, les phospholipases, les glycosidases et les lysozymes. Ces enzymes agissent sur les microorganismes

en perturbant leurs fonctions ou en détruisant les composants de leurs membranes ou parois. Les exemples les mieux illustrés de ce type de facteurs sont représentés par le lysozyme, la BPI (bacterial permeability-increasing protein), les défensines et la lactoferrine. Le lysozyme peut dégrader certaines parois bactériennes (Ellison et Giehl, 1991). La BPI perce la membrane des bactéries Gram- en fixant le LPS (Elsbach et Weiss, 1985). Les défensines agissent sur les bactéries Gram+ en dégradant leurs peptidoglycans, mais elles peuvent agir aussi sur d'autres pathogènes telles certaines bactéries Gram-, des champignons et certains virus enveloppés. Elles peuvent induire la perte de l'intégrité des membranes internes et externes des bactéries (Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1985; Thomas et Lehrer, 1988). La lactoferrine bloque l'activité des enzymes bactériennes dépendantes du fer en le chélatant (Bullen, 1981; Bullen et al., 1991).

Les deux mécanismes de lyse oxydatif et non oxydatif peuvent détruire un grand nombre de pathogènes. Ils peuvent agir en synergie comme ils peuvent agir indépendamment l'un de l'autre. Malgré l'efficacité de ces deux processus, plusieurs micro-organismes ont pu développer diverses stratégies pour déjouer le pouvoir de lyse des PMN. Ainsi la susceptibilité des pathogènes aux dérivés oxygénés varie suivant les espèces. Cette différence de la sensibilité dépend du taux intracellulaire de certaines enzymes, notamment la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, les réductases et les peroxydases. Grâce à ces systèmes enzymatiques, plusieurs agents infectieux peuvent échapper à l'effet fatal des dérivés oxygénés. Par exemple, *Listeria monocytogenes* peut éviter l'action létale des métabolites d'oxygène en augmentant sa production de catalase (Bortolussi et al., 1987). De même *Neisseria gonorrhoeae* résiste à des concentrations élevées de H₂O₂ grâce à l'induction de la synthèse de nouvelles protéines (Fu et al., 1989). *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Bacillus subtilis* peuvent survivre en présence de concentrations létales de H₂O₂ (Morgan et al., 1986). Leur adaptation semble liée à l'induction de divers mécanismes tels la production d'enzymes anti-oxydantes et la réparation d'ADN. D'autres micro-organismes ont développé d'autres moyens d'échappement à la lyse, tel est le cas de *Leishmania* qui peut résister à des milieux acides, *Legionella pneumophila* et *Toxoplasma gondi* qui

peuvent inhiber l'acidification du milieu. Certains agents infectieux peuvent inhiber la fusion phagosome-lysosome, c'est le cas par exemple, de *Chlamydia psittaci* et *Mycobacterium tuberculosis*.

4- Implication du neutrophile dans la réaction inflammatoire.

Les neutrophiles sont fortement impliqués dans le processus inflammatoire. Ils interviennent dans la destruction des pathogènes et des cellules endommagées, de même que, dans la production d'agents pro-inflammatoires, tels les facteurs chimiotactiques, les cytokines, les leucotriènes et d'autres médiateurs lipidiques. Malheureusement, ils peuvent aussi induire différentes lésions tissulaires. Dans les conditions normales, la production de facteurs chimiotactiques s'arrête dès que le pathogène est détruit par les PMN. Ces derniers cessent de migrer au site inflammatoire et les processus de cicatrisation et de réparation des tissus commencent. Toutefois, quand l'infiltration des neutrophiles au site d'inflammation ne cesse pas, les tissus peuvent être endommagés en permanence. C'est le cas par exemple des tissus qui manifestent des inflammations chroniques. Les facteurs produits lors de l'activation des PMN peuvent endommager sérieusement les tissus de l'hôte. Ces dommages peuvent être provoqués par la perturbation des systèmes anti-oxydants et anti-protéases. En effet, le plasma et les fluides tissulaires contiennent une grande variété d'inhibiteurs de protéases. Plusieurs anti-protéases sont membres de la famille SERPIN (serine protease inhibitor) (Smith, 1994), c'est le cas par exemple de α_1 -proteinase inhibitor, α_1 -antichymotrypsin et plasminogen-activator inhibitor.

Les dérivés oxygénés peuvent endommager les tissus de l'hôte en réduisant les concentrations extracellulaires des anti-protéases de telle sorte qu'elles ne puissent pas inhiber les protéases sécrétées (Weiss, 1989). H_2O_2 inactive les anti-protéases tel l' α_1 -protease inhibitor et l' α_2 -macroglobuline, lesquelles sont des inhibiteurs endogènes de l'élastase. De plus, H_2O_2 active les formes latentes des métalloprotéases telles la collagénase et la gélatinase. Ces dernières contribuent à

l'inactivation des anti-protéases (Saari et al., 1990; Vissors et al., 1988). Les produits oxydatifs générés lors de l'activation des neutrophiles peuvent prolonger la réaction inflammatoire. Cette prolongation peut être due à la perturbation du réseau d'anti-protéases dont l'activation peut être affectée par les métabolites d'oxygènes. Ceci peut engendrer une activité plus prolongée des protéases et des dérivés oxygénés.

III- Immunopathologie du neutrophile

Les PMN jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire. Ils représentent la première ligne de défense qui intervient lors des agressions externes. Toutefois, ces cellules peuvent être impliquées dans plusieurs immunopathologies. Elles peuvent provoquer des dommages tissulaires assez sérieux chez l'hôte (Weiss, 1989). En effet, les neutrophiles peuvent produire un ensemble de réactifs oxygénés tel, l' O_2^- , H_2O_2 et HOCl. En outre, ils contiennent dans leurs granules une grande variété d'enzymes protéolytiques notamment, l'élastase, la collagénase et la gélatinase (Smith, 1994). Tous ces constituants des PMN et ces dérivés oxygénés peuvent être toxiques non seulement pour les pathogènes, mais aussi pour l'hôte s'ils sont sécrétés dans l'espace extracellulaire.

Les dommages tissulaires peuvent se produire lors de différentes étapes de l'activité des neutrophiles. Parmi ces étapes on note la migration durant laquelle une activation prématurée des PMN entraîne la production des dérivés toxiques, la destruction de la cible au cours de laquelle il peut y avoir libération des produits toxiques dans le milieu extracellulaire. La phagocytose frustrée ``frustrated phagocytosis`` par exemple est un événement qui peut induire la sécrétion des dérivés toxiques dans l'espace extracellulaire. Ce phénomène peut avoir lieu quand la taille de la cellule cible ne permet pas son internalisation par le phagocyte.

Les principaux facteurs impliqués dans les dommages tissulaires sont, les enzymes protéolytiques, les dérivés oxygénés et les métabolites de l'acide arachidonique. Ces différents facteurs peuvent agir indépendamment les uns des autres ou en synergie. Ainsi les dérivés oxygénés peuvent induire directement d'importantes lésions au niveau des cellules de l'hôte (Johnson et al., 1981; Martin et al., 1981; Sacks et al., 1978; Simon et al., 1981). De plus, ils peuvent activer certaines métalloprotéases dont la collagénase et la gélatinase (Peppin et Weiss, 1986; Weiss et al., 1985). La réaction de HOCl avec certaines amines peut entraîner la production de dérivés aminés. Ces derniers sont très toxiques et ont une longue durée de vie (Test et Weiss, 1986; Weiss, 1989). Les dérivés oxygénés peuvent entraîner la peroxydation des lipides membranaires. Ceci altère l'intégrité structurelle des membranes. De même, ces métabolites d'oxygène peuvent directement s'attaquer aux protéines des membranes cellulaires et affecter ainsi leurs fonctions (Wolf et al., 1986). Ils peuvent induire des changements conformationnels ou des dénaturations des protéines. En outre, ces réactifs peuvent altérer la structure et la fonction de l'ARN et de l'ADN (Weitzman et Gordon, 1990). Les métabolites de l'acide arachidonique tel les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes, sont aussi capables de causer des dommages tissulaires.

En plus des dérivés d'oxygène et d'acide arachidonique, les enzymes protéolytiques peuvent également nuire à l'hôte. Effectivement, trois principales enzymes semblent fortement impliquées dans les lésions tissulaires. Ceci peut se produire malgré la présence du système anti-protéase. Ce dernier peut être perturbé par divers facteurs tel H_2O_2 qui peut inactiver les anti-protéases; α_1 -protéase inhibiteur et α_2 -macroglobuline. Les enzymes protéolytiques peuvent s'attaquer à différents constituants de la matrice extracellulaire. Cette dernière est impliquée dans différentes fonctions cellulaires notamment, la régulation de la forme des cellules, la migration et la réparation des tissus. Ces enzymes peuvent alors dégrader l'élastine, le collagène, les protéoglycans, les glycoprotéines de même que d'autres composants. Ainsi, l'élastase qui est un constituant des

granules azurophiles peut dégrader l'élastine, le collagène de type III et IV, la fibronectine, les protéoglycanes et d'autres composants (Janoff, 1985). La collagénase et l'élastase peuvent digérer le cartilage articulaire, les tissus élastiques des vaisseaux artérielles et l'élastine du tissu des poumons. En outre, les métalloprotéases peuvent aussi s'attaquer à la matrice extracellulaire. Ainsi, la collagénase peut dégrader le collagène de type I, II et III, alors que la gélatinase peut cliver le collagène de type IV, V, et XI (Weiss et Peppin, 1986). En plus d'agir directement sur les tissus, les enzymes protéolytiques contribuent à l'amplification des réactions inflammatoires par différents processus tel le clivage des composants du complément.

Ces différents mécanismes de toxicité, dégradation et de lyse impliquent les neutrophiles dans plusieurs pathologies notamment, l'ARDS (Adult respiratory distress syndrome), l'infarctus myocardique et l'arthrite rhumatoïde.

1. L'ARDS (Adult respiratory distress syndrome)

L'ARDS est un processus inflammatoire qui entraîne l'altération de la structure et des fonctions des tissus du poumon. Cette maladie est caractérisée par une infiltration assez importante des neutrophiles et des lésions tissulaires au niveau des poumons (Martin et al., 1989). De même, les personnes atteintes par l'ARDS présentent des anomalies fonctionnelles au niveau des neutrophiles du sang. Les dommages des tissus semblent être causés par les dérivés oxygénés, les enzymes protéolytiques et les métabolites de l'acide arachidonique. Ainsi, diverses études faites sur des animaux tel le lapin, le chien et le mouton ont montré l'implication de différents facteurs notamment, OH, H₂O₂, HOCl, l'élastase, l'acide arachidonique et le thromboxane B₂ (Demling, 1982; Ogletree et Brigham, 1980).

2. L'infarctus myocardique

Cette pathologie est associée à l'infiltration et l'activation des neutrophiles au niveau du myocarde. Les principaux facteurs impliqués dans l'infarctus

myocardique sont les métabolites d'oxygène, les molécules d'adhésion, certaines protéases, le complément et le leucotriène B4 (McCutchan et al., 1990; Walden et al., 1990). Ainsi le C5a et le LTB4 semblent jouer un rôle important dans l'infiltration des neutrophiles au niveau du myocarde (Entman et al., 1991; Karasawa et al., 1991). Certaines études associent aussi le PAF à cette infiltration (Kubes et al., 1990). De plus les molécules d'adhésion; CD11b/CD18 et ICAM1 interviennent dans les interactions entre neutrophiles et myocytes. Des études ont démontré qu'il y a une augmentation d'expression de l'ARNm de CD11b/CD18, ICAM1 et de la sélécine-P lors de l'infarctus myocardique (Smith et al., 1991b). De même, l'utilisation d'anticorps monoclonaux de CD18 et de CD11b entraîne une diminution de l'accumulation des neutrophiles dans le myocarde chez certains animaux (Dreyer et al., 1991; Simpson et al., 1988). Le C5a semble agir comme un facteur chimiotactique initial qui va attirer les neutrophiles vers la lésion. Les PMN alors adhèrent à l'endothélium vasculaire via CD11b/CD18 et ICAM1 et migrent à travers les cellules endothéliales. Les neutrophiles activés vont sécréter le LTB4 et le PAF. Ces derniers vont induire le recrutement et l'activation des PMN. À ce stade, les neutrophiles activés vont libérer leurs protéases et les dérivés oxygénés et entraîner alors les lésions tissulaires.

3. L'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une maladie autoimmune. Elle est caractérisée par la prolifération des cellules synoviales, l'inflammation chronique, la destruction des tissus articulaires adjacents, la résorption osseuse et la destruction des composants de la matrice extracellulaire (Chin et al., 1990). Différentes cellules sont impliquées dans cette pathologie notamment les macrophages, les cellules synoviales, les lymphocytes T et les neutrophiles (Baker et al., 1983; Hogg et al., 1985; Kato et al., 1997; Weinberg et al., 1993; Weissman et Korchak, 1984). Ces derniers sont présents en grande quantité dans le fluide synovial. Les principaux facteurs qui sont associés à l'arthrite rhumatoïde sont les complexes immuns, certaines cytokines et facteurs de croissance, les molécules d'adhésion et certains médiateurs inflammatoires. Les neutrophiles peuvent être attirés et activés au site

de l'inflammation par l'IL-8 et les complexes immuns (Smith, 1994). D'autres cytokines et médiateurs produits au niveau des tissus synoviaux peuvent aussi affecter les fonctions des PMN. Parmi ces facteurs on cite l'IL-1, l'ENA-78, le $\text{TNF}\alpha$, le $\text{TGF}\beta$ et le GM-CSF (Alvaro-Gracia et al., 1991; Chin et al., 1990; Koch et al., 1994). Une fois activés, les neutrophiles libèrent leurs enzymes protéolytiques ainsi que d'autres médiateurs pro-inflammatoires. Ceci provoque une amplification du processus inflammatoire et des lésions tissulaires plus importantes (Weissman et Korchak, 1984).

IV- Interactions cellulaires

Les neutrophiles peuvent interagir avec une grande variété de cellules. Ceci peut se faire par un contact direct cellule- cellule via les récepteurs de surface, ou à distance par l'intermédiaire de facteurs solubles. Ces derniers peuvent être des cytokines, des facteurs de croissance ou d'autres médiateurs solubles tels les métabolites de l'acide arachidonique. Le contact direct peut se produire via les molécules d'adhésion ou d'autres récepteurs. Parmi les principales cellules qui interagissent avec les PMN on cite, les lymphocytes, les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les plaquettes, les myocytes, les fibroblastes et les synoviocytes. Toutes les interactions qui se produisent que ce soit directement ou indirectement entre les neutrophiles et ces cellules peuvent réguler l'ensemble de leurs fonctions. Ainsi, la migration des neutrophiles se trouve influencée par l'expression des molécules d'adhésion telles LFA-1, MAC1 et ICAM-1 et par la sécrétion des médiateurs solubles tels le PAF, le LTB_4 et l'IL-8. L'opsonisation dépend de l'expression des récepteurs CR3, CD32 et CD64 qui interagissent respectivement avec le C3b_i et les anticorps. De même, les mécanismes de lyse dépendent à la fois de l'interaction directe des PMN avec la cible et des médiateurs solubles tels l'IL-1, l'IL-8, le $\text{TNF}\alpha$, le PAF et l'ENA-78. Ces interactions ont pour but de bien gérer les différentes fonctions des neutrophiles et de mener à terme tout processus inflammatoire. Toutefois,

certaines perturbations peuvent se produire au sein de ce réseau et entraîner un dérèglement d'une ou plusieurs activités des PMN. Ceci engendre alors des anomalies dans la réponse immunitaire impliquant ainsi les neutrophiles dans diverses immunopathologies.

V- Problématique et objectifs du travail

Des études récentes ont démontré que les interactions des neutrophiles avec d'autres cellules telles les fibroblastes et les plaquettes, peuvent augmenter leur survie et leur activation (Andonegui et al., 1997; Ling et al., 1990). Cet effet semble dû à un ou des facteurs sécrétés par ces cellules. Ces observations suggèrent que les fibroblastes et les plaquettes peuvent influencer les propriétés proinflammatoires des neutrophiles dans les tissus. En plus, les PMN sont impliqués dans une grande variété d'immunopathologies notamment l'arthrite rhumatoïde. En effet, l'accumulation des neutrophiles activés au niveau du liquide synovial des patients stipule l'existence de médiateur (s) responsable (s) de ce recrutement et cet activation. Ce (s) facteur (s) pourrait être produit par les cellules avoisinantes telles les synoviocytes et les macrophages. Notre projet de recherche porte sur l'étude des interactions cellulaires lors de co-cultures : neutrophiles / synoviocytes et neutrophiles / macrophages (RAW264.7). Cet étude s'intéresse à l'impact des facteurs de croissance sur la survie et l'activation des PMN. En outre, cette recherche tente d'élucider certains aspects du rôle joué par les neutrophiles dans certaines pathologies inflammatoires tel l'arthrite. De même, ce projet porte sur l'implication des synoviocytes et / ou les macrophages dans la régulation de la survie et des fonctions des PMN.

Notre plan d'étude est le suivant :

- 1- À partir des membranes synoviales des genoux de rats, nous avons isolé et mis en culture les synoviocytes.

- 2- Lors de co-cultures : neutrophiles/synoviocytes et neutrophiles/macrophages (RAW264.7), nous avons évalué la survie des neutrophiles pendant différentes périodes d'incubations.
- 3- À partir des cultures cellulaires des synoviocytes et des RAW264.7, nous avons généré des milieux conditionnés. Ces derniers ont été mis en présence des PMN et on a évalué la survie des neutrophiles.
- 4- Nous avons analysé l'impact de ces milieux conditionnés sur certaines fonctions des PMN notamment la respiration oxydative et la phagocytose.
- 5- On a fractionné le milieu conditionné et caractérisé le poids moléculaire du facteur en question par centrifugation ultradifférentielle.
- 6- À l'aide de test d'immunoneutralisation, on a démontré que le facteur est différent des modulateurs connus dans la littérature.
- 7- On a étudié certaines propriétés physico-chimiques du facteur.
- 8- À l'aide des techniques de séparation par la FPLC et l'électrophorèse, nous avons pu obtenir le facteur sous une forme semi-pure.
- 9- Le facteur partiellement purifié a été évalué pour ses propriétés biologiques sur les neutrophiles *in vitro*.
- 10- On a essayé d'obtenir la séquence du facteur en question.
- 11- Étant donné que le facteur prolongeait la survie des PMN, on a étudié son mécanisme d'action via son effet sur l'apoptose.
- 12- On a analysé l'effet du facteur sur l'expression de Fas et de Bcl-2.

CHAPITRE II
MATÉRIEL ET MÉTHODES ET RÉSULTATS

Partie 1

Nous avons voulu étudier l'impact des interactions cellulaires (neutrophiles/synoviocytes et neutrophiles/macrophages) sur la modulation de la survie et de l'activation des PMN. À cet effet nous avons établi des co-cultures: (PMN / SYN et PMN / RAW) et nous avons étudié la survie et l'activation des neutrophiles en co-culture et en présence des milieux conditionnés des SYN et des RAW. De plus, nous avons entamé des procédures de purification du facteur sécrété par les synoviocytes, et nous avons examiné son effet sur l'apoptose.

Article 1

**MODULATION OF HUMAN NEUTROPHILS SURVIVAL BY CO-CULTURES WITH
SYNOVIOCYTES AND RAW 264.7 MACROPHAGES CELL LINE**

Mouna Lagraoui and Lyne Gagnon

Cet article a été soumis au Journal of Experimental medicine.

MODULATION OF HUMAN NEUTROPHILS SURVIVAL BY CO-CULTURES WITH SYNOVIOCYTES AND RAW 264.7 MACROPHAGES CELL LINE.

BY Mouna Lagraoui and Lyne Gagnon.

From the department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, and Biochem Pharma Inc.

Summary

In vitro cultured polymorphonuclear neutrophils (PMN) rapidly die displaying changes characteristic of cells undergoing apoptosis. Herein, we demonstrate that co-culture of PMNs with rat synoviocytes and macrophage cell line RAW 264.7 enhances human neutrophils survival and activation demonstrated by superoxide production and phagocytosis. Conditioned medium from cultures of synoviocytes or RAW 264.7 cells enhanced neutrophil survival to the same level as the co-culture with the respective cells. This enhancement of survival was not inhibited by addition of neutralizing antibodies against several cytokines such as GM-CSF, IL-1 α , IL-8 and TGF- β 1. Preliminary assessment of physicochemical properties of the crude conditioned medium demonstrated the presence of a soluble, heat-stable factor withstanding temperatures of up to 90-100°C for 20-60 minutes. Moreover, the heated conditioned medium showed greater activity than the crude (non-heated) conditioned medium. Estimation of the molecular weight of the factor by ultrafiltration showed it to be present in a fraction greater than 100 kD which sustained neutrophil survival and activation in both crude and heated conditioned media of cultured rat synoviocytes. Characterization by gel filtration showed that the fraction corresponded to approximately 600 kD and was active in promoting survival and activation of PMNs. Estimation of molecular weight by gel electrophoresis, under non denaturing conditions, showed this factor to have a molecular weight around 240 kD. Our results indicate that rat synoviocytes and

RAW 264.7 secrete soluble factors that can enhance neutrophil survival and activation. These data suggest that rat synoviocytes are strongly implicated in neutrophils activation and could play a key role in inflammatory disorders.

Key words: *Neutrophils, Synoviocytes, Activation, Apoptosis, Cytokines, Inflammation.*

Introduction

Neutrophils are the major type of polymorphonuclear leukocytes that are mobile and can ingest and destroy most pathogenic microorganisms. PMNs act as the first line of defense against invading pathogens. During the inflammatory response, neutrophils leave the circulation upon appropriate stimulation and enter the inflamed areas to exert their biological function. In the absence of appropriate stimuli, neutrophils undergo programmed cell death (PCD) and subsequently senesce. The apoptotic senescent PMNs are then recognized and phagocytosed by macrophages. This event represents a mechanism capable of promoting resolution of inflammation. Synoviocytes and macrophages play an important role in the inflammatory processes via the production of various mediators which modulate survival, activation and disposal of neutrophils. In addition to cell recruitment from blood, enhancement of neutrophil survival may represent a major mechanism of PMN accumulation at the inflammatory sites. It has been shown that co-culture of fibroblasts and pulmonary macrophages as well as their conditioned medium enhances neutrophil survival (1,2,5,17). This enhancement might be due to the action of a single cytokine or a combination of cytokines. Among the cytokines involved GM-CSF, G-CSF, IL-1 α , IL-2, IL-5, IFN γ , and TGF β ₁ have been shown to increase neutrophils survival (3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 32) and activation (9, 12, 13, 17, 27, 28, 32). It has been also shown that IL-2 prevents neutrophil apoptosis by inducing new RNA and protein synthesis (8). Other cytokines such as IL-8 and its related molecules (19, 25, 27, 32), chemokines

(19, 27, 29), FMLP related bacterial product (28), C5a product of complement activation and bioactive lipids, platelet activating factor (15) and leukotriene B4 (26) also modulate neutrophil activation. In this study, we demonstrate that rat synoviocytes and macrophage cell line (RAW264.7) as well as their conditioned media enhance human neutrophil survival and activation. Our results indicate that rat synoviocytes and RAW264.7 cell line secrete a soluble factor that can prolong neutrophil survival and promote their activation.

Materials and methods

Cell lines

RAW 264.7 cells were obtained from ATCC (TIB 71). They were cultured in complete media: (DMEM, Gibco) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Hyclone), 2mM l-glutamine (Gibco) and 1 % penicillin/streptomycin (Gibco). Two millions RAW 264.7 cells were seeded overnight in 12-well plate (Corning) for adherence before the beginning of the co-culture.

Synoviocytes were isolated from rat synovial membrane as described by Lafyatis et al,1989 (15) with a slight modification in the culture media. Passages number 4 - 9 of rat synoviocytes were established in enriched medium [DMEM-F12 (Gibco) supplemented with 20% FBS, garamycine (100ug/ml) and 0.2% fungizone (Gibco)] by plating in 75 cm² plastic tissue culture flasks (corning). After reaching confluence, the synoviocytes were passaged by treatment with trypsin and were reseeded overnight in enriched medium in 12-well plate at a concentration of 2×10^6 cells/ml for adherence before the beginning of the co-culture.

Conditioned media

Conditioned media (supernatant: SN) were aspirated from confluent cultures of synoviocytes and RAW 264.7. These conditioned media were pooled, centrifuged for 30min at 1000g, filtered through 0.45-um (Millipore) and kept

at -80°C until used. In some assays, conditioned media were heated for 20 to 60 minutes at 90 to 100°C.

Fractionation of the conditioned media was achieved by ultrafiltration on 100kD cutoff centricon (Amicon). Fractionated conditioned medium was processed through a FPLC gel filtration (Superose 6, Pharmacia) for preliminary purification.

Electrophoresis

Biologically active fractions obtained by FPLC from rat synoviocytes heated or not heated fractionated conditioned media were run on a PAGE 10% ,0.75mm thickness under non denaturing and non reducing conditions. Proteins were visualized by silver staining. Molecular weight of the sample was estimated by comparison with high molecular weight protein standards (Bio-Rad).

Protein recovery from native gels

To extract proteins from native gel we used an Amicon's combined Microcon/Micropure system. Briefly, biologically active fraction obtained by gel filtration was electrophoresed (PAGE 10%, 0.75mm) under non denaturing and non reducing conditions. All bands on the gel were then cut, and these excised bands were homogenized in an extraction buffer and prepared for recovery in a Microcon/Micropure system according to the supplier's instruction. All samples were then assessed for their biological effect on neutrophil phagocytosis.

Culture of human neutrophils

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) were obtained from peripheral blood of healthy volunteers by gradient centrifugation with lympholyte-poly (Cedarlane) followed by hypotonic lysis of contaminating erythrocytes. They were resuspended in completed medium, RPMI supplemented with 10 % FBS (Gibco). Differential count gave 92-97 % neutrophils in a Wright Giemsa staining.

