

Université de Montréal

**INDUCTION DE L'APOPTOSE DES NEUTROPHILES DE  
NOUVEAU-NÉS PAR L'INFECTION AU VIRUS HERPÈS  
SIMPLEX-1**

**Par**

**Jamila Ennaciri**

**Département de microbiologie et immunologie**

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
**Maître ès sciences (M. Sc.)**  
en microbiologie et immunologie

©Jamila Ennaciri, 2001



W  
4

U58

2001

11,093

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Titre du mémoire :

**INDUCTION DE L'APOPTOSE DES NEUTROPHILES DE  
NOUVEAU-NÉS PAR L'INFECTION AU VIRUS HERPÈS  
SIMPLEX-1**

Présenté par :

**Jamila Ennaciri**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Emil Toma

Dr Serge Montplaisir

Dr José Menezes

Dr Baruch Toledano

Mémoire accepté le : .....

## SOMMAIRE

La réponse immunitaire contre les infections virales implique à la fois une réponse non spécifique et une réponse spécifique. Les neutrophiles jouent un rôle primordial dans la réponse non spécifique. Le virus Herpès Simplex-1 (HSV-1) est la cause la plus commune d'encéphalite virale sporadique fatale en Amérique du Nord. La mortalité étant évalué de 50 à 60% des nouveau-nés infectés.

Des études antérieures indiquent que les neutrophiles des adultes et des nouveau-nés réagissent différemment en général. La réponse des neutrophiles des nouveau-nés et des adultes à l'infection au HSV-1 ainsi que l'effet de ce virus sur l'apoptose de ces cellules ne sont pas connus.

Le but de cette étude est de déterminer si les neutrophiles des nouveau-nés sont plus susceptibles à l'induction d'apoptose que ceux des adultes suite à l'infection au HSV. A cet égard, notre hypothèse de travail serait que l'HSV induit l'apoptose des neutrophiles comme une stratégie pour évader l'immunité innée et que les neutrophiles néonataux sont plus susceptibles.

L'infection des neutrophiles au HSV a été déterminée par immunofluorescence et cytométrie en flux; l'HSV-1 infecte effectivement les neutrophiles. L'apoptose a été évaluée par l'annexine V et par l'iodure de propidium; et notre étude démontre que l'HSV-1 augmente l'apoptose des neutrophiles néonataux et pas des neutrophiles adultes. Cette apoptose est associée à l'expression de Fas, FasL et FasL soluble et ceci a été déterminé par cytométrie en flux.

Cette étude pourrait expliquer la raison de la sévérité des infections à HSV-1 chez le nouveau-né contrairement à l'adulte. En causant une

augmentation d'apoptose chez les neutrophiles néonataux infectés, ces derniers ne sont pas impliqués dans la réponse immunitaire non spécifique et ne peuvent pas déclencher la réponse immunitaire spécifique, il s'en suit une invasion du système immunitaire.

## **TABLE DES MATIÈRES**

Identification du jury	2
Sommaire	3
Table des matières	5
Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Liste des abréviations	10
Remerciements	11
Dédicace	12

## **CHAPITRE I : INTRODUCTION**

1- Neutrophiles	14
a) Structure	
b) Cinétique	
c) Fonctions	
2- Virus Herpès simplex	27
a) Structure	
b) Pouvoir pathogène	
c) Mode transmission	
d) La réponse immunitaire	
e) Les neutrophiles et les infections à HSV-1	
3- Apoptose	32

- a) Définition
- b) Les différentes voies d'apoptose
- c) L'apoptose par death factor

4- Projet de recherche 36

**CHAPITRE II : ARTICLE 38**

Induction of Apoptosis by Herpes Simplex Virus-1 in Neonatal, but not Adult Neutrophils.

- 1- Abstract
- 2- Introduction
- 3- Materials and methods
- 4- Results
- 5- Discussion
- 6- Acknowledgments
- 7- References

**CHAPITRE III : DISCUSSION 67**

**CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES 74**

**BIBLIOGRAPHIE 76**

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Propriétés des récepteurs chimiotactiques des PMN	22
Tableau 2. Propriétés des récepteurs d'opsonisation des PMN	23



## LISTE DE FIGURES

Introduction :

Figure 1. Schéma montrant le développement des PMN dans la moelle osseuse	17
Figure 2. L'interaction des PMN avec l'endothélium vasculaire	19
Figure 3. Les différents stimuli de l'apoptose	34

Article :

Figure 1A. Demonstration of HSV-1 infection of human neutrophils by immunofluorescence. Figure 1B. Demonstration of HSV-1 infection of human neutrophils by flow cytometry.	59
Figure 2A. There is an increase in the number of Annexin V positive PI negative neutrophils in the HSV-1+ neonatal neutrophils as opposed to controls. Figure 2B. There is no increase of the percentage of apoptotic adult neutrophils between HSV-1 infected neutrophils and controls.	60
Figure 3A. Graphical representation of the percentage of apoptosis in apoptotic neonatal neutrophils post HSV-1 infection as opposed to control neutrophils. Figure 3B. Graphical representation of the percentage of apoptotic neutrophils demonstrate no significant increase in apoptotic adult neutrophils post HSV infection as opposed to control neutrophils.	61
Figure 4A-B. Effect of HSV-1 infection on Fas expression on neonatal neutrophils	62
Figure 5A-B. Effect of HSV-1 infection on FasL expression on neonatal neutrophils	63

Figure 6. HSV-1 increases release of soluble FasL by neonatal neutrophils in vitro. 64

## **LISTE DE ABRÉVIATIONS**

CMH 1 : complexe majeur d'histocompatibilité 1  
CR1 : complement receptor type 1  
FADD : Fas-associating protein with death domain  
FITC : fluorescein isothiocyanate  
G-CSF : granulocyte -colony stimulating factor  
GM-CSF: granulocyte macrophage-colony stimulating factor  
HSV-1 : herpes simplex virus 1  
IFN- $\alpha$  : interferon alpha  
IFN- $\gamma$  : interferon gamma  
IL-1 : interleukine 1  
IL-2 : interleukine 2  
IL-6 : interleukine 6  
IL-8 : interleukine 8  
IL-15 : interleukine 15  
IgM : immunoglobuline M  
IgG : immunoglobuline G  
IgA : immunoglobuline A  
LPS : lipopolysaccharide  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
NGF : neuronal growth factor  
NF-kB : nuclear factor- kappa B  
NK : natural killer  
PAF : platelet activating factor  
PBS : phosphate buffered saline  
PMN : polymorphonucléaire neutrophile  
TNF : tumor necrosis factor  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
TNFR : tumor necrosis factor receptor

## REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur, Dr B.Toledano qui m'a soutenue, formée et encouragée tout au long de ma maîtrise.

Un grand merci également au Dr J. Menezes, mon codirecteur, pour ses conseils très précieux.

Un grand merci pour le personnel de la salle d'accouchement qui m'ont fourni le sang du cordon ombilical et merci aussi à tous les volontaires qui m'ont fourni le sang d'adulte.

Merci au Docteur Carolina Alfieri pour les enrichissantes discussions sur les *herpes simplex virus*.

Merci également à mes collègues Laurent Knafo, Stéphane Pinsonneault et Steven Tran pour leur soutien technique; Myriam, Souad et Roxanne pour leur encouragement et leur disponibilité.

Et finalement, j'aimerais remercier toute personne qui a contribué de loin ou de près à l'aboutissement de ce travail, plus particulièrement les membres de ma famille, ainsi que mes amis François Bérout, Douglas Rideout, et Myriam Carrière de m'avoir écoutée, supportée et encouragée.

## DÉDICACE

Je dédicace mon mémoire à ma mère qui m'a encouragée tout au long de mes études et qui m'a poussée en sciences de la vie.

Merci mère.

## **I. INTRODUCTION**

## 1- Neutrophiles

Les leucocytes ou globules blancs, jouent un rôle essentiel dans la lutte de l'organisme contre les infections. En moyenne les leucocytes sont au nombre de  $4 \text{ à } 11 \times 10^9$  par litre de sang. Parmi les éléments figurés du sang, les leucocytes sont les seuls à posséder un noyau et les organites habituels.

Suivant les caractéristiques structurales et chimiques, les leucocytes se divisent en deux grandes catégories : les granulocytes et les agranulocytes. Les premiers contiennent des granules spécialisés. Les granulocytes ont une forme sphérique et sont plus grands que les érythrocytes. Ils sont dotés d'un noyau présentant plusieurs lobes reliés entre eux par de très fins ponts, et selon la couleur de leurs granulations, on distingue les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les neutrophiles constituent presque la moitié de la population des globules blancs (40 à 70%).

### a) Structure :

Quand on a regardé les traits morphologiques du développement de la lignée myéloïde par le microscope photonique, on a identifié 6 stades avant d'arriver au stade de polymorphonucléaire neutrophile (PMN). Ces stades se différencient en fonction de la taille, du volume du noyau, de la densité de la chromatine, du nombre des granules et de la coloration du cytoplasme (figure 1).

#### 1) Le stade myéloblaste

Le myéloblaste est le plus petit précurseur myéloïde (un diamètre de 15-20 microns), avec un noyau large et rond, un ou quelques nucléoles,

quelques mitochondries et un appareil de Golgi. Les granules sont absentes et le cytoplasme est petit.

## 2) Le stade promyélocyte

Le promyélocyte est le plus large des cellules (un diamètre  $> 20$  microns) avec une importante présence de granules violettes appelées azurophiles ou granules primaires. Le noyau ressemble à celui du myéloblaste.

## 3) Le myélocyte

Le myélocyte est le dernier précurseur à subir la mitose. La progéniture de myélocyte est petite (un diamètre  $< 20$  microns). Durant cette période, les granules spécifiques sont synthétisées. Les nucléoles se réduisent et s'anéantissent, le noyau devient petit et irrégulier, et le ratio noyau/cytoplasme se réduit.

## 4) Le métamyélocyte

Le métamyélocyte est légèrement plus petit que le myélocyte, durant ce stade, le cytoplasme mature et ressemble plus à celui de la forme juvénile du PMN. Les granules sont petites et fines, le noyau ressemble à un haricot. Le métamyélocyte perd la capacité de division et se caractérise plus par son noyau qui s'allonge et se ségmente.

## 5) La forme juvénile

La forme juvénile est caractérisée par un noyau allongé mais pas encore tout à fait segmenté. Le cytoplasme ressemble plus à celui du PMN avec une coloration rose et des granules azurophiles fines. La forme juvénile est fonctionnelle du point de vue phagocytose. Elle doit compter parmi les neutrophiles PMN lors du comptage de ces derniers.

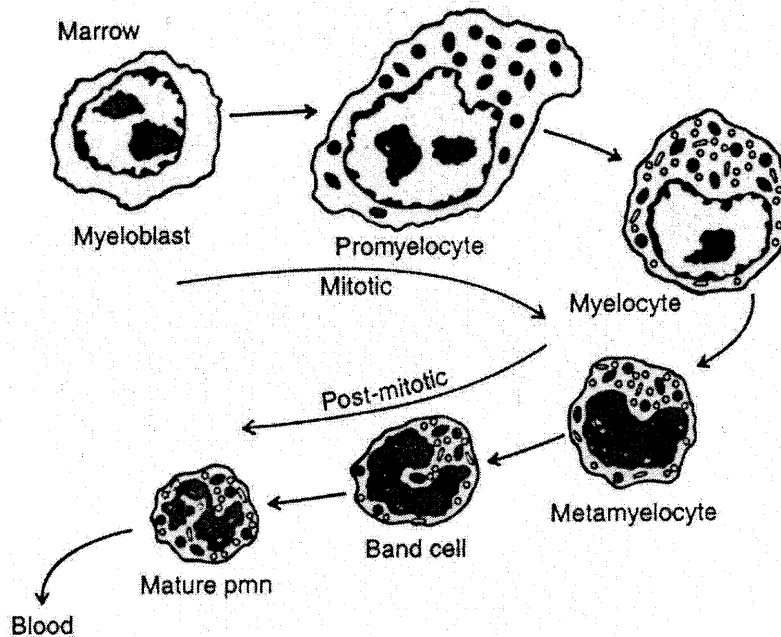


## 6) Le PMN

Le PMN est le dernier stade de maturation avec une taille standard (13 microns), un noyau plurilobé, un appareil de Golgi petit par rapport au promyélocyte et au myélocyte. Un réticulum endoplasmique rugueux et des mitochondries peu abondants. Le cytoplasme des neutrophiles est rose et contient quatre types de granulations ou de vésicules identifiées par des marqueurs enzymatiques.

- Les granules azurophiles myeloperoxydase positives, dont la matrice contient des protéines microbicides et des hydrolases acides impliquées dans la dégradation oxydative et non oxydative des bactéries et des champignons. La membrane des granules azurophiles contient des récepteurs et des protéines impliqués dans la transduction de signaux.
- Les granules spécifiques contiennent la lactoferrine qui sert de marqueur pour ce type de granules. La matrice des granules spécifiques contient des hydrolases distinctes de celles des granules azurophiles, de la vitamine B12 et la protéine de fixation « Binding protein ». Leur membrane contient des récepteurs du chimotactisme et d'opsonisation, la protéine d'adhésion et le cytochrome b.
- Les vésicules sécrétoires contiennent la phosphatase alcaline, leur membrane est aussi une source du cytochrome b, elle contient également des récepteurs pour le plasminogène activateur.
- Un autre type de granules peroxydases négatives vient d'être identifié, ces granules sont riches en gélatinase mais faibles en lactoferrine

**Figure 1.** Schéma montrant le développement des PMN dans la moelle osseuse.



b) La cinétique des granulocytes neutrophiles :

Les polymorphonucléaires neutrophiles sont distribués entre la moelle osseuse, le compartiment sanguin et les différents tissus à travers l'organisme. Le compartiment de la moelle osseuse est le plus grand avec un nombre de PMN de  $2.26 \times 10^9$  cellules par Kg. Le compartiment sanguin constitue le tiers du compartiment de la moelle osseuse avec un nombre de PMN de  $0.7 \times 10^9$ . Seulement la moitié est dans les vaisseaux sanguins, l'autre moitié est accrochée à l'endothélium vasculaire. Ces deux compartiments sont en équilibre perpétuel.

Le compartiment du tissu extravasculaire n'a pas été quantifié, vu qu'il varie dépendamment de la migration des PMN vers les sites d'infection ou d'inflammation <sup>1</sup>.

c) Fonction :

Les neutrophiles jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire. Le granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) est un facteur de croissance spécifique de la lignée hématopoiétique du PMN; il stimule sélectivement la prolifération et la maturation de la lignée myéloïde précurseur des PMN <sup>2</sup>. Cette cytokine a un rôle crucial dans le maintien d'un taux normal des PMN dans le sang et dans l'augmentation du nombre des PMN dans la circulation périphérique en cas d'infection ou d'inflammation. Le G-CSF active également les différentes fonctions des neutrophiles incluant l'expression des molécules d'adhésion, l'adhésion, le chimiotactisme, les métabolites oxygénés, la phagocytose et la bactéricidie <sup>3;4</sup>.

\* Interactions moléculaires entre les PMN et l'endothélium :

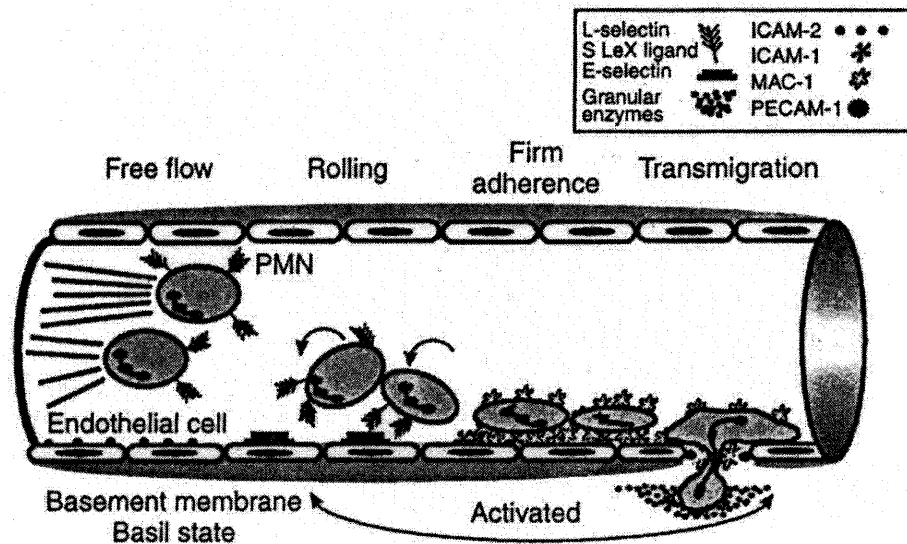
En temps normal, les PMN circulent tout au long du réseau vasculaire sans entraver l'intégrité vasculaire. Cependant, à des sites inflammatoires, les PMN adhèrent à l'endothélium, provoquent ainsi une diapédèse entre les cellules endothéliales, et les PMN passent à travers ces cellules endothéliales vers les tissus.

Le recrutement des PMN circulants vers les sites d'inflammation ou d'infection, nécessite une série d'évènements qui ont lieu entre les PMN et les cellules endothéliales. Ce recrutement est médié par les molécules d'adhésion. Les PMN et les cellules endothéliales passent d'un état basal

à un état activé par une variété de médiateurs d'inflammation. Ce processus emprunte quatre étapes :

- 1) Les PMN et les cellules endothéliales sont à leur état basal juste avant de s'exposer à des médiateurs d'inflammation
- 2) L'endothélium vasculaire exprime la molécule ICAM-2 qui n'affecte pas le flux normal des PMN. Ces derniers expriment à leur tour la L-sélectine et son ligand SleX et commencent à rouler vers la paroi de l'endothélium.
- 3) Les cellules endothéliales sont activées par l'IL-1, le TNF- $\alpha$  ou une endotoxine et expriment la E-sélectine, qui provoque la perte de l'attachement des PMN aux cellules endothéliales. Les cellules endothéliales libèrent l'IL-8, le GM-CSF, et platelet activating factor (PAF). Une de ces molécules induit la libération par les PMN de la Mac-1 intégrine  $\beta$ -2 qui médie une forte adhérence des PMN à l'ICAM-1 exprimée par les cellules endothéliales actives
- 4) Les cellules Les endothéliales expriment la PECAM-1 qui lie la Mac-1 des PMN et qui aide ces derniers à migrer vers les tissus (figure 2).

**Figure 2.** L'interaction des PMN avec l'endothélium vasculaire



\* Le chimiotactisme :

Le facteur de chimiotactisme l'IL-8 est synthétisé et libéré par les PMN dans le but de permettre la migration des PMN du vaisseau sanguin à travers l'endothélium vers les tissus, lieu d'inflammation ou d'infection. L'IL-8 augmente également le recrutement des PMN et d'autres cellules du système immunitaire dans les sites d'inflammation <sup>5</sup>.

\* La phagocytose:

La dégranulation des PMN commence avec le déclenchement de la phagocytose. Les granules passent dans le milieu externe et fusionnent leurs membranes avec les vacuoles phagocytaires nouvellement constituées à partir de l'invagination de la membrane plasmique (phagosomes); ainsi quand le phagosome fusionne avec un lysosome, le phagolysosome est détruit.

Le mécanisme par lequel les neutrophiles détruisent la paroi ingérée est plus complexe qu'une simple digestion du microorganisme par les enzymes lysosomiales. Certaines de ces enzymes utilisent l'oxygène consommé en grandes quantités par la cellule pour élaborer des radicaux libres (dont le superoxyde) selon un processus appelé explosion respiratoire. Ces radicaux libres possèdent une grande capacité de destruction des cellules. Les neutrophiles secrètent également des substances chimiques comme le lysozyme qui agit comme un antibiotique en détruisant la paroi des bactéries et la lactoferrine, qui inhibe la multiplication bactérienne.

Pour qu'ils accomplissent leur activité phagocytaire, les neutrophiles doivent adhérer à la particule à ingérer. L'adhérence se produit lorsque les corps étrangers sont recouverts des protéines du complément, d'anticorps, ou encore de certaines cytokines. Ce complexe immun sert de sites auxquels les récepteurs sur la membrane plasmique des phagocytes peuvent se fixer. Ce processus est appelé opsonisation.

#### \* Le priming ou l'amorçage des neutrophiles

Les neutrophiles existent sous 3 formes : quiescents, activés ou amorcés. Les neutrophiles amorcés sont prêts à manifester une explosion respiratoire poussée ou une réponse de leurs granules quand ils sont provoqués par leurs agonistes, les agonistes capables d'induire l'amorçage des neutrophiles sont de trois genres :

1) les médiateurs inflammatoires qui sont chimiotactiques et qui se lient à la famille des récepteurs chimiotactiques à 7 domaines transmembranaires (tableau 1)

2) les immunoglobulines et le complément qui se lient aux récepteurs à un domaine transmembranaire qui nécessitent un cross-linking pour leur activation ( tableau 2)

3) les cytokines inflammatoires et les facteurs de croissance qui se lient spécifiquement à leurs récepteurs à un domaine transmembranaire (ex : TNF- $\alpha$ , LPS, GM-CSF, IL-1, orthovanidate)

Ces molécules amorcent les neutrophiles à une dose spécifique qui ne provoque pas l'augmentation du calcium libre dans le cytosol , mais participe à la phosphorylation des protéines intracellulaires sur les résidus tyrosine des PMNs.

Les neutrophiles peuvent être amorcés par un agoniste et induire la réponse respiratoire par un deuxième agoniste. L'amorçage peut achever en quelques minutes; il peut aussi être un peu plus lent et nécessiter 30 minutes, comme il peut durer plusieurs heures.

L'amorçage est le résultat de la communication intracellulaire entre le système de signalisation du calcium à travers la sérine/thréonine kinase comme la protéine kinase C, la phospholipase A2, ou la calcium moduline kinase dépendant, et le système de signalisation calcium tyrosine kinase indépendant via la tyrosine kinase.

**Tableau 1.** Propriétés des récepteurs chimiotactiques des PMN

Specific Receptor	Type	Receptor/ PMN	High-affinity kDa (nM)	Low-affinity kDa (nM)
FMLP	Bacterial product	50,000	20	—
C5a	Complement fragment	50,000–100,000	2	—
IL 8R1	CXC chemokine peptide	20,000	0.8	—
GRO $\alpha$	CXC chemokine peptide	60,000–90,000	0.3 (30–45%)	30 (55–70%)
NAP-2	CXC chemokine peptide	60,000–90,000	0.7 (30–45%)	30 (55–70%)
PAF	CXC chemokine phospholipid	1,000 270,000	0.2 —	— 500
LTB4	CXC chemokine phospholipid	4,500 270,000	0.4 —	— 75

**Tableau 2.** Propriétés des récepteurs d'opsonisation des PMN

Specific Receptor	Marker	Type/ Mol. Mass	Opsonic Ligand	Binding Affinity (Ka)	Functions
Fc $\gamma$ R1; expression requires IFN- $\gamma$	CD64	Single trans-membrane protein 72 kDa	IgG1	High 50 nM	Activation Phagocytosis
Fc $\gamma$ R1a(a', b not expressed); expression is constitutive	CD32	Single trans-membrane glycoprotein 40 kDa	IgG1	Low	Activation Phagocytosis
Fc $\gamma$ R1IIB; Expression is constitutive "A" isoform not expressed	CD 16 NA 1 & NA 2 allele-antigen SH antigen	GPI-anchored glycoprotein 50–80 kDa	IgG1 complexes IgG3 complexes	Low 110 nM Low 470 nM	Activation Immune-binding Phagocytosis requires CR1 or Fc $\gamma$ R2
Fc $\alpha$ R	CD89 My43 IgM	Single trans-membrane glycoprotein 60 kDa	IgA1, IgA2 Secretory IgA1, IgA2		Activation Phagocytosis
CR1	CD35 4 alleles	Single trans-membrane glycoprotein 160, 190, 220, 250 kDa	C3b & C4b dimers	High 0.5 nM	Phagocytosis
CR3	CD11b/ CD18 Mac1	Heterodimeric transmembrane protein	C3bi	High 0.5 nM Ca+2, Mg+2 IMF-1	Activation Phagocytosis



\* L'explosion respiratoire :

L'activation des PMN provoque en quelques secondes la consommation accrue de l'oxygène. Cette explosion oxydative résulte de l'activation d'un système latent à enzyme du genre NADPH oxydase ou l'explosion respiratoire oxydase. Les produits de cette explosion sont générés par le transfert d'un seul électron à partir du NADPH vers la molécule d'oxygène ( $O_2$ ) formant l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ).  $O_2^-$  se transforme rapidement, spontanément ou catalysé par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  réagit soit avec l'anion superoxyde et forme le radical hydroxyde ( $OH^\cdot$ ), soit avec l'ion  $Cl^-$  et forme l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ). Le superoxyde est légèrement bactéricide, mais le radical  $OH^\cdot$  tue les microbes et cause des lésions dans les tissus environnants. L'acide hypochloreux forme des chloramines de longues durées qui contribuent à l'élimination par oxydation des microbes. Ces radicaux oxygénés activent les métaloprotéinases comme l'élastase et la collagénase durant la dégranulation des PMN. Les neutrophiles ont également d'autres antioxydants tels que l'acide ascorbique, la  $\alpha$ -tocophérolé membranaire et une catalase soluble.

\* La voie de l'oxyde d'azote :

Les neutrophiles sont dotés d'une autre activité antimicrobienne, celle de la voie de l'oxyde d'azote synthétase ou encore « nitric oxide synthetase » NOS. Cette dernière se traduit par la génération d'intermédiaires azotés très réactifs. L'oxyde d'azote (NO) ou autres intermédiaires dérivent du L-arginine et sont induits dans les PMN quand ces derniers sont exposés à des médiateurs d'inflammation. Aussi,

à partir des PMN, l'enzyme superoxyde dismutase inhibe la thrombine qui induit l'aggrégation des plaquettes en libérant des anions nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), ( $\text{NO}_3^-$ ) et le peroxy-nitrite. Au fait, les intermédiaires azotés jouent un rôle essentiel dans l'inflammation.

\*Autre activité antimicrobienne non oxydante :

les neutrophiles ont la capacité d'éliminer les microorganismes pathogènes en utilisant des protéines antimicrobiennes présentes dans leurs granules azurophiles, spécifiques et la gélatinase. Parmi ces protéines il y'a les défensines <sup>6</sup>, les serprocidines et la protéine BPI « bacterial permeability-increasing » <sup>7</sup>. Les défensines constituent la moitié des protéines des granules. Elles ont des propriétés viricides, bactéricides et fongicides et sont hautement cationiques. Les serprocidines éliminent les bactéries gram- et gram+ par différents mécanismes très spécifiques. La BPI a une activité bactéricide importante en anaérobie <sup>8</sup>. La lactoferine, protéine des granules spécifiques est bactéricide, et agit au niveau des bactéries gram-. Le lysozyme présent dans les granules azurophiles, spécifiques et dans la gélatinase aide à digestion des pathogènes phagocytés par les PMN. Cette voie antimicrobienne non oxydante s'avère cruciale dans des conditions d'anaérobie.

\* Les neutrophiles : médiateurs dans la réponse spécifique

On a pendant longtemps cru que les PMN étaient simplement impliqués dans l'inflammation et la réponse non spécifique. Cependant, des études récentes ont démontré que les neutrophiles jouent un rôle majeur dans la réponse spécifique, en induisant la synthèse de plusieurs cytokines <sup>5</sup>. En

effet, les PMN matures mais non stimulés, synthétisent le récepteur du complément type 1 (CR1)<sup>9</sup> et les molécules du CMH1<sup>10</sup>. Après toute stimulation, ils vont synthétiser et sécréter plusieurs médiateurs importants tels que l'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )<sup>11</sup>, le tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )<sup>12;12;13</sup>, l'interleukine 8 (IL-8)<sup>14</sup>, le platelet activating factor (PAF) et la leukotriène B<sub>4</sub><sup>15</sup>.

Les PMN produisent l'interleukine 1 (IL-1)<sup>16;17</sup>. IL-1 $\alpha$  participe dans différentes activités notamment l'activation des lymphocytes B et T, l'induction d'autres cytokines régulatrices comme IL-6, IL-8 et le GM-CSF<sup>18</sup>. En plus, IL-1 a des effets paracrines et autocrines, elle stimule sa propre production par les PMN<sup>16;19</sup>, l'induction locale de molécules d'adhésion à partir des cellules endothéliales<sup>20</sup>, et l'accumulation d'autres PMN aussi bien que des monocytes et lymphocytes.

Les PMN synthétisent et libèrent le TNF- $\alpha$  en réponse à la stimulation par les LPS<sup>12;13</sup>, GM-CSF<sup>21</sup>, ou *Candida albicans*<sup>12</sup>. Le TNF- $\alpha$  sécrété par les PMN participe également dans l'activation des cellules T et dans le recrutement des PMN dans les sites d'inflammation.

La stimulation des PMN hautement purifiés par le GM-CSF et un faible taux de TNF- $\alpha$  induit ces cellules à l'accumulation de l'ARNm de l'IL-6<sup>22</sup> qui stimule la maturation finale des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes sécrétant des anticorps.

Les PMN stimulés par les LPS, synthétisent et libèrent IL-8 qui est un facteur de chimiotactisme. IL-8, en plus de participer dans le recrutement des PMN dans les sites d'inflammation, permet aussi le chimiotactisme d'une petite proportion de cellules T<sup>23</sup>. On peut ainsi dire que les PMN régulent le recrutement des lymphocytes T dans la réponse spécifique.

Récemment, on a découvert que les PMN sécrètent les macrophages inflammatory protein  $\alpha$  et  $\beta$  (MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ )<sup>24;25</sup>. Ceci est d'une importance considérable car le MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  sont deux chimioattractants pour les monocytes<sup>24</sup> et des sous populations des cellules T<sup>26</sup>, et aussi activent plusieurs fonctions des macrophages et des neutrophiles<sup>27</sup>.