Freshly isolated PMN (2×10^6 cells/ml) were added to enriched medium as control or to confluent synoviocytes and RAW 264.7 for a period of 18, 24, 48 or 72 hours in 12-well tissue culture. In other experiments, neutrophils (2×10^6 cells/ml) were incubated with conditioned media collected from synoviocytes and RAW 264.7 or with enriched medium as control. . The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95 % air 5 % CO₂. All samples were assayed in duplicate. After incubation, neutrophil survival was assessed by trypan blue exclusion and data were expressed as the percent of viable cells.

Apoptosis

Apoptosis was assessed according to the method described by Nicoletti et al (31). Briefly, freshly isolated neutrophils were incubated for 24 hours at 37°C with different fractions obtained by filtration through the superose 6 column of the synoviocytes heated and fractionated conditioned medium. After incubation, cells were stained by propidium iodide (PI, Sigma) and analyzed for apoptosis using XL Flow Cytometer. Data were then expressed as the percent of apoptotic cells.

Neutrophils activation

PMN activation was assessed by respiratory burst and phagocytosis as described in (32). Briefly, freshly isolated neutrophils were incubated for 24 hours at 37°C with fractionated conditioned media (heated or not) collected from rat synoviocytes and RAW 264.7 cultures or with fractions obtained by filtration through a superose 6 column. After 24 hours of incubation, neutrophils were then adjusted to 1×10^6 cells/ml in phosphate buffer saline (PBS) supplemented with D-glucose and incubated with hydroethidine (HE, Sigma) (100ng/test) for oxidative burst or with fluoresbrite carboxylate microspheres (Polysciences) (1/10 dilution) for phagocytosis. After 30 min incubation at 37°C, PMN were washed and fixed in 2% paraformaldehyde.

Fixed neutrophils were then analyzed for activation using XL Flow Cytometer (Coulter). Data were then expressed as the percent of activated cells.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical evaluation of the data was performed by student-t test to determine a significant variance. A P- value less than 0.05 was considered significant for all tests (*).

Results

Our results demonstrate that co-culture of human neutrophils with either rat synoviocytes or macrophagic cell line RAW 264.7 significantly enhances their survival compared to control (neutrophils alone) cultured cells. When co-cultured at 17, 24, 48 and 72 hours incubation times there is a 10-30% increase in the number of surviving neutrophils determined by trypan blue exclusion (figure 1). This enhancement was optimal at 24 hours. This incubation time was therefore chosen as for all subsequent analysis. To determine whether cell contact was necessary for the enhancement of survival or whether it was due to a soluble factor, we have collected the conditioned media of the synoviocytes and RAW 264.7 cultures. As shown in figure 2, cell contact was not required since the constitutive expression of a soluble factor in the conditioned medium still retained enhancement of neutrophil survival.

Evaluation of the physicochemical properties showed that a 20 to 60 minutes incubation of conditioned medium at 90 to 100°C, did not affect the activity of the factor. Furthermore, chymotrypsine and acidic treatments had no effect on the activity of the conditioned medium and did not affect enhancement of neutrophils survival (data not shown).

To further characterize the nature of the soluble factor and to determine the role of known cytokines in the enhancement of neutrophil survival, we have used a number of neutralizing antibodies against IL-1 α , IL-8, GM-CSF. As shown in table 1, the soluble factor from the conditioned medium

responsible for enhancement of neutrophil survival was markedly different from IL-1 α , IL-8, GM-CSF. Estimation of molecular weight by ultrafiltration showed that the factor obtained from both RAW264.7 macrophage cell line and synoviocyte conditioned media that retained neutrophil survival enhancement was greater than 100Kd (table 2). Furthermore, heat treatment of conditioned media did not affect molecular weight determination. Concurrently with enhancement of neutrophil survival by conditioned medium's fraction greater than 100kD it also significantly enhanced neutrophil activation measured by superoxide production (table 3).

Gel filtration (superose 6, FPLC) was also performed on synoviocytes heated and fractionated conditioned medium greater than 100 kD. A gel filtration profile is shown in figure 3. It was determined that the molecular weight of the factor related to neutrophil activation (assessed by superoxide generation and phagocytosis) was approximately 600 kD. As shown in figures 4 and 5, this factor strongly affected neutrophils activation by enhancing phagocytosis and superoxide production. By electrophoresis under non denaturing condition, the estimated molecular weight of this factor was approximately 240kD (figure6). This estimation was concluded after assesment of proteins recovered from native gel by Microcon/Micropure System for their effect on neutrophil phagocytosis (data not shown).

To determine the possible mode of action of this factor affecting neutrophil survival, we have investigated its effect on neutrophil apoptosis. The results showed that treatment with this factor resulted in a decrease of neutrophil apoptosis assessed by propidium iodide incorporation (figure 7).

Discussion

In this study, we have demonstrated that *in vitro* neutrophil survival is enhanced by RAW 264.7 or synoviocytes co-culture and by their respective conditioned medium. PMN have limited life span *in vitro* and *in vivo* (18, 24, 30) and in the absence of appropriate stimuli, neutrophils undergo programmed

cell death, an active process known as apoptosis. In this context, our results indicate that conditioned medium from RAW 264.7 and synoviocyte cultures produce a soluble factor which enhances neutrophil survival and activation. Furthermore, the factor derived from synoviocytes conditioned medium decreases neutrophil apoptosis and enhances their activation demonstrated by an increase in phagocytosis and superoxide production.

PMN are known to play a central role in inflammation. These cells are the first cells to be recruited at the inflammatory site. The activities of neutrophils are regulated by different mediators such as cytokines, bioactive lipids and other molecules (15,26). Their functions depend on a complex balance of stimulatory and inhibitory pathways which are regulated by these mediators. Our data indicate that in the presence of other inflammatory cells (macrophages) or at an inflammatory site (for example: in contact with synoviocytes), PMNs survival and activation can be controlled by soluble factors released in the microenvironment. As seen by neutralizing antibodies, this soluble factor is different from IL-1 α , IL-8, GM-CSF.

It is also heat stable and has an approximate molecular weight of 240 kD on gel electrophoresis under non denaturing conditions. Similar data was observed by Ogushi et al (17), who showed that fibroblast co-cultures contained two soluble factors affecting PMN survival, the first one was less than 10kD and was determined to be IL-8 and the second one was greater than 100kD and still non identified. In the other hand (1), co-culture of human neutrophils with human fibroblasts maintained the viability and enhanced the functional response of neutrophils.

Preliminary studies for the characterization of this factor showed that it is not inactivated by acidic pH or exposure to chymotrypsine. Other studies of the physicochemical properties and chromatography analysis are under investigation to further purify and characterize this factor. Our data suggest that this factor can play a central role in inflammatory processes by modulation of

neutrophil survival and activation. This finding may be of clinical interest and it raises the possibility that a therapeutic approach targeting this factor might specifically reduce neutrophil activation particularly in inflammatory disorders and other diseases in which synoviocytes may play a major role in the activation of neutrophils.

Acknowledgments- The authors thank Dr. Salam Kadhim and Dr. Serge Montplaisir for their helpful discussion, we also acknowledge financial support from Biochem Therapeutic Inc and material support from University of Montreal.

References

1. Ling, C.J., W.F. Owen, jr., and K.F. Austen. 1990. Human fibroblasts maintain the viability and augment the functional response of human neutrophils in culture. *J. Clin. Invest.* 85:601-604.
2. Southey, A.K., C.M. Oconnor, and M.X. Fitzgerald. 1993. The effect of fibroblast conditioned medium on neutrophil survival and activation. *Biochemical Society Transactions.* 52S:22.
3. Brach, M.A., S. Devos, H.J. Gruss, and F. Herrman. 1992. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood.* 80:2920-2924.
4. Cox, G., J. Gauldie, and M. Jordana. 1992. Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 7:507-513.
5. Alvaro-Gracia, J.M., N.J. Zvaifler, C.B. Brown, K. Kaushansky, and G.S. Firestein. 1991. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor production and gene expression in rheumatoid arthritis

- and its regulation by IL-1 α and Tumor Necrosis Factor- α . *J. Immunol.* 146:3365-3371.
6. Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, and A. Mantovani. 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 80:2012-2020.
 7. Adachi, S., M. Kubota, Y.W. Lin, A. Okuda, K. Matsubara, Y. Wakazono, H. Hirota, K. Kuwakado, and Y. Akiyama. 1994. In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor promotes neutrophil survival *in vitro*. *Eur. J. Haematol.* 53:129-134.
 8. Pericle, F., J.H. Liu, J.I. Diaz, D.K. Blanchard, S. Wei, G. Forni, and J.Y. Djeu. 1994. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 24:440-444.
 9. Ichinose, Y., N. Hara, M. Ohta, H. Aso, H. Chikama, M. Kawasaki, I. Kubota, T. Shimizu, and K. Yagawa. 1990. Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Lipopolysaccharide maintain the phenotype of superoxide anion generation by neutrophils. *Infect. Immun.* 58:1647-1652.
 10. Adachi, S., M. Kubota, Y. Wakazono, H. Hirota, K. Matsubara, K. Kuwakado, Y. Akiyama, and H. Mikawa. 1993. Mechanism of enhancement of neutrophil survival by granulocyte colony-stimulating factor and adenine. *Exp Hematol.* 21:1213-1218.
 11. Begley, C.G., A. F. Lopez, N. A. Nicola, D. J. Warren, M. A. Vadas, C. J. Sanderson, and D. Metcalf. 1986. Purified Colony-Stimulating Factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils *in vitro*: a rapid and sensitive microassay for Colony-Stimulating Factors. *Blood.* 68:162-166.
 12. Vancheri, C., T. Ohtoshi, G. Cox, A. Xaubet, J. S. Abrams, J. Gauldie, J. Dolovich, J. Denburg, and M. Jordana. 1991. Neutrophilic differentiation induced by human upper airway fibroblast-derived Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4:11-17.

13. Campbell, L. J., D. W. Maher, D. L. M. Tay, A. W. Boyd, S. Rockman, K. McGrath, R. M. Fox, and G. Morstyn. 1992. Marrow proliferation and the appearance of giant neutrophils in response to recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF). *British. J. Haematol.* 80:298-304.
14. Adachi, S., M. Kubota, K. Matsubara, Y. Wakazono, H. Hirota, K. Kuwakado, Y. Akiyama, and H. Mikawa. 1993. Role of protein kinase C in neutrophil survival enhanced by granulocyte colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.* 21:1709-1713.
15. Lafyatis, R., E. F. Remmers, A. B. Roberts, D. E. Yocum, M. B. Sporn, and R. L. Wilder. 1989. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous Platelet-derived Growth Factor and inhibition by Transforming Growth Factor-Beta and Retinoids. *J. Clin. Invest.* 83:1267-1276.
16. Tiku, K., M. L. Tiku, and J. L. Skosey. 1986. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 136:3677-3685.
17. Ogushi, F., M. Masuda., K. Fujisawa., K. Tani., K. Asada., S. Yasuoka., and T. Ogura. 1993. Neutrophil chemotactic factor in supernatant from pulmonary fibroblasts stimulated with cytokines. *Japanese.J. Thorac. Diseases.* 31: 453-458.
18. John A. Smith. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56:672-686.
19. L'Heureux, G. P., S. Bourgoin, N. Jean., S. R. McColl., and P. H. Naccache. 1995. Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human neutrophils: interleukin-8 but not NAP-2 or GRO α , stimulates phospholipase D activity. *Blood.* 85:522-531.
20. Perticarari. S., G. Presani., and E. Banfi. 1994. A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. *J. Immunol. Methods.* 170:117-124.
21. Homburg, C. H. E., M. De Haas., A. E. G. K. Von Dem Borne., A. J. Verhoeven., C. P. M. Reutelingsperger., and D. Roos. 1995. Human

- neutrophils lose their surface Fc γ RIII and acquire annexin v binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood*. 85:532-540.
22. Savill, J. S., A. H. Wyllie., J. E. Henson., M. J. Walport., P. M. Henson., and C. Haslett. 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 83:865-875.
 23. Haslett. C., L. A. Guthrie., M. M. Kopaniak., R. B. Johnston., and P. M. Henson. 1985. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Pathol.* 119:101-110.
 24. Whyte, M. K. B., L. C. Meagher., J. MacDermot., and C. Haslett. 1993. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.* 150:5124-5134.
 25. Rathanaswami, P., M. Hachicha., W. L. Wong., T. J. Schall., and S. R. McColl. 1993. Synergistic effect of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts. Evidence that interleukin-8 is the major neutrophil-activating chemokine released in response to monokine activation. *Arthritis. Rheum.* 36:1295-1304.
 26. Gerard Cox. 1995. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.* 154:4719-4725.
 27. Peveri, P., A. Walz., B. Dewald., and M. Baggiolini. 1988. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 167:1547-1559.
 28. Mitsuyama, T., K. Takeshige., T. Furuno., T. Tanaka., K. Hidaka., M. Abe., and N. Hara. 1995. An inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase enhances the superoxide production of human neutrophils stimulated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Mol. Cell. Biochem.* 145:19-24.
 29. Koch, A. E., S. L. Kunkel., L. A. Harlow., D. D. Mazarakis., G. K. Haines., M. D. Burdick., R. M. Pope., A. Walz., and R. M. Strieter. 1994. Epithelial

- neutrophil activating peptide-78: A novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J. Clin. Invest.* 94:1012-1018.
30. Cartwright, G. E., J. W. Athens., and N. M. Wintrobe. 1964. The kinetic of granulopoiesis in normal man. *Blood.* 24:780-803.
31. Nicoletti, I., G. Migliorati., M. C. Pagliacci., F. Grignani., and C. Riccardi. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 139:271-279.
32. Lagraoui, M., and L. Gagnon. 1997. Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF- β 1. *Cell. Mol. Biol.* 43:313-318.

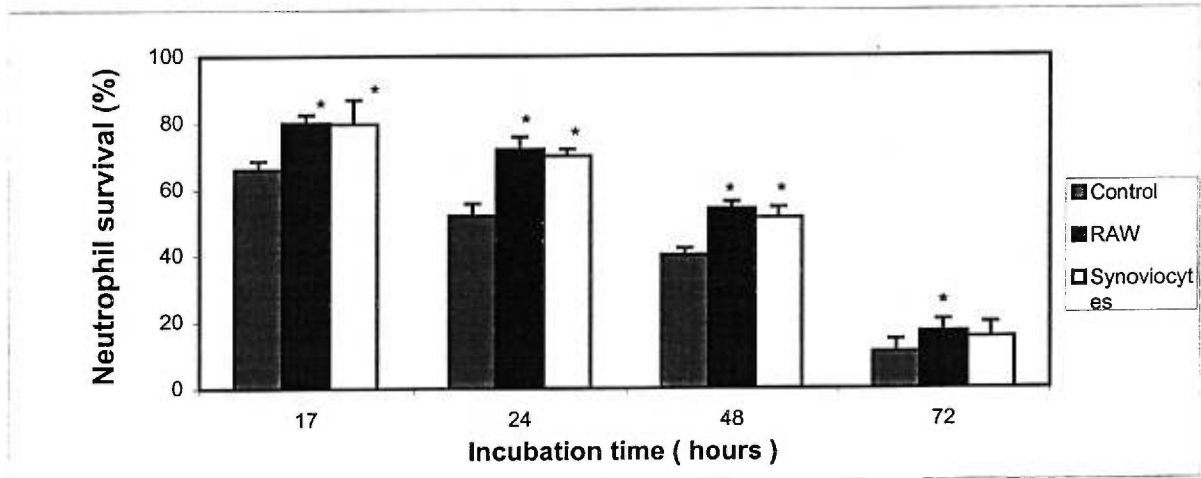


Figure 1. Neutrophils survival in co-culture with RAW:264.7 and Synoviocytes. Survival was determined by trypan blue exclusion at different times. A $P < 0.05$ was considered significant:*. (n = 13).

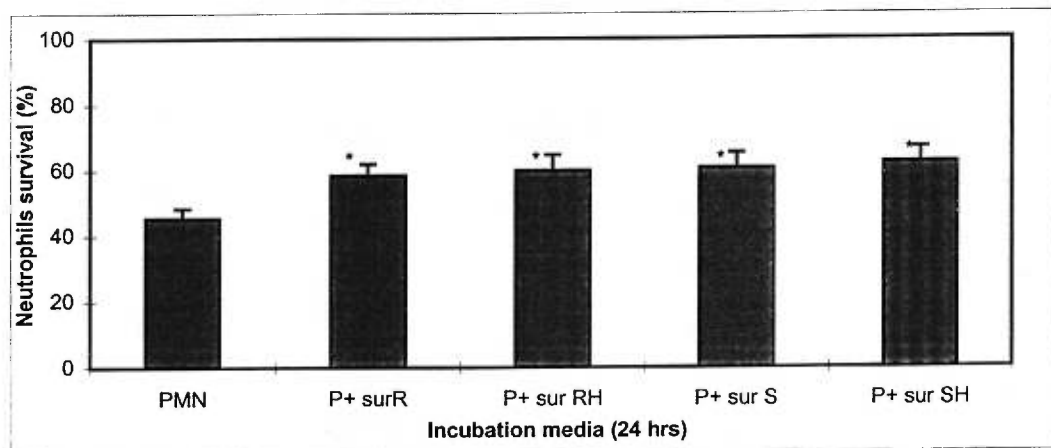


Figure 2. Effect of conditioned media on neutrophil survival. Cells (PMN : P) were incubated for 24 hours with or without conditioned media (heated(H) or not), collected from synoviocytes (sur S) and RAW 264.7 (Sur R) cultures. Cells viability was determined by trypan blue exclusion. Data are expressed as the percent of viable cells. A $P < 0,05$ was considered significant:*. (n = 13).

Table 1. *Effect of neutralizing antibodies on neutrophil survival*

Treatment	SN:RAW	SN:SYN
Control	71 ± 5.4	69 ± 4.3
Anti IL-1 α (0.03ug/ml)	70 ± 2.6	68 ± 2.2
Anti IL-8 (180ug/ml)	72 ± 3.0	69 ± 1.6
Anti GM-CSF (0.7ug/ml)	68 ± 1.5	67 ± 1.8

Conditioned media were collected from RAW264.7 (SN:RAW) and synoviocytes (SN:SYN) cultures and assayed for neutrophils survival after 24 incubation. The control is presented by neutrophils incubated in RPMI supplemented with 10%-FBS. No difference was detected with isotypic control. A p-value > 0.05 was not considered significant. (n = 6).

Table 2. *Effect of fractionated conditioned media on neutrophil survival*

<i>Media</i>	<i>Neutrophil survival (%)</i>
Control	54 ± 6.3
SN: RAW < 100 kD	59 ± 6.7
SNH: RAW < 100 kD	60 ± 6
SN: SYN < 100 kD	57 ± 3.2
SNH: SYN < 100 kD	58 ± 5.4
SN: RAW > 100 kD	71 ± 5*
SNH: RAW >100 kD	72 ± 5.8*
SN: SYN > 100 kD	61 ± 2.9*
SNH: SYN > 100 kD	64 ± 6*

Conditioned media were collected from RAW264.7 (SN:RAW) and synoviocytes (SN:SYN) cultures, and fractionated by ultrafiltration on 100kD cutoff centricon. Heated conditioned media (SNH:RAW or SNH:SYN) were also fractionated and assayed for neutrophils survival after 24h incubation. The control is presented by neutrophils incubated in RPMI supplemented with 10%-FBS. Results are presented as the percent of neutrophils survival. A P-value < 0.05 was considered significant: *. (n = 6).

Table 3. *Effect of fractionated conditioned media on neutrophil respiratory burst*

<i>Media</i>	<i>Relative fluorescence</i>
Control	5.4 ± 0.19
SN: RAW < 100 kD	5.7 ± 0.61
SNH: RAW < 100 kD	6.2 ± 0.74
SN: SYN < 100 kD	5.6 ± 0.53
SNH: SYN < 100 kD	6.3 ± 0.05
SN: RAW > 100 kD	8.6 ± 0.64
SNH: RAW >100 kD	8.1 ± 1.10
SN: SYN > 100 kD	7.7 ± 0.94
SNH: SYN > 100 kD	9.01 ± 2.8

Conditioned media were collected from RAW264.7 (SN:RAW) and Synoviocytes (SN:SYN) cultures, and fractionated by ultrafiltration on 100kD cutoff centricon. Heated conditioned media (SNH:RAW or SNH:SYN) were also fractionated and assayed for neutrophils respiratory burst after 24h incubation. The control is presented by neutrophils incubated in RPMI supplemented with 10%-FBS. A p-value > 0.05 was not considered significant. (n = 6).

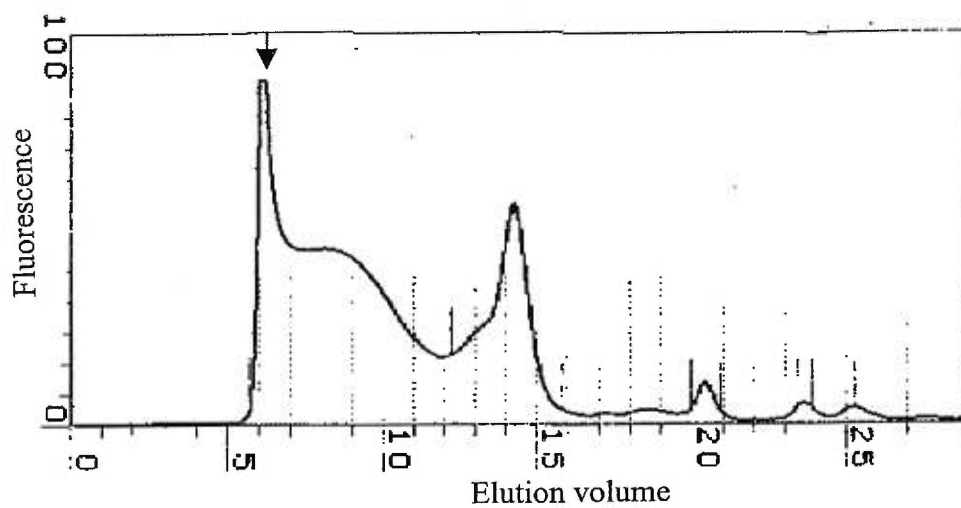


Figure 3. FPLC profile. Synoviocytes heated and fractionated conditioned medium was eluted through a superose 6 column. Collected fractions were assessed for their effect on neutrophils activation. The arrow indicates peak which contains biologically active fractions.

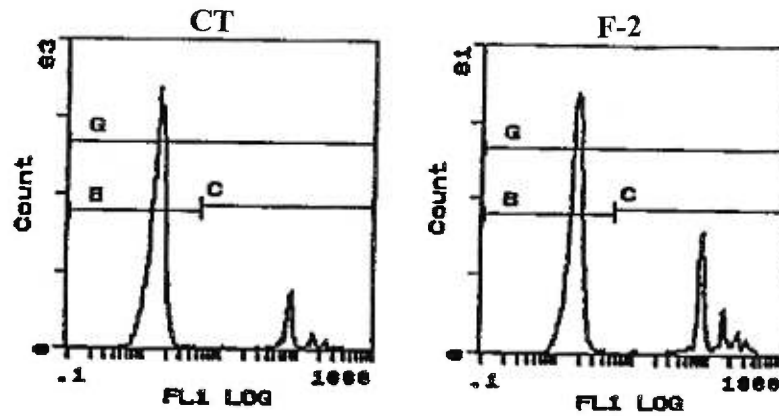


Figure 4A. Cytometry profile analysis of activated neutrophils: effect of fractions on neutrophil phagocytosis. CT: PMN incubated with RPMI-10% FBS, F-2: PMN incubated in the presence of fraction 2 (F-2). (n = 8) .

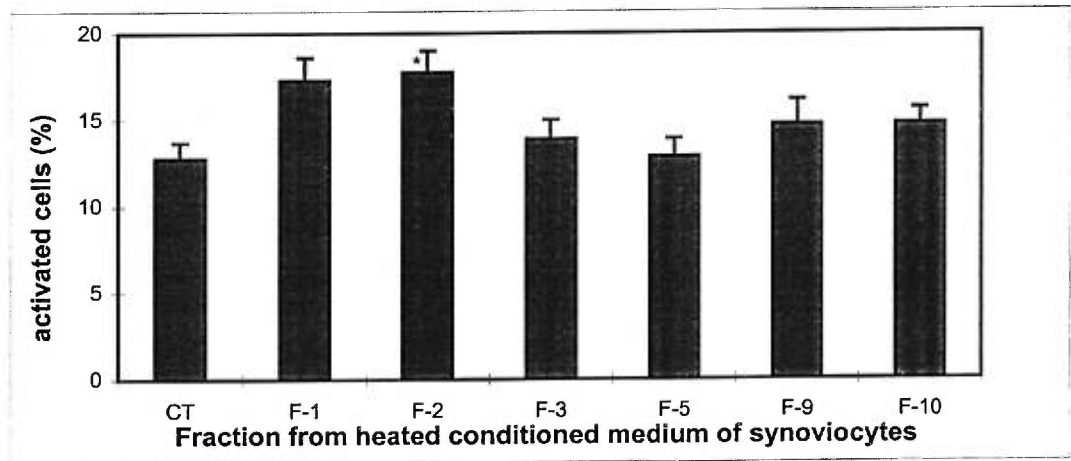


Figure 4B. Effect of fractions on neutrophil phagocytosis. Neutrophils were incubated for 24 hours in presence or absence of different fractions (F) obtained by FPLC of the synoviocytes heated and fractionated conditioned medium. Phagocytosis was evaluated as described in Materials and Methods. A $P < 0.05$ was considered significant:*. (A): Cytometry profile analysis of activated neutrophils. (B): Calculated results obtained by cytometry analysis.