Les neutrophiles expriment des récepteurs pour l'IL-15, qui exerce plusieurs activités chez les PMN<sup>28</sup>. L'IL-15 induit l'activation de NF-kB chez les neutrophiles, induit la production de l'IL-8 chez ces même cellules, augmente la phagocytose par les PMN de *Candida albicans* et retarde l'apoptose des neutrophiles<sup>29</sup>.

Donc, ceci nous indique que les neutrophiles contribuent significativement dans l'initiation et l'amplification de la réponse immunitaire cellulaire et humorale.

## **2- Le virus herpès simplex type 1 (HSV-1)**

### **a) Structure**

Virus appartenant à la famille des *herpesviridae*, enveloppé, avec un génome très grand et complexe, caractérisé par un ADN double brin linéaire. Le virus est constitué de 4 éléments; de l'intérieur vers l'extérieur on trouve : le core qui contient l'acide nucléique, une capsid icosaédrique, un tégument entourant la capsid et l'enveloppe. Le génome viral a un poids moléculaire de 150 Kb, et code pour plus de 70 polypeptides. Peu est connu concernant ces protéines. La capsid est formée de 162 capsomères et elle est entourée du tégument. L'enveloppe est constituée de glycoprotéines, de lipides et de

polyamines. Les glycoprotéines permettent l'attachement du virus à la cellule hôte et suscitent aussi la réponse de l'hôte <sup>30</sup>

Pour initier l'infection, le virus doit s'attacher aux récepteurs à la surface de la cellule hôte. Un des récepteurs de l'HSV-1 est l'héparane sulfate. La déletion de l'héparane sulfate de la surface des cellules ou l'utilisation de cellules mutées déficientes pour la synthèse de l'héparane sulfate réduit l'attachement et ainsi l'infection à 85% <sup>31;32</sup>. Ceci démontre que l'héparane sulfate est un récepteur majeur de l'HSV-1. Une fois l'attachement fait, le virus fusionne son enveloppe avec la membrane plasmique de l'hôte, et la capside nue se trouve transportée vers les pores nucléaires. L'ADN est ainsi libéré dans le noyau de la cellule où la transcription, la réplication et l'assemblage se produisent.

La transcription de l'ADN est caractérisée par l'expression de 3 classes de gènes : alpha, beta et gamma, et qu'on appelle respectivement pré-précoces, précoces et tardifs. Ces gènes sont exprimés d'une façon contrôlée et régulée. Les gènes alpha sont responsables de l'initiation de l'infection. Les cinq gènes alpha sont transcrits dans les cellules infectées en absence de la synthèse de protéines virales. Les gènes beta codent pour les enzymes nécessaires à la réplication virale telle la thymidine kinase et des protéines nécessaires à la réplication. L'expression des gènes beta dépend de l'expression fonctionnelle des gènes alpha. Une fois les gènes beta exprimés les gènes alpha arrêtent leurs expressions et la synthèse protéique cellulaire s'arrête également. Les gènes gamma sont impliqués dans la synthèse de protéines

structurales, et leur expression qui est lente et qui nécessite la synthèse de l'ADN viral, dépend des gènes beta<sup>33</sup>.

L'assemblage des virus se fait dans le noyau, avec l'acquisition de l'enveloppe. La capsid bourgeonne avec la membrane nucléaire, et le virus complet est transporté à travers le cytoplasme vers la membrane plasmique, où la libération de particules virales a lieu.

#### b) Le pouvoir pathogène

Ce virus à la fois dermatrope et neurotrope donne des infections d'une remarquable diversité quant à leur manifestations cliniques et leur degré de gravité.

Virus très lytique dans les cellules épithéliales, il peut être très pathogène. Il cause des infections oculaires qui se manifestent par une kératoconjonctivite, des infections labiales et buccales telle la gingivostomatite, des infections des voies aériennes supérieures comme la pharyngite, l'oesophagite, la trachéite, la trachéobronchite et des infections génitales. L'HSV est souvent latent dans les cellules nerveuses, plus exactement dans le corps cellulaire des neurones sensitifs périphériques innervant le territoire de la primo-infection, où il peut se réactiver et gagner par voie axonale centrifuge la jonction cutanéomuqueuse pour y donner les vésicules caractéristiques d'herpès labial récurrent.

L'HSV-1 est impliqué dans 30% des cas d'infections herpétiques néonatales<sup>34</sup>. Une des manifestations les plus sévères de l'herpès type 1, est l'**encéphalite**, habituellement localisée au lobe temporal, volontiers unilatérale, sous forme d'un foyer de nécrose hémorragique.

L'encéphalite débute brutalement par de la fièvre et des signes encéphalitiques : des crises convulsives, des troubles du comportement, des paralysies, des troubles de la conscience qui vont s'aggraver jusqu'au coma. La mortalité spontanée est de 50 % et la survie se trouve marquée par des séquelles neurologiques<sup>35</sup>

#### c) Mode de transmission

Chez l'adulte la transmission peut se faire par contact direct avec les vésicules des lésions cutané-muqueuses, contenant les particules virales, ou par voie sexuelle concernant l'herpès génital.

L'infection du nouveau-né peut survenir de trois manières : intra-utérine, périnatale, et postnatale. Pour les deux premiers modes de transmission, la mère est le réservoir du virus. Cependant, la transmission périnatale où il y a contact entre le fœtus et les sécrétions génitales maternelles représente 75 à 80% des cas. La transmission postnatale représente 15 à 20% des cas. La transmission intra-utérine représente un très faible pourcentage car 30 bébés ont été identifiés dans le monde avec une infection congénitale<sup>33</sup>. Dans l'ensemble, l'HSV-1 représente 30% des infections herpétiques néonatales, dont la majorité sont des infections post-natales. Cependant, c'est ce type qui cause des manifestations sévères telle l'encéphalite et non pas le type 2<sup>36</sup>.

#### d) La réponse immunitaire de l'hôte

Quand on veut définir la réponse immunitaire de l'hôte envers l'infection à HSV-1, il faut préciser l'âge de l'hôte, adulte ou nouveau-né.

La pathogénicité de l'infection à HSV-1 dépend de la réponse immunitaire spécifique et non spécifique de l'hôte, les macrophages, les

neutrophiles, les cellules NK, les sous populations spécifiques de cellules T, les anticorps spécifiques et les lymphokines d'une part et de la voie de transmission d'autre part. La réponse immunitaire de l'hôte peut influencer l'établissement de la maladie, la sévérité de l'infection, et la résistance de l'hôte au maintien et à la réactivation du virus.

La réponse humorale suite à l'infection se traduit par l'apparition transitoire d'IgM trois semaines post-infection, suivie d'IgG et d'IgA, qui tendent à persister longtemps, mais ne neutralisent pas complètement le virus, et donc ne protègent pas contre la récurrence, ni contre la surinfection exogène<sup>33</sup>.

La réponse cellulaire est importante dans la réponse immunitaire du nouveau-né. Des nouveau-nés infectés par l'HSV ont une réponse cellulaire retardée (de 2 à 4 semaines après l'apparition des symptômes cliniques) par rapport aux adultes. Aussi, ils ont une production faible d'interféron alpha par rapport aux adultes lors d'une primo-infection à HSV<sup>37</sup>. L'interféron alpha est impliqué dans la maturation de la réponse cellulaire, plus particulièrement dans l'activation des cellules NK. Egalement, les nouveau-nés infectés ont une réponse faible des lymphocytes malgré la stimulation par l'interféron-gamma<sup>37;38</sup>, et des neutrophiles immatures<sup>39</sup>. Est-ce le virus qui cause ce retard de la réponse cellulaire ou l'immaturation du système immunitaire? Dans tous les cas, ceci démontre quelque part «l'incompétence» du système immunitaire du nouveau-né.

#### f) Les neutrophiles et les infections à HSV-1

On a souvent pensé que les macrophages et les lymphocytes sont les cellules majeures impliquées dans les défenses immunitaires. Cependant,



différentes et plusieurs raisons montrent que les neutrophiles non seulement participent dans la phagocytose des bactéries et dans l'inflammation, mais également contribuent à la défense de l'hôte contre les infections virales. Parmi ces raisons, certaines infections virales augmentent le nombre des neutrophiles circulants<sup>40</sup> et la réponse active et dominante des neutrophiles dans les lieux de l'infection virale<sup>40</sup>. En plus, Il a été rapporté que les neutrophiles adhèrent aux cellules infectées par les virus<sup>41;42</sup>. Plus récemment, il a été démontré que les neutrophiles matures, même si limités dans leur capacité de synthèse et de sécrétion de protéines, ils sont capables de produire une variété de médiateurs tels que des enzymes protéolytiques et des cytokines, dotés d'activités antivirales<sup>5;43</sup>.

Dans le cas de l'infection de la cornée par l'HSV-1, ce sont les neutrophiles, les premières cellules à s'infiltrer dans la cornée, et ce sont les PMN qui restent prédominantes durant le développement de la kératite herpétique<sup>44-46</sup>. Des études *in vivo* chez la souris ont démontré que l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  sont impliqués dans le chimiotactisme des PMN lors d'une kératite herpétique<sup>47</sup>; l'IL-2 prolonge la vie des neutrophiles dans les sites inflammatoires et active l'exocytose des enzymes protéolytiques. *In vitro*, il a été démontré que les PMN adhèrent aux cellules infectées par le HSV suite à l'activation de la voie du complément<sup>48</sup> et à la présence d'anticorps spécifique anti-HSV<sup>49;50</sup>. Une étude adjacente a démontré que les neutrophiles contrôlent la réplication virale et la propagation du virus dans le cas d'une infection de la cornée par l'HSV-1.

### 3- L'apoptose

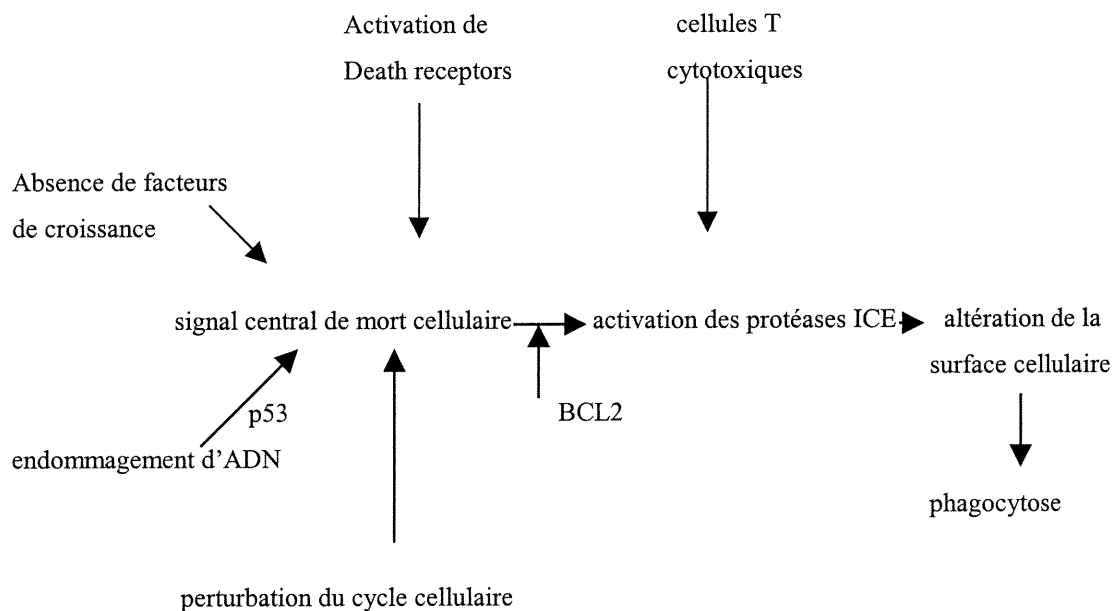
#### a ) Définition

L'apoptose est un procédé fonctionnel durant l'embryogenèse, elle joue un rôle crucial dans le remodelage des tissus, et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Chez les eucaryotes, les cellules sont appelées à mourir pour différentes raisons suite à un dommage irréparable, un signal d'induction d'apoptose ou la perte d'un signal de survie. Elle est impliquée dans la régression de tumeurs, dans les défenses immunitaires et dans l'élimination des lymphocytes T autogéniques (95%) au niveau du thymus<sup>51</sup>. C'est un processus génétiquement déterminé et biologiquement actif. L'apoptose est initiée et complétée de manière ordonnée par l'activation et la synthèse par la cellule apoptotique de plusieurs ARN et protéines nécessaires à la mort cellulaire. Elle se distingue de la nécrose, qui est pathologique et qui est causée par un endommagement soudain et sévère d'une cellule. Sur la base de changements morphologiques<sup>52</sup>, les cellules apoptotiques se caractérisent par un ADN fragmenté, une rupture du cytosquelette, un rétrécissement de la cellule, un noyau condensé et une chromatine condensée. Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne suscite pas d'inflammation, les cellules apoptotiques maintiennent leur intégrité membranaire et expriment des marqueurs de surface en vue de leur phagocytose par les macrophages, et donc ne libèrent pas leur contenu cytoplasmique dans le milieu extra cellulaire.

#### b ) Les différentes voies d'apoptose :

L'apoptose, peut être déclenchée par plusieurs et différents stimuli qui contrôlent son induction ou sa suppression. Parmi les inducteurs de

l'apoptose il y'a une série de médiateurs physiologiques incluant des signaux de la famille TNF (tumor necrosis factor), le retrait d'un facteur de croissance essentiel, le traitement avec des glucocorticoïdes, les neurotransmetteurs, le gène supresseur de tumeurs p53. Les lymphocytes T cytotoxiques, les infections virales et la formation de radicaux libres induisent également l'apoptose <sup>53</sup>. Tous ces stimuli agissent à travers différentes voies, mais aboutissent au même résultat à la fin : la mort de la cellule. D'un autre côté, il y'a les supresseurs d'apoptose tels que certaines molécules de la famille Bcl-2 <sup>54</sup>, des produits de gènes viraux <sup>55;56</sup>, et des agents pharmacologiques tels que les antioxydants <sup>57</sup>.



### c) L'apoptose par death factor :

Une voie majeure induisant l'apoptose a été découverte en étudiant les propriétés du récepteur Fas. Au fait, un anticorps dirigé contre la

molécule Fas induit l'apoptose des cellules qui expriment cette molécule à leur surface<sup>58;59</sup>.

Fas est un récepteur à la surface des cellules, fait partie de la famille des récepteurs TNF « tumor necrosis factor ». Son ligand est une protéine transmembranaire de type II, nommée Fas Ligand. FasL appartient également à la famille TNF. Il est exprimé chez les cellules T et les cellules NK, et il induit l'apoptose chez les cellules exprimant Fas<sup>60;61</sup>.

Il existe plusieurs récepteurs membres de la famille TNF. En plus des deux récepteurs TNFR (TNFR1 et TNFR2) et Fas, il y'a d'autres récepteurs trouvés chez les lymphocytes T, le récepteur pour la lymphotoxine- $\beta$ , et le récepteur NGF (p75), CD40, CD27, et CD30 (Nagata et Golstein, 1995). Cette famille s'élargit toujours et trois nouveaux membres ont été récemment identifiés. Il y a le « human DR3 » (Death receptor 3), le human HVEM (herpes virus early mediator) and chicken CAR1 (cytopathicavian leukosis-sarcoma virus receptor). Leurs ligands correspondants sont des protéines transmembranaires. Ceci suggère une interaction intercellulaire dans laquelle, un ligand d'une cellule peut aller se fixer sur le récepteur à la surface d'une autre cellule et ainsi y induit la mort cellulaire.

Parmi les récepteurs de la famille TNF, Fas et TNFR sont tous les deux impliqués dans l'apoptose. TNF peut exister sous forme protéine soluble clivée et dans ce cas ci, il agit comme un facteur de croissance soluble surtout produit chez les macrophages. TNF est un facteur pléiotropique qui signale plusieurs réponses cellulaires dont la cytotoxicité. TNF induit l'apoptose et déclenche des signaux intracellulaires qui active la transcription du facteur nucléaire « nuclear factor kB » (NF- $\kappa$ B)<sup>61</sup>.

Des études ont démontré la présence d'une région extra-cellulaire conservée (20-25%) au niveau C-terminal, chez les membres de la famille TNF. Cette région a été appelé « Death domain ».

Pour qu'il y ait apoptose, FasL doit induire une trimérisation du récepteur Fas. Une fois Fas trimérisé, ceci active sa région cytoplasmique, ainsi FADD (Fas-associating protein with death domain) ou MORT1 se fixe à cette région de Fas via une interaction avec leur death domain au niveau C-terminal. Au niveau N-terminal de FADD/MORT1, il y'a une région appelée DED (death effector domain) qui est responsable du recrutement de la caspase-8. Le niveau C-terminal de la caspase-8 appartient à la famille ICE, plus spécifiquement à la sous-famille caspase-3. La caspase-8 clive le domaine des protéases, et ainsi la cascade des caspases se déclenche et induit les changements morphologiques de la cellule et du noyau et dégradation de l'ADN chromosomique<sup>61</sup>.

#### **4- Projet de maîtrise**

Les neutrophiles sont les premières cellules à migrer aux sites de l'inflammation. Leurs principales fonctions se manifestent par la phagocytose de bactéries et de virus<sup>62</sup>, la production d'enzymes dégradantes et l'initiation de la réponse immunitaire spécifique via la production de cytokines. Les neutrophiles vont également synthétiser des facteurs de chimiotactisme en vue de recruter d'autres cellules.

Il y a 1,6 milliards de PMN par Kg par jour produits chez un adulte, cependant un nombre équivalant de cellules doit mourir dans le but de maintenir un nombre constant de cellules<sup>63</sup>. La demi-vie des neutrophiles

adultes dans la circulation périphérique est de 6 à 20 heures, par contre , dans des sites inflammatoires, l'apoptose et la clairance des neutrophiles sont retardées et ces derniers peuvent survivre au-delà de 48 heures. Ceci suggère la présence de certains facteurs dans l'environnement inflammé qui modulent le taux d'apoptose, tel qu'a été démontré dans des études *in vitro* lors du retardement de l'apoptose dû à l'exposition des neutrophiles aux lipopolysaccharides, C5a and GM-CSF<sup>64;65</sup>. Ceci mène à une prolongation de la vie des neutrophiles dans le but d'éliminer les microorganismes pathogènes.

Les neutrophiles humains sont des cellules différenciées qui subissent spontanément l'apoptose. En culture cellulaire, les neutrophiles peuvent survivre environ 72 heures. Dans la littérature, il a été rapporté que les neutrophiles subissent l'apoptose par l'interaction de Fas et Fas ligand<sup>66;67</sup>.

La littérature est pleine d'exemples de défenses altérées du nouveau-né<sup>39;68</sup>. Il a été démontré que les neutrophiles immatures des nouveau-nés ont un faible chimiotactisme et une faible habilité à la phagocytose. L'apoptose représente un mécanisme de contrôle de longévité fonctionnelle des neutrophiles et ainsi module leur participation dans le contrôle des infections. Donc, une balance entre les stimuli pro-apoptotiques et anti-apoptotiques représente un point critique dans le contrôle des infections virales.

Des études antérieures ont rapporté que les infections virales induisent l'apoptose des neutrophiles adultes. Ceci inclut EBV, un membre de la famille des *herpesviridae*<sup>69</sup>, le virus de l'influenza A<sup>70</sup>, et le virus respiratoire syncytial (RSV)<sup>71</sup>. Donc, si le taux d'apoptose des neutrophiles suite à une infection virale augmente, la réponse

immunitaire médiée par les neutrophiles serait altérée et il s'en suit une invasion du système immunitaire. A date il n'y a pas eu d'études faites démontrant l'effet de l'infection à HSV-1 dans la progression de l'apoptose des neutrophiles et encore moins chez les nouveau-nés.

Le but de notre étude est de déterminer si les neutrophiles des nouveau-nés sont plus susceptibles à l'induction de l'apoptose que ceux des adultes suite à l'infection à l'HSV-1. Cette étude va permettre de donner une idée générale concernant la réponse immunitaire du nouveau-né par rapport à celle de l'adulte suite à une infection virale, et permettra également de mieux définir l'immunobiologie de l'infection des neutrophiles néonataux et adultes par l'HSV.

**II. ARTICLE**



J'ai personnellement contribué à la réalisation de l'ensemble des travaux et résultats présentés dans ce mémoire.

Le docteur Baruch Toledano et le docteur José Menezes ont contribué à la réalisation de ce travail grâce à leur soutien financier et la qualité de leur encadrement.

Le docteur François Proulx a participé aux analyses statistiques.

**Induction of Apoptosis by Herpes Simplex Virus-1 in  
Neonatal, but not Adult Neutrophils.**

Jamila Ennaciri, José Menezes, François Proulx and Baruch Toledano

Sainte Justine Hospital  
Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine,  
Université de Montréal  
Montreal, Quebec, H3C 3J7

Corresponding Address: Baruch Toledano

Sainte-Justine Hospital Room 7924b

3175 Cote Sainte-Catherine Road

Montreal, Canada H3T 1C5

Telephone: 514- 345-4675

FAX: 514-345-4822

E-mail: [baruch\\_toledano@SSSS.gouv.qc.ca](mailto:baruch_toledano@SSSS.gouv.qc.ca)

## ABSTRACT

Neutrophils are known to play a role in innate defences against infectious agents. The responses from neonatal neutrophils to viruses are not well understood. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is the most common cause of fatal sporadic viral encephalitis in North America with a mortality of 50-60%.

Studies have shown that viruses such as the Epstein-Barr, influenza A and respiratory syncytial virus can induce apoptosis in adult neutrophils. There have been no studies to assess the effects of HSV infection on neutrophils. Here we report a comparative study on the effect of HSV on apoptosis of neutrophil from both adults and neonates.

Neutrophils were cultured in the presence or absence of HSV-1 and treated with fluorescent annexin V staining 20 hours post-infection to measure apoptosis by flow cytometry. HSV-1 induced apoptosis in neonatal neutrophils, i.e.  $24.1\% \pm 8.6$  of cells were apoptotic as compared to  $7.2\% \pm 3.4$  in non-infected cells. HSV-1 had no such effect on adult neutrophils. Using monoclonal antibodies to Fas and FasL, we also found that HSV-1 increased the expression of both Fas and FasL by 2.7 and 2.1 times, respectively, in neonatal neutrophils as compared to uninfected controls. Further, using a ELISA essay, we also found an increased release of soluble FasL from HSV-1 infected neonatal, but not adult, neutrophils (from  $352 \pm 475$  pg/ml to  $2600 \pm 552$  pg/ml).

Increased neonatal neutrophil apoptosis following HSV-1 infection may represent an important mechanism by which HSV-1 may affect the anti-

viral response of neonatal neutrophils and could explain, at least in part, the severe infections that are caused in newborns by this herpesvirus.

## INTRODUCTION

Host defences against viral infections involve both non-specific and specific immune responses. The effector cells in non-specific immune response are mainly macrophages, neutrophils and natural killer cells<sup>33</sup>. The widespread presence of neutrophils may suggest that they are the initial leukocytes implicated in host defence against invading pathogens. The anti-microbial response of neutrophils involves the phagocytosis of microbial agents<sup>72</sup>, the production of degradative enzymes and oxygen free-radicals as well as the synthesis of immunoactivating proteins that initiate the mechanisms of the specific immune response<sup>5;43;73</sup>. However, the effects of viral infections on neutrophils have been poorly elucidated.

Neutrophils are terminally differentiated cells that spontaneously undergo apoptosis<sup>67</sup>. Apoptosis represents a mechanism of controlling the functional longevity of neutrophils in tissues and therefore affects their participation in the control of infections. Neonatal neutrophils have been demonstrated to have decreased chemotaxis, functional abnormality and diminished phagocytic abilities<sup>39</sup>.

Herpes simplex virus (HSV) is the most common cause of fatal sporadic viral encephalitis in North America<sup>74</sup>. For HSV infection with disseminated sepsis, mortality rates are 50-60% with only 60% of survivors having a normal neurologic outcome after one year<sup>34,75</sup>. Host response in newborns with HSV infection are different than in adults and are reflected in the increased morbidity and mortality associated with this infection in newborns<sup>76</sup>. The transplacental transfer of antibodies

does not seem to affect the outcome as it relates to HSV infection<sup>37</sup>. There are no data evaluating the effect of HSV-1 infection on neutrophil apoptosis.<sup>77-80</sup> Based on studies indicating a developmental immaturity of cord blood PMN<sup>68;81</sup>, we studied the effects of HSV-1 infection on the progression of neutrophil apoptosis and assessed whether this progression differs between neonatal and adult neutrophils.

One candidate for a molecular trigger of apoptosis in neutrophils is the Fas receptor. Fas protein is expressed on neutrophil's plasma membrane, and when it binds to Fas ligand (FasL) which is also constitutively expressed on neutrophils, this interaction leads to apoptosis in neutrophils<sup>66;67</sup>. Also neutrophils constitutively release soluble form of FasL<sup>67</sup>, thus providing a paracrine pathway for the neutrophils to mediate its own programmed cell death. We therefore, evaluated the expression of Fas and FasL by HSV-1 infected neutrophils and measured the release of soluble Fas ligand (sFasL).

## MATERIALS AND METHODS

*Neutrophils isolation.* Umbilical venous blood samples were obtained from the fetal side of placentas of healthy, full term neonates within five minutes of birth in the obstetrical unit of Sainte-Justine Hospital and venous blood was collected from healthy adult volunteers. Neutrophils were isolated using two gradients of percoll (SIGMA, St Louis, MO, USA) 62% and 76%<sup>82</sup>. The PMN were washed three times with PBS (Phosphate Buffered Saline) and resuspended in Iscove's Modified Dulbecco's Medium IMDM (SIGMA, St Louis, MO, USA) with 1% of heat-inactivated autologous plasma. The purity of all neutrophil preparations used was evaluated by cell analyser (Technicon H 3 RTX, Bayer's, NY, USA) and was greater than 90%.

*Virus preparation and neutrophil infection.* HSV-1 was produced in VERO cells. When the cytopathic effect in infected cells reached 70%, cell-free culture supernatants were obtained. The pellet was frozen and thawed 3 times, centrifuged five minutes at 2000 rpm and the resulting supernatant was added to the first one. All the supernatants were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  pore size filter. Viral particles were harvested by differential ultracentrifugation. Virus stocks were resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (GIBCO BRL, Grand Island, NY) aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Viral titre was measured by cytopathic effect using the Reed-Muench method<sup>83</sup>; the titre was evaluated at  $10^9/\text{ml}$ . The mock control was prepared from uninfected VERO culture supernatant, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Neutrophils were incubated in the presence or absence of HSV-1 in a 5 ml

polystyrene round-bottom tube (Falcon 352058, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) for 20h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

*Detection of HSV-1 protein in infected neutrophils.* Neonatal and adult neutrophils were incubated in the presence or absence of HSV-1 for 20h. The Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (Pharmingen, San Diego, CA) treatment was used in order to permeabilize and fix neutrophils membrane. Cells were then stained with monoclonal antibody to cytoplasmic protein specific for HSV-1 (Clone H62, Medicorp, Montreal, Qc, Canada) directly labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) for 30 min at 4°C. Negative control staining was revealed using FITC-conjugated murine IgG1. The staining was performed for 30 minutes at 4°C in the dark, cells were washed with Perm wash (Cytotfix/Cytoperm plus Kit) twice, then they were resuspended in staining buffer and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. The neutrophils were then analysed by flow cytometry. In addition, immunofluorescence was used to detect HSV-1 in neutrophils. After their incubation with or without HSV-1 for 20h, the cells were washed three times by PBS, dried and fixed with cold acetone/methanol, then, stained with the same MoAb anti HSV-1 for 1h at 37°C, washed with PBS 4 times and fixed on slide and visualised by fluorescence microscopy.

*Analysis of apoptotic cells by flow cytometry.* After HSV-1 treatment, we identified normal, apoptotic, and necrotic cells based on their propidium iodide (PI) and annexin-V staining (Annexin-V- Fluos Staining Kit, Boehringer Mannheim GmbH, Germany). 10<sup>6</sup> cells were washed twice with PBS, resuspended in 100 µl of staining solution



(predilute 2  $\mu$ l Annexin-V-fluorescein labeling reagent in 100  $\mu$ l HEPES buffer and add 2  $\mu$ l PI) and incubated for 10-15 min at 15 to 20°C. The cells were then analysed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada). Analysis was performed from samples of 10,000 cells. The neutrophils were gated using forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) in order to only consider a homogenous population of neutrophils within our samples.

*Detection of Fas and Fas L expression.* Cell surface expression of Fas and FasL was assayed by flow cytometry using 20  $\mu$ l of murine MoAbs anti-human Fas (IgG1, clone UB2, MBL, CO., LTD, Nagoya, Japan) directly labeled with FITC and 4  $\mu$ l of anti-human FasL NOK-1 (Pharmingen, Mississauga, ON, Canada) for primary staining and revealed with 4  $\mu$ l of FITC-conjugate purified goat anti-mouse IgG (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) for secondary staining. Negative control staining was revealed using 4  $\mu$ l of murine IgG 1 (Pharmingen, Mississauga, ON, Canada). Cells were stained with specific antibodies for 45 minutes at 4°C in the dark, washed with PBS containing 0.1% of sodium azide twice, and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS before flow cytometry analysis. Analysis was performed on 10,000 cells per sample.

*Detection of soluble FasL.* Cell-free supernatants from untreated and HSV-1 treated neonatal and adults neutrophils were obtained after 20 h post infection and tested for the release of soluble FasL using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan). The assay uses anti FasL monoclonal antibodies against

two different epitopes. 100  $\mu$ l of free supernatant were used to reveal the release of soluble FasL. The optical density of each well is measured at 450 nm using a microplate reader (TECAN. SPECTRA, Austria). The concentration of soluble FasL is calibrated from a dose response curve based on reference standards.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad InStat and Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). The difference between HSV-1 infected neutrophils and uninfected control neutrophils was evaluated using Student's paired *t*-test. The study was approved by the Institution Review Board at Sainte Justine Hospital.