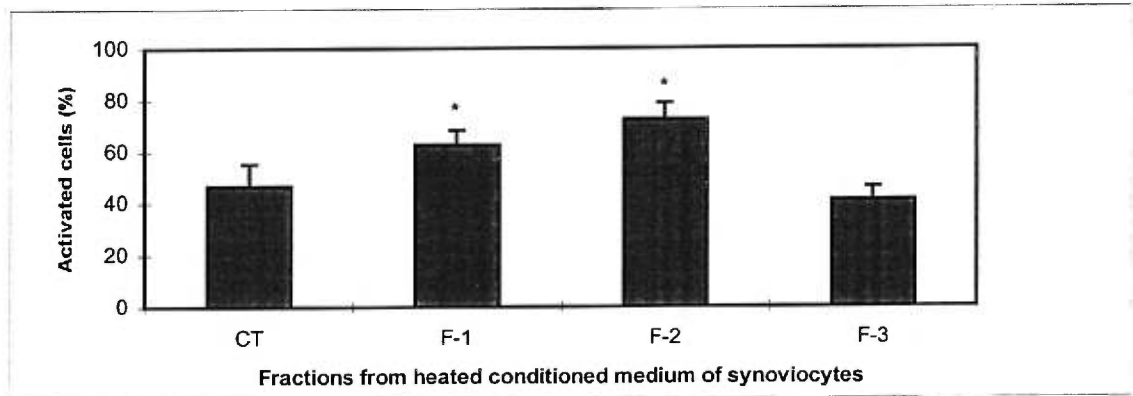


Figure 5. Effect of fractions on neutrophil respiratory burst. Neutrophils were incubated for 24 hours with or without fractions obtained by FPLC of the synoviocytes heated and fractionated conditioned medium. Respiratory burst was assessed as described in Materials and Methods. A $P < 0.05$ was considered significant :*. (n = 8).

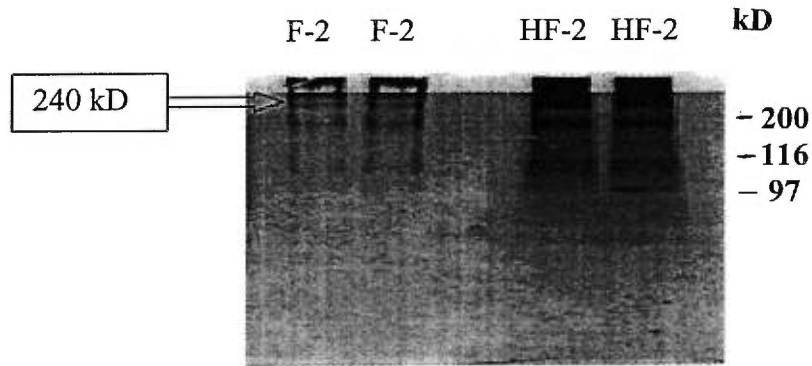


Figure 6. Native PAGE. Biologically active fractions obtained by FPLC from rat synoviocytes heated or not heated fractionated conditioned media (F2, HF2) were electrophoresed on a 10% PAGE under non denaturing and non reducing conditions.

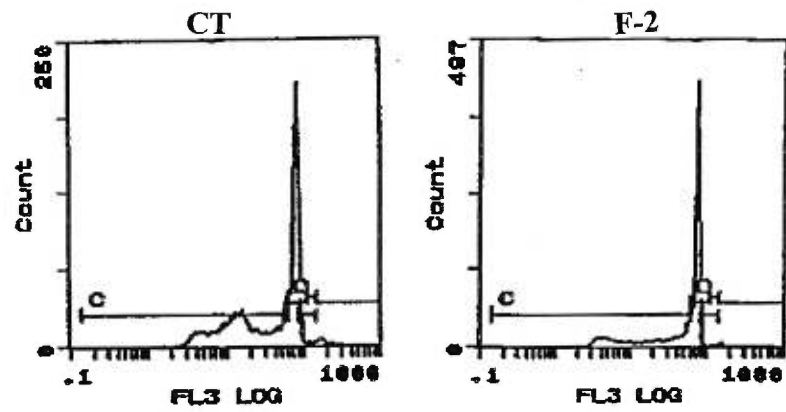


Figure 7A. Cytometry profile analysis of apoptotic neutrophils: effect of fractions on neutrophil apoptosis. CT: PMN incubated with RPMI-10% FBS, F-2: PMN incubated in the presence of fraction 2 (F-2). (n = 7).

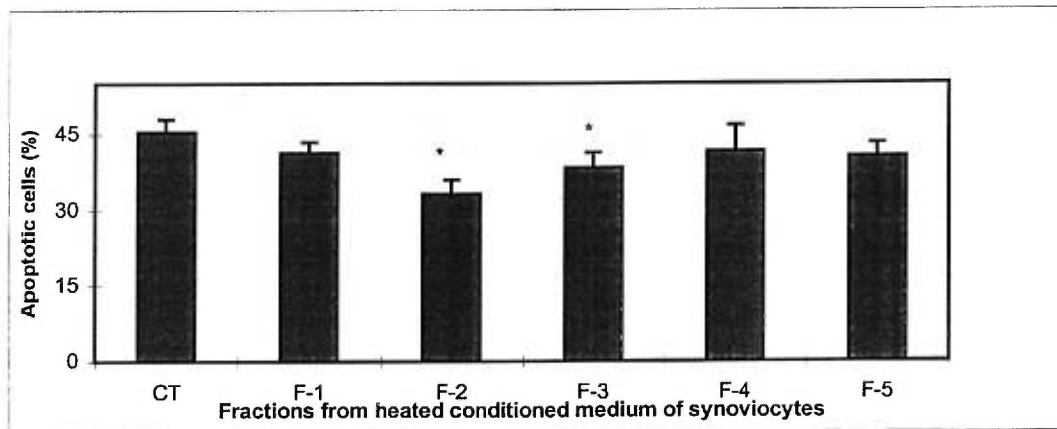


Figure 7B. Effect of fractions on neutrophil apoptosis. Cells were incubated for 24 hours with or without fractions obtained by FPLC of the synoviocytes heated and fractionated conditioned medium. Apoptosis was assessed as described in Materials and Methods. A $P < 0,05$ was considered significant:*. (A): Cytometry profile analysis of apoptotic cells. (B): Calculated results obtained by cytometry analysis.

Partie 2

Étant donné que le facteur des synoviocytes présente certaines ressemblances biochimiques avec le TGF- β 1, nous avons pensé qu'il pourrait être ou appartenir à la famille du TGF- β 1, d'où notre étude de l'effet du TGF- β 1 sur les neutrophiles.

Article 2

ENHANCEMENT OF HUMAN NEUTROPHIL SURVIVAL AND ACTIVATION BY TGF- β 1

Mouna Lagraoui and Lyne Gagnon

Cellular and Molecular Biology, 43 (3):313-318, 1997.

ENHANCEMENT OF HUMAN NEUTROPHIL SURVIVAL AND ACTIVATION BY TGF- β 1

Mouna LAGRAOUI and Lyne GAGNON^z

^z BioChem Therapeutics, Laval, Québec, H7V 4A7 Canada

Received October 22, 1996; Accepted January 8, 1997

Abstract - Transforming growth factor beta (TGF- β) is a multifunctional growth factor which promotes the inflammatory process. We have investigated the effect of TGF- β 1 on neutrophil survival, recruitment and activation. These last steps are essential for their participation in the inflammatory response. Our results demonstrate that TGF- β 1 at a concentration of 20-40 ng/ml is a potent neutrophil chemotactic factor. The chemotactic activity induced by TGF- β 1 is greater than that induced by fMLP (10^{-8} M). Furthermore, TGF- β 1 (20-30 ng/ml) induces neutrophil activation demonstrated by an increase of respiratory burst and phagocytosis. Finally, TGF- β 1 also enhances human neutrophil survival (43 to 93%) at concentrations as low as 2 to 20 ng/ml. This study provides evidence that TGF- β 1 is capable of recruiting and activating neutrophils at inflammatory sites and enhances their survival.

Key words: Neutrophil, chemotaxis, respiratory burst, transforming growth factor beta (TGF- β)

INTRODUCTION

Transforming growth factor beta is synthesized and released by most of the normal and neoplastic cells, however the major reservoirs of TGF- β are localized in platelets and bone (Craig Hooper, 1991; Grotendorst *et al.*, 1989; Khalil *et al.*, 1989; Roberts and Sporn, 1993; Wahl *et al.*, 1993). Among its effects, TGF- β can regulate cell growth and differentiation as well as production of extracellular matrix proteins (Brown *et al.*, 1990; Glick *et al.*, 1991; Grotendorst *et al.*, 1989; Khalil *et al.*, 1991; Parekh *et al.*, 1994; Rizzino, 1988; Sporn *et al.*, 1987). TGF- β is strongly implicated in the inflammatory process (Brandes *et al.*, 1991; Fava *et al.*, 1991; Parekh *et al.*, 1994; Postlethwaite and Seyer, 1995; Susuki *et al.*,

1994; Wahl *et al.*, 1993). The release of TGF- β at sites of infection and inflammation appears to play a key role in the recruitment, adherence and enzymatic activity necessary for leukocyte extravascularization, accumulation and differentiation (Fava *et al.*, 1991; Parekh *et al.*, 1994; Postlethwaite *et al.*, 1994; Susuki *et al.*, 1994; Wahl *et al.*, 1993). In fact, TGF- β facilitates leukocyte adhesion to the vessel wall and extracellular matrix at the site of inflammation, by increasing integrin expression (Parekh *et al.*, 1994; Susuki *et al.*, 1994; Wahl *et al.*, 1993). TGF- β also enhances prostaglandin release and modulates several metabolic pathways (Craig Hooper, 1991). It is a potent chemotactic factor for blood neutrophils, monocytes and lymphocytes (Brandes *et al.*, 1991; Fava *et al.*, 1991; Parekh *et al.*, 1994; Postlethwaite and Seyer, 1995; Postlethwaite *et al.*, 1994; Susuki *et al.*, 1994; Thelen *et al.*, 1995; Wahl *et al.*, 1993). The presence of TGF- β in the synovial effusions asso-

Abbreviations: TGF- β : transforming growth factor; fMLP: N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine; HE: hydroethidine; PMA: phorbol 12-myristate 13 acetate

ciated with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and gout (Fava *et al.*, 1991; Khalil *et al.*, 1991; Roberts and Sporn, 1993) implicates this cytokine in the pathogenesis of these diseases. Its effects on cells and tissues at the site of infection, demonstrate that there is a relationship between this cytokine, inflammation and pathogenesis. In this study, we demonstrate that TGF- β 1 is an important mediator implicated in neutrophil recruitment, survival and activation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

TGF- β 1 (Human, recombinant) was purchased from R&D systems (Minneapolis, USA). fMLP and PMA were obtained from Sigma (Mississauga, Canada). ^{51}Cr Chromium ($\text{Na}_2\text{Cr}_5\text{O}_4$) was purchased from Amersham (Oakville, Canada). Dihydroethidium (HE) was obtained from Molecular probes (USA). Fluoresbrite carboxylate microspheres (1.75 μ) were purchased from Polysciences (Markham, Canada).

Preparation of Human Neutrophils

Neutrophils were obtained from the peripheral blood of healthy volunteers by gradient centrifugation with Lympholyte-poly (Cedarlane, Hornby, Canada) followed by hypotonic lysis of contaminating erythrocytes. The cells were resuspended in RPMI (Gibco, Burlington, Canada) supplemented with 10% FBS (Hyclone, Logan, USA). Final cell preparations routinely consisted of >95% neutrophils as determined by a Wright Giemsa staining. Viability was determined by trypan blue exclusion and was greater than 97%.

Chemotaxis and Transmigration

Neutrophil chemotaxis was evaluated according to a minor modification of the procedure described by Casale *et al.* (1992). Briefly, transmigration of neutrophils through filters was achieved using the 24 well tissue culture transwell (3 μm) plates (Costar, Montreal, Canada) (Capsoni *et al.*, 1989; Casale *et al.*, 1992; Gallin *et al.*, 1973; Repesh, 1989; Saiki *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1990). ^{51}Cr labelled neutrophils (1×10^6) were placed in the upper chamber and the chemotactic factor (TGF- β 1) was placed in the lower chamber. fMLP (10^{-8} M) was used as a positive control. Each variable was tested in triplicate or quadruplicate. The plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 and 95% humidity for 2 hrs. After incubation, the lower chamber contents were mixed with an equal vol. of 2% triton X-100, collected and counted in a Gamma counter. The data were expressed as the percent net stimulated migration (NSM) according to the formula used by Casale *et al.* (1992):

$$\left[\frac{(\text{cpm experimental sample}) - (\text{cpm of negative control sample})}{(\text{total cpm added to chamber})} \right] \times 100\%$$

Phagocytosis

Neutrophils ($2 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated for 24 hrs. at 37°C in 5% CO_2 and 95% humidity with various concentration of TGF- β 1. After 24 hrs., viability was determined by trypan blue exclusion and cells were washed 3 times with PBS containing 2 mM glucose, 1 mM MgCl_2 and 1 mM CaCl_2 . The cell concentration was then adjusted to 1×10^6 cells/ml and then incubated with fluoresbrite carboxylate microspheres (1/10 dilution). After 30 min. of incubation, neutrophils were washed and fixed in 2% paraformaldehyde. Fixed neutrophils were analyzed for microspheres ingestion using XL Flow Cytometer (Coulter, Montréal, Canada). Data were then expressed as the percent of phagocytic cells.

Respiratory Burst

Neutrophils ($2 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated for 24 hrs. with various concentrations of TGF- β 1 at 37°C. After 24 hrs. cells were washed 3 times with PBS containing 2 mM glucose, 1 mM MgCl_2 and 1 mM CaCl_2 and adjusted to 1×10^6 cells/ml. The cells were then incubated with HE (100 ng/test (Callewaert *et al.*, 1991; Perticarari *et al.*, 1991, 1996; Rothe and Valet, 1990) and PMA (200 ng/test) for 20 to 30 min. at 37°C. After incubation, cells were washed in PBS and fixed with 2% paraformaldehyde. Respiratory burst analysis was performed on XL Flow Cytometer. Data were then expressed as the percent of fluorescent cells.

Survival

Neutrophils ($2 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated for various periods of time in presence or absence of TGF- β 1. Viability was determined by trypan blue exclusion. Data were expressed as the percent of viable cells.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical evaluation of the data was performed by student-t test to determine a significant variance. A p-value less than 0.05 was considered significant for all tests.

RESULTS

In a two hours transmigration assay, TGF- β 1 was shown to induce a potent and significant increase of neutrophil chemotaxis. In a dose-response fashion, a four to five fold increase was observed at concentration as low as 20 to 40 ng/ml (Fig. 1). Chemotactic activity induced by TGF- β 1 was also greater than the one induced by fMLP (10^{-8} M, four fold increase). The effect of TGF- β 1 on neutrophil activation was assessed on production of reactive oxygen intermediates and phagocytosis by TGF- β 1 stimulated neutrophils. Dihydroethidium was used as a probe for measurement of

reactive oxygen intermediates production. Again, in a dose dependent manner, TGF- β 1 increased the production of reactive oxygen intermediates by 30 to 70% (Fig. 2). Phagocytosis measured as fluoresbrite ingestion was also significantly enhanced by TGF- β 1 stimulated neutrophils. A

two fold dose dependent increase in phagocytosis was obtained at a concentration between 10 to 40 ng/ml (Fig. 3). Finally, as determined by trypan blue exclusion, an augmentation of 45 to 93% of neutrophil survival was achieved using TGF- β 1 concentrations of 2 to 20 ng/ml (Table 1).

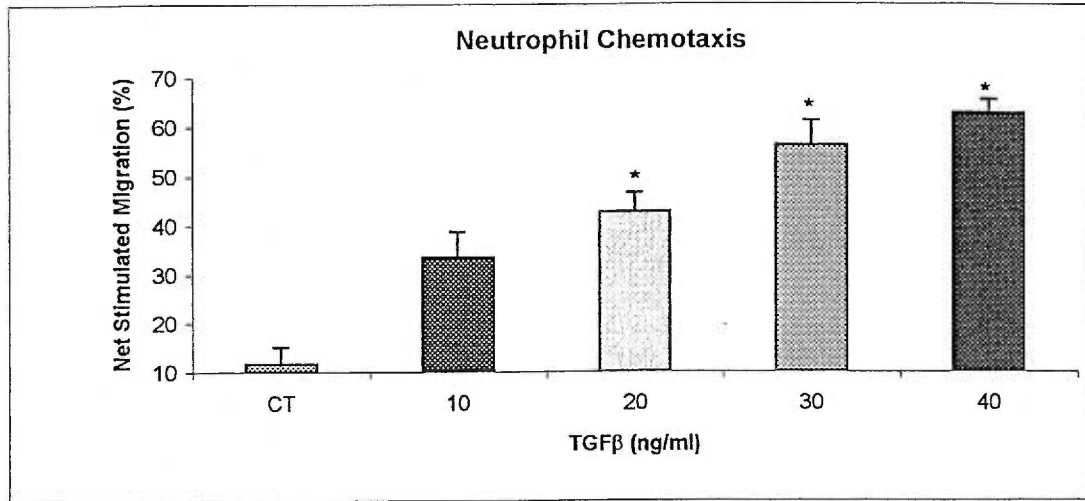


Fig. 1 Effect of TGF- β 1 on neutrophil chemotaxis. Various concentration of TGF- β 1 were used to study its effect on neutrophil migration. Chemotactic activity was performed as described in Materials and Methods. The data were expressed as the percent net stimulated migration. Results represent the mean values of six representative experiments. A $p < 0.05$ was considered significant (by Student's t-test).

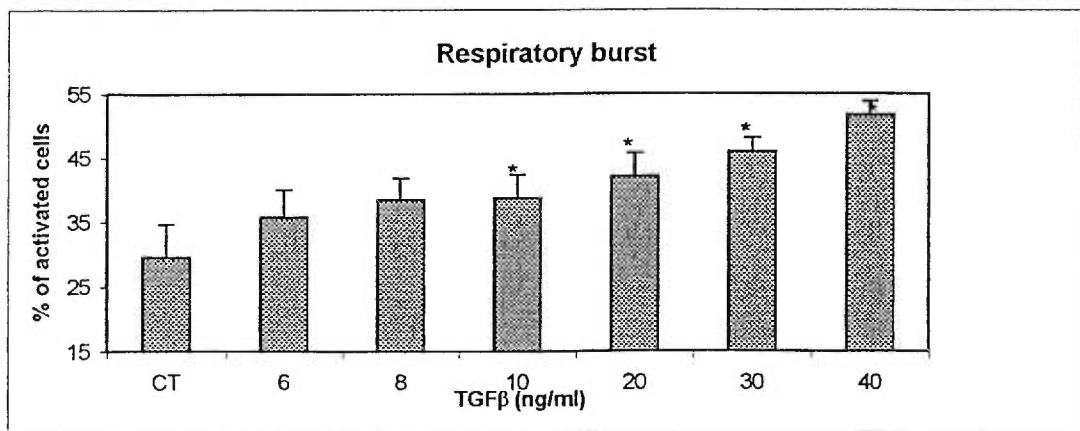


Fig. 2 Effect of TGF- β 1 on respiratory burst. Neutrophils were incubated with various concentration of TGF- β 1 for 24 hrs. Activity of cells was assessed as described in Materials and Methods. Data were expressed as the percent of activated cells and results represent the mean values of seven representative experiments. A $p < 0.05$ was considered significant.

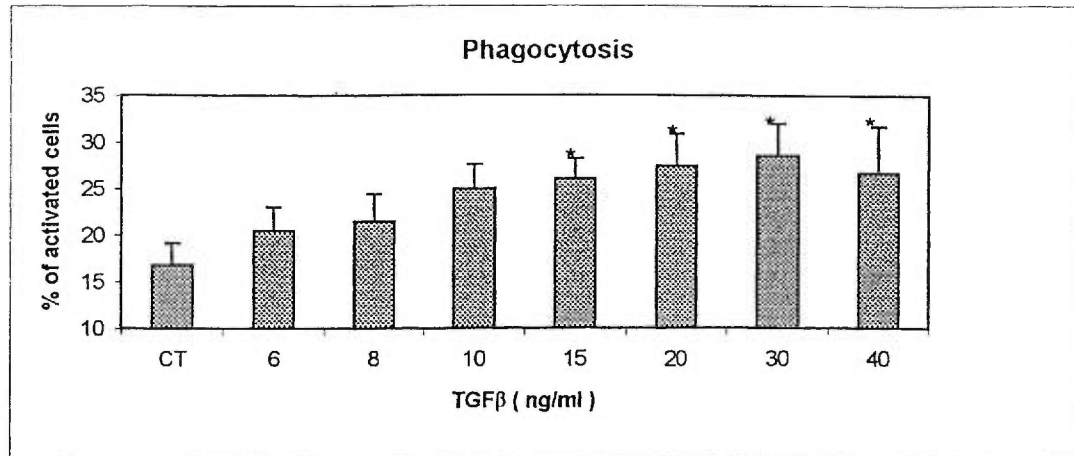


Fig. 3 Effect of TGF- β 1 on neutrophil phagocytosis. PMN were exposed to TGF- β 1 for 24 hrs., then the cells were assayed for phagocytosis as described in Materials and Methods. The data were expressed as the percent of activated cells. Results represent the mean values from seven representative experiments. A p value less than 0.05 was considered significant.

Table 1 Enhancement of neutrophil survival by TGF- β 1

TGF- β 1 (ng/ml)	Cell Viability (%)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
0	34	24	29
2	48	39	39
20	58	63	48

Cells viability was determined by trypan blue exclusion.

DISCUSSION

The studies reported here indicate that the pro-inflammatory effects of TGF- β may also be mediated through its effects on neutrophil survival and functions. Our results confirmed an increase in human neutrophil migration (picomolar range). However, inconsistent results for chemotaxis activity (femtomolar or no activity) are reported in the literature (Locatelli *et al.*, 1993) which may be due to the different methods used to assess chemotaxis. We have also found that the magnitude of chemotaxis varies depending on the TGF- β 1 lot.

GM-CSF, IL-6, IL-8 and TNF- α and - β have all been shown to prime or directly stimulate neutrophil respiratory burst (Brandes *et al.*, 1991; Colotta *et al.*, 1992; Hebert and Baker, 1993; L'Heureux *et al.*, 1995; McColl *et al.*, 1990; von Asmuth and Buurman, 1995). In contrast to Brandes *et al.* (1991), our results demonstrate that TGF- β 1 enhances strongly the neutrophil respiratory burst. In addition, TGF- β 1 induces an increase in neutrophil phagocytosis. This difference in respiratory burst induction may be primarily due to the sensitivity of the method for determination of reactive oxygen intermediates production and also to a longer period of incubation. Furthermore, we have observed an increase in neutrophil survival as determined by trypan blue exclusion which may play an important role in the inflammatory response. Although additional studies are necessary to further understand the mechanism by which TGF- β 1 prevents neutrophil apoptosis. Our data suggest that through its ability to mediate neutrophil migration, survival and activation, TGF- β 1 plays an important role in the inflammatory process.

Acknowledgments – The authors thank Dr. Salam Kadhim and Dr. Terry Bowlin (both from BioChem Therapeutics, Laval, Canada) for their critical review of this manuscript.

REFERENCES

- Brandes, M.E., Mai, U.E.H., Ohura, K. and Wahl, S.M., Type I transforming growth factor β receptors on neutrophil mediated chemotaxis to transforming growth factor β . *J. Immunol.* 1991, **147**: 1600-1606.
- Brown, P.D., Wakefield, L.M., Levinson, A.D. and Sporn, M.B., Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2 and 3. *Growth Factors* 1990, **3**: 35-43.
- Callewaert, D.M., Radcliff, G., Waite, R., Lefevre, J. and Poulik, M.D., Characterization of effector-target conjugates for cloned human natural killer and human lymphokine activated killer cells by flow cytometry. *Cytometry* 1991, **12**: 666-676.
- Capsoni, F., Minonzio, F., Ongari, A.M. and Zanussi, C., A new simplified single-filter assay for *in vitro* evaluation of chemotaxis of ^{51}Cr -labeled polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol. Meth.* 1989, **120**: 125-131.
- Casale, T.B., Abbas, M.K. and Carolan, E.J., Degree of neutrophil chemotaxis is dependent upon the chemoattractant and barrier. *Am. J. respir. cell. mol. Biol.* 1992, **7**: 112-117.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. and Mantovani, A., Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992, **80**(8): 2012-2020.
- Craig Hooper, W., The role of transforming growth factor-beta in hematopoiesis. A review. *Leukemia Res.* 1991, **15**(4): 179-184.
- Fava, R.A., Olsen, N.J., Postlethwaite, A.E., Broadley, K.N., Davidson, J.M., Nanney, L.B., Lucas, C. and Townes, A.S., Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implication for TGF- β -driven synovial inflammation and hyperplasia. *J. exp. Med.* 1991, **173**: 1121-1132.
- Gallin, J.I., Clark, R.A. and Kimball, H.R., Granulocyte chemotaxis: an improved *in vitro* assay employing ^{51}Cr -labeled granulocytes. *J. Immunol.* 1973, **110**: N: 1.
- Glick, A.B., McCune, B.K., Abdulkarem, N., Flanders, K.C., Lumadue, J.A., Smith, J.M. and Sporn, M.B., Complex regulation of TGF- β expression by retinoic acid in the vitamin A-deficient rat. *Development* 1991, **111**: 1081-1086.
- Grotendorst, G.R., Smale, G. and Pencev, D., Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J. cell. Physiol.* 1989, **140**: 396-402.
- Hebert, C.A. and Baker, J.B., Interleukin-8: A review. *Cancer Invest.* 1993, **11**(6): 743-750.
- Khalil, N., Bereznyay, O., Sporn, M. and Greenberg, A.H., Macrophage production of transforming growth factor- β and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J. exp. Med.* 1989, **170**: 727-737.
- Khalil, N., O'connor, R.N., Unruh, H.W., Warren, P.W., Flanders, K.C., Kemp, A., Bereznyay, O.H. and Greenberg, A.H., Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor- β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. respir. cell. mol. Biol.* 1991, **5**: 155-162.
- L'Heureux, G.P., Bourgoin, S., Jean, N., McColl, S.R. and Naccache, P.H., Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human neutrophils: interleukin-8, but not NAP-2 or GRO α , stimulates phospholipase D activity. *Blood* 1995, **85**(2): 522-531.
- Locatelli, L., Sacerdote, P., Mantegazza, P. and Panerai, A.E., Effect of ibuprofen and diclofenac on the chemotaxis induced by substance p and transforming growth factor-beta on human monocytes and polymorphonuclear cells. *Int. J. Immunopharmacol.* 1993, **15**(7): 833-838.
- McColl, S.R., Beauseigle, D., Gilbert, C. and Naccache, P.H., Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- α involves regulation at a post-cell surface receptor level. *J. Immunol.* 1990, **145**: 3047.
- Parekh, T., Saxena, B., Reibman, J., Cronstein, B.N. and Gold, L.I., Neutrophil chemotaxis in response to TGF- β isoforms (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) is mediated by fibronectin. *J. Immunol.* 1994, **152**(5): 2456-2466.
- Perticarari, S., Presani, G. and Banfi, E., A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. *J. immunol. Meth.* 1994, **170**: 117-124.
- Perticarari, S., Presani, G., Mangiarotti, M.A. and Banfi, E., Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils. *Cytometry* 1991, **12**: 687-693.
- Postlethwaite, A.E. and Seyer, J.M., Identification of a chemotactic epitope in human transforming growth factor-beta 1 spanning amino acid residues 368 - 374. *J. Cell Physiol.* 1995, **164**(3): 587-592.
- Postlethwaite, A.E., Raghov, R., Stricklin, G., Ballou, L. and Sampath, T.K., Osteogenic protein-1, a bone morphogenic protein member of the TGF-beta superfamily, shares chemotactic but not fibrogenic properties with TGF- β . *J. Cell Physiol.* 1994, **161**(3): 562-570.
- Repech, L.A., A new *in vitro* assay for quantitating tumor cell invasion. *Inv. Metast.* 1989, **9**: 192-208.
- Rizzino, A., Transforming growth factor- β : Multiple effects on cell differentiation and extracellular matrix. *Develop. Biol.* 1988, **130**: 411-422.
- Roberts, A.B. and Sporn, M.B., Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factor* 1993, **8**: 1-9.
- Rothe, G. and Valet, G., Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leuk. Biol.* 1990, **47**: 440-448.
- Saiki, I., Murata, J., Matsuno, K., Ogawa, R., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I., Anti-metastatic and anti-invasive effects of polymeric Arg-Gly-Asp(RGD) peptide, poly(RGD) and its analogues. *Jpn. J. Cancer Res.* 1990, **81**: 660-667.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M. and de Crombrughe, B., Some recent advances in the chemis-

- try and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* 1987, **105**: 1039-1045.
- Susuki, Y., Tanigaki, T., Heimer, D., Wang, W., Ross, W.G., Murphy, G.A., Sakai, A., Sussman, H.H., Vu, T.H. and Raffin, T.A., TGF- β 1 causes increased endothelial ICAM-1 expression and lung injury. *J. appl. Physiol.* 1994, **77**(3): 1281-1287.
- Thelen, M., Uguccioni, M. and Bosiger, J., PI 3-kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 1995, **217**(3): 1255-1262.
- von Asmuth, E.J.U. and Buurman, W.A., Endothelial cell associated platelet-activating factor (PAF), a costimulatory intermediate in TNF- α -induced H₂O₂ release by adherent neutrophil leukocytes. *J. Immunol.* 1995, **154**: 1383-1390.
- Wahl, S.M., Costa, G.L., Mizel, D.E., Allen, J.B., Skaleric, U. and Mangan, D.F., Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J. Periodontol.* 1993, **64**: 450-455.
- Weiss, T.L., Selleck, S.E., Reusch, M. and Wintroub, B.U., Serial subculture and relative transport of human endothelial cells in serum-free, defined conditions. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 1990, **26**: 759-768.

Partie 3

Afin d'élucider le mécanisme d'action du facteur sécrété par les synoviocytes sur la survie et l'apoptose des neutrophiles, nous avons étudié son effet sur l'expression de Bcl-2 et Fas, lesquels jouent un rôle important dans l'apoptose.

Article 3

**CONDITIONED MEDIUM OF RAT SYNOVIOCYTES INHIBITS HUMAN NEUTROPHILS
APOPTOSIS BY ENHANCING BCL-2 EXPRESSION.**

Mouna Lagraoui et Lyne Gagnon

Cet article a été soumis au Journal of Immunology

Conditioned medium of rat synoviocytes inhibits human neutrophils apoptosis by enhancing Bcl-2 expression.

By Mouna Lagraoui and Lyne Gagnon.

From the department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, and Biochem Pharma Inc.

Summary

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) have a short half-life and rapidly undergo characteristic changes indicative of apoptosis. Recently we have reported that coculture with rat synoviocytes or their conditioned medium modulates neutrophil survival and activation. In this study we report that culture of neutrophils in the presence of fractionated conditioned medium from rat synoviocytes enhances neutrophils survival by preventing these cells from undergoing programmed cell death (PCD). The prevention of apoptosis seems to be related to an induction of Bcl-2 expression. No effect on Fas/Apo-1 expression is observed. These results suggest that synoviocytes may play a central role in modulation of neutrophil survival and activation during inflammatory processes, and this may be due to an induction of Bcl-2 expression.

***Key words:** Neutrophils, Synoviocytes, Apoptosis, Inflammation.*

Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the first line of defense against invading pathogens (1). They play a central role during acute inflammation, their primary function being the phagocytosis and killing of the

infectious agents (2). To accomplish this role, PMNs leave the circulation in response to chemotactic factors and enter in the affected area to exert their biological function; they recognize, phagocytose and kill pathogens (3,4,6). Unfortunately, neutrophils also contribute in a major way to the symptoms of chronic inflammation (5).

Effectively, neutrophils are able to release a number of potentially injurious agents when activated, and therefore cause serious tissue damage (6,7). There are two principal groups of agents which contribute to the pathogenesis of several human diseases; reactive oxidants and proteolytic enzymes (6,7,9). Among these are superoxide anions, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, serine proteinase, elastase, collagenase and gelatinase (9-11). Various cytokines secreted during inflammation may regulate the recruitment, accumulation, survival and activation of neutrophils in the affected area (5,6,12-16). Some of these cytokines such as IL-1 β , TNF- α , IFN γ , IL-8 and its related molecules, TGF- β 1, PDGF and GM-CSF play a key role in inflammatory processes by regulating the activity and the survival of PMNs.

Aging neutrophils undergo programmed cell death (PCD) (13,17). Apoptotic cells are therefore recognized and ingested by macrophages (18,19). This process represents a mechanism by which neutrophils are cleared from the inflammatory site. The failure of this process may result in serious inflammatory diseases mediated by an accumulation and persistence of activated neutrophils at the injured site. Among these inflammatory disorders are rheumatoid arthritis, ischemia-reperfusion injury and adult respiratory distress syndrome (6). It was reported that a variety of inflammatory mediators may regulate apoptosis *in vitro*. Among these, GM-CSF, IL-1, IL-2 and LPS may inhibit neutrophil apoptosis (13,20,21). Others studies have reported the effects of G-CSF and IL-6 on the suppression of neutrophil apoptosis (21,22). A recent study has shown that the interaction of neutrophils with platelets induces an inhibition of human neutrophil apoptosis (25).

Furthermore, apoptosis may be regulated by other mechanisms such as the interaction of the Fas molecule with its ligand (FasL) which promotes PCD by transducing an apoptotic signal (26,27,48) or the intervention of Bcl-2 or its homologue A1 which inhibit apoptosis (32,49). The Fas (Apo-1 : CD95), belongs to the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, and FasL is a member of the TNF family (32). It has been shown that PCD induced by the interaction of Fas with FasL, play an important role in preventing certain autoimmune diseases (33-36) . The Bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) protooncogene encodes an inner mitochondrial membrane protein that inhibits apoptosis (37-42). It was reported that Bcl-2 blocks PCD by its antioxidant activity and by inhibiting the activity of the cysteine protease ICE (interleukin1 β converting enzyme) (43). A1 is a Bcl-2 homologue which is expressed in neutrophils and macrophages (50,51). Others studies have reported the involvement of A1 in the inhibition of certain types of neutrophil apoptosis (49,51).

During the inflammatory process, neutrophils interact with various cells such as endothelial cells, macrophages, lymphocytes, and synoviocytes. In this microenvironment, various factors and cytokines secreted by those cells may attract and activate neutrophils and promote or inhibit their survival. In a previous work, we have demonstrated that rat synoviocytes secrete a soluble factor which enhances human neutrophils survival and activation. Preliminary purifications of this factor have shown that it has a molecular weight greater than 100 kD and it elutes in fraction # 2 when heated and fractionated conditioned medium was passed through a superose 6 column. In this study, we report that this soluble factor secreted by rat synoviocytes promotes human neutrophils survival by suppressing apoptosis. This inhibition of PCD correlates with an enhancement of Bcl-2 expression, whereas no significant change was detected in the expression of Fas/Apo-1. Our results indicate that synoviocytes may play a central role in the pathogenesis of inflammatory

disorders by secreting a soluble factor which promotes neutrophil survival and activation.

In our previous work, we have demonstrated that rat synoviocytes secrete a soluble factor which promotes neutrophil survival and activation, as assessed by superoxide generation and phagocytosis. Preliminary physicochemical characterization of this factor has shown that the factor is heat stable and the native form has a molecular weight greater than 100 kDa. In the present study, we have investigated the effect of this factor on neutrophil apoptosis and the mechanism by which this factor could inhibit apoptosis, notably by its effects on Bcl-2 and Fas/Apo-1 expression.

Materials and Methods

Isolation and culture of human neutrophils

Neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy volunteers by gradient centrifugation as described by Lagraoui and Gagnon (16). The cells were resuspended in RPMI 1640 (Gibco) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone) to a density of 2×10^6 per ml. Final cell preparations routinely consisted of > 95% neutrophils as determined by a Wright Giemsa staining (Sigma). Viability was determined by trypan blue (Gibco) exclusion and was greater than 97%.

Freshly isolated neutrophils were incubated for a period of 24 hours in a 12-well tissue culture plate, either alone or in the presence of fractionated conditioned medium. The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/ 5% CO₂. After incubation, neutrophil survival was assessed by trypan blue exclusion.

Isolation of rat synoviocytes

Synoviocytes were isolated from rat synovial membrane as described by Lafyatis *et al.*,(23). Passages 4 – 9 were used in our assays. Cells were suspended at 2×10^6 cells per ml in DMEM-F12 (Gibco) supplemented with 20% FBS, garamycine (100ug/ml) and 0.2% fungizone (Gibco).

Conditioned medium

Conditioned medium (supernatant) was collected from rat synoviocytes cultures and kept at -80°C until used. Fractionation was achieved on heated conditioned medium (20 minutes at 90°C to 100°C) by ultrafiltration on 100 kD cutoff centricon (Amicon). Fractionated conditioned medium was processed through a FPLC gel filtration column (Superose 6, Pharmacia) for preliminary purification. Collected fractions were then assessed for activity against neutrophils; survival, apoptosis, Bcl-2 and Fas/Apo-1 expression.

Apoptosis Assay

Apoptosis was assessed according to the method described by Nicoletti *et al.*, (24). Briefly, freshly isolated neutrophils were incubated for 24 hours at 37°C with different fractions of conditioned medium prepared as above. After incubation, cells were stained with propidium iodide (PI, Sigma) and analyzed for apoptosis using an XL Flow Cytometer (Coulter). Data were then expressed as the percent of apoptotic cells.

Bcl-2 expression assay

After 24 hours of incubation with or without fractions of rat synoviocytes conditioned medium, neutrophils were lysed in SDS sample buffer and boiled for 5 min. Cellular extracts were electrophoresed on 8% SDS-PAGE. Proteins

were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham) at 100V for 1h. Transfer efficiency was visualized by reversible Ponceau red staining. Immunoblotting was performed using a mouse monoclonal antibody (Ab3, Oncogene Science) to detect human Bcl-2. The reaction was visualized by an ECL kit (ECL western blotting protocols, Amersham) and the immunodetection was achieved according to the protocol provided by the supplier.

Fas expression assay

Quantification of human Fas/Apo-1 was performed using a sandwich enzyme immunoassay using a mouse monoclonal antibody (Fas/Apo-1 Quantitative Assay, Oncogene). Neutrophils were incubated for 24 hours in the presence or absence of the fractions of rat synoviocytes conditioned medium. Cell lysis and Fas/Apo-1 quantification were achieved according to the manufacturer's instructions. The concentration of Fas/Apo-1 in the sample was determined by comparing the absorbance of Fas measured in the sample with that obtained from the standard.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical evaluation of the data was performed by student-t test to determine a significant variance. A P-value less than 0.05 was considered significant for all tests and it is presented by (*).

Results

Fractionated conditioned medium inhibits neutrophils apoptosis

It was previously demonstrated that the factor is recovered in fractions 2 and 3 (data submitted). This factor increases neutrophil survival, as assessed by trypan blue exclusion and activation (respiratory burst and phagocytosis).

Freshly isolated neutrophils were incubated for 24 hours with or without fractions collected by FPLC performed on rat synoviocytes heated and fractionated conditioned medium. After incubation, apoptosis was assessed by propidium iodide (PI) incorporation (PI incorporation into DNA strand occurring under apoptosis). Our results indicate that the active fraction 2 and 3 obtained by FPLC gel filtration significantly reduce neutrophil apoptosis induction (Figure1). A reduction of 12% (fraction 2) and 7% (fraction 3) is observed after 24 hour-cultures. Fraction 2 was used for the following experiments.

Fraction 2 : Effect on Fas/Apo-1 expression

To investigate the mechanism by which the fraction 2 (F-2) inhibits apoptosis, we studied its effect on Fas expression. As shown in Table1, there is no difference in the level of Fas production between neutrophils incubated in the presence of F-2 and the control (neutrophils incubated in presence of PBS or RPMI-10% FBS).

Fraction 2 : effect on Bcl-2 expression

Because Bcl-2 plays a central role in cell protection against apoptosis, we have looked at the effect of the preincubation of neutrophils with fraction F-2 on Bcl-2 expression. As shown in figure 2, Bcl-2 expression is significantly induced by preincubation of neutrophils with F-2. This expression was observed after 24 hours and Bcl-2 is overexpressed compared to the control.

Discussion

During inflammation, PMNs interact with numerous cells notably platelets, macrophages, lymphocytes and synoviocytes. These cells may modulate neutrophil survival and activation, by secreting various factors such as cytokines and growth factors (13). PMNs are short-lived cells and in the absence of appropriate stimuli they undergo rapid programmed cell death or apoptosis (13,17), after which they are recognized and phagocytosed by macrophages (18,19). This process has been suggested to be a mechanism by which neutrophils are removed from inflammatory site. It serves to limit tissue damages and to resolve efficiently the process of inflammation.

We have previously shown that rat synoviocytes produce a soluble factor which promotes neutrophil survival and activation by increasing their phagocytosis and respiratory burst (data submitted). Effectively, neutrophils incubated in the presence of fractionated and heated conditioned medium from rat synoviocytes, showed a significant increase in their activities compared to the neutrophils incubated in complete culture medium (control). This factor is secreted spontaneously by both normal and arthritis-induced rat synoviocytes. In this study, we report that this factor promotes neutrophil survival *in vitro* by an inhibition of apoptosis. PMNs die by PCD, this process may be regulated by various mechanisms involving modulators such as cytokines, growth factors, Bcl-2 and Fas/FasL system (13,20-22,26,27,32,48).

In the present study, we attempt to understand the mechanism by which the factor secreted by rat synoviocytes could inhibit neutrophil apoptosis. Since Bcl-2 and the Fas/FasL system are strongly involved in the PCD process, we investigated the effect of our factor on their expression. Neutrophils incubated in presence of fractionated and heated conditioned medium from rat synoviocytes showed a significant reduction of apoptosis and an important increase of Bcl-2 expression. However, no changes were observed on Fas expression. Several studies have reported the involvement of the Fas/FasL system in apoptosis (26,27). Effectively, the interaction of Fas, a widely

expressed 45kDa protein, with its ligand FasL, a 37kD protein mediates PCD in various cells including neutrophils (28-32). In other hands, Fas mediated neutrophil apoptosis is suppressed by incubation with growth factors or cytokines such as G-CSF, GM-CSF, IFN- γ and TNF- α (48). Our results showed that the soluble factor does not influence the expression of Fas on the neutrophils. Further studies are required to elucidate the direct effect of this factor on neutrophil apoptosis mediated by the Fas/FasL system.

The Bcl-2 protooncogene encodes for a 26kD protein that has been shown to enhance the survival of some types of hematopoietic cells (39). Various investigations have demonstrated that the Bcl-2 family blocks apoptosis (37,42). In fact, Bcl-2 is able to prevent programmed cell death of myeloid and lymphoid cells when certain growth factors are withdrawn (47). It can also protect mammalian cells from DNA, RNA and protein synthesis inhibitors, heat shock and irradiation (44,47). In other hands, Bcl-2 may block apoptosis by inhibiting the activity of the ICE and by its antioxidative activity (43,45,46). In this study, we report that rat synoviocytes conditioned medium contains a soluble factor which inhibits apoptosis. This inhibition was associated with enhancement of Bcl-2 expression. It will be of considerable interest to examine whether this overexpression of Bcl-2 in neutrophils has a direct effect on apoptosis mediated by the Fas/FasL system or if it affects another PCD pathway, and to examine the molecular mechanisms by which it occurs. Neutrophils are implicated in several inflammatory disorders (e.g. rheumatoid arthritis : RA). Effectively, the recruitment of PMNs into the inflamed joints of RA patients, and their accumulation into the synovial fluids indicate that these cells are strongly involved in the pathology of RA. Moreover, activation of neutrophils by immune complexes in synovial fluid contributes to the pathogenesis of RA (6-8). PMNs contain a wide spectrum of cartilage-degrading enzymes which, upon stimulation, can be released along with cytotoxic oxygen metabolites. Activated neutrophils, therefore, may contribute, besides other cells, to tissue damage at sites of inflammation (5-11).

In this work, we demonstrate that rat synoviocytes secrete a soluble factor which promotes neutrophils survival and activation (data submitted). This factor prevents PMNs from undergoing programmed cell death. This prevention correlates with an increase of Bcl-2 expression. Our finding suggest that the factor may have an important role in modulating neutrophil apoptosis. It will be of considerable interest to examine the effect of this factor on the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 homologue, A1, since it was shown that it is induced by proinflammatory cytokines (51).

These results suggest that synoviocytes may participate in a significant way in the pathogenesis of some inflammatory processes such RA by secreting a factor inducing survival and activation of neutrophils in RA joints and synovial fluid.

Acknowledgments

We thank Dr. Serge Montplaisir and Dr. Shaun Abott for their helpful comments on the manuscript. We acknowledge financial support from Biochem Therapeutic Inc and material support from University of Montréal. We also thank Sonia Fortin for her help in processing some data.

References

1. Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, A. Mantovani. 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80 (8):2012.
2. Homburg, C. H. E., M. De haas, A. G. E. Kr. Von dem born, A. J. Verhoeven, C. P. M. Reutelingsperger, and D. Roos. 1995. Human neutrophils lose their surface Fc γ RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85 (2):532.
3. Strieter, R. M., S. L. Kunkel, M. D. Burdick, P. M. Lincoln, and A. Walz. 1992. The detection of a novel neutrophil-activating peptide (ENA-78) using a sensitive ELISA. *Immunol. Invest.* 21 (6):589.

4. Feng, D., J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak. 1998. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med.* 187 (6):903.
5. Bickel, M. 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J. Periodontol.* 64:456.
6. Smith, J. A. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation : a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56:672.
7. Seitz, M., B. Dewald, N. Gerber, and M. Baggiolini. 1991. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 87:463.
8. Koch, A. E., S. L. Kunkel, L. A. Harlow, D. D. Mazarakis, G. K. Haines, M. D. Burdick, R.M. Pope, A. Walz, and R.M. Strieter. 1994. Epithelial neutrophil activating peptide-78 : a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J. Clin. Invest.* 94:1012.
9. Masure, S., P. Proost, J. Van Damme, and G. Opdenakker. 1991. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur. J. Biochem.* 198:391.
10. Manna, S.K., S. Samanta, and A. K. Samanta. 1997. Hamycin inhibits IL-8-induced biologic response by modulating its receptor in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 159:5042.
11. Kasama, T., R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick, and S. L. Kunkel. 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 α . *J. Exp. Med.* 178:63.
12. Ichinose, Y., N. Hara, M. Ohta, H. Aso, H. Chikama, M. Kawasaki, I. Kubota, T. Shimizu, and K. Yagawa. 1990. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide maintain the phenotype of superoxide anion generation by neutrophils. *Infect. Immun.* 58 (6):1647.
13. Brach, M. A., S. DeVos, H. J. Gruss, and F. Herrmann. 1992. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 80 (11):2920.

14. Adachi, S., M. Kubota, Y. Wakazono, H. Hirota, K. Matsubara, K. Kuwakado, Y. Akiyama, and H. Mikawa. 1993. Mechanism of enhancement of neutrophil survival by granulocyte colony-stimulating factor and adenine. *Exp. Hematol.* 21:1213.
15. Adachi, S., M. Kubota, K. Matsubara, Y. Wakazono, H. Hirota, K. Kuwakado, Y. Akiyama, and H. Mikawa. 1993. Role of protein kinase C in neutrophil survival enhanced by granulocyte colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.* 21:1709.
16. Lagraoui, M., and L. Gagnon. 1997. Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF- β 1. *Cell. Mol. Biol.* 43 (3):313.
17. Cox, G. 1995. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.* 154:4719.
18. Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson, and C. Haslett. 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. *J. Clin. Invest.* 83:865.
19. Savill, J. 1992. Macrophage recognition of senescent neutrophils. *Clin. Sci.* 83:649.
20. Pericle, F., J. H. Liu, J. I. Diaz, D. K. Blanchard, S. Wei, G. Forni, and J. Y. Djeu. 1994. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 24:440.
21. Yamamoto, C., S. I. Yoshida, H. Taniguchi, M. H. Qin, H. Miyamoto, and Y. Mizuguchi. 1993. Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect. Immun.* 61 (5):1972.
22. Biffl, W. L., E. E. Moore, F. A. Moore, and C. C. Barnett, Jr. 1995. Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J. Leukoc. Biol.* 58:582.
23. Lafyatis, R., E. F. Remmers, A. B. Roberts, D. E. Yocum, M. B. Sporn, and R. L. Wilder. 1989. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J. Clin. Invest.* 83:1267.

24. Nicoletti, I., G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, and C. Riccardi. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 139:271.
25. Andonegui, G., A. S. Trevani, D. H. Lopez, S. Raiden, M. Giordano, and J. R. Geffner. 1997. Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. *J. Immunol.* 158:3372.
26. Biancone, L., A. De Martino, V. Orlandi, P.G. Conaldi, A. Toniolo, and G. Camussi. 1997. Development of inflammatory angiogenesis by local stimulation of Fas *in vivo*. *J. Exp. Med.* 186 (1):147.
27. Halaas, O., R. Vik, and T. Espevik. 1998. Induction of Fas ligand in murine bone marrow NK cells by bacterial polysaccharides. *J. Immunol.* 160:4330.
28. Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, and S. Nagata. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169.
29. Abbas, A. K. 1996. Die and let live: Eliminating dangerous lymphocytes. *Cell* 84:655.
30. Enari, M., H. Hug, and S. Nagata. 1995. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375:78.
31. Los, M., M. Van de Craen, L. C. Penning, H. Schenk, M. Westendorp, P. A. Baeuerle, W. Dröge, P. H. Krammer, W. Fiers, and K. Schulze-Osthoff. 1995. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/Apo-1-mediated apoptosis. *Nature* 375:81.
32. Itoh, N., Y. Tsujimoto, and S. Nagata. 1993. Effect of Bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* 151:621.
33. Singer, G. G., A. C. Carrera, A. M. Rothstein, C. Martinez-A, and A. K. Abbas. 1994. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: The MRL-*lpr/lpr* model. *Curr. Opin. Immunol.* 6:913.
34. Takahashi, T., M. Tanaka, C. I. Brannan, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, T. Suda, and S. Nagata. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76:969.

35. Fukunaga, R. W., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314.
36. Ettinger, R., J. K. M. Wang, P. Bossu, K. Papas, C. L. Sidman, A. K. Abbas, and A. M. Rothstein. 1994. Functional distinctions between MRL-*lpr* and MRL-*gld* lymphocytes. Normal cells reverse the *gld* but not *lpr* immunoregulatory defect. *J. Immunol.* 152:1557.
37. Carson, W. E., S. Haldar, R. A. Baiocchi, C. M. Croce, and M. A. Caligiuri. 1994. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7553.
38. Silverman, G. A., E. Yang, J. H. Proffitt, M. Zutter, and S. J. Korsmeyer. 1993. Genetic transfer and expression of reconstructed yeast artificial chromosomes containing normal and translocated Bcl-2 proto-oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 13:5469.
39. Reed, J. C., H. S. Talwar, M. Cuddy, G. Baffy, J. Williamson, U. R. Rapp, and G. J. Fisher. 1991. Mitochondrial protein p26 Bcl-2 reduces growth factor requirements of NIH3T3 fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 195:277.
40. Haldar, S., A. Basu, and C. M. Croce. 1997. Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer. Res.* 57:229.
41. Raff, M. C., B. A. Barres, J. F. Burne, H. S. Coles, Y. Ishizaki, M. D. Jacobson. 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262:695.
42. Schneider, T. J., D. Grillot, L.C. Foote, G. E. Nunez, and T. L. Rothstein. 1997. Bcl-x protects primary B cells against Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 159:4834.
43. Martinou, J. C. 1995. La mort cellulaire programmée dans le système nerveux. *Médecine/Sciences.* 11:367.
44. Vaux, D. L. 1993. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:786.