## RESULTS

*HSV-1 infection of neutrophils.* We demonstrated the presence of HSV-1 in neutrophils by intracellular immunofluorescence (Figure 1A). Expression of HSV-1 cytoplasmic protein in neutrophils indicated that viral proteins are present in neutrophils. In HSV-1 infected neonatal neutrophils there is marked expression of cells staining for the HSV-1 protein. The presence of HSV-1 staining in the uninfected cells is consistent with non specific staining as it was similar to IgG isotype control staining. We also analyzed the presence of HSV-1 protein in infected cells as compared to control cells by flow cytometry (Figure 1B). There were  $8\% \pm 3$  of infected neutrophils that stained for HSV-1 protein as opposed to the background staining of  $3\% \pm 1$  in the control neutrophils ( $p < 0.009$ ). Similar evidence of neutrophil infection was demonstrated in adult neutrophils ( $5.7\% \pm 10$  to  $3.75\% \pm 4.45$ ,  $p < 0.0007$ ).

*HSV-1 induces apoptosis in neonatal neutrophils.* HSV-1 infection of neonatal neutrophils resulted in a significant increase in the percentage of apoptotic neutrophils (Figure 2A). This effect was contrasted to the effect of HSV-1 infection on adult neutrophils which showed no alteration in their rate of apoptosis (Figure 2B). HSV-1 increased the percentage of apoptosis in infected neonatal neutrophils as compared to control neutrophils;  $24\% \pm 8.6$  vs.  $7.2\% \pm 3.4$  ( $p < 0.0007$ ) (Figure 3A). In adults, HSV-1 infected neutrophils did not show an increase in the percentage of apoptosis as compared to control neutrophils;  $5.7\% \pm 2.2$

versus  $5.4\% \pm 2.4$  (Figure 3B). Mock infection from VERO cells did not increase apoptosis in neonatal neutrophils. In addition, 6 hours post infection treatment of HSV-1 infected neonatal neutrophils, no increase in their rate of apoptosis as compared to controls was noted ( $6.82\% \pm 3.35$  to  $4.86\% \pm 2.83$ ). Pre-incubation of HSV-1 infected neonatal neutrophils with 3  $\mu\text{g}$  of Acyclovir (ACV) blocked the increase in neonatal neutrophil apoptosis.

Treatment of neonatal neutrophils by inactivated viruses did not increase apoptosis in neonatal neutrophils as compared to neutrophils treated with infectious HSV-1. Furthermore, infection of neonatal neutrophils by HSV-1 at low infectious titre ( $10^3/\text{ml}$ ) did not induce neutrophil apoptosis as compared to neutrophils treated with HSV-1 at high infectious titre ( $10^9/\text{ml}$ ) respectively ( $3.0\% \pm 0.1$  to  $24.1\% \pm 8.6$ ,  $p < .001$ ).

*Fas expression increases in HSV+ neonatal neutrophils.* In neonatal neutrophils, the expression of Fas increased in HSV-1 infected cells as compared to non infected cells (Figure 4A, B). There was no significant difference in Fas expression between infected and non infected adult neutrophils. Fas receptor expression which is constitutively expressed on neutrophils<sup>67</sup> increased by a factor of  $270\% \pm 108$  of control in neutrophils with HSV-1 ( $p < 0.03$ ).

*FasL expression increases in HSV + neonatal neutrophils.* In neonatal neutrophils, the expression of FasL increased in HSV-1 infected cells as compared to non infected cells (Figure 5A,B). In adult neutrophils, no

significant difference was shown between infected and non-infected neutrophils. FasL, which is also expressed constitutively on neutrophils<sup>67</sup> increased by a factor of  $212\% \pm 74$  of control in neonatal neutrophils infected with HSV-1 ( $p < .007$ ).

*The release of soluble FasL increases in neonatal neutrophils.* Associated with an increase in surface expression of Fas and FasL there was an increase in the release of soluble FasL. In infected neutrophils soluble FasL could induce apoptosis via Fas receptor ligation in adjoining neutrophils. There was an increase in soluble FasL from  $2600 \pm 552$  pg/l in infected cells as opposed to  $352 \pm 475$  pg/ml in control neutrophils (Figure 6).

## DISCUSSION

It is well established that there are distinct differences between infants' and adults' immune functions. These variations are likely due to a combination of factors, deficiencies of antibody, macrophages, and T lymphocytes<sup>33</sup>. Deficiency in neutrophils function appears to be a major host defence abnormality in the neonate<sup>37;39;77;80</sup>. In the case of virus-infected cells, apoptosis represents an efficient mechanism by which the virus can induce cell death and disseminate progeny while limiting induction of inflammatory and immune responses. The presence of progeny virions in membrane bound bodies also protects them from contact with neutralizing antibodies.

To demonstrate neutrophil infection by HSV-1, we used monoclonal antibody to anti- cytoplasmic protein specific to HSV-1; we thus showed the presence of viral protein in infected neutrophils. We have demonstrated that HSV-1 infects human neutrophils and increases the incidence of neonatal neutrophils apoptosis as opposed to adult neutrophils. Heparan sulfate has been described as a major factor in binding of HSV to the epithelial cell surface<sup>31;32</sup>. The percentage of infected cells was low, and this may be due to different neutrophil populations, or that the heparan sulfate receptor of HSV-1 is low on the surface of neutrophils.

The rate of apoptosis in neonatal neutrophils depends on several factors.

a) First of all, the infectious titre of the virus : the higher virus titre, the higher increases in apoptosis. b) Competition between some non

infectious viral particles and infectious particles: infection of neutrophils by high and low titred virus or inactivated virus, did not induce the apoptosis in neonatal neutrophils. This suggests that, non-infectious viral particles may compete with infectious particles. In addition, in order to induce apoptosis, the virus should have a minimum infectious dose ( $IDTC_{50} = 10^7/ml$  minimum), and should penetrate and replicate in neutrophils. Inactivated virus preparation did not induce apoptosis in neonatal neutrophils; this was demonstrated by acyclovir. In fact, the penetration of virus into the cell was necessary but not sufficient to induce apoptosis.

Cell analysis at different post-infection periods indicated that the percentage of apoptotic cells increased from 20 hours post-infection. This may suggest that apoptosis of neonatal neurophils depends on virus replication, and may be on the expression of viral  $\beta$ - or  $\gamma$ -genes. Treatment of neonatal HSV-1 infected neutrophils by acyclovir (ACV) resulted in reduced apoptosis in these cells; this implies that the replication of the virus is necessary for the increase of apoptosis.

Fas and FasL system represent an important cellular pathway to mediate the apoptosis in a large variety of cells and tissues<sup>60;61</sup>. Fas is constitutively expressed on human neutrophils, monocytes, a fraction of lymphocytes and eosinophils<sup>84-86</sup>. FasL expression is restricted to neutrophils<sup>67</sup>. This coexpression of Fas and FasL in neutrophils suggests a mechanism by which neutrophils regulate their apoptosis and their turnover after exerting their function in the immune system. Immunofluorescence analysis showed that Fas and FasL expression

increases in neonatal neutrophils infected by HSV-1; this indicates that HSV-1-induced apoptosis in neutrophils may be regulated via Fas and FasL pathway. Soluble FasL in infected neonatal neutrophils was also increased, suggesting that apoptosis of the neutrophils may also be mediated in a paracrine pathway following viral infection.

Given the size and complexity of HSV-1 genome, further studies are required to identify the expressed genes in this infection, and genes responsible of the increase in apoptosis. Moreover, these studies may help determine the pathogenesis of severe HSV-1 infection in neonates.



## References

1. Whitley R,J. 1996. Hepes Simplex Viruses. In *Fields Virology*. e. al. Fields BN, ed. Philadelphia, pp. 2297-2342.
2. Roberts, R. L., B. J. Ank, and E. R. Stiehm. 1994. Antiviral properties of neonatal and adult human neutrophils. *Pediatric Research* 36:792-798.
3. Cassatella, M. A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. [Review] [63 refs]. *Immunology Today* 16:21-26.
4. Lloyd, A. R. and J. J. Oppenheim. 1992. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. [Review] [38 refs]. *Immunology Today* 13:169-172.
5. Zhang, P., W. R. Summer, G. J. Bagby, and S. Nelson. 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. [Review] [157 refs]. *Immunological Reviews* 173:39-51.
6. Whitley, R., A. Arvin, C. Prober, S. Burchett, L. Corey, D. Powell, S. Plotkin, S. Starr, C. Alford, and J. Connor. 1991. A controlled trial comparing vidarabine with acyclovir in neonatal herpes simplex virus infection. Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *New England Journal of Medicine* 324:444-449.

7. Whitley, R., A. Arvin, C. Prober, L. Corey, S. Burchett, S. Plotkin, S. Starr, R. Jacobs, D. Powell, and A. Nahmias. 1991. Predictors of morbidity and mortality in neonates with herpes simplex virus infections. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *New England Journal of Medicine* 324:450-454.
8. Brown, Z. A., J. Benedetti, R. Ashley, S. Burchett, S. Selke, S. Berry, L. A. Vontver, and L. Corey. 1991. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor [see comments]. *New England Journal of Medicine* 324:1247-1252.
9. Whitley, R. J., L. Corey, A. Arvin, F. D. Lakeman, C. V. Sumaya, P. F. Wright, L. M. Dunkle, R. W. Steele, S. J. Soong, and A. J. Nahmias. 1988. Changing presentation of herpes simplex virus infection in neonates. *Journal of Infectious Diseases* 158:109-116.
10. Sullender, W. M., J. L. Miller, L. L. Yasukawa, J. S. Bradley, Black, SB, A. S. Yeager, and A. M. Arvin. 1987. Humoral and cell-mediated immunity in neonates with herpes simplex virus infection [published erratum appears in J Infect Dis 1987 Apr;155(4):838]. *Journal of Infectious Diseases* 155:28-37.
11. Liles, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, Klebanoff, and SJ. 1996. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 184:429-440.

12. Hill, H. R. 1985. Host defenses in the neonate: prospects for enhancement. [Review] [81 refs]. *Seminars in Perinatology* 9:2-11.
13. Hill, H. R. 1987. Biochemical, structural, and functional abnormalities of polymorphonuclear leukocytes in the neonate. [Review] [116 refs]. *Pediatric Research* 22:375-382.
14. Johnston, R. B., Jr. 1998. Function and cell biology of neutrophils and mononuclear phagocytes in the newborn infant. [Review] [90 refs]. *Vaccine* 16:1363-1368.
15. Wilson, C. B. 1986. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. [Review] [118 refs]. *Journal of Pediatrics* 108:1-12.
16. Sacchi, F., N. H. Augustine, M. M. Coello, E. Z. Morris, and H. R. Hill. 1987. Abnormality in actin polymerization associated with defective chemotaxis in neutrophils from neonates. *International Archives of Allergy & Applied Immunology* 84:32-39.
17. Bortolussi, R., S. Howlett, K. Rajaraman, and S. Halperin. 1993. Deficient priming activity of newborn cord blood-derived polymorphonuclear neutrophilic granulocytes with lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha triggered with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Pediatric Research* 34:243-248.
18. Koenig, J. M., J. Simon, D. C. Anderson, E. Smith, and C. W. Smith. 1996. Diminished soluble and total cellular L-selectin in

cord blood is associated with its impaired shedding from activated neutrophils. *Pediatric Research* 39:616-621.

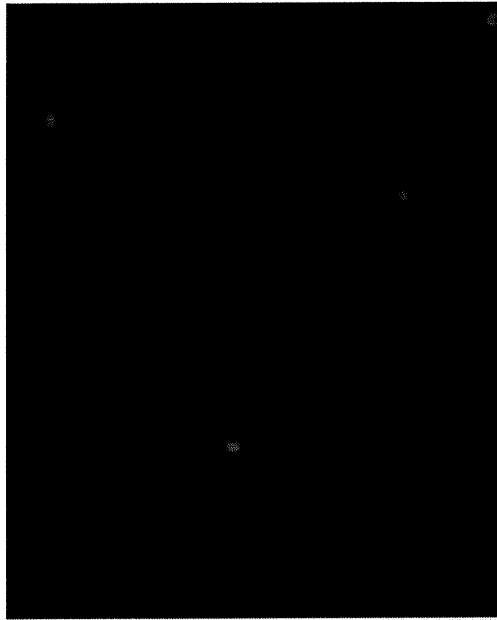
19. Allgaier, B., M. Shi, D. Luo, and J. M. Koenig. 1998. Spontaneous and Fas-mediated apoptosis are diminished in umbilical cord blood neutrophils compared with adult neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 64:331-336.
20. Giudicelli, J., P. J. Philip, P. Delque, and P. Sudaka. 1982. A single-step centrifugation method for separation of granulocytes and mononuclear cells from blood using discontinuous density gradient of Percoll. *Journal of Immunological Methods* 54:43-46.
21. Shieh, M. T., D. WuDunn, R. I. Montgomery, J. D. Esko, and P. G. Spear. 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Cell Biology* 116:1273-1281.
22. WuDunn, D. and P. G. Spear. 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *Journal of Virology* 63:52-58.
23. Nagata, S. and P. Golstein. 1995. The Fas death factor. [Review] [98 refs]. *Science* 267:1449-1456.
24. Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. [Review] [85 refs]. *Cell* 88:355-365.
25. Iwai, K., T. Miyawaki, T. Takizawa, A. Konno, K. Ohta, Yachie, A., H. Seki, and N. Taniguchi. 1994. Differential expression of bcl-2

and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* 84:1201-1208.

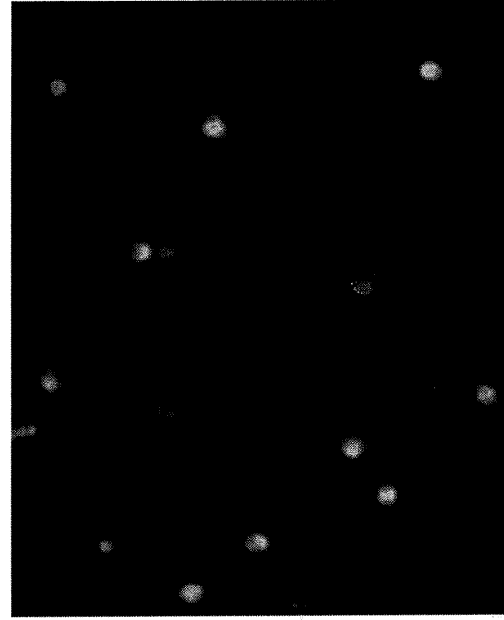
26. Matsumoto, K., R. P. Schleimer, H. Saito, Y. Iikura, Bochner, and BS. 1995. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro. *Blood* 86:1437-1443.
27. Cohen, J. J. 1991. Programmed cell death in the immune system. [Review] [159 refs]. *Advances in Immunology* 50:55-85.

Figure 1

A

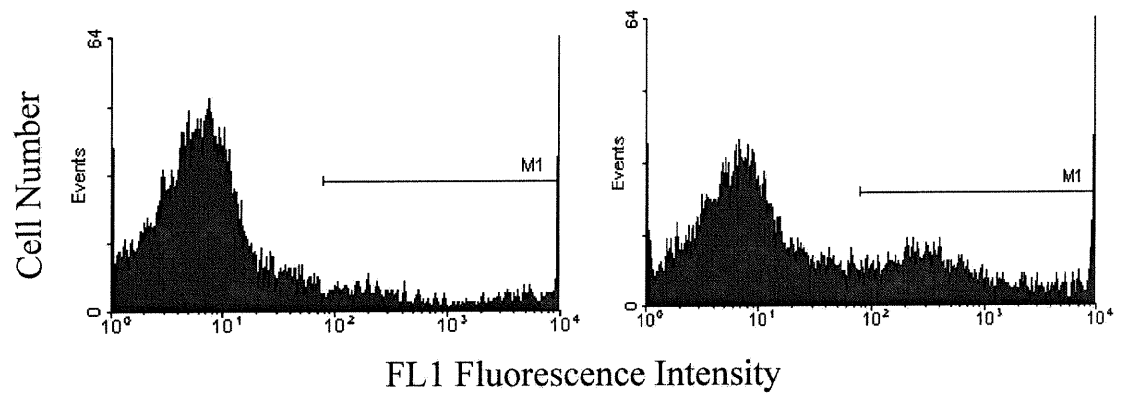


Neonatal Neutrophils Control



Neonatal Neutrophils HSV+

B



FL1 Fluorescence Intensity

Figure 2

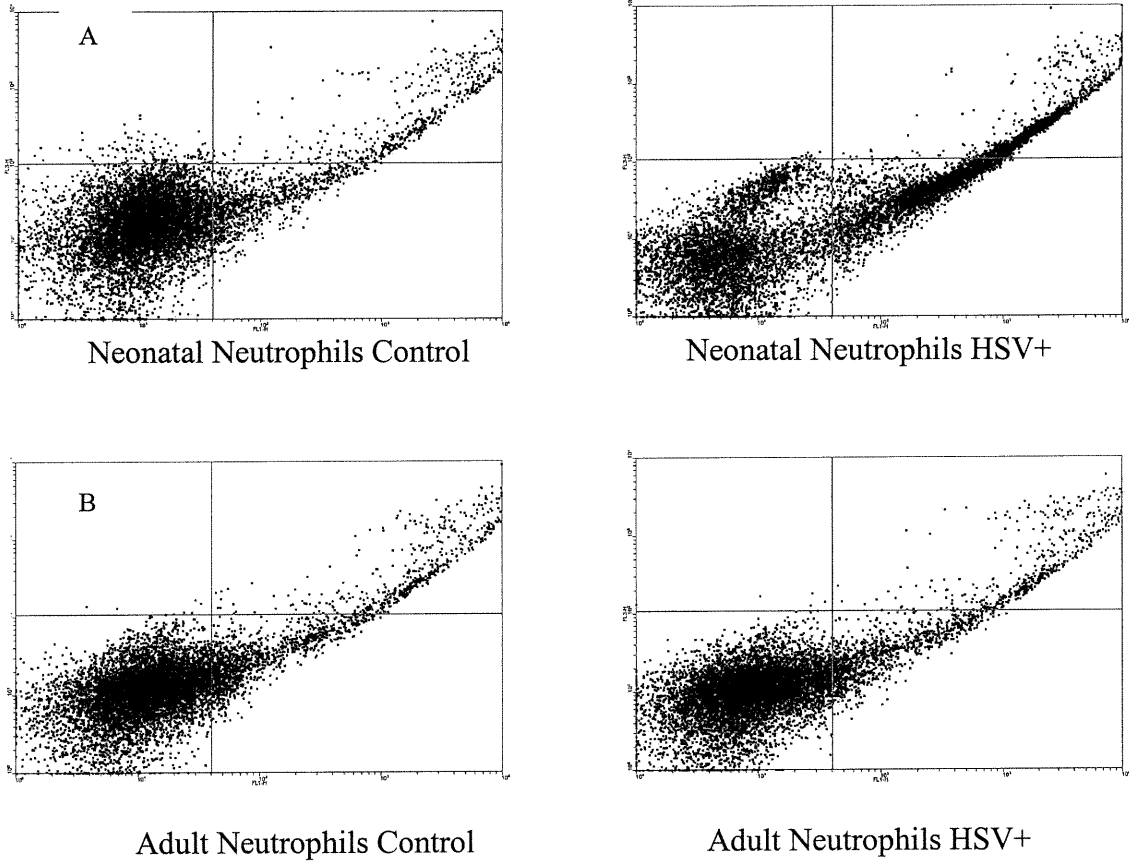
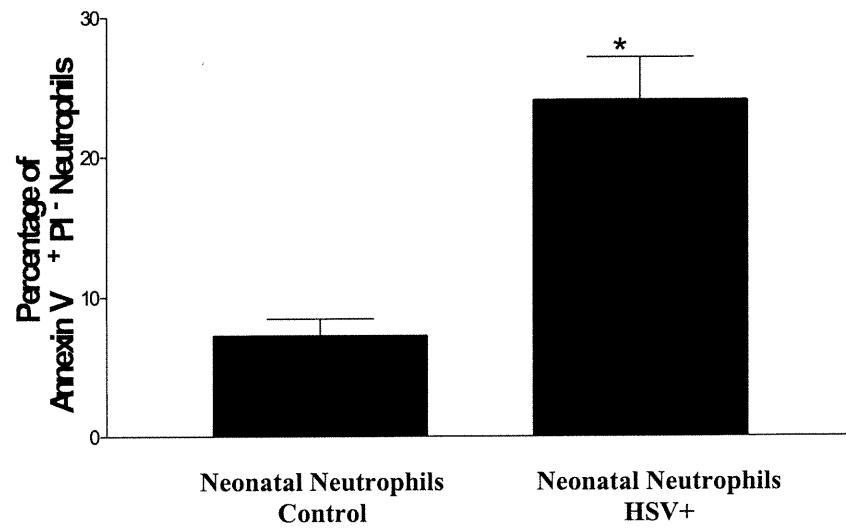
**Annexin V Labeling**

Figure 3

A



B

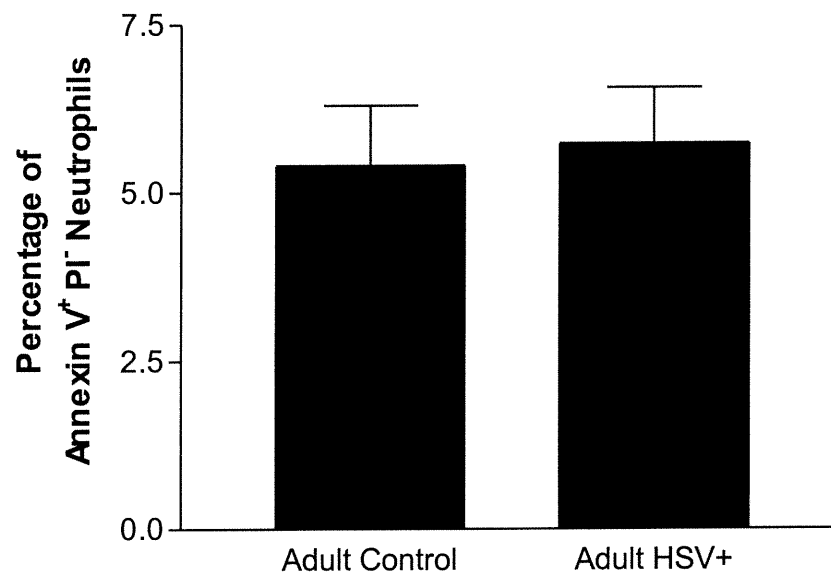
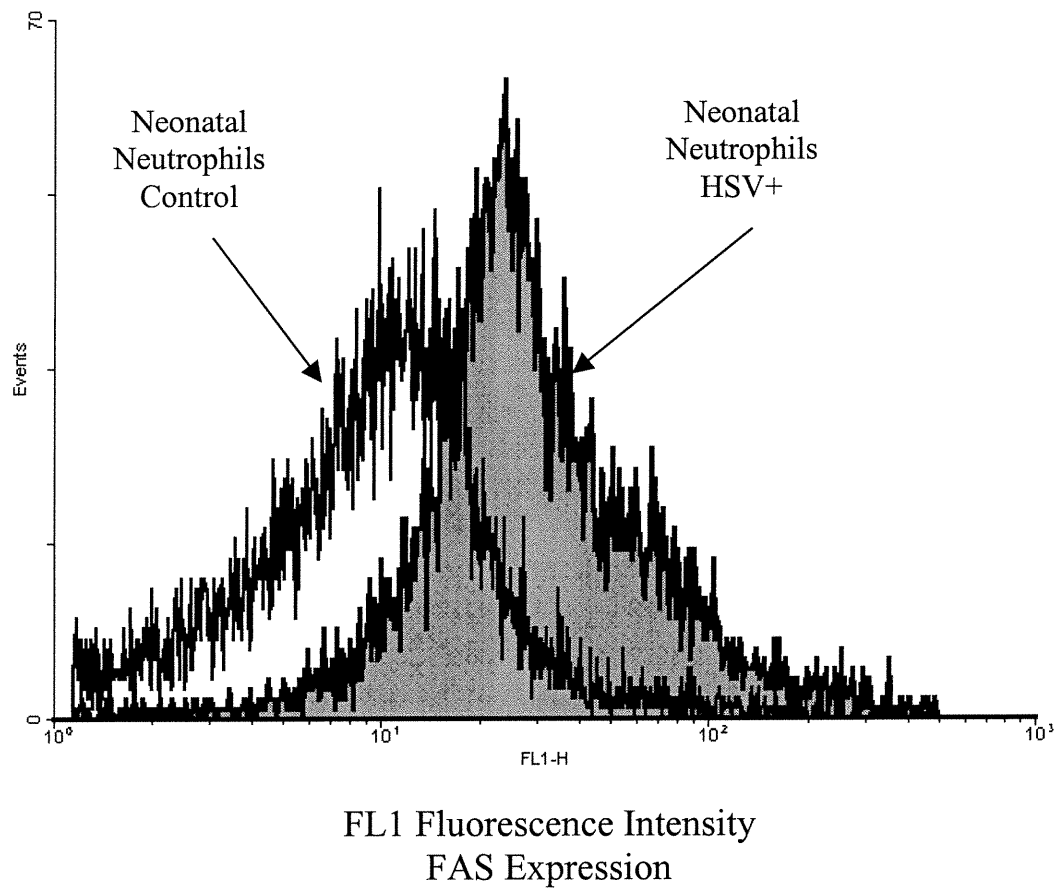