45. Herman, D., and B. Mignotte. 1994. L'apoptose dérive-t-elle de la mort nucléaire programmée mise en œuvre par les protistes ? *Médecine/Sciences*. 10:687.
46. Strasser, A., A. W. Harris, T. Jacks, and S. Cory. 1994. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79:329.
47. Chiu, V. K., C. M. Walsh, C. C. Liu, J. C. Reed, and W. R. Clark. 1995. Bcl-2 blocks degranulation but not fas-based cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 154:2023.
48. Liles, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, S. J. Klebanoff. 1996. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes : implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J. Exp. Med.* 184:429.
49. Hamasaki, A., F. Sendo., K. Nakayama., N. Ishida., I. Negishi., K. I. Nakayama., and S. Hatakeyama. (1998). Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the Bcl-2 -related A1 gene. *J. Exp. Med.* 188:1985-1992.
50. Chuang, P. I., E. Yee., A. Karsan., R. K. Winn., and J. M. Harlan. (1998). A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 249:361-365.
51. Orlofsky, A., R. D. Somogyi., L. M. Weiss., and M. B. Prystowsky. (1999). The murine antiapoptotic protein A1 is induced in inflammatory macrophages and constitutively expressed in neutrophils. *J. Immunol.* 163:412-419.

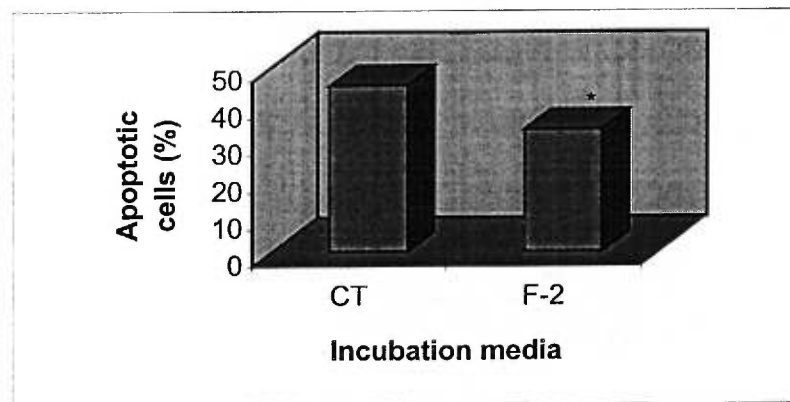


Figure 1. Effect of fraction on neutrophil apoptosis. Cells were incubated for 24 hours with or without biological active fraction (F-2) obtained by FPLC from heated conditioned medium of synoviocytes. Apoptosis was assessed as described in Materials and Methods. Data were expressed as the percent of apoptotic cells. A $p < 0,05$ was considered significant. ($n = 7$).

Table 1. Effect of fraction 2 (F-2) from rat synoviocytes heated and fractionated conditioned medium on Fas protein expression.

<i>Media</i>	<i>Concentration of Fas: Units/ml \pm SD</i>
PBS	2.04 \pm .21
RPMI-10% FBS	1.96 \pm .16
F-2	2.03 \pm .12

Neutrophils were incubated in presence of fraction 2 (F-2) collected by FPLC from rat synoviocytes heated and conditioned medium or in the presence of PBS or RPMI-10% FBS for 24 hrs. After incubation, quantification of Fas was assessed by ELISA . Results are expressed as the mean \pm SD. A p- value $>$ 0.05 was not considered significant.



Figure 2. Western blot analysis of Bcl-2 protein in neutrophils incubated with or without fraction 2 (F-2). Samples were incubated respectively with, 1: RPMI-10%FBS, 2: PBS, 3: F-2 and 4: TGF- β 1. After 24 hours of incubation, the western blot analysis of Bcl-2 protein were performed as described in Materials and Methods. Red ponceau staining was used to visualize the bands after each transfert.

CHAPITRE III

DISCUSSION

La réponse immunitaire est un processus complexe qui met en jeu deux mécanismes importants ; l'immunité innée et l'immunité acquise. Ces deux phénomènes se complètent d'une façon efficace afin de permettre le bon déroulement d'une réponse immunitaire normale. L'immunité innée et acquise reposent sur l'intervention d'une grande variété de cellules mettant en jeu ainsi un ensemble d'interactions cellulaires. Ces dernières peuvent s'effectuer par contact direct (cellule-cellule) ou d'une façon indirecte. Le contact direct fait intervenir des récepteurs et leurs ligands, alors que l'action indirecte met en jeu des cytokines et des facteurs de croissance ainsi que d'autres médiateurs solubles.

L'immunité innée correspond au premier mécanisme de défense de l'hôte contre les agressions. Elle nécessite l'intervention de différents types de cellules tel les macrophages, les cellules NK et les neutrophiles. Ces derniers sont les premiers à arriver au site de lésion. Grâce à leur structure et leurs constituants, ils interviennent d'une façon très efficace dans la défense de l'hôte. Les PMN peuvent interagir avec différentes cellules par l'intermédiaire de divers médiateurs. Ces derniers peuvent être libérés par les cellules avoisinantes et moduler la réponse des neutrophiles. Ils peuvent ainsi affecter leur survie et / ou leur activation. Ceci met en jeu un vaste réseau de cytokines, facteurs de croissance et médiateurs solubles.

Plusieurs études ont démontré que les interactions cellulaires entre les neutrophiles et les cellules avoisinantes jouent un rôle important dans la réponse des PMN. En effet, des auteurs ont démontré que les co-cultures des neutrophiles avec d'autres cellules tel les fibroblastes et les plaquettes augmentaient la survie des PMN (Ling *et al.*, 1990 ; Andonegui *et al.*, 1997). Ce phénomène est dû à la sécrétion par ces cellules de facteurs solubles qui peuvent moduler la survie et / ou l'activation des neutrophiles. Ceci est confirmé par d'autres résultats. Ces derniers ont démontré que les milieux conditionnés ou les surnageants recueillis à partir des cultures de certaines

cellules telles les fibroblastes, modulaient la réponse des PMN (Southey *et al.*, 1993 ; Ogushi *et al.*, 1993).

Les neutrophiles contiennent une grande variété de facteurs lytiques qui leur permettent de combattre divers agents pathogènes. Malheureusement, ces facteurs peuvent aussi induire des dommages tissulaires assez importants et impliquer ces cellules dans différentes immunopathologies. Ainsi, en cas d'un dérèglement de la réponse immunitaire, les neutrophiles activés en interagissant avec les cellules de leur voisinage immédiat maintiennent la synthèse et la sécrétion de leurs facteurs lytiques. Ceci entraîne alors des lésions tissulaires qui peuvent être néfastes pour l'hôte.

Les résultats obtenus au cours de ce projet nous ont permis d'éclaircir certains aspects des interactions cellulaires qui ont lieu entre les neutrophiles et les autres cellules avoisinantes. De même, cette étude nous a aidé à comprendre comment les PMN en interagissant avec les cellules de leur voisinage immédiat peuvent induire des dommages tissulaires comme par exemple dans le cas d'arthrite rhumatoïde. Lors de ce projet, nous avons pu démontrer que les cocultures : neutrophiles avec les synoviocytes de rat ou neutrophiles avec les RAW264.7 (lignée macrophagique) entraînaient une augmentation de la survie des neutrophiles comparé au contrôle (neutrophiles incubés seulement avec du RPMI-10% FBS) ($68\% \pm 4.2$, $72\% \pm 50\% \pm 3.2$). Cette augmentation de survie se maintenait même en absence de ces cellules. En effet, lors de l'incubation des PMN avec les surnageants recueillis à partir des cultures des synoviocytes et des RAW264.7, nous avons pu noter qu'il y avait toujours une augmentation de la survie comparé au contrôle ($60.7\% \pm 4.6$, $58.5\% \pm 3.4$, $45\% \pm 3.07$). Ceci nous a amené à conclure que le contact direct (cellule-cellule) n'est pas nécessaire à cette prolongation de survie. C'est donc un (ou des) facteur soluble sécrété par les synoviocytes et les RAW264.7 qui est responsable de cette augmentation de survie.

Normalement, les neutrophiles ont une durée de vie limitée et leur demi-vie dans la circulation est de 4 à 10 heures (Smith, 1994). *In vitro*, en absence de facteurs de croissance appropriés les PMN meurent rapidement en entamant le processus d'apoptose (Colotta *et al.*, 1992 ; Brach *et al.*, 1992). Plusieurs cytokines et facteurs de croissance augmentent la survie des neutrophiles et stimulent leur activation. Parmi les principaux facteurs qui agissent sur les PMN, trois médiateurs jouent un rôle important dans la modulation de leur survie et de leurs fonctions. Il s'agit de l'IL-1, l'IL-8 et du GM-CSF. L'IL-1 agit en synergie avec d'autres facteurs aux stades précoces de l'hématopoïèse, elle active les neutrophiles et est fortement impliquée dans les réactions inflammatoires (Dinarello, 1991). L'IL-8 représente la famille des α -chemokines, c'est un puissant facteur chimiotactique et activateur des PMN. L'IL-8 stimule plusieurs fonctions des neutrophiles lors du processus inflammatoire (Bickel, 1993). Le GM-CSF prolonge la survie des PMN et agit seul ou en collaboration avec d'autres cytokines pour moduler leur activation (Brach *et al.*, 1992 ; Cox *et al.*, 1992 ; Smith. 1994). Afin d'identifier le facteur sécrété par les synoviocytes et les RAW264.7, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux neutralisants contre l'IL-1, l'IL-8 et le GM-CSF. Nos résultats ont démontré que l'incubation des neutrophiles en présence des surnageants des synoviocytes et de RAW264.7 et des anticorps, n'inhibait pas la prolongation de survie induite par les surnageants. Ceci démontre donc que le facteur en question est différent de l'IL-1, l'IL-8, et du GM-CSF. En plus, ce facteur n'est pas affecté par les traitements à la chaleur. Nous avons chauffé les surnageants pendant 20 à 60 min à 100°C, et nous avons remarqué que leur effet sur la prolongation de survie des PMN n'a pas changé. Des études ont démontré la stabilité de certaines cytokines et facteurs de croissance à des températures élevées. C'est le cas par exemple de l'IL-8 et du TGF- β 1. Effectivement, 90% de l'activité de l'IL-8 est retrouvée après 30 min à 60°C, et 86% après 5 min à 100°C (Cavaillon, 1996). De même, le TGF- β 1 qui est généralement sécrété sous une forme latente, peut être activé de différentes façons, telles les variations du pH et les traitements à la chaleur. Il a été

rapporté que l'activation complète du TGF- β 1 est atteinte après 10 min à 70°C, 5 min à 75°C, et 1 min à 85-90°C (Brown *et al.*, 1990). Par ailleurs, nous avons pu démontrer lors de notre étude du TGF- β 1 que ce dernier gardait 70% de son activité après 60 min à 100°C. La stabilité de notre facteur à la chaleur nous a ainsi permis d'éliminer plusieurs médiateurs de la liste des éventuelles cytokines qui pourraient lui correspondre, tel le TGF- β 1. Toutefois, l'utilisation d'un anticorps monoclonal neutralisant du TGF- β 1, n'affecte pas l'augmentation de survie des PMN induite par notre facteur.

Dans le but de mieux caractériser ce facteur, nous avons essayé d'estimer son poids moléculaire. Pour ce faire, nous avons utilisé dans un premier temps l'ultrafiltration différentielle. Cette méthode est basée sur l'utilisation de centricon de divers seuils de séparation. Elle permet en même temps la concentration et la séparation en fractions de l'échantillon. Dans notre cas, on a utilisé des centricons dont les seuils de séparation sont de 50 kD et 100 kD. Ainsi, les surnageants des synoviocytes et des RAW264.7 qui ont été chauffés ou non pendant 20 min à 100°C ont été concentrés à l'aide de centricons-100. Ceci a permis de séparer les surnageants chauffés ou non en deux types de fractions: celles qui contiennent des facteurs dont le poids moléculaire est supérieur à 100 kD et celles dont les facteurs ont un poids moléculaire inférieur à 100 kD. Toutes ces fractions ont été testées pour la survie et l'activation des neutrophiles. Les résultats ont démontré que seules les fractions qui contiennent des facteurs de poids moléculaire supérieur à 100 kD pouvaient significativement prolonger la survie des PMN et induire leur activation. Cette dernière a été mise en évidence par l'étude de la respiration oxydative. En effet, les fractions de poids moléculaire supérieur à 100 kD stimulaient la production du peroxyde d'hydrogène par les neutrophiles. Les deux types de cellules, synoviocytes et RAW264.7, sécrètent un ou des facteur(s) qui active et prolonge la survie des neutrophiles. On ne sait pas s'il s'agit d'un même facteur ou si ce sont des facteurs distincts.

Afin d'identifier le facteur en question, nous avons décidé de nous concentrer sur un seul type de surnageant. Notre choix s'est alors porté sur le surnageant des synoviocytes qui sont fortement impliqués dans l'arthrite rhumatoïde (Firstein *et al.*, 1992 ; Rathanaswami *et al.*, 1993). Le reste de notre étude s'est effectué sur le surnageant des synoviocytes qui a été chauffé à 100°C pendant 20 min. Ainsi, l'analyse chromatographique (FPLC) nous a permis d'estimer le poids moléculaire de ce facteur. La séparation par gel de filtration a démontré qu'il a un poids moléculaire natif approximatif de 600 kD. Effectivement, toutes les fractions obtenues par FPLC ont été testées pour leur activité biologique sur les neutrophiles. D'après le profil de la FPLC, la fraction qui active les PMN se trouve dans le pic qui correspond à des hauts poids moléculaires. Ces derniers ont été estimés selon les standards qui ont servis à l'équilibration de la colonne. Nos résultats ont démontré que la fraction-2 (F-2) qui correspond au poids moléculaire approximatif de 600 kD activait les neutrophiles. Ceci a été mis en évidence par l'effet de la F-2 sur la phagocytose et la respiration oxydative des PMN. En effet, cette fraction stimule significativement la phagocytose et la respiration oxydative des neutrophiles comparé au contrôle et aux autres fractions. L'activation de la respiration oxydative s'est traduite par une augmentation de la production du peroxyde d'hydrogène. En outre, lors d'une étude préliminaire de certaines propriétés physicochimiques du facteur de la fraction F-2 nous avons constaté qu'il n'était pas affecté par des traitements acides ou par la chymotrypsine. Ce phénomène peut être expliqué selon deux hypothèses, soit: 1) les deux types de traitement (acide et enzymatique) n'ont effectivement aucun effet sur le facteur, 2) au contraire ils l'affectent mais d'une façon positive. On peut supposer que la chymotrypsine dégrade le facteur à un site bien précis de telle sorte que la partie responsable de l'activité biologique puisse rester intacte. Ainsi, la fraction ne perd pas son pouvoir de stimuler la phagocytose. En ce qui concerne le traitement acide, on peut supposer que l'acidité active le facteur, mais vu qu'il a déjà atteint son seuil optimal d'activation par la chaleur il ne peut être activé davantage. Ceci pourrait expliquer pourquoi ces traitements ne semblent pas affecter le pouvoir de la fraction F-2 de stimuler la

phagocytose. Toutefois, ces hypothèses ne peuvent être réellement démontrées que si le facteur est complètement purifié. Donc une étude plus approfondie sur le facteur purifié s'impose puisque celui qu'on a utilisé dans nos expériences est semi-pur.

Par ailleurs, l'analyse électrophorétique sous des conditions non dénaturantes a montré que le facteur a un poids moléculaire d'environ 240 kD. En plus, étant donné que notre facteur ne pouvait être visualisé sur gel que par des colorations au nitrate d'argent, on a pu conclure qu'il pourrait s'agir d'un puissant médiateur. Ce dernier étant présent dans la fraction F-2 à des concentrations de nanogramme (ng) et moins, peut moduler à la fois la survie et l'activation des PMN. Ceci nous permet de postuler qu'il pourrait avoir une activité biologique à des concentrations approximatives de 10^{-12} à 10^{-14} M. La variation du poids moléculaire (240 kD et 600 kD) d'une technique de purification à l'autre est due probablement au changement de l'agglomération de la molécule qui peut varier suivant les milieux de séparation qui ne sont pas identiques. Dans le cas de la FPLC, on a utilisé une colonne (superose-6) dont le milieu de séparation est l'agarose, tandis que pour l'électrophorèse le milieu de séparation est l'acrylamide. En effet, le comportement biochimique de la molécule pourrait changer d'un milieu chimique à un autre, soit en formant des complexes (dimères ou trimères), ou en se liant à une autre protéine et ainsi former un agglomérat ce qui donne un PM élevé au niveau de la FPLC. Des résultats similaires ont été obtenus lors de la purification du TGF- β (Karl et Sporn, 1990).

Les résultats obtenus démontrent que les synoviocytes sécrètent un facteur qui module la survie et l'activation des neutrophiles. Ceci signifie que les synoviocytes peuvent contribuer d'une façon importante à la gravité de certains cas d'arthrite telle l'arthrite rhumatoïde (Koch et al., 1994; Tiku et al., 1986; Weissmann et Korchak, 1984). Cette maladie implique différentes cytokines et facteurs de croissance, de même qu'une grande variété de cellules notamment, les synoviocytes et les neutrophiles. Ces derniers se retrouvent en très grand

nombre au niveau du fluide synovial des patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Le recrutement et l'activation des PMN peuvent être induits par différentes cytokines et facteurs qui peuvent être présents dans le site d'inflammation. Effectivement, les neutrophiles peuvent être activés par les complexes immuns qui se trouvent dans le fluide synovial, de même que par des cytokines tel l'IL-8. Le facteur sécrété par les synoviocytes peut aussi contribuer à l'activation des PMN. Une fois activés, les neutrophiles produisent les dérivés oxygénés et les enzymes lytiques. En plus, ils sécrètent des cytokines tel l'IL-1 qui vont participer à ce désordre pathologique. L'IL-1 est une cytokine proinflammatoire qui est aussi impliquée dans l'arthrite. Des études ont démontré que l'IL-1 stimule la prolifération des synoviocytes en culture de même que la production de certaines enzymes telles la collagénase et des métalloprotéinases qui sont impliquées dans la destruction de la matrice extracellulaire (Firestein *et al.*, 1992). Les dérivés toxiques produits par les neutrophiles combinés aux enzymes sécrétées par les synoviocytes, peuvent endommager sérieusement les tissus de l'hôte tel la dégradation du cartilage articulaire qui se produit dans le cas d'arthrite rhumatoïde. Donc, on peut supposer qu'il se produit toute une cascade d'événements qui sont induits par un vaste réseau de cytokines. Ces dernières peuvent alors agir en synergie ou en chaîne et entraîner divers phénomènes physiologiques qui se traduisent par des désordres inflammatoires.

Ayant une idée approximative sur le haut poids moléculaire et la stabilité du facteur à la chaleur, nous avons alors pensé qu'il pourrait s'agir du TGF- β 1. En effet ce dernier, présente un haut poids moléculaire à l'état natif et il est stable à des chaleurs élevées. De plus, c'est un facteur de croissance cellulaire dont l'effet varie suivant le type de cellule. Toutefois, l'étude de l'anticorps monoclonal neutralisant du TGF- β 1 nous a indiqué une différence par rapport à notre facteur. Ceci a soulevé plusieurs questions notamment: cet anticorps pouvait-il vraiment inhiber l'action du TGF- β 1 sur la survie des PMN dans notre essai ? À quel niveau, l'anticorps inhibait le TGF- β 1 ? D'où, notre étude

en parallèle de l'action du TGF- β 1 sur la survie et l'activation des neutrophiles. En général, le TGF- β 1 est sécrété sous forme d'un complexe biologiquement inactif ayant un poids moléculaire d'environ 225 kD à 300 kD (Pircher *et al.*, 1986 ; Sporn *et al.*, 1987). Ce complexe est constitué d'un composant bioactif qui est un dimère de 25 kD et qui s'associe de façon non covalente au précurseur (dimère de 75 kD qui est appelé β 1-LAP : Latency-associated peptide) (Wakefield *et al.*, 1989 ; Grotendorst *et al.*, 1989 ; Brown *et al.*, 1990). À ces composés et selon la source s'ajoute une autre protéine de 125 kD à 205 kD, il s'agit de la LTBP (Latent TGF- β binding protein) (Miyazono *et al.*, 1993). Une fois sécrété sous forme de complexe latent, le TGF- β doit être activé avant d'interagir avec l'un de ses différents récepteurs spécifiques. Au fait, l'inactivation biologique du TGF- β est due à son association aux deux protéines de 75 kD et 125-205 kD (Wahl *et al.*, 1993). L'activation du TGF- β nécessite sa dissociation de ces deux protéines et la libération de la partie active qui est de 25 kD. Ceci peut se faire de différentes manières notamment par le biais de mécanismes protéolytiques faisant intervenir des protéases, à l'aide des microenvironnements acides et par des traitements à la chaleur (Sporn *et al.*, 1987 ; Brown *et al.*, 1990). La forme active du TGF- β 1 en interagissant avec ses récepteurs spécifiques, peut induire différentes réponses biologiques d'une grande variété de cellules. Parmi ses principales fonctions, sa puissante intervention dans les réactions inflammatoires lui permet d'agir sur différentes cellules telles les monocytes et les neutrophiles. Effectivement, le TGF- β est impliqué dans divers stades de l'inflammation notamment le recrutement, l'adhésion, l'extravasation et l'accumulation des leucocytes. (Fava *et al.*, 1991 ; Wahl *et al.*, 1993 ; Parekh *et al.*, 1994). En plus, il augmente la libération des prostaglandines et l'expression des molécules d'adhésions telle ICAM-1 (Craig Hooper, 1991 ; Suzuki *et al.*, 1994). Nos expériences concernant le TGF- β 1 sont venues compléter et consolider d'autres études effectuées par d'autres chercheurs, tel son effet chimiotactique sur les neutrophiles (Fava *et al.*, 1991 ; Grotendorst *et al.*, 1989 ; Suzuki *et al.*, 1994 ; Wahl *et al.*, 1993).

Nos résultats ont démontré que le TGF- β 1 peut jouer un rôle clé dans les processus inflammatoires. En effet, lors de notre étude, on a pu montrer qu'il exerce un pouvoir chimiotactique important sur les neutrophiles. Son chimiotactisme dépend de la dose et se manifeste par une courbe dose-réponse. En plus, on a démontré que le TGF- β 1 active significativement les PMN, et ce en stimulant la phagocytose et en induisant la production du peroxyde d'hydrogène. On a pu aussi noter qu'il pouvait prolonger la survie des neutrophiles (Lagraoui et Gagnon., 1997). Lorsqu'effectuée en présence du TGF- β 1, la survie des PMN est diminuée par l'utilisation de l'anticorps neutralisant du TGF- β 1. Autre fait intéressant, dans une étude menée en parallèle avec celle du TGF- β 1, on a pu démontrer que le facteur des synoviocytes affectait significativement la survie des cellules mink (résultats non montrés). En effet, ce facteur comme le TGF- β 1 inhibe la prolifération des cellules de vison. Toutefois, le pouvoir d'inhibition du facteur est moins fort que celui du TGF- β 1. Ce résultat, nous permet de conclure que notre facteur possède une activité semblable à celle du TGF- β 1.

Ces différents effets sur les neutrophiles peuvent associer le TGF β 1 à plusieurs pathophysiologies inflammatoires. Nos résultats combinés à ceux obtenus par d'autres auteurs nous renseignent un peu sur l'impact du TGF β 1 dans certaines pathologies. Parmi ces dernières, on cite le cas de certaines maladies du poumon qui implique les PMN et le TGF β 1, lésions periodontales et de l'arthrite rhumatoïde (Suzuki *et al.*, 1994 ; Wahl *et al.*, 1993). En effet, le TGF β 1 est un facteur ubiquitaire, il est sécrété par une grande variété de cellules. Son pouvoir de recrutement et d'activation des neutrophiles, associé à celui d'autres cytokines tel l'IL-8 peut entraîner divers dommages tissulaires. L'activation des neutrophiles se traduit principalement par la phagocytose, la production de dérivés oxygénés tels le superoxyde anion (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et des enzymes lytiques telles les défensines, le lysozyme, la BPI (Bacterial permeability increasing protein) et les hydrolases acides.

Tous ces produits sont toxiques et ont pour but de détruire les agents infectieux. Toutefois, ils peuvent causer des lésions fatales à l'hôte lorsqu'ils sont libérés directement dans le milieu tissulaire.

En résumé, notre étude sur le TGF- β 1 nous a renseigné sur l'effet de ce médiateur sur la survie, la chimiotaxie et l'activation des neutrophiles. Elle nous a permis de conclure que le TGF- β 1 possède plusieurs similarités dont; 1) son effet sur les PMN, 2) son activation à la chaleur et au pH, 3) son poids moléculaire, 4) son effet inhibiteur sur les cellules de vison, par rapport à notre facteur. Cependant, des différences importantes entre notre facteur et le TGF- β 1 ont été établies: 1) le TGF- β 1 exerce un pouvoir chimiotactique important sur les neutrophiles, alors que le facteur en question ne présente aucune activité chimiotactique pour ces cellules, 2) l'effet de notre facteur sur la survie des PMN n'est pas affecté par l'anticorps neutralisant anti- TGF- β 1.

Ces résultats nous indiquent que notre facteur n'est pas le TGF- β 1, mais pourrait-il être de la même famille ? D'autres études, dont le séquençage de notre facteur, nous renseigneront sur l'origine de notre facteur.

Nous avons donc tenté de séquencer le facteur de survie des neutrophiles. Malheureusement, la protéine était bloquée en position N-terminale (résultats non montrés). Il nous restait donc l'analyse des acides aminés par digestion partielle. Malheureusement, nous avons été incapables d'obtenir une assez grande quantité de protéines pour le séquençage. Etant un facteur de haut poids moléculaire, nous devons isoler des quantités de l'ordre du nanogramme et plus pour obtenir une séquence. Cette quantité nous aurait pris approximativement 3 à 4 mois de culture de synoviocytes, cellules primaires difficiles à cultiver et inutilisables après le passage 9.

Nous avons également utilisé des synoviocytes de rats arthritiques, induits par l'adjuvant de Freund. Nous n'avons pas observé de différence dans la

production de ce facteur entre les synoviocytes normaux et arthritiques, car nous devions concentrer notre échantillon dans les deux cas (résultats non montrés).

Après avoir caractérisé partiellement ce facteur, nous avons étudié son effet sur l'apoptose des neutrophiles. Ceci, dans le but d'élucider le mécanisme par lequel ce facteur prolonge la survie de ces cellules. En général, les PMN privés de facteurs de croissance appropriés meurent par apoptose (Brach *et al.*, 1992 ; Cox, 1995). Les cellules apoptotiques sont alors reconnues et phagocytés par les macrophages (Savill *et al.*, 1989 ; Savill, 1992 ; Meszaros *et al.*, 1999). C'est un phénomène qui permet la résolution des réactions inflammatoires dans les conditions normales (Colotta *et al.*, 1992 ; Andonegui *et al.*, 1997).

L'apoptose ou mort cellulaire programmée (PCD : Programmed cell death) est un processus qui permet de contrôler la viabilité cellulaire. Effectivement, dans un organisme, le nombre de cellules qui le constituent dépend d'un équilibre entre les phénomènes de multiplication et de suicide des cellules. Ainsi, l'apoptose peut être un mécanisme de défense qui permet d'éliminer les cellules indésirables, notamment les cellules transformées ou les cellules qui pourraient réagir contre leur propre organisme. Par ailleurs, la survie d'une cellule dépend de plusieurs éléments tels que les facteurs de croissance et les communications avec les cellules avoisinantes. Les différents signaux émis lors des interactions cellulaires jouent un rôle primordial dans la décision finale de mort ou de vie d'une cellule. L'apoptose peut se déclencher suite à différents événements telles que l'absence ou la diminution de facteurs de croissance appropriés dans le milieu cellulaire, l'émission de signaux qui diminuent l'expression de gènes inhibiteurs de suicide tel que le Bcl-2 et enfin l'interaction de certaines molécules de surface avec leur ligands tels les systèmes Fas / FasL et TNFR / TNF.

Au fait, Bcl-2 appartient à une famille de gènes impliqués dans la PCD tels que Bcl-x1 et Bax. Le protooncogène Bcl-2 qui code pour une protéine membranaire de 26 kD est un inhibiteur d'apoptose (Carson *et al.*, 1994 ; Haldar *et al.*, 1997; Raff et al., 1993; Silverman *et al.*, 1993). Il peut ainsi protéger les cellules contre différents agents tels les inhibiteurs de synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines. Il a aussi un pouvoir protecteur contre l'irradiation et l'effet de l'absence de certains facteurs de croissance (Chiu *et al.*, 1995; Vaux, 1993). De plus, il a été démontré que l'homologue de Bcl-2: la protéine A1 présente chez les neutrophiles possède aussi des propriétés anti-apoptotiques (Chuang *et al.*, 1998; Hamasaki *et al.*, 1998; Orlofsky *et al.*, 1999). A1 pourrait jouer un rôle important dans le développement des PMN et la modulation de leur survie (Chuang et al., 1998). En outre, il semble que A1 peut être un puissant régulateur de l'apoptose dans certains cas d'inflammation (Orlofsky et al., 1999).

D'après certains auteurs, la protéine Bcl-2 inhibe l'apoptose grâce à son pouvoir antioxydant et à sa capacité d'inhiber l'activité des protéases à cystéine ICE (Interleukin 1 β converting enzyme) (Herman, et Mignotte., 1994; Martinou, 1995 ; Strasser *et al.*, 1994). Des études ont démontré que le Bcl-2 exerce son pouvoir antioxydant en inhibant la génération des dérivés oxygénés tels que les radicaux hydroxyles (Kane *et al.*, 1993; Zamzami *et al.*, 1998). Bcl-2 peut aussi inhiber l'activité oxydante des dérivés oxygénés en augmentant la production des enzymes antioxydantes telles que la catalase et la superoxyde dismutase, de même que celle du glutathion (GSH) (Ellerby *et al.*, 1996; Heldy, et McCulloch., 1996; Zamzami *et al.*, 1998). Des chercheurs ont suggéré que Bcl-2 pourrait agir en tant qu'antioxydant de différentes manières (Kane *et al.*, 1993): 1) en agissant comme une protéine "scavenger" qui interagit avec les radicaux, 2) en agissant comme une protéine qui se lie aux métaux, 3) en inhibant certains transferts d'électrons au niveau mitochondrial. Par ailleurs, la protéine Bcl-2 pourrait protéger les cellules contre la PCD par piégeage direct des radicaux oxygénés et hydroxyles. (Herman, et Mignotte., 1994).

L'ICE est un inducteur d'apoptose, c'est une protéase à cystéine qui fait partie de la famille des caspases, elle permet la conversion du précurseur inactif de l'interleukine-1 β en cytokine fonctionnelle. Les caspases sont fortement impliquées dans l'apoptose, elles agissent en cascade pour induire la PCD et font intervenir différentes protéines de signalisation (Cohen, 1997). Ces protéases sont synthétisées sous forme inactive, pour qu'elles puissent être effectives dans le processus d'apoptose elles doivent être activées par protéolyse. Certains chercheurs suggèrent que Bcl-2 et Bcl-x_L exercent leur action anti-apoptotique avant l'activation de certaines caspases (Cohen, 1997).

Deux autres mécanismes sont aussi impliqués dans la régulation d'apoptose, il s'agit des système Fas / FasL et TNFR / TNF (Biancone et al., 1997; Halaas et al., 1998). La PCD induite par Fas et le TNF fait intervenir la caspase 8 (Cohen, 1997). Fas et TNFR sont des membres de la famille des récepteurs de TNF et du NGF (nerve growth factor). L'activation de ces molécules par leurs ligands ou par des anticorps induit l'apoptose. Des études ont démontré que Fas et TNFR1 ont en commun un domaine de la mort (death domain: DD). Ce dernier est nécessaire pour l'induction du signal de la PCD. Lors du processus de l'apoptose, différentes protéines interagissent entre elles pour déclencher le suicide cellulaire. Ainsi, Fas se lie à FADD (Fas-associating protein with death domain) et TNFR1 s'associe avec TRADD (TNFR1-associated death domain protein). Il existe une troisième protéine qui peut se lier à la fois à Fas et au TNFR1, il s'agit de la molécule RIP (receptor-interacting protein) (Cohen, 1997).

La molécule Fas de 45 kD en interagissant avec son ligand FasL de 37 kD déclenche le processus d'apoptose chez différentes cellules tel les neutrophiles (Itoh *et al.*, 1993 ; Suda *et al.*, 1993). Toutefois, la mort cellulaire programmée induite chez les PMN par le système Fas / FasL peut être inhibée par l'incubation avec différentes cytokines notamment ; le G-CSF, le GM-CSF, l'IFN- γ et le TNF α (Liles *et al.*, 1996). En outre, il a été démontré que la PCD

peut être modulée par divers médiateurs d'inflammation. En effet, des auteurs ont rapporté que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, le G-CSF, le GM-CSF, et le LPS peuvent inhiber l'apoptose des PMN (Brach *et al.*, 1992 ; Yamamoto *et al.*, 1993 ; Pericle *et al.*, 1994; Biffl *et al.*, 1995).

Notre étude de l'apoptose a démontré que le facteur semi-purifié des synoviocytes induit une diminution de la PCD des neutrophiles ($33\% \pm 2$, $45\% \pm 2.5$). Ceci se traduit par une prolongation de la survie et du pouvoir d'être activés des PMN tel que démontré par son effet sur la phagocytose et la respiration oxydative ($18\% \pm 1.25$, $13\% \pm 0.92$ et $72\% \pm 6.2$, $47\% \pm 8.5\%$). Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel le facteur peut diminuer l'apoptose, nous avons étudié son impact sur l'expression du Bcl-2 et de Fas. Nos résultats ont démontré que le facteur en question induisait une augmentation assez importante de l'expression de Bcl-2. Quant à Fas, on n'a pas pu noter de différence significative dans son expression. Aussi peut-on conclure que le facteur des synoviocytes peut prolonger la survie des neutrophiles en inhibant l'apoptose. Cette inhibition pourrait être associée à une augmentation d'expression de Bcl-2. Étant donné que A1 est présent chez les neutrophiles et qu'il peut réguler l'apoptose, on peut suggérer que cette protéine pourrait aussi être affectée par ce nouveau facteur. Des études concernant l'effet de ce facteur sur l'expression de A1 au niveau des PMN s'imposent, d'autant plus qu'il a été démontré que l'expression de A1 peut être induite par certaines cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α (Karsan *et al.*, 1996a).

Cette étude, nous a permis d'éclaircir certains points de l'implication des neutrophiles et des synoviocytes dans certains désordres inflammatoires, telle l'arthrite rhumatoïde. Effectivement, cette pathologie est modulée par une grande variété de cytokines et facteurs de croissance, de même que par un ensemble d'interactions cellulaires. L'accumulation des PMN au niveau du fluide synovial et leur activation jouent un rôle important dans la gravité de ce processus inflammatoire. En outre, le facteur sécrété par les synoviocytes peut

être un nouveau médiateur qui impliquerait les synoviocytes directement ou indirectement dans cette maladie. En effet, les différentes actions de ce facteur sur les neutrophiles, suggèrent que les synoviocytes peuvent affecter d'une façon indirecte ce type d'inflammation. Ceci via leur médiateur soluble sécrété dans le milieu avoisinant des PMN. Ces derniers étant activés, produisent les dérivés oxygénés et les enzymes de lyse. Ces médiateurs toxiques participent d'une façon significative à la destruction des tissus de l'hôte. Par ailleurs, les neutrophiles activés peuvent aussi produire différentes cytokines qui vont activer d'autres cellules et induire la libération de nouveaux médiateurs. Parmi les cytokines qu'on retrouve dans les tissus et le fluides synoviaux des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, on cite l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IFN- γ , le TNF- α , le TGF- β et le GM-CSF (Alvaro-Gracia *et al.*, 1991; Firestein *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1994; Rathanaswami *et al.*, 1993; Weinberg *et al.*, 1993). L'IL-1, qui peut être produite par différentes cellules incluant les neutrophiles, joue un rôle important dans la pathogénèse de l'arthrite. Elle induit la libération de différents médiateurs pro-inflammatoires, de même que la prolifération des synoviocytes. Ceux ci vont alors produire diverses enzymes qui participent à la dégradation de la matrice extracellulaire des synovies chez les patients. Cette production d'enzymes lytiques implique de façon directe les synoviocytes dans l'arthrite rhumatoïde.

En somme, ce nouveau facteur des synoviocytes vient s'ajouter à la longue liste des cytokines et facteurs de croissance impliqués dans les réponses immunitaires. La réaction inflammatoire est un processus assez complexe. Il met en jeu un vaste réseau de médiateurs solubles, de cytokines et de facteurs de croissance, de même qu'une grande variété de cellules. La bonne résolution du phénomène inflammatoire repose essentiellement sur l'équilibre dans la synthèse et la production des différents médiateurs et sur les interactions cellulaires. Ces dernières vont alors déclencher l'émission de divers signaux, lesquels vont décider de l'inhibition ou de la réalisation d'un événement cellulaire.

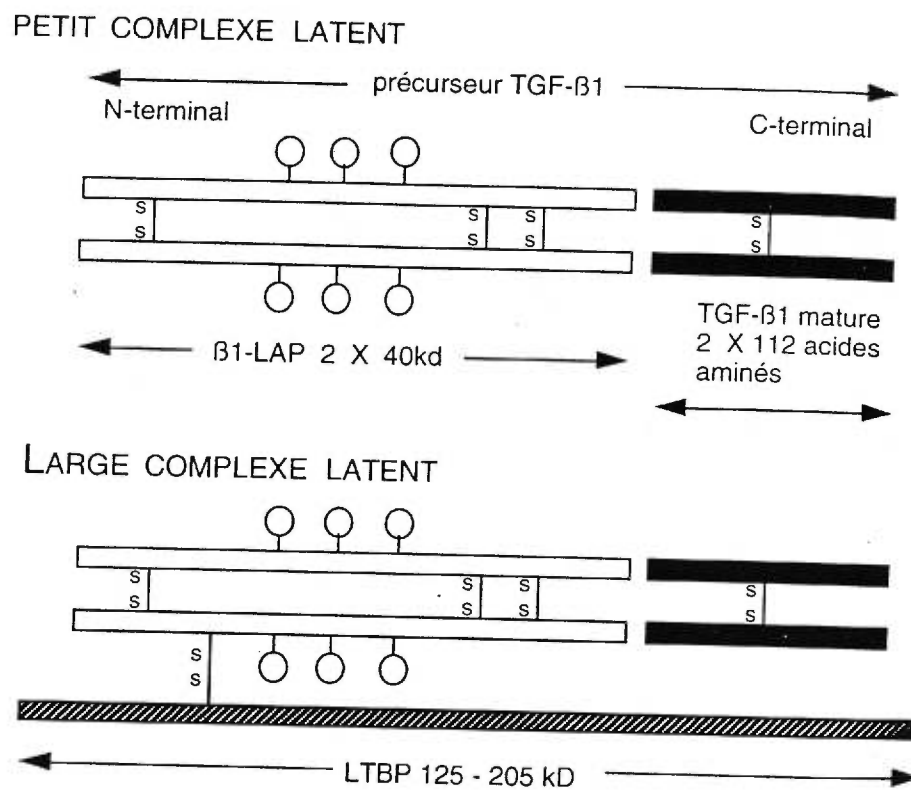
TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 

Figure 1. Schéma de la structure du TGF- β 1 latent: La partie bioactive (25 kD) est constituée d'homodimères, chacun de 112 acides aminés correspondant à l'extrémité C-terminal du précurseur (390 acides aminés). La "binding protein" (1394 acides aminés chez l'homme) est associée avec le complexe latent provenant des plaquettes, mais elle n'est pas nécessaire pour la latence. Les lettres s s représentent les ponts disulfures, sans indications de leurs sites ou nombres. Les cercles vides représentent les sites de N-glycosylation [20].

CHAPITRE IV
CONCLUSION GÉNÉRALE

L'efficacité remarquable de nos défenses contre la multitude des agents infectieux environnants est due à une grande variété d'interactions cellulaires qui ont lieu lors des réponses immunitaires. Ce sont les signaux émis durant ces communications entre les cellules qui permettent ou non la réalisation des événements physiologiques. Aussi peut-on dire que le contrôle et la bonne coordination de toutes ces interactions représentent des processus indispensables au bon déroulement d'une réponse immunitaire. Le moindre dérèglement dans ces communications cellulaires peut engendrer de graves lésions tissulaires, voir même fatales.

Les travaux effectués au cours de cette thèse, nous ont permis de mieux comprendre comment les interactions cellulaires entre les neutrophiles et les synoviocytes pourraient causer des lésions tissulaires. En effet, les synoviocytes peuvent jouer un rôle important dans certaines pathologies, notamment l'arthrite rhumatoïde. Cette maladie autoimmune touche un grand nombre de personnes. Elle est caractérisée par la déformation des articulations et la diminution de l'amplitude des mouvements. La cause directe de l'arthrite rhumatoïde n'a pas encore été identifiée clairement. Au fait, ce désordre inflammatoire est assez complexe car il fait intervenir une grande variété de cellules, telles les lymphocytes T, les macrophages, les neutrophiles et les synoviocytes. De plus, un vaste réseau de cytokines, facteurs de croissance et médiateurs solubles est impliqué dans cette maladie. Parmi ces facteurs on cite, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IFN- γ , le TNF- α , le TGF- β , le GM-CSF, la PGE2 et la collagénase. Chaque type de cellules, de même que ses dérivés solubles, contribuent à leur façon à la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde. Il est difficile de dire que ce sont ces cellules et non pas les autres qui sont responsables de telles lésions. En conséquence, on peut dire que les synoviocytes et les neutrophiles font partie de `` l'orchestre`` et viennent compléter l'œuvre des autres types cellulaires pour réaliser la grande ``symphonie`` qu'est l'arthrite rhumatoïde.

Le facteur sécrété par les synoviocytes peut les impliquer dans cette pathologie de deux manières. Elles peuvent contribuer à cette maladie d'une façon directe en proliférant et en libérant leurs propres enzymes qui vont participer à la dégradation du cartilage. Ceci peut se faire suite à la sécrétion du facteur par les synoviocytes. Ce médiateur peut agir sur différentes cellules dont les neutrophiles, et induire la libération de nouvelles cytokines telle l'IL-1 qui vont affecter les synoviocytes. Le facteur pourrait aussi agir d'une façon autocrine sur ces cellules.

Par ailleurs, ce nouveau médiateur peut impliquer indirectement les synoviocytes dans l'arthrite rhumatoïde. Effectivement, en prolongeant la survie des PMN et on les activant, ce facteur déclenche différents mécanismes de lyse. Ces derniers sont dus à l'ensemble des dérivés toxiques que peuvent produire les neutrophiles, notamment le peroxyde d'hydrogène, le superoxyde anion, les hydrolases acides, les protéases, l'élastase et la collagénase. Tous ces produits peuvent alors participer à la pathogénèse de cette maladie.

Notre étude nous a permis de mettre en évidence l'implication d'un nouveau facteur dans l'arthrite rhumatoïde. L'effet de ce médiateur sur les neutrophiles nous permet de conclure qu'il pourrait être impliqué dans d'autres processus inflammatoires. En effet, les PMN représentent la première ligne de défense de l'organisme. Ce sont les premières cellules à être recrutées au site d'inflammation. L'existence de ce nouveau facteur qui est un puissant activateur des neutrophiles au niveau du site de lésion vient confirmer l'évidente implication de ces cellules dans les pathologies d'ordre inflammatoire. Différentes études ont déjà démontré la participation des PMN dans l'arthrite rhumatoïde (Weissmann, G., et H. Korchak., 1984; Koch et al., 1994).

L'identification complète de ce facteur va contribuer à la compréhension de plusieurs cas d'inflammation chronique. En effet d'autres études s'imposent, notamment la purification complète de ce médiateur, le clonage de son gène, l'identification de ses autres sources et de ses récepteurs, l'étude de

son effet sur d'autres cellules tels les macrophages et les lymphocytes, son impact direct sur l'apoptose induite par le système Fas / FasL chez les neutrophiles et sur l'expression de la protéine A1, l'identification de ses voies de signalisation, ainsi que son effet sur le métabolisme de l'acide arachidonique et l'expression des molécules d'adhésion chez les PMN. L'identification totale de ce facteur va nous permettre d'envisager certaines approches thérapeutiques tel l'élaboration d'anticorps neutralisants ou des récepteurs solubles. Ces deux types de produits pourraient inhiber l'action du facteur en question, et ce, soit en le neutralisant complètement, soit en l'empêchant de se lier à son récepteur sur la cellule cible. Ceci pourrait aider à réduire les dommages tissulaires qui se produisent lors de l'arthrite. Par ailleurs, des études plus approfondies de ce facteur et de son implication dans le système immunitaire en général, vont permettre de considérer des solutions thérapeutiques plus avancées telle l'utilisation des techniques d'ARN antisense pour l'inhibition ou la diminution de l'expression du facteur.

CHAPITRE V
BIBLIOGRAPHIE

Adachi, S., M. Kubota., Y. Wakazono., H. Hirota., K. Matsubara., K. Kuwakado., Y. Akiyama., and H. Mikawa. (1993a). Mechanism of enhancement of neutrophil survival by granulocyte colony-stimulating factor and adenine. *Exp. Hematol.* 21:1213-1218.

Adachi, S., M. Kubota, K. Matsubara, Y. Wakazono, H. Hirota, K. Kuwakado, Y. Akiyama, and H. Mikawa. (1993b). Role of protein kinase C in neutrophil survival enhanced by granulocyte colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.* 21:1709-1713.

Adachi, S., M. Kubota, Y.W. Lin, A. Okuda, K. Matsubara, Y. Wakazono, H. Hirota, K. Kuwakado, and Y. Akiyama. (1994). *In vivo* administration of granulocyte colony-stimulating factor promotes neutrophil survival *in vitro*. *Eur. J. Haematol.* 53:129-134.

Agwu, D. E., L. C. McPhail, M. C. Chabot., L. W. Daniel., R. L. Wykle., and C. E. McCall. (1989). Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264:1405-1413.

Agwu, D. E., C. E. McCall., and L. C. McPhail. (1991). Regulation of phospho-lipase D-induced hydrolysis of choline-containing phosphoglycerides by cyclic AMP in human neutrophils. *J. Immunol.* 146:3895-3903.

Ahuja, S. K., T. Ozcelik., A. Milatovitch., U. Francke., and P. M. Murphy. (1992). Molecular evolution of the interleukin-8 receptor gene cluster. *Nature Genetics.* 2:31-36.

Ahuja, S. K., and P. M. Murphy. (1996). The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) α , GRO β , GRO γ , Neutrophil-activating peptide-2, and Epithelial cell-derived Neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists

for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J. Biol. Chem.* 271:20545-20550.

Akira, S., T. Hirano., T. Taga., and T. Kishimoto. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB. J.* 4 :2860-2867.

Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, and J. Yuan. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87:171.

Altieri, D. C., R. Bader., P. M. Mannucci., and T. S. Edgington. (1988). Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J. Cell. Biol.* 107:1893-1900.

Alvaro-Gracia, J. M., N. J. Zvaifler, C. B. Brown, K. Kaushansky, and G. S. Firestein. (1991). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 146:3365-3371.

Amatruda, T. T., N. P. Gerard., C. Gerard., and M. I. Simon. (1993). Specific interaction of chemoattractant factor receptors with G-proteins. *J. Biol. Chem.* 268: 10139-10144.

Andonegui, G., A. S. Trevani, D. H. Lopez, S. Raiden, M. Giordano, and J. R. Geffner. (1997). Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. *J. Immunol.* 158:3372.

Arnaout, M. A., S. K. Gupta., M. W. Pierce., and D. G. Tenen. (1988). Amino acid sequence of the alpha subunit of human leukocyte adhesion receptor Mo1 (complement receptor type 3). *J. Cell. Biol.* 106:2153-2918.

Arrufo, A., I. Stamenkovic., M. Melnick., C. B. Underhill., and B. Seed. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 61:1303-1313.

Atkinson, Y. H., W. A. Marasco., A. F. Lopez., and M. A. Vadas. (1988). Recombinant human tumor necrosis factor- α . Regulation of N-formyl methionyl leucyl phenyl alanine receptor affinity and function on human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 81 :759-765.

Baker, D. G., J. M. Dayer, M. Roelke, H. R. Schumacher, and S. M. Krane. (1983). Rheumatoid synovial cell morphologic changes induced by a mononuclear cell factor in culture. *Arthr. Rheum.* 26:8-14.

Barrett, A. J., A. A. Kembhavi., M. A. Brown., H. Kirschke., C. G. Knight., M. Tamai., and K. Hanada. (1982). L-trans-Epoxy succinyl leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* 201:189-198.

Bazzoni, F., M. A. Cassatella., F. Rossi., M. Ceska., B. Dewald., and M. Baggiolini. (1991). Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J. Exp. Med.* 173 :771-774.

Beaulieu, A. D., F. Lang., M. Belles-Isles., and P. Poubelle. (1987). Protein biosynthetic activity of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory arthropathies. Increased synthesis and release of fibronectin. *J. Rheumatol.* 14:656-661.

Beckmann, M. P., W. E. Munger., C. Kozlosky., T. VandenBos., V. Price., S. Lyman., N. P. Gerard., C. Gerard., and D. P. Cerretti. (1991). Molecular characterisation of interleukin-8 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:784-789.

Beller, D. I., T. A. Springer., and R. D. Schreiber. (1982). Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J. Exp. Med.* 156:1000-1009.

Bevilacqua, M. P., J. S. Pober., D. L. Mendrick., R. S. Cotran., and M. A. Gimbrone. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule, ELAM-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9238-9242.

Biancone, L., A. De Martino, V. Orlandi, P.G. Conaldi, A. Toniolo, and G. Camussi. (1997). Development of inflammatory angiogenesis by local stimulation of Fas in vivo. *J. Exp. Med.* 186 (1):147.

Bickel, M. (1993). The role of Interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J. Periodontol.* 64 :456-460.

Biffl, W. L., E. E. Moore, F. A. Moore, and C. C. Barnett, Jr. (1995). Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J. Leukoc. Biol.* 58:582.

Bokoch, G. M. (1990). Signal transduction by GTP binding proteins during leukocyte activation: phagocytic cells. *Curr. Top. Membr. Transp.* 35:65-101.

Bortolussi, R., C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls., van. B. S. Asbeck., and J. Verhoef. (1987). Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxidative agents generated by neutrophils and enzyme systems. *Infect. Immun.* 55:3197-3202.

Boulay, F., M. Tardif., L. Brouchon., and P. Vignais. (1990). The human N-formylpeptide receptor. Characterisation of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry.* 29:11123-11133.

Bourne, H. R., D. A. Sanders., and F. McCormick. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 348:125-132.

Brach, M. A., S. DeVos., H. J. Gruss., and F. Hermann. (1992). Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*. 80 :2920-2924.

Brown, P. D., L. M. Wakefield., A. D. Levinson., and M. B. Sporn. (1990). Physicochemical activation of recombinant latent Transforming Growth Factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors*. 3 :35-43.

Buckle, A. M., and N. Hogg. (1989). The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J. Immunol*. 143:2295-2301.

Bullen, J. J. (1981). The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis*. 3:1127-1138.

Bullen, J. J., C. G. Ward., and H. J. Rogers. (1991). The critical role of iron in some clinical infections. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis*. 10:613-617.

Cairo, M., (1991a). Hematopoietic growth factors : A new frontier in immunotherapy. *J. Pediatr*. 118, S1-S3.

Cairo, M., D. Mauss., J. Plunkett., S. Gillis., and C. Van de Ven. (1991b). Modulation of neonatal myelopoiesis in newborn rats following 7-day administration of either GM-CSF or IL-3 (granulocyte-monocyte colony stimulating factor or interleukin-3). *Pediatr. Res*. 29 :504-509.

Cairo, M., J. Plunkett., A. Nguyen., S. Clark., and C. Van de Ven. (1991c). Sequential administration of interleukin-6 and granulocyte-colony stimulating factor in newborn rats: Modulation of newborn granulopoiesis and thrombopoiesis. *Pediatr. Res.* 30 :554-559.

Campbell, L. J., D. W. Maher., D. L. M. Tay., A. W. Boyd., S. Rockman., K. McGrath., R. M. Fox., and G. Morstyn. (1992). Marrow proliferation and the appearance of giant neutrophils in response to recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF). *British. J. Haematol.* 80:298-304.