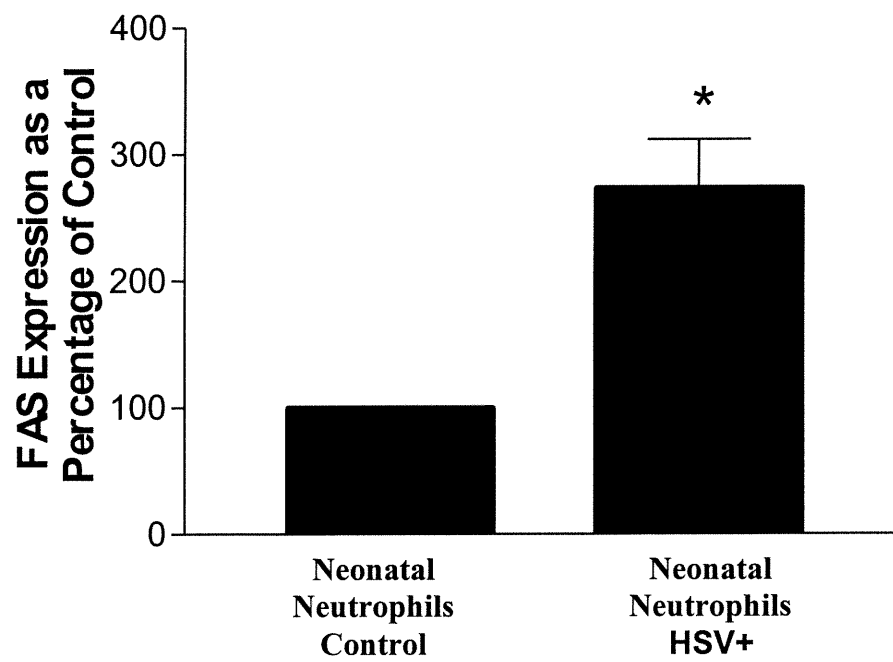


Figure 4

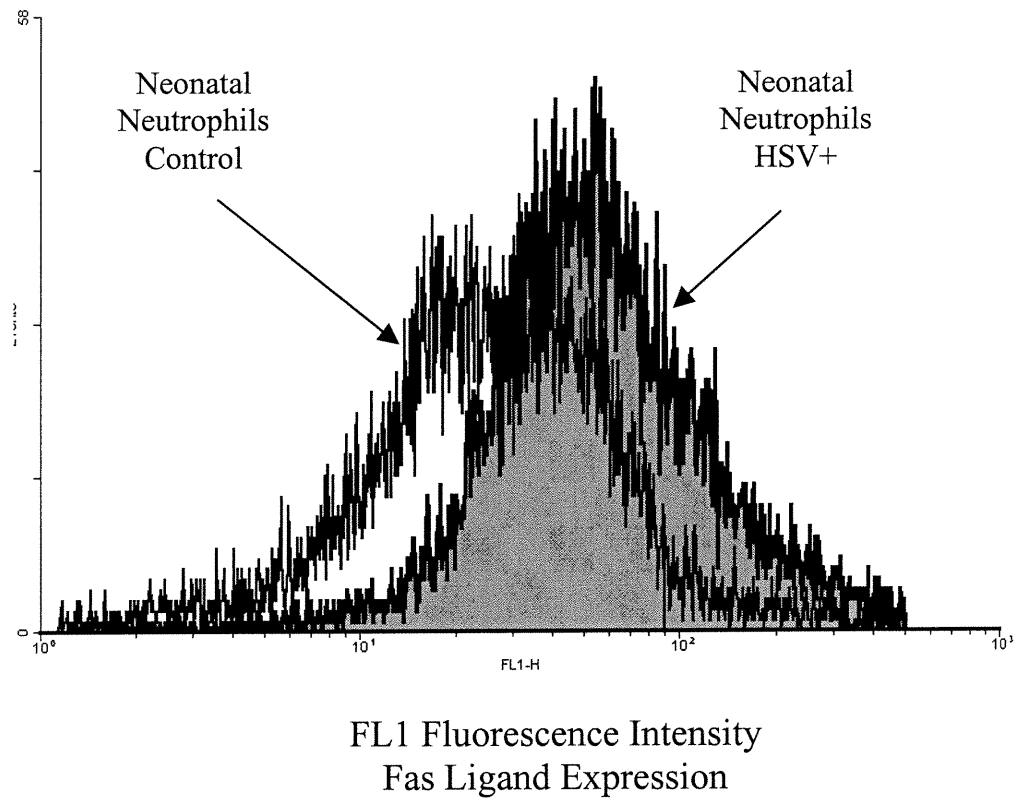
A



B



**Figure 5**  
**A**



**B**

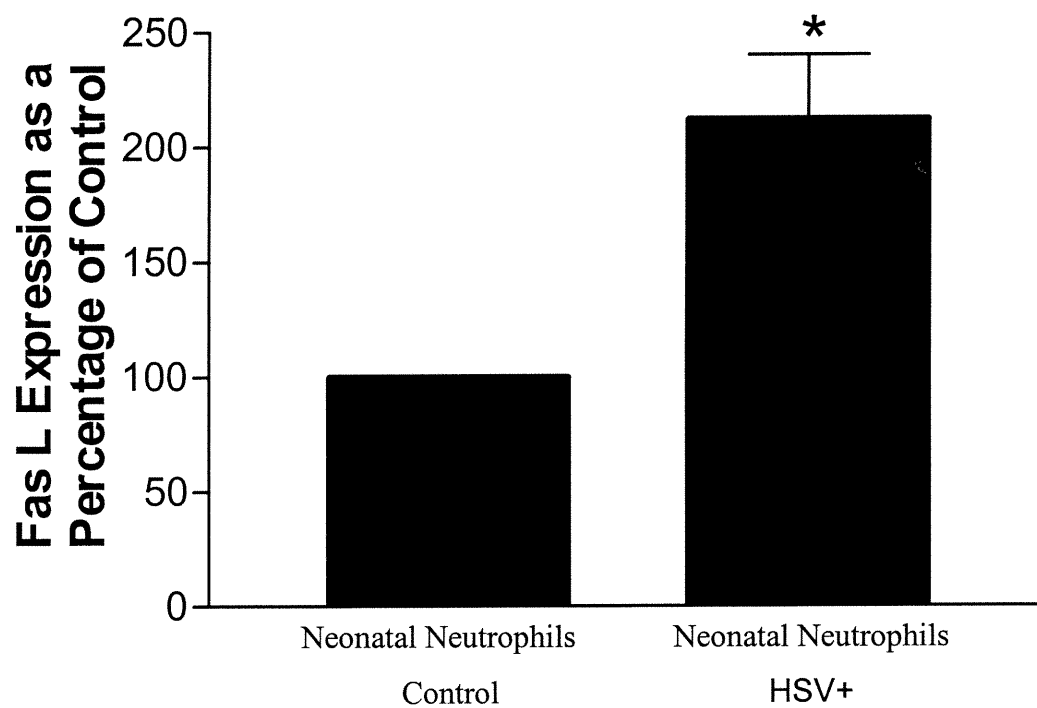
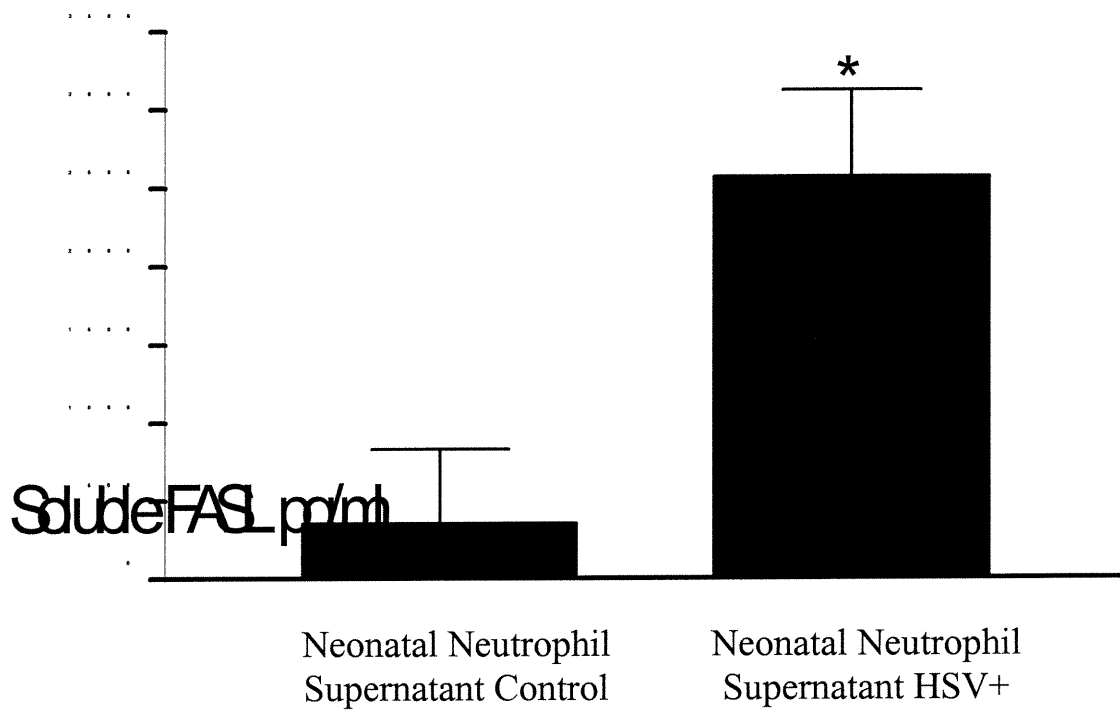


Figure 6



## Figure Legends

**Figure 1.** HSV infection of human neutrophils. **Figure 1A.** The presence of HSV protein in neutrophils was demonstrated using monoclonal antibody against specific cytoplasmic protein to HSV-1, and detected by immunofluorescence. The staining seen in the uninfected neutrophil was consistent with non specific binding as it was identical to the IgG isotype control staining. **Figure 1B.** The presence of HSV-1 cytoplasmic protein in neutrophils was measured by flow cytometry. M1 represents the neutrophils containing HSV-1 protein. ( $8\% \pm 3$  versus  $3\% \pm 1$ ,  $p < 0.0007$ )

**Figure 2.** Effect of HSV-1 on neutrophil apoptosis. Representative profiles of results obtained by flow cytometric analysis of HSV-1 infected neutrophils from a newborn and adult. **Figure 2A.** There is an increase in the number of Annexin V positive PI negative neutrophils (lower right quadrant) in the HSV+ neonatal neutrophils as opposed to controls. **Figure 2B.** There is no increase of the percentage of apoptotic adult neutrophils between HSV-1 infected neutrophils and control neutrophils

**Figure 3.** **3A.** This graphical representation of the percentage of apoptotic neutrophils demonstrate a significant increase in apoptotic neonatal neutrophils post HSV infection as opposed to control neutrophils.  $24\% \pm 8.6\%$  vs.  $7.2\% \pm 3.3\%$  ( $n = 8$ ), respectively ( $p < 0.005$ ). **Figure 3B.** This graphical representation of the percentage of apoptotic neutrophils demonstrate no significant increase in apoptotic

adult neutrophils post HSV infection as opposed to control neutrophils.  $5.7\% \pm 2.2$  and  $5.4\% \pm 2.4\%$  ( $n = 8$ ), respectively

**Figure 4.** Effect of HSV-1 infection on Fas expression on neonatal neutrophils. **Figure 4A.** These results are representative of five independent experiments, and demonstrate cell surface expression of Fas in HSV-1 infected neonatal neutrophils. Fas expression was measured on HSV-1 infected neutrophils (dark surface) compared to uninfected neutrophils (light surface). **Figure 4B.** There is a  $270\% \pm 108$  increased expression of Fas in HSV-1 infected neutrophil as opposed to control ( $n = 5$ ,  $p < 0.03$ )

**Figure 5.** Effect of HSV-1 on Fas L expression on neonatal neutrophils. **Figure 5A.** This figure representative of five experiments, demonstrate the expression of FasL. FasL expression was measured on HSV-1 infected neutrophils (dark surface) as compared to control (light surface). **Figure 5B.** HSV-1 infected neonatal neutrophils show a  $212\% \pm 74$  increased expression as opposed to control ( $n = 5$ ,  $p < .007$ ).

**Figure 6.** HSV-1 increases release of soluble FasL by neonatal neutrophils in vitro ( $2600 \pm 552$  pg/ml in infected vs.  $352 \pm 475$  pg/ml in uninfected neutrophils.  $n = 7$ ,  $p < .005$ ).

### **III. DISCUSSION**

Il est clairement établi que les nouveau-nés sont plus susceptibles aux infections que les adultes<sup>39</sup>. Ceci est possiblement dû au fait que le système immunitaire du nouveau-né n'est pas entièrement développé comparativement à celui de l'adulte<sup>72;77;79;87;88</sup>. Ceci est dû à d'innombrables facteurs, plus spécifiquement à l'immaturation de certaines cellules du système immunitaire. Dans ce contexte, l'immaturation des neutrophiles représente un des facteurs majeurs. Plusieurs raisons le confirment. 1) les neutrophiles sont les premières cellules à s'impliquer dans certaines infections dont souffrent les enfants, exemple des infections dermiques à *Staphylococcus* et à *Candida*<sup>89</sup>. 2) L'incidence élevée des pneumonies à *Streptococcus B* chez les nouveau-nés<sup>90</sup>. Il y a peu de neutrophiles dans les alvéoles des nouveau-nés décédés de pneumonie à *Streptococcus B*<sup>91</sup>, alors que chez l'adulte, les neutrophiles sont les cellules prédominantes dans l'exudat inflammatoire des alvéoles d'adultes souffrant de cette maladie<sup>92</sup>. 3) Les infections systémiques chez les nouveau-nés sont souvent plus communes et plus sévères quand il s'agit d'une neutropénie<sup>93</sup>. Ces points montrent clairement que le dysfonctionnement des neutrophiles contribue grandement à la sévérité des infections chez les nouveau-nés.

Concernant les infections virales, les neutrophiles sont directement activés en absence d'anticorps<sup>94</sup>. Des études *in vitro* ont démontré que les neutrophiles adhèrent beaucoup plus aux cellules infectées par différents virus, incluant le virus herpes simplex et l'influenza<sup>42;95;96</sup>. Les virus peuvent aussi indirectement activer les neutrophiles en stimulant la libération des cytokines telle que l'IFN- $\gamma$  à partir des cellules

mononuclées<sup>97</sup>. Les virus, à leur tour, peuvent être inactivés par les radicaux oxygénés libérés par les neutrophiles.

Cependant, les virus peuvent aussi échapper au système immunitaire. Différents moyens sont utilisés. Parmi ceux-là, il y a l'inhibition d'expression de molécules des CMH. Des fois même, les virus ont des molécules qui ressemblent aux CMH de l'hôte; ainsi ils détournent le système immunitaire en modulant les signaux activant les cellules NK<sup>55;98</sup>. Tout dépend du virus, certains vont soit augmenter, soit supprimer l'apoptose<sup>56;98</sup> dans le but d'échapper au système immunitaire. Un autre moyen aussi utilisé par les virus c'est celui d'inhiber la synthèse des cytokines et d'éliminer le déclenchement de la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Encore pire, certains virus à ADN comme les herpesvirus et les poxvirus<sup>98-100</sup> vont coder pour des molécules qui ressemblent aux cytokines (virokines) ou aux récepteurs des cytokines (virorécepteurs), dans le but d'inhiber l'action des cytokines.<sup>98;100</sup>

Concernant l'herpès simplex 1, ce virus code pour des récepteurs du fragment Fc des anticorps, et ainsi inhibe l'activation des phagocytes et du complément dépendant de l'immunité par le fragment Fc<sup>98</sup>. En ce qui concerne l'apoptose, des études ont démontré que le gène  $\gamma_1$  34.5 de l'HSV-1 est essentiel pour une réplication efficace et pour une infection létale dans le cerveau du rongeur<sup>101</sup>. Ce gène n'est pas nécessaire pour la réplication virale en culture cellulaire. Cependant, il empêche l'arrêt de la synthèse protéique dans les cellules de neuroblastome humain où est associé avec une baisse d'apoptose<sup>102</sup>. Cette baisse d'apoptose des



neurones infectés par l'HSV-1 et la promotion de la neurovirulence pourrait servir de base dans la compréhension de l'encéphalite à HSV-1 chez l'humain.

Au fait, une des propriétés de l'apoptose est que les cellules apoptotiques maintiennent leur intégrité membranaire et ne déversent pas leur contenu dans le milieu extra-cellulaire. Elles sont phagocytées par les macrophages et ne provoquent pas d'inflammation. Donc, dans le cas des cellules infectées par un virus, l'apoptose qui normalement est considérée comme un mécanisme de défense immunitaire innée<sup>103</sup> représente un mécanisme efficace pour le virus, par lequel il va induire la mort de la cellule et libérer sa progéniture dans le milieu externe sans déclencher de l'inflammation et alerter le système immunitaire. Ainsi, il échappe à l'immunosurveillance.

Il y a beaucoup de virus qui augmentent ou induisent l'apoptose dans les cellules cibles pour échapper au système immunitaire. Parmi ceux-là, il y a le CAV (chicken anemia virus) qui induit l'apoptose dans les cellules qu'il infecte<sup>104;105</sup>, les Adénovirus humains, qui possèdent la protéine, E1A, E3 et certains produits de la protéine E4 responsables de l'induction de l'apoptose dans les cellules infectées<sup>106;107</sup>. Les lentivirus, dont l'exemple clé est le VIH, induisent l'apoptose des cellules T CD4 infectées<sup>108;109</sup> et l'apoptose de cellules T non infectées mais voisines de cellules infectées<sup>110</sup>. D'autres virus<sup>56</sup> causent également l'apoptose dans les cellules qu'ils infectent<sup>111 74;98;100</sup>.

Lors de notre étude sur l'infection des neutrophiles des adultes et de nouveau-nés par l'HSV-1, on a démontré que l'HSV-1 augmente l'apoptose chez les neutrophiles de nouveau-nés infectés contrairement à ceux de l'adulte. Ceci montre que l'HSV-1 infecte les neutrophiles des nouveau-nés, cause leur mort par apoptose et ainsi, ne suscitent pas une réponse immunitaire. En plus, les neutrophiles qui en temps normal sont impliqués dans toute sorte de réponse non-spécifique, et servent de médiateurs dans la réponse spécifique, voient leur taux d'apoptose augmenté. Ceci pourrait probablement expliquer la sévérité des infections à HSV-1 chez le nouveau-né, et laisse croire que l'augmentation d'apoptose chez les neutrophiles des nouveau-nés infectés est un des mécanisme par lequel le virus échappe au système immunitaire.

Un autre point à souligner, le pourcentage de neutrophiles infectés représente environ le tiers. Ceci est probablement dû à la présence de différentes populations de neutrophiles, ou au faible taux de l'héparane sulfate à la surface de neutrophiles. Il est démontré que l'héparane sulfate est un facteur majeur dans la fixation de l'HSV-1 à la surface de cellules<sup>31;32</sup>.

L'induction de l'apoptose chez les neutrophiles de nouveau-nés dépend de plusieurs facteurs. Premièrement, le titre infectieux du virus; plus le titre infectieux est élevé, plus l'apoptose est importante. Deuxièmement, la compétition entre des particules virales infectieuses et des particules virales non-infectieuses : l'infection simultanée de neutrophiles par un virus à titre infectieux élevé et un virus à titre infectieux bas ou inactivé

baisse le taux d'apoptose des neutrophiles infectés ( résultat obtenu dans notre laboratoire). Ceci suppose que les particules virales non-infectieuses se fixent sur les molécules d'héparane sulfate à la surface des neutrophiles et rentrent en compétition avec les particules virales infectieuses. Troisièmement, pour que le virus cause l'apoptose, il faut qu'il pénètre et qu'il se réplique à l'intérieur des neutrophiles. L'infection des neutrophiles de nouveau-né par un virus inactivé n'induit pas l'apoptose dans ces cellules (résultat démontré dans notre laboratoire). Ceci suggère que la réplication virale est nécessaire pour qu'il y ait induction d'apoptose.

Le traitement de neutrophiles de nouveau-nés infectés par l'HSV-1 par l'acyclovir baisse l'apoptose dans ces cellules ( résultat démontré dans notre laboratoire). Ce qui suggère également que la réplication et la transcription de certains gènes sont nécessaires pour l'augmentation de l'apoptose. Aussi, différents traitements à différentes périodes post-infection indiquent que l'apoptose augmente à partir de 20h post-infection, ce qui laisse croire que des gènes exprimés lors de la réplication peuvent probablement être impliqués dans cette apoptose.

D'un autre côté, l'immunofluorescence a montré que l'expression de Fas et de FasL augmente chez les neutrophiles de nouveau-nés infectés par L'HSV-1. Ceci indique que l'apoptose induite chez les neutrophiles infectés par L'HSV-1 peut être régulée par la voie de Fas et FasL . La sécrétion de FasL soluble par les neutrophiles des nouveau-nés infectés a aussi été démontré par ELISA. Ceci indique que l'apoptose des neutrophiles peut être médiée par une voie paracrine et autocrine suite à l'infection des neutrophiles par le HSV-1.

Lors de la mesure de l'apoptose, cette dernière augmente de 7 à 24% environ dans les cellules infectées par le HSV-1, donc il restait 75% de cellules vivantes non apoptotiques. Cependant, quand on mesure l'expression de Fas et FasL à la surface cellulaire, cette expression augmente de deux fois par rapport aux cellules contrôles non infectées. Donc, est-ce que cette augmentation d'apoptose provient uniquement de cellules infectées apoptotiques ou aussi de cellules apoptotiques non infectées? Des études futures dans le but d'identifier l'état des cellules apoptotiques seront nécessaires.

Des études futures sont aussi requises pour identifier les gènes exprimés lors de cette infection tels que les gènes alpha responsables de l'initiation de l'infection et les gènes beta nécessaires à la réplication du virus. Également, les gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose des neutrophiles infectés doivent être identifiés. Pour cela, suite à la fixation de FasL sur le récepteur Fas, on pourra évaluer l'activation de la caspase-8 et des gènes pro-apoptotiques Bax- $\alpha$ , Bid et Bak ainsi que leur impact sur la perte du potentiel transmembranaire mitochondriale<sup>112;113</sup>. Cette perte du potentiel membranaire libère le cytochrome c et autres protéines qui provoquent l'activation des caspases-9 et -3 et mort cellulaire. L'intégrité de la membrane mitochondriale est stabilisée par Bcl-2 ce qui empêche la libération du cytochrome c. Cependant, il sera important de mesurer aussi l'expression de certains gènes anti-apoptotiques tels Bcl-2, Bcl-XL et la protéine A-1<sup>113;114</sup>. Aussi, l'effet de l'incubation des neutrophiles de nouveau-nés infectés en présence de certaines cytokines dotées d'activités anti-apoptotiques dans le but de

remédier à cette augmentation d'apoptose reste à être examiné. Les cytokines les plus intéressantes à explorer dans ce but seront l'IL-15 et le GM-CSF.

Cette étude nous a permis de mieux comprendre l'effet de l'infection des neutrophiles néonataux et adultes par l'HSV-1. Nos résultats pourront s'avérer utiles dans le but d'établir de nouvelles stratégies immuno-thérapeutiques chez les nouveau-nés à risque d'infection à HSV-1.

## **VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVE**

L'étude effectuée a démontré que l'infection à l'HSV-1 augmente l'induction de l'apoptose des neutrophiles des nouveau-nés et pas des adultes. Cette apoptose est régulée par la voie Fas et Fas ligand.

Ceci suggère un mécanisme par lequel le virus échappe à la réponse immunitaire et pourrait expliquer pourquoi le HSV-1 cause des infections sévères chez les nouveau-nés.

**BIBLIOGRAPHIE**



1. Hoffman, R., E. J. J. Benz, S. J. Shattil, B. Furie, H. J. Cohen, L. E. Silberstein, and P. McGlave. 2000. In *Hematology, Basic Principles and Practice.*, pp. 667-686.
2. Clark, S. C. and R. Kamen. 1987. The human hematopoietic colony-stimulating factors. [Review] [69 refs]. *Science* 236:1229-1237.
3. Yong, K. L. and D. C. Linch. 1993. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor differentially regulates neutrophil migration across IL-1-activated and nonactivated human endothelium. *Journal of Immunology* 150:2449-2456.
4. Yong, K. L. and D. C. Linch. 1992. Differential effects of granulocyte- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors (G- and GM-CSF) on neutrophil adhesion in vitro and in vivo. *European Journal of Haematology* 49:251-259.
5. Lloyd, A. R. and J. J. Oppenheim. 1992. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. [Review] [38 refs]. *Immunology Today* 13:169-172.
6. Yomogida, S., I. Nagaoka, K. Saito, and T. Yamashita. 1996. Evaluation of the effects of defensins on neutrophil functions. *Inflammation Research* 45:62-67.
7. Spitznagel, J. K. 1990. Antibiotic proteins of human neutrophils. [Review] [41 refs]. *Journal of Clinical Investigation* 86:1381-1386.

8. Stinavage, P., L. E. Martin, and J. K. Spitznagel. 1989. O antigen and lipid A phosphoryl groups in resistance of *Salmonella typhimurium* LT-2 to nonoxidative killing in human polymorphonuclear neutrophils. *Infection & Immunity* 57:3894-3900.
9. Neuman, E., J. W. Huleatt, and R. M. Jack. 1990. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases synthesis and expression of CR1 and CR3 by human peripheral blood neutrophils. *Journal of Immunology* 145:3325-3332.
10. Neuman, E., J. W. Huleatt, H. Vargas, E. E. Rupp, and R. M. Jack. 1992. Regulation of MHC class I synthesis and expression by human neutrophils. *Journal of Immunology* 148:3520-3527.
11. Shirafuji, N., S. Matsuda, H. Ogura, K. Tani, H. Kodo, Ozawa, K, S. Nagata, S. Asano, and F. Takaku. 1990. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates human mature neutrophilic granulocytes to produce interferon-alpha. *Blood* 75:17-19.
12. Djeu, J. Y., D. Serbousek, and D. K. Blanchard. 1990. Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 76:1405-1409.
13. Dubravec, D. B., D. R. Spriggs, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1990. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:6758-6761.
14. Strieter, R. M., K. Kasahara, R. M. Allen, T. J. Standiford, Rolfe, MW, F. S. Becker, S. W. Chensue, and S. L. Kunkel. 1992. Cytokine-

- induced neutrophil-derived interleukin-8. *American Journal of Pathology* 141:397-407.
15. Sisson, J. H., S. M. Prescott, T. M. McIntyre, and G. A. Zimmerman. 1987. Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B<sub>4</sub> metabolism. *Journal of Immunology* 138:3918-3926.
  16. Marucha, P. T., R. A. Zeff, and D. L. Kreutzer. 1990. Cytokine regulation of IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte. *Journal of Immunology* 145:2932-2937.
  17. Tiku, K., M. L. Tiku, and J. L. Skosey. 1986. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Immunology* 136:3677-3685.
  18. Dinarello, C. A. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. [Review] [326 refs]. *Blood* 77:1627-1652.
  19. Lord, P. C., L. M. Wilmoth, S. B. Mizel, and C. E. McCall. 1991. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Clinical Investigation* 87:1312-1321.
  20. Osborn, L. 1990. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. [Review] [24 refs]. *Cell* 62:3-6.

21. Lindemann, A., D. Riedel, W. Oster, H. W. Ziegler-Heitbrock, R. Mertelsmann, and F. Herrmann. 1989. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Clinical Investigation* 83:1308-1312.
22. Cicco, N. A., A. Lindemann, J. Content, P. Vandenbussche, M. Lubbert, J. Gauss, R. Mertelsmann, and F. Herrmann. 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.
23. Larsen, C. G., A. O. Anderson, E. Appella, J. J. Oppenheim, and K. Matsushima. 1989. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243:1464-1466.
24. Kasama, T., R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick, Kunkel, and SL. 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *Journal of Experimental Medicine* 178:63-72.
25. Kasama, T., R. M. Strieter, N. W. Lukacs, M. D. Burdick, and S. L. Kunkel. 1994. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *Journal of Immunology* 152:3559-3569.
26. Taub, D. D., K. Conlon, A. R. Lloyd, J. J. Oppenheim, and D. J. Kelvin. 1993. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260:355-358.

27. Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. [Review] [150 refs]. *Annual Review of Immunology* 9:617-648.
28. Musso, T., L. Calosso, M. Zucca, M. Millesimo, M. Puliti, S. Bulfone-Paus, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A. N. Ponzi, and R. Badolato. 1998. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infection & Immunity* 66:2640-2647.
29. McDonald, P. P., M. P. Russo, S. Ferrini, and M. A. Cassatella. 1998. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* 92:4828-4835.
30. Spear PG. 1984. In *The herpesviruses*. Plenum, ed. New York, pp. 315-356.
31. Shieh, M. T., D. WuDunn, R. I. Montgomery, J. D. Esko, and P. G. Spear. 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Cell Biology* 116:1273-1281.
32. WuDunn, D. and P. G. Spear. 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *Journal of Virology* 63:52-58.
33. Whitley, R. J. 1996. Heps Simplex Viruses. In *Fields Virology*. e. al. Fields BN, ed. Philadelphia, pp. 2297-2342.

34. Whitley, R., A. Arvin, C. Prober, L. Corey, S. Burchett, S. Plotkin, S. Starr, R. Jacobs, D. Powell, and A. Nahmias. 1991. Predictors of morbidity and mortality in neonates with herpes simplex virus infections. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *New England Journal of Medicine* 324:450-454.
35. Whitley, R. J. Neonatal herpes simplex virus infections. 7, 119-126. 1985.  
Ref Type: Generic
36. Thouvenot, D. and F. Najioullah. 1999. [Herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2)]. [French]. *Revue du Praticien* 49:2203-2207.
37. Sullender, W. M., J. L. Miller, L. L. Yasukawa, J. S. Bradley, Black, SB, A. S. Yeager, and A. M. Arvin. 1987. Humoral and cell-mediated immunity in neonates with herpes simplex virus infection [published erratum appears in J Infect Dis 1987 Apr;155(4):838]. *Journal of Infectious Diseases* 155:28-37.
38. Kohl, S. and M. W. Harmon. 1983. Human neonatal leukocyte interferon production and natural killer cytotoxicity in response to herpes simplex virus. *Journal of Interferon Research* 3:461-463.
39. Hill, H. R. 1985. Host defenses in the neonate: prospects for enhancement. [Review] [81 refs]. *Seminars in Perinatology* 9:2-11.

40. Douglas, R. G., Jr., R. H. Alford, T. R. Cate, and R. B. Couch. 1966. The leukocyte response during viral respiratory illness in man. *Annals of Internal Medicine* 64:521-530.
41. MacGregor, R. R., H. M. Friedman, E. J. Macarak, and N. A. Kefalides. 1980. Virus infection of endothelial cells increases granulocyte adherence. *Journal of Clinical Investigation* 65:1469-1477.
42. Ratcliffe, D. R., S. L. Nolin, and E. B. Cramer. 1988. Neutrophil interaction with influenza-infected epithelial cells. *Blood* 72:142-149.
43. Cassatella, M. A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. [Review] [63 refs]. *Immunology Today* 16:21-26.
44. Metcalf, J. F. and R. W. Reichert. 1979. Histological and electron microscopic studies of experimental herpetic keratitis in the rabbit. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 18:1123-1138.
45. Meyers-Elliott, R. H. and P. A. Chitjian. 1981. Immunopathogenesis of corneal inflammation in herpes simplex virus stromal keratitis: role of the polymorphonuclear leukocyte. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 20:784-798.
46. Wang, H. M., M. M. Sheu, R. D. Stulting, and H. J. Kaplan. 1989. Immunohistochemical evaluation of murine HSV-1 keratouveitis. *Current Eye Research* 8:37-46.

47. Tang, Q., W. Chen, and R. L. Hendricks. 1997. Proinflammatory functions of IL-2 in herpes simplex virus corneal infection. *Journal of Immunology* 158:1275-1283.
48. Van Strijp, J. A., K. Van, KP, L. A. Miltenburg, A. C. Fluit, and J. Verhoef. 1988. Attachment of human polymorphonuclear leukocytes to herpes simplex virus-infected fibroblasts mediated by antibody-independent complement activation. *Journal of Virology* 62:847-850.
49. Smith, J. W., J. R. Jachimowicz, and E. L. Bingham. 1986. Binding and internalization of herpes simplex virus-antibody complexes by polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Medical Virology* 20:151-163.
50. Van Strijp, J. A., K. Van, KP, M. E. van der Tol, A. C. Fluit, H. Snippe, and J. Verhoef. 1989. Phagocytosis of herpes simplex virus by human granulocytes and monocytes. *Archives of Virology* 104:287-298.
51. Williams, G. T. 1994. Apoptosis in the immune system. [Review] [29 refs]. *Journal of Pathology* 173:1-4.
52. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. [Review] [68 refs]. *British Journal of Cancer* 26:239-257.
53. Marshall, J. C. and R. W. Watson. 1997. Programmed cell death (apoptosis) and the resolution of systemic inflammation. [Review] [25 refs]. *Canadian Journal of Surgery* 40:169-174.



54. Reed, J. C. 1995. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. [Review] [57 refs]. *Current Opinion in Oncology* 7:541-546.
55. Alcamí, A. and U. H. Koszinowski. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. [Review] [50 refs]. *Immunology Today* 21:447-455.
56. Teodoro, J. G. and P. E. Branton. 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. [Review] [103 refs]. *Journal of Virology* 71:1739-1746.
57. Oppenheim, R. W. 1997. Related mechanisms of action of growth factors and antioxidants in apoptosis: an overview. [Review] [40 refs]. *Advances in Neurology* 72:69-78.
58. Trauth, B. C., C. Klas, A. M. Peters, S. Matzku, P. Moller, Falk, W, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245:301-305.
59. Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine* 169:1747-1756.
60. Nagata, S. and P. Golstein. 1995. The Fas death factor. [Review] [98 refs]. *Science* 267:1449-1456.
61. Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. [Review] [85 refs]. *Cell* 88:355-365.

62. 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. *Journal of Experimental Medicine* 173:771-774.
63. Cotter, T. G., R. S. Fernandes, S. Verhaegen, and J. V. McCarthy. 1994. Cell death in the myeloid lineage. [Review] [57 refs]. *Immunological Reviews* 142:93-112.
64. Hu, B. and K. Yasui. 1997. Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammation site. *International Journal of Hematology* 66:179-188.
65. Lee, A., M. K. Whyte, and C. Haslett. 1993. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *Journal of Leukocyte Biology* 54:283-288.
66. Allgaier, B