Carolan, E. J., and T. B. Casale. (1990). Degree of platelet activating factor-induced neutrophil migration is dependent upon the molecular species. *J. Immunol.* 145:2561-2565.

Carson, W. E., S. Haldar, R. A. Baiocchi, C. M. Croce, and M. A. Caligiuri. (1994). The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7553.

Carveth, H. J., J. F. Bohusack., T. M. McIntyre., M. Baggiolini., S. M. Prescott., and G. A. Zimmerman. (1989). Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 162 :387-393.

Cassimeris, L., and S. H. Zigmond. (1990). Chemoattractant stimulation of polymorphonuclear leukocyte locomotion. *Sem. Cell. Biol.* 1:125-134.

Cavaillon, J. M. (1996). Chapitre 15: Interleukine-8 et chémokines (par J. M. Cavaillon), Chapitre 25: Transforming growth factor- β (par D. A. Lawrence). Dans les cytokines, 2^{ème} édition. Édition de Masson, S. A. (Paris). Pp: 217 et 367.

Chin, J. E., G. E. Winterrowd, R. F. Krzesicki, and M. E. Sanders. (1990). Role of cytokines in inflammatory synovitis. The coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthr. Rheumt.* 33:1776-1786.

Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V. M. Dixit. (1995). FADD, a novel domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 81:505-512.

Christensen, R., and G. Rothstein. (1985). Neutrophil myeloperoxidase concentration: changes with development and during bacterial infection. *Pediatr. Res.* 19:1278-1282.

Chuang, P. I., E. Yee., A. Karsan., R. K. Winn., and J. M. Harlan. (1998). A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 249:361-365.

Cicco, N., A. Lindemann., J. Content., P. Vandebussche., M. Lubbert., J. Gauss., R. Mertelsmann., and F. Hemann. (1990). Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood.* 75:2049-2052.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326:1-16.

Cohen, M. S., B. E. Brigitan., D. J. Hasselt., and G. M. Rosen. (1988). Phagocytes O₂ reduction, and hydroxyl radical. *Rev. Infect. Dis.* 10:1088-1096.

Colotta, F., F. Re., N. Polentaruti., S. Sozzani., and A. Mantovani. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 80 :2012-2020.

Conrad Liles, W., P. A. Kiener., J. A. Ledbetter., A. Aruffo., and S. J. Klebanoff. (1996). Differential expression of Fas (CD95) and Fas Ligand on normal human phagocytes: Implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J. Exp. Med.* 184:429-440.

Corbi, A. L., L. J. Miller., K. O'Connor., R. S. Larson., and T. A. Springer. (1987). cDNA cloning and complete primary structure of the alpha subunit of a leukocyte adhesion glycoprotein, p150, 95. *EMBO. J.* 6:4023-4028.

Corbi, A. L., T. K. Kishimoto., L. J. Miller., and T. A. Springer. (1988). The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. *J. Biol. Chem.* 263:12403-12411.

Cox, G., J. Gauldie., and M. Jordana. (1992). Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7 :507-513.

Cox, G. (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.* 154:4719-4725.

Craig, H. (1991). The role of transforming growth factor-beta in hematopoiesis. *Leukemia Res.* 15 :179-184.

Dahinden, C. A., J. Zingg, F. E. Maly, and A. L. Wick. (1988). Leukotriene production in human neutrophils primed by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and stimulated with the complement component C5a and FMLP as second signals. *J. Exp. Med.* 167:1281-1295.

Daiter, E., and J. W. Pollard. (1992). Colony stimulating factor-1 (CSF-1) in pregnancy. *Reprod. Med. Rev.* 1:83-97.

De Fougères, A. R., S. A. Stacker., R. Schwartting., and T. A. Springer. (1991). Characterisation of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174:253-267.

Demetri, G. D., and J. D. Griffin. (1991). Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 78:2791-2808.

Demling, R. H. (1982). Role of prostaglandins in acute pulmonary microvascular injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 384:517-534.

Detmers, P. A., S. K. Lo., E. Olsen-Egbert., A. Walz., M. Baggiolini., and Z. A. Cohn. (1990). Neutrophil activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18. *J. Exp. Med.* 171:1151-1162.

Devreotes, P. N., and S. H. Zigmond. (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells: A focus on leukocytes and dictyostelium. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 4:649-686.

Diacovo, T. G., S. J. Roth., J. M. Buccola., D. F. Bainton., and T. A. Springer. (1996). Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the β 2-Integrin CD11b/CD18. *Blood.* 88:146-157.

Diamond, M. S., D. E. Staunton., A. R. de Fougères., S. A. Stacker., J. Garcia-Aguilar., M. L. Hibbs., and T. A. Springer. (1990). ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell. Biol.* 111:3129-3139.

Dinarelo, C. A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 77 : 1627-1652.

DiPersio, J. F., P. Billing., R. Williams., and J. C. Gasson. (1988). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines prime human neutrophils for enhanced arachidonic acid release and leukotriene B4 synthesis. *J. Immunol.* 140 :4315-4322.

Di Virgilio, F., O. Stendahl., D. Pittet., P. D. Lew., and T. Pozzan. (1990). Cytoplasmic calcium in phagocyte activation. *Curr. Top. Membr. Transp.* 35:180-205.

Dobrina, A., B. R. Schwartz., T. M. Carlos., H. D. Ochs., P. G. Beatty., and J. M. Harlan. (1989). CD11/CD18-independent neutrophil adherence to inducible endothelial-leukocyte adhesion molecules (ELAM-1) *in vitro*. *Immunol.* 67:502-508.

Dreyer, W. J., L. H. Michael., S. West., C. W. Smith., R. Rothlein., R. D. Rossen., D. C. Anderson., and M. L. Entman. (1991). Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation.* 84:400-411.

Dustin, M. L., R. Rothlein., A. K. Bhan., C. A. Dinarelo., and T. A. Springer. (1986). Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry and function of natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137:245-254.

Ellison, R. T., and T. J. Giehl. (1991). Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88:1080-1091.

Ellerby, L. M., H. M. Ellerby., S. M. Park., A. L. Holleran., A. N. Murphy., G. Fiskum., D. J. Kane., M. P. Testa., C. Kayalar., and D. E.

Bredesen. (1996). Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J. Neurochem.* 67:1259-1267.

Elsbach, P., and J. Weiss. (1985). Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Blood.* 11:159-163.

Entman, M. L., L. Michael, R. D. Rossen., W. J. Dreyer., D. C. Anderson., A. A. Taylor., and C. W. Smith. (1991). Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB. J.* 5:2529-2537.

Fanger, M. W., L. Shen., R. F. Graziano., and P. M. Guyre. (1989). Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol. Today.* 10:92-99.

Fava, R. A., N. J. Olsen., A. E. Postlethwaite., K. N. Broadley., J. M. Davidson., L. B. Nanney., C. Lucas., and A. S. Townes. (1991). Transforming growth factor β 1(TGF- β 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues : implication for TGF- β -driven synovial inflammation and hyperplasia. *J. Exp. Med.* 173:1121-1132.

Fawcett, J., C. L. L. Holness., L. A. Needham., H. Turley., K. C. Gaffer., D. Y. Mason., and D. C. Simmons. (1992). Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1 constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature.* 360:481-484.

Firestein, G. S., A. E. Berger, D. E. Tracey, J. G. Chosay, D. L. Chapman, M. M. Paine, C. Yu, and N. J. Zvaifler. (1992). IL-1 receptor antagonist protein production and gene expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *J. Immunol.* 149:1054-1062.

Fu, K. S., D. J. Hassett., and M. S. Cohen. (1989). Oxidant stress in *Neisseria gonorrhoeae*: adaptation and effects on L-(+)-lactate dehydrogenase activity. *Infect. Immun.* 57:2173-2178.

Fukunaga, R., E. Ishizaka-Ikeda., and S. Nagata. (1990). Purification and characterization of the receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 265:14008-15.

Ganz, T., M. E. Selsted., D. Szklarek., S. S. L. Harwing., K. Daher., D. F. Bainton., and R. I. Lehrer. (1985). Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76:1427-1435.

Gauldie, J., C. Richards., D. Harnish., P. Lansdorp., and H. Baumann. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7251-7255.

Gelas, P., G. Ribbes., M. Record., F. Terce., and H. Chap. (1989). Differential activation by fMet-Leu-Phe and phorbol ester of a plasma membrane phosphatidylcholine-specific phospholipase D in human neutrophils. *FEBS. Lett.* 251:213-218.

Geng, J. G., M. P. Bevilacqua., K. L. Moore., T. M. McIntyre., S. M. Prescott., J. M. Kim., G. A. Bliss., G. A. Zimmerman., and R. P. McEver. (1990). Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature.* 343:757-759.

Gordon, M. Y. (1994). Origin and development of neutrophils. Dans *Immunopharmacology of neutrophil*, edited by P. G. Hellewell and T. J. Williams. (London). Pp:5-26.

Grigg, J. M., J. S. Savill, C. Sarraf, C. Haslett, and M. Silverman. (1991). Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. *Lancet*. 338:720.

Grotendorst, G. R., G. Smale., and D. Pancev. (1989). Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J. Cell. Biol.* 140:396-402.

Gutkind, J. S., and K. C. Robbins. (1989). Translocation of the FGR protein tyrosine kinase as a consequence of neutrophil activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8783-8787.

Halaas, O., R. Vik, and T. Espevik. (1998). Induction of Fas ligand in murine bone marrow NK cells by bacterial polysaccharides. *J. Immunol.* 160:4330.

Hamasaki, A., F. Sendo., K. Nakayama., N. Ishida., I. Negishi., K. I. Nakayama., and S. Hatakeyama. (1998). Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the Bcl-2 -related A1 gene. *J. Exp. Med.* 188:1985-1992.

Haskill, S., A. Peace., J. Morris., S. A. Sporn., A. Anisowicz., S. W. Lee., T. Smith., G. Martin., P. Ralph., and R. Sager. (1990). Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7732-7736.

Haslett, C. (1992). Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin. Sci.* 83:639-648.

Hattori, R., K. K. Hamilton., R. D. Fugate., R. D. McEver., and P. J. Sims. (1989). Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J. Biol. Chem.* 264:7768-7771.

Heck, L. W., W. D. Blackburn., M. H. Irwin., and D. R. Abrahamson. (1990). Degradation of basement membrane laminin by human neutrophil elastase and cathepsin G. *Am. J. Path.* 136:1267-1274.

Hedley, D. W., et E. A. McCulloch. (1996). Generation of reactive oxygen intermediates after treatment of blasts of acute myeloblastic leukemia with cytosine arabinoside: role of Bcl-2. *Leukemia.* 10:1143-1149.

Herman, D., and B. Mignotte. (1994). L'apoptose dérive-t-elle de la mort nucléaire programmée mise en œuvre par les protistes. *Médecine/Sciences.* 10:687.

Hill, H. R., A. O. Shigeoka., N. H. Augustine., D. Pritchard., J. L. Lunblad., and R. S. Schwartz. (1984). Fibronectin enhances the opsonic and protective activity of monoclonal and polyclonal antibody against group B streptococci. *J. Exp. Med.* 159:1618-1628.

Hirano, T., K. Yasukawa., H. Harada., T. Taga., Y. Watanabe., T. Matsuda., S. Kashiwamura., K. Nakajima., K. Koyama., A. Iwamatu., S. Tsunasawa., K. Sakiyama., Y. Takahara., T. Taniguchi., and T. Kishimoto. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 324:73-76.

Hooper, W. G. (1991). The role of transforming growth factor-beta in hematopoiesis. A review. *Leukemia. Research.* 15:179-184.

Howard, T. H., and C. O. Oresajo. (1985). The kinetics of chemotactic peptide-induced change in F-actin content, F-actin distribution, and the shape of neutrophil. *J. Cell. Biol.* 101:1078-1085.

Hsu-Lin, S. C., C. L. Berman., B. C. Furie., D. August., and B. Furie. (1984). A platelet membrane protein expressed during platelet activation. *J. Biol. Chem.* 259:9121-9126.

Huang, C. K. (1989). Protein kinases in neutrophils: A review. *Membr. Biochem.* 8:61-79.

Huizinga, T. W. J., C. E. Van der Schoot., C. Jost., R. Klassen., M. Kleijer., A. E. G. Kr. Von dem Borne., D. Roos., and Tetteroo. (1988). The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature.* 333:667-669.

Ichimanu, E., H. Sakai., T. Saku., K. Kunimatsu., Y. Kato., I. Kato., and K. Yamamoto. (1990). Characterisation of hemoglobin-hydrolyzing acidic proteinases in human and rat neutrophils. *J. Biochem. (Tokyo)* 108:1009-1015.

Ikebuchi, K., G. G. Wong., S. C. Clark., J. N. Ihle., Y. Hirai., and M. Ogawa. (1987). Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hematopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9035-9039.

Itoh, N., Y. Tsujimoto, and S. Nagata. (1993). Effect of Bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* 151:621.

Janoff, A. (1985). Elastase in tissue injury. *Annu. Rev. Med.* 36:207-216.

Johnson, K. J., J. C. Fantone., J. Kaplan., and P. A. Ward. (1981). *In vivo* damage of rat lungs by oxygen metabolites. *J. Clin. Invest.* 67:983-993.

Johnson, K. J., J. Varani, and J. E. Smolen. (1992). Neutrophil activation and function in health and disease. Dans Granulocyte responses to cytokines, edited by R. G. Coffey. (New York). Pp: 1-46.

Jutila, M. A., L. Rott., E. L. Berg., and E. C. Butcher. (1989). Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen *in vivo*: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J. Immunol.* 143:3318-3324.

Kanaho, Y., H. Kanoh., K. Saitoh., and Y. Nozawa. (1991). Phospholipase D activation by platelet-activating factor, leukotriene B₄ and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rabbit neutrophils. Phospholipase D is involved in enzyme release. *J. Immunol.* 146:3536-3541.

Kane, D. J., T. A. Sarafian., R. Anton., H. Hahn., E. B. Gralla., J. S. Valentine., T. Ord., and D. E. Bredesen. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: Decreased generation of reactive oxygen species. *Science.* 262:1274-1277.

Karasawa, A., J. P. Guo., X. L. Ma., P. S. Tsao., A. M. Lefer. (1991). Protective actions of a leukotriene B₄ antagonist in splanchnic ischemia and reperfusion in rats. *Am. J. Physiol.* 193:G191-198.

Karl, A. P., and M. B. Sporn. (1990). Latent forms of TGF- β : Structure and Biology, Pp:51-58, Par Miyazono, et al., dans Transforming Growth Factor- β s, Chemistry, Biology and Therapeutics. New York academy of sciences, ANYAA9 593.

Karsan, A., E. Yee., K. Kaushansky., and J. M. Harlan. (1996a). Cloning of a human Bcl-2 homologue: Inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood.* 87:3089-3096.

Karsan, A., E. Yee., and J. M. Harlan. (1996b). Endothelial cell death induced by Tumor Necrosis Factor- α is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. *J. Biol. Chem.* 271:27201-27204.

Kato, T., M. Kurokawa, K. Masuko-Hongo, H. Sasakawa, T. Sekine, S. Ueda, K. Yamamoto, and K. Nishioka. (1997). T cell clonality in synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis. Persistent but fluctuant oligoclonal T cell expansions. *J. Immunol.* 159:5143-5149.

Kawano, M., T. Hirano., T. Matsuda., T. Taga., Y. Horii., K. Iwato., H. Asaoka., B. Tang., O. Tanabe., H. Tanaka., A. Kuramoto., and T. Kishimoto. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature.* 332:83-85.

Kimberly, R.P., J.W. Ahlstrom., M. E. Click., and J. C. Edberg. (1990). The glycosyl phosphatidylinositol-linked FcγRIII_{PMN} mediates transmembrane signalling events distinct from FcγRII. *J. Exp. Med.* 171:1239-1255.

Kishimoto, T. K., R. A. Warnock., M. A. Jutila., E. C. Butcher., C. Lane., D. C. Anderson., and C. W. Smith. (1991). Antibodies against human neutrophil LECAM-1(LAM-1/Leu8/DREG-56 antigen) and endothelial adhesion molecule-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway *in vitro.* *Blood.* 78:805-811.

Klebanoff, S. J., and A. M. Walterdorff. (1990). Prooxidant activity of transferrin and lactoferrin. *J. Exp. Med.* 172:1293-1303.

Koch, A. E., S. L. Kunkel., L. A. Harlow., D. D. Mazarakis., G. K. Haines., M. D. Burdick., R. M. Pope., A. Walz., and R. M. Strieter. (1994). Epithelial neutrophil activating peptide-78: A novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J. Clin. Invest.* 94:1012-1018.

Kubes, P., G. Ibbotson., J. Russell., J. L. Wallace., and D. N. Granger. (1990). Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am. J. Physiol.* 259:G300-305.

Lagraoui, M., and L. Gagnon. (1997). Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF- β 1. *Cell. Mol. Biol.* 43:313-318.

Lambeth, J. D. (1988). Activation of the respiratory burst in neutrophils: on the role of membrane-derived second messengers, Ca⁺⁺, and protein kinase C. *J. Bioenerg. Biomembr.* 20:709-733.

Larson, R. S., A. L. Corbi., L. Berman., and T. A. Springer. (1989). Primary structure of the LFA-1 alpha subunit. An integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J. Cell. Biol.* 108:703-712.

Lesser, M., M. L. Padilla., and C. Cardozo. (1992). Induction of emphysema in hamsters by intratracheal instillation of cathepsin B. *Am. Rev. Respir Dis.* 145:661-668.

Liles, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, S. J. Klebanoff. (1996). Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes : implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J. Exp. Med.* 184:429.

Lindemann, A., D. Riedel., W. Oster., S. C. Meuer., D. Blohm., R. H. Mertelsmann., and F. Hermann. (1988). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces interleukin-1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 140 :837-839.

Lindemann, A., D. Riedel., W. Oster., H. W. L. Ziegler-Heibroek., R. Mertelsmann., and F. Hermann. (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 83:1308-1312.

Ling, C.J., W.F. Owen, jr., and K.F. Austen. (1990). Human fibroblasts maintain the viability and augment the functional response of human neutrophils in culture. *J. Clin. Invest.* 85:601-604.

Lotz, M., F. Jirik., R. Kabourdis., C. Tsoukas., T. K. T. Hirano., and D. A. Carson. (1988). B cell-stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 167:1253-1258.

Lowe, J. B., L. M. Stoolman., R. P. Nair., R. D. Larsen., T. L. Berhend., and R. M. Marks. (1990). ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyl transferase cDNA. *Cell.* 63:475-484.

Martin, T. R., B. P. Pistorese., E. Y. Chi., R. B. Goodman., and M. A. Matthay. (1989). Effects of leukotriene B₄ in the human lung: recruitment of neutrophils in the alveolar spaces without a change in protein permeability. *J. Clin. Invest.* 84:1609-1619.

Martin, T. R., B. P. Pistorese., L. D. Hudson., and R. J. Maunder. (1991). The function of lung and blood neutrophils in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144:254-262.

Martin, W. J., J. E. Gadek., G. W. Hunninghake., and R. G. Crystal. (1981). Oxidant injury of lung parenchymal cells. *J. Clin. Invest.* 68:1277-1288.

Martinou, J. C. (1995). La mort cellulaire programmée dans le système nerveux. *médecine/sciences.* 11:367.

Massagué, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6:597-641.

McColl, S. R., D. Beausiegle., C. Gilbert., and P. H. Naccache. (1990). Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage

colony-stimulating factor and tumor necrosis factor involves regulation at a post-receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins. *J. Immunol.* 145 :3047-3053.

McColl, S. R., E. Krump, P. H. Naccache, P. E. Poubelle, M. Braquet, and P. Borgeat. (1991). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances the synthesis of leukotriene B₄ by human neutrophils in response to PAF-acether. Enhancement of both arachidonic acid release and 5-lipoxygenase activation. *J. Immunol.* 146:1204-1211.

McCutchan, H. J., J. R. Schwappach., E. G. Enquist., D. L. Walden., L. S. Terada., O. K. Reiss., J. A. Leff., and J. E. Repine. (1990). Xanthine oxidase derived H₂O₂ contributes to reperfusion injury of ischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 258:H1415-1419.

McDonald, P. P., M. Pouliot, P. Borgeat, and S. R. McColl. (1993). Induction by chemokines of lipid mediator synthesis in GM-CSF-treated human neutrophils. *J. Immunol.* 151:6399-6409.

McEver, R. P., J. H. Beckstead., K. L. Moore., L. Marshall-Carson., and D. F. Bainton. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein is also synthesised by vascular endothelial cells and is localised in the Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84:92-99.

Meszaros, A. J., S. J. Reichner, and J. E. Albina. (1999). Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 65:35-42.

Miyake, K., C. B. Underhill., J. Lesley., and P. W. Kincade. (1990). Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 172:69-75.

Miyazono, K., H. Ichijo., and C. H. Heldin (1993). Transforming growth factor- β : latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors*. 8 :11-22.

Morgan, R. W., M. F. Christman., F. S. Jacobson., G. Storz., and B. N. Ames. (1986). Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8059-8063.

Mullmann, T. J., M. I. Siegel., R. W. Egan., and M. M. Billah. (1990). Complement C5a activation of phospholipase D in human neutrophils. A major route to the production of phosphatidates and diglycerides. *J. Immunol.* 144:1901-1908.

Murphy, G., J. J. Reynolds., U. Bretz., and M. Baggiolini. (1982). Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. J.* 203:209-221.

Murphy, G., M.I. Crockett., R. V. Ward., and A. J. P. Docherty. (1991). Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan: a quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem.. J.* 277:277-279.

Muzio, M. A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Kramer, M. E. Peter, and V. M. Dixit. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 85:817-827.

Myones, B. L., J. G. Daizell, N. Hogg, and G. D. Ross. (1988). Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J. Clin. Invest.* 82:640-651.

Nakamura, M., Z. Honda, T. Izumi, H. Sakanaka, M. Minami, H. Bito, Y. Seyama, T. Matsumoto, M. Noma, and J. Shimizu. (1991). Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 266:20400-20405.

Netzel-Arnett, S., G. B. Fields, H. Birkedal-Hansen, and H. E. Van Wart. (1991). Sequence specificities of human fibroblast and neutrophil collagenases. *J. Biol. Chem.* 266:6747-6755.

Nicholson, D. W., and N. A. Thornberry. (1997). Caspases: killer proteases. *TIBS.* 22:299-306.

Ogletree, M. L., and K. L. Brigham. (1980). Arachidonate raises vascular resistance but not permeability in lungs of awake sheep. *J. Appl. Physiol.* 48:581-586.

Okada, M., M. Kitahara, S. Kishimoto, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto. (1988). IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 141:1543-1549.

Omann, G. M., R. A. Allen, G. M. Bokach, R. G. Painter, A. E. Traynor, and L. A. Sklar. (1987). Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil. *Physiol. Rev.* 67:285-322.

Oppenheim, J. J., C. O. C. Zachariae, N. Mukaida, and K. Matsushima. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Ann. Rev. Immunol.* 9 :617-648.

Orlofsky, A., R. D. Somogyi., L. M. Weiss., and M. B. Prystowsky. (1999). The murine antiapoptotic protein A1 is induced in inflammatory macrophages and constitutively expressed in neutrophils. *J. Immunol.* 163:412-419.

Parekh, T., B. Saxena., J. Reibman., B. N. Cronstein., and L. I. Gold. (1994). Neutrophil chemotaxis in response to TGF- β isoforms (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) is mediated by fibronectin. *J. Immunol.* 152 :2456-2466.

Patel, D. K., G. A. Zimmermann., S. M. Prescott., R. P. McEver., and T. M. McIntyre. (1991). Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J. Cell. Biol.* 112:749-759.

Peppin, G. J., and S. J. Weiss. (1986). Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4322-4326.

Pericle, F., J.H. Liu, J.I. Diaz, D.K. Blanchard, S. Wei, G. Forni, and J.Y. Djeu. (1994). Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 24:440-444.

Perlmutter, R. M., J. D. Marth., S. F. Ziegler., A. M. Garvin., S. Pawar., M. P. Cooke., and K. M. Abraham. (1988). Specialized protein tyrosine kinase proto-oncogenes in hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 948:245-262.

Pestka, S. (1983). The human interferons-from protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between, and beyond. *Arch. Biochem. Biophys.* 221:1-37.

Pestka, S. (1986). Interferon from 1981 to 1986. *Meth. Enzymol.* 119:3-14.

Peveri, P., A. Walz., B. Dewald., and M. Baggiolini. (1988). A novel neutrophil activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 167 :1547-1559.

Phillips, M. L., E. Nudelman., F. C. A. Gaeta., M. Perez., A. K. Singhal., S. I. Hakomori., and J. C. Paulson. (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sial-le^x. *Science.* 250:1130-1132.

Pircher, R., P. Jullien., and D. A. Lawrence. (1986). β -Transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136 :30-37.

Pober, J. S., M. P. Bevilacqua., D. L. Mendrick., L. A. Lapierre., W. Fiers., and M. A. Jr. Gimbrone. (1986a). Two distinct monokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 136:1680-1687.

Pober, J. S., M. A. Jr. Gimbrone., L. A. Lapierre., D. L. Mendrick., W. Fiers., R. Rothlein., and T. A. Springer. (1986b). Overlapping patterns of activation by human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J. Immunol.* 137:1893-1896.

Pontremoli, S., E. Melloni., B. Sparatore., M. Michetti., F. Salamino., and B. L. Horecker. (1990). Isozymes of protein kinase C in human neutrophils and their modification by two endogenous proteinases. *J. Biol. Chem.* 265:706-712.

Proctor, R. A., E. Prendergast., and D. F. Mosher. (1984). Fibronectin mediates attachment of *Staphylococcus aureus* to human neutrophils. *Blood.* 59:681-685.

Raff, M. C., B. A. Barres, J. F. Burne, H. S. Coles, Y. Ishizaki, M. D. Jacobson. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival : lessons from the nervous system. *Science* 262:695.

Raines, E. W., S. K. Dower., and R. Ross. (1989). Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science*. 243 :393-396.

Rathanaswami, P., M. Hachicha., W. L. Wong., T. J. Schall., and S. R. McColl. (1993). Synergistic effect of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts. Evidence that interleukin-8 is the major neutrophil-activating chemokine released in response to monokine activation. *Arthritis. Rheum.* 36:1295-1304.

Ravetch, J. V., and B. Perussia. (1989). Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. *J. Exp. Med.* 170:481-497.

Reed, J. C., H. S. Talwar, M. Cuddy, G. Baffy, J. Williamson, U. R. Rapp, and G. J. Fisher. (1991). Mitochondrial protein p26 Bcl-2 reduces growth factor requirements of NIH3T3 fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 195:277.

Reibman, J., K. Haines., and G. Weissmann. (1990). Alterations in cyclic nucleotides and the activation of neutrophils. *Curr. Top. Membr. Transp.* 35:399-424.

Revillard, J. P. (1994). Stress cellulaire, inflammation et cicatrisation. Dans *Immunologie*, édition de Boeck-Wesmael, S. A. (Bruxelles). Pp:157-167.

Richter, J., T. Andersson., and I. Olsson. (1989). Effect of tumor necrosis factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation. *J. Immunol.* 142 :3199-3205.

Rollins, T. E., S. Siciliano., S. Kobayashi., D. N. Cianciarulo., V. Bonilla-Argudo., K. Collier., and M. S. Springer. (1991). Purification of the active C5a receptor from human polymorphonuclear leukocytes as a receptor-Gi complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:971-975.

Roth, P., and E. R. Stanley. (1992). The biology of CSF-1 and its receptor. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 181:141-167.

Roubin, R., P. P. Elsas., W. Fiers., and A. J. Dessin. (1987). Recombinant human tumor necrosis factor (rTNF) enhances leukotriene biosynthesis in neutrophils and eosinophils stimulated with the Ca²⁺ ionophore A23187. *Clin. Exp. Immunol.* 70 :484-490.

Saari, H., K. Suomalainen, O. Lindy, Y. T. Konttinen, and T. Sorsa. (1990). Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171:979-987.

Sacks, T., C. F. Moldow., P. R. Craddock., T. K. Bowers., and H. S. Jacobs. (1978). Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. *J. Clin. Invest.* 61:1161-1167.

Samuel, C. E. (1991). Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology.* 183:1-11.

Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson, and C. Haslett. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. *J. Clin. Invest.* 83:865.

Savill, J. (1992). Macrophage recognition of senescent neutrophils. *Clin. Sci.* 83:649.

Sawyer, D. W., G. R. Donowitz, and G. L. Mandell. (1989). Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. *Rev. Infect. Dis. 2 (Suppl 7):S1532-S1544.*

Scallon, B. J., E. Scigliano, V. H. Freedman, M. C. Miedel, Y. C. E. Pan, J. C. Unkeless, and J. P. Kochan. (1989). A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositol-anchored forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5079-5083.*

Schall, T. J. (1991). Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine. 3:165-183.*

Schneider, T. J., D. Grillot, L.C. Foote, G. E. Nunez, and T. L. Rothstein. (1997). Bcl-x protects primary B cells against Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol. 159:4834.*

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

Segal, A. W. (1988). The molecular and cellular pathology of chronic granulomatous disease. *Eur. J. Clin. Invest. 18:433-443.*

Selsted, M. E., S. S. L. Harwing, T. Ganz, J. W. Schilling, and R. I. Lehrer. (1985). Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest. 76:1436-1439.*

Senior, R. M., G. L. Griffin, C. J. Fliszar, S. D. Shapiro, G. I. Goldberg, and H.G. Welgus. (1991). Human 92- and 72-kDa type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem. 266:7870-7875.*

Sherr, C. J. (1990). Colony-stimulating factor-1 receptor. *Blood*. 75:1-12.

Shirafuji, N., S. Matsuda., H. Ogura., K. Tani., H. Kodo., K. Ozawa., S. Nagata., S. Asuno., and F. Takaku. (1990). Granulocyte colony-stimulating factor stimulates mature neutrophil granulocytes to produce interferon α . *Blood*. 75:17-19.

Siciliano, S. J., T. E. Rollins., and M. S. Springer. (1990). Interaction between the C5a receptor and Gi in both the membrane-bound and detergent-solubilized states. *J. Biol. Chem.* 265:19568-19574.

Silverman, G. A., E. Yang, J. H. Proffitt, M. Zutter, and S. J. Korsmeyer. (1993). Genetic transfer and expression of reconstructed yeast artificial chromosomes containing normal and translocated Bcl-2 proto-oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 13:5469.

Simon, R. H., C. H. Scoggin., and D. Patterson. (1981). Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 256:7181-7186.

Simpson, P. J., F. R. III. Todd., J. C. Fantone., J. K. Michelson., J. D. Griffin., and B. R. Lucchesi. (1988). Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (Anti-Mol, Anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J. Clin. Invest.* 81:624-629.

Singer, S. J., and A. Kupfer. (1986). The directed migration of eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2:337-365.

Smith, C. W., S. D. Marlin., R. Rothlein., C. Thomas., and D. C. Anderson. (1989). Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 83:2008-2017.

Smith, C. W., T. K. Kishimoto., O. Abbass., B. J. Hughes., R. Rothlein., L. V. McIntyre., E. Butcher., and D. C. Anderson. (1991a). Chemotactic factors regulate lectin adhesion to molecule-1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 87:609-618.

Smith, C. W., M. L. Entman., C. L. Lane., A. L. Beauder., T. I. Ty., K. Youker., H. K. Hawkins., and D. C. Anderson. (1991b). Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J. Clin. Invest.* 88:1216-1223.

Smith, J. A. (1994). Neutrophils, host defense, and inflammation : a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56:672-686.

Sporn, M. B., A. B. Roberts., L. M. Wakefield., and B. de Crombrughe. (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell. Biol.* 105:1039-1045.

Springer, T. A., and L. A. Lasky. (1991). Sticky sugars for selectins. *Nature.* 349:196-197.

Stanley, E. R., L. J. Guilbert., R. J. Tushinski., and S. H. Bartelmez. (1983). CSF-1 a mononuclear phagocyte lineage-specific haemopoietic growth factor. *J. Cell. Biochem.* 21:151-159.

Staunton, D. E., M. L. Dustin., and T. A. Springer. (1989). Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature.* 339:61-64.

Strasser, A., A. W. Harris, T. Jacks, and S. Cory. (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79:329.

Sullivan, G. W., H. T. Carper., J. A. Sullivan., and G. L. Mandell. (1987). Interleukin-1 primes neutrophils. *Clin. Res.* 35:657A.

Suter, S., U. B. Schaad., J. J. Morgenthaler., I. Chevallier., and H. P. Schnebli. (1988). Fibronectin-cleaving activity in bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 158:89-100.

Suzuki, Y., T. Tanigaki., D. Heimer., W. Wang., W. G. Ross., G. A. Murphy., A. Sakai., H. H. Sussman., T. H. Vu., and T. A. Raffin. (1994). TGF- β 1 causes increased endothelial ICAM-1 expression and lung injury. *J. Appl. Physiol.* 77:1281-1287.

Takahashi, H., T. Nukiwa., P. Basset., and R. G. Crystal. (1988). Myelomonocytic cell lineage expression of the neutrophil elastase gene. *J. Biol. Chem.* 263:2543-2547.

Test, S. T., and S. J. Weiss. (1986). The generation and utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils. *Adv. Free Radical. Biol. Med.* 2:91-116.

Thomas, L. T., and R. I. Lehrer. (1988). Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev. Infect. Dis.* 10 (Suppl 2):S450-456.

Tiku, K., M. L. Tiku., and J. L. Skosey. (1986). Interleukin-1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 136:3677-3685.

Toothill, V. J., J. A. van Mourik., H. K. Niewenhuis., M. J. Metzelaar., and J. D. Pearson. (1990). Characterisation of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial cells. *J. Immunol.* 145:283-291.

Tosi, M. F., and M. Berger. (1988). Functional differences between the 40 kDa and 50-70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and anti-receptor antibodies. *J. Immunol.* 146:2097-2103.

Trabandt, A., R. E. Gay., H. G. Fassbender., and S. Gay. (1991). Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34:1444-1451.

Travis, J. (1988). Structure, function, and control of neutrophil proteinases. *Am. J. Med.* 84:37-42.

Traynor-Kaplan, A. E. (1990). Phosphoinositide metabolism during phagocytic cell activation. (1990). *Curr. Top. Membr. Transp.* 35:303-332.

Unkeless, J. C. (1989). Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G. *J. Clin. Invest.* 83:355-361.

Vancheri, C., T. Ohtoshi., G. Cox., A. Xaubet., J. S. Abrams., J. Gauldie., J. Dolovich., J. Denburg., and M. Jordana. (1991). Neutrophilic differentiation induced by human upper airway fibroblast-derived Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4:11-17.

Van Damme, J., J. Opdenaker., R. J. Simpson., M. R. Rubira., S. Cayphas., A. Vink., A. Billiau., and J. F. Snick. (1987). Identification of the human 26-kD protein, interferon-beta 2 (IFN-beta2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 165:914-919.

Vazeux, R., P. A. Hoffman., J. K. Tomiton., E. S. Dickinson., R. L. Jarman., T. St. John., and W. M. Gallatin. (1992). Cloning and characterisation of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature*. 360:485-488.

Vissors, M. C. M., P. M. George, I. C. Bathurst, S. O. Brennan, and C. C. Winterbourn. (1988). Cleavage and inactivation of α 1-antitrypsin by metalloproteinases released from neutrophils. *J. Clin. Invest.* 82:706-710.

Wahl, S. M., G. L. Costa., D. E. Mizel., J. B. Allen., U. Skaleric., and D. F. Mangan. (1993). Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J. Periodontol.* 64:450-455.

Wakefield, L. M., D. M. Smith., S. Broz., M. Jackson., A. D. Levinson., and M. B. Sporn. (1989). Recombinant TGF- β 1 is synthesized as a two-component latent complex that shares some structural features with the native platelet latent TGF- β 1 complex. *Growth Factors.* 1:203-218.

Walden, D. L., H. J. McCutchan., E. G. Enquist., J. R. Schwappach., P. F. Shanley., O. K. Reiss., L. S. Terada., J. A. Leff., and J. E. Repine. (1990). Neutrophils accumulate and contribute to skeletal muscle dysfunction after ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 259: H1809-1812.

Walz, A., and M. Baggiolini. (1990). Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J. Exp. Med.* 171:449-454.

Walz, A., R. Burgener., B. Car., M. Baggiolini., S. L. Kunkel., and R. M. Strieter. (1991). Structure and neutrophil-activating properties of a novel

inflammatory peptide (ENA78) with homology to interleukin 8. *J. Exp. Med.* 174:1355-1362.

Walz, G. A., A. Aruffo., W. Kolanus., M. Bevilacqua., and B. Seed. (1990). Recognition by ELAM-1 of the sial-le^x. *Science.* 250:1132-1135.

Wardlaw, A. J., and G. M. Walsh. (1994). Neutrophil adhesion receptors. Dans *Immunopharmacology of neutrophil*, edited by P. G. Hellewell and T. J. Williams. (London). Pp:133-157.

Watson, S., C. Fennie., and L. A. Lasky. (1991). Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimaera. *Nature.* 349:164-167.

Watts, R. G., M. A. Crispens., and T. H. Howard. (1991). A quantitative study of the role of F-actin in producing neutrophil shape. *Cell. Motil. Cytoskel.* 19:159-168.

Weinberg, J. B., T. S. Wortham, M. A. Misukonis, K. L. Patton, and S. R. Chitneni. (1993). Synovial mononuclear phagocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: quantitative and functional aspects. *Immunol. Invest.* 22:365-374.

Weisbart, R. H., D. W. Golde., and J. C. Gasson. (1986). Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors. *J. Immunol.* 137:3584-3587.

Weismann, G., and H. Korchak. (1984). Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. *Inflammation.* 8:S3-14.

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

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

Weiss, S. J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320:365-376.

Weitzman, S. A., and L. I. Gordon. (1990). Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*. 76:655-663.

Welte, K., E. Platzer., L. Lu., J. Gabilove., E. Levi., R. Mertelsmann., and M. Moore. (1987). Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:1526-1530.

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

Wilhelm, S. M., I. E. Collier., B. L. Marmer., A. Z. Eisen., G. A. Grant., and G. I. Goldberg. (1989). SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264:17213-17221.

Woessner, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB. J.* 5:2145-2154.

Wolf, S. P., A. Garner., and R. T. Dean. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends. Biochem. Sci.* 11:27-31.

Wong, G. G., J. S. Witek., P. A. Temple., K. M. Wilkens., A. C. Leary., D. P. Luxenberg., S. S. Jones., E. L. Brown., R. M. Kay., E. C. Orr., C. Shoemaker., D. W. Golde., R. J. Kaufman., R. M. Hewick., E. A. Wang., and S. C. Clark. (1985). Human GM-CSF : Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science.* 228:810-815.

Wright, S. D., J. I. Weitz., A. J. Huang., S. M. Levin., S. C. Silverstein., and J. D. Loike. (1988). Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognises fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7734-7738.

Wymann, M. P., V. von Tscherner., D. A. Deranleau., and M. Baggiolini. (1987). The onset of the respiratory burst in human neutrophils. Real time studies of H₂O₂ formation reveal a rapid agonist-induced transduction process. *J. Biol. Chem.* 262:12048-12053.

Yamamoto, C., S. I. Yoshida, H. Taniguchi, M. H. Qin, H. Miyamoto, and Y. Mizuguchi. (1993). Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect. Immun.* 61 (5):1972.

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

Yang, Y. C., A. B. Ciarletta., P. A. Temple., M. P. Chung., S. Kovacic., J. S. W. Giannotti., A. C. Leary., R. Kriz., R. E. Donahue., G. G. Wong., and S. C. Clark. (1986). Human interleukin-3 (multi-CSF) : Identification by

expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell*. 47:3-10.

Yoshida, H., S. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, L. D. Shultz, and S. Nishikawa. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*. 345:442-444.

Zamzami, N., C. Brenner, I. Marzo, S. A. Susin, and G. Kroemer. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*. 16:2265-2282.

ANNEXES

Table des matières

Introduction.....	3
Annexe 1: Matériels et Méthodes.....	5
Annexe 2: Effet des bandes obtenues par électrophorèse sur gel natif de la fraction F-2 sur la phagocytose des neutrophiles.....	8
Annexe 3: Effet des différentes dilutions de la fraction F-2 sur la synthèse d'ARN et de protéines chez les neutrophiles.....	10
Annexe 4: Effet des différentes dilutions de la fraction F-2 sur la prolifération des leucocytes mononucléés humains (PBML).....	12
Annexe 5: Contrôles positifs des anticorps monoclonaux neutralisants utilisés contre l'IL-1 α et l'IL-8.....	14
Liste des abréviations.....	16

Introduction

Ces annexes permettent de présenter des résultats non-mentionnés dans les articles et ainsi complètent la thèse. Dans une première partie (annexe 1), nous incluons les matériels et méthodes utilisés. Les méthodes mentionnées sont: la prolifération des leucocytes mononucléés (PBML), la synthèse d'ARN et des protéines, la chimiotaxie et la prolifération des cellules T helper (D10G4.1).

Dans l'annexe 2, nous présentons les résultats de l'activité biologique des bandes obtenues à partir du gel natif de la fraction F-2 (FPLC). Ces résultats démontrent que l'activité biologique déterminée par l'augmentation de la phagocytose des PMN se retrouve principalement dans la bande 2. Cette bande correspond à une protéine ayant un poids moléculaire approximatif de 240kD.

L'annexe 3 représente l'effet des diverses dilutions de la fraction F-2 sur la synthèse d'ARN et des protéines chez les neutrophiles. Quoique préliminaires, ces résultats démontrent que l'effet de la fraction 2 sur la synthèse d'ARN et des protéines est dépendant de la concentration du facteur.

L'annexe 4 introduit l'effet biologique de la fraction F-2 sur d'autres cellules sanguines; soit les leucocytes mononucléés. Nous remarquons que l'augmentation de la prolifération des PBML est dépendante de la concentration de la fraction F-2.

L'annexe 5 expose les résultats des contrôles positifs des anticorps monoclonaux utilisés contre les différentes cytokines. Les résultats indiquent une inhibition de l'activité biologique de ces cytokines aux concentrations utilisées lors de nos essais.

Les résultats de ces annexes indiquent que l'activité du facteur sécrété par les synoviocytes agit d'une façon concentration dépendante, active d'autres cellules immunes (PBML) et a un poids moléculaire approximatif de 240kD.

Annexe 1

Matériels et méthodes

Prolifération des PBML (Peripheral blood mononuclear lymphocytes).

Les PBML sont isolés à partir du sang humain selon un gradient de densité de lympholyte poly. La concentration cellulaire est ajustée à 2×10^6 cellules/ml. Les cellules (100ul/puit) sont incubées dans des plaques de 96 puits en présence ou en absence de différentes dilutions de la fraction F-2 à 37° C , 5% CO₂ et 95% humidité. La fraction F-2 est obtenue par FPLC à partir du milieu conditionné chauffé et fractionné des synoviocytes. Après 72 heures d'incubation, on ajoute la thymidine tritiée (³H-thymidine; 1μCi/puit) et on incube pendant 6 heures à 37°C. Les cellules sont alors filtrées et on détermine l'incorporation de la ³H-thymidine à l'aide d'un compteur microbêta. Les résultats sont exprimés en cpm (coups par minute) et reflètent la synthèse d'ADN soit la prolifération cellulaire.

Synthèse d'ARN et des protéines.

La synthèse d'ARN et des protéines a été déterminée selon la méthode décrite par Brach et al., 1992. avec une légère modification concernant le temps d'incubation (24 heures). Brièvement, les neutrophiles (1×10^6 cellules/ml) isolés à partir du sang humain sont incubés dans des plaques de 96 puits en présence ou en absence de différentes dilutions de la fraction F-2 à 37° C, 5% CO₂ et 95% humidité. Durant les 6 dernières heures d'incubation, on ajoute l'uridine tritiée: ³H-uridine (2.8×10^4 kBq/ml) ou la leucine tritiée: ³H-leucine (1×10^4 kBq/ml). L'incorporation d'uridine est un indice direct de la synthèse d'ARN, tandis que la leucine reflète la synthèse protéinique. L'incorporation de ³H-uridine ou ³H-leucine est déterminée par un compteur microbêta, les résultats sont exprimés en cpm.

Chimiotaxie.

La migration des neutrophiles a été mesurée selon la méthode décrite par Lagraoui et Gagnon, 1997. Brièvement, l'IL-8 (1ug/ml, EC 50) est placé dans le compartiment du bas en présence ou en absence de l'anticorps neutralisant, anti-IL-8 (180 ug/ml; IC50, 800ug/ml; IC100). Les contrôles sont représentés par le milieu complété avec 10% FBS. Les neutrophiles (1×10^6 cellules/ml) marqués au chromium (^{51}Cr) sont ajoutés au compartiment du haut et le tout est incubé pendant 2 heures à 37° C, 5% CO₂ et 95% humidité. Après 2 heures d'incubation, le contenu du compartiment du bas est collecté puis compté au compteur gamma. La quantité de radioactivité déterminée est un indice de la transmigration des neutrophiles (chimiotaxie).

Prolifération des cellules D10.G4.1.

1×10^4 cellules/puit sont incubées en présence de l'IL-1 α (50 pg/ml, EC50), avec ou sans l'anticorps, anti-IL-1 α (0.03 ug/ml; IC50, 0.1ug/ml; IC100). Après 72 heures d'incubation, on ajoute la thymidine tritiée: ^3H -thymidine (Amersham) (1 μCi /puits) et on incube pendant 6 heures à 37°C. Les cellules sont alors filtrées et on détermine l'incorporation de la ^3H -thymidine à l'aide d'un compteur microbèta. Les résultats sont exprimés en cpm (coups par minute) et sont un indice de la prolifération cellulaire.

Annexe 2

Tableau 1. Effet des bandes obtenues par électrophorèse sur gel natif de la fraction F- 2 (FPLC) sur la phagocytose des neutrophiles.

<i>Bandes</i>	<i>Phagocytose (%)</i>
PBS (contrôle)	12
B-1	17
B-2	26*
B-3	14
B-4	12
B-5	11
B-6	11
B-7	12
B-8 (contrôle)	11
B-9 (contrôle)	12

La fraction F-2 obtenue par FPLC à partir du milieu conditionné chauffé et fractionné a été séparée sur gel natif (native –PAGE, page 77). Après migration, le gel est coupé en différentes bandes (0.5 cm), celles ci sont éluées en utilisant le système microcon-micropure (Amicon). Les différents échantillons sont alors testés pour leur effet sur la phagocytose des neutrophiles. Les contrôles (B-8 et B-9) correspondent à des bandes qui ont été prélevées au niveau de puits vides loin de la zone de migration de la fraction F-2. Le % de phagocytose est un indice de l'activation cellulaire des neutrophiles.

Annexe 3

Tableau 2. Effet des différentes dilutions de la fraction F-2 sur la synthèse d'ARN et de protéines chez les neutrophiles.

<i>Traitement</i>	<i>Incorporation de 3H-uridine ARN (cpm)</i>	<i>Incorporation de 3H-leucine Protéines (cpm)</i>
RPMI-10% FBS	375	1382
Dilutions de F-2:		
1/2	531	2692
1/4	356	1912
1/8	303	1642
1/16	308	1292
1/32	395	1413

Les neutrophiles humains fraîchement isolés sont incubés en présence ou en absence de différentes dilutions de la fraction F-2 obtenue par FPLC . La synthèse d'ARN et des protéines est déterminée selon la méthode décrite par Brach et al., 1992 (voir Matériels et Méthodes, annexe I). Le contrôle est représenté par les neutrophiles qui ont été incubés uniquement dans du RPMI-10% FBS. Les résultats sont représentés en cpm.

Annexe 4

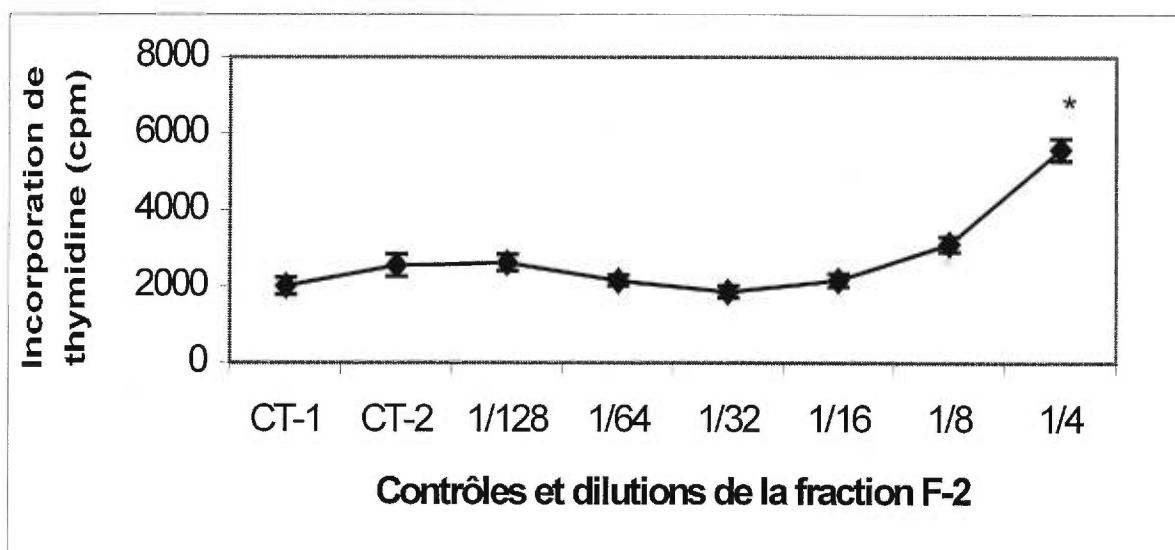


Figure 1. Effet de différentes dilutions de la fraction F-2 sur la prolifération des PBML.

Les leucocytes mononucléés fraîchement isolés sont incubés en présence ou en absence de différentes dilutions de la fraction F-2. L'essai de prolifération est effectué tel que décrit dans Matériels et Méthodes. Les contrôles sont représentés par; CT1: PBML incubés en présence du PBS, CT2: PBML incubés en présence du RPMI-10% FBS.

Annexe 5

Tableau 3. Contrôles positifs des anticorps monoclonaux neutralisants utilisés contre l'IL-8 et l'IL-1 α .

<i>Traitements</i>	<i>Chimiotaxie (IL-8/Anti IL-8) cpm (% d'inhibition)</i>	<i>Prolifération des D10G4.1 (IL-1α/Anti-IL-1α) cpm (% d'inhibition)</i>
Contrôle : RPMI-10% FBS	360	240
IL-8 (50pg/ml)	1250	ND
IL-8 + Anti -IL-8 (180 ug/ml)	500 (\approx 60%)	ND
IL-8 + Anti- IL-8 (800ug/ml)	106 (\approx 92%)	ND
IL-1 α	ND	12001
IL-1 α + Anti-IL-1 α (0.03ug/ml)	ND	5113(\approx 58%)
IL-1 α + Anti-IL-1 α (0.1ug/ml)	ND	1158(\approx 91%)

Les essais de chimiotaxie et de prolifération ont été réalisés dans le but de vérifier le pouvoir neutralisant des anticorps utilisés; soit chimiotaxie pour l'anti-IL-8 et prolifération des cellules T helper D10G4.1 pour l'anti-IL-1 α . Ces essais ont été effectués tel que décrit dans Matériels et Méthodes. (ND: non déterminé).

Liste des abréviations

ADN:	Acide desoxyribonucléique.
ARN:	Acide ribonucléique.
Cr ⁵¹ :	Chromium ⁵¹ .
EC:	Concentration efficace.
EC50:	Concentration efficace induisant 50% d'augmentation de l'activité biologique.
IC:	Concentration inhibitrice.
IC50:	Concentration inhibant 50% de l'activité biologique.
IL:	Interleukine.
PBML:	Leucocytes mononucléés du sang périphérique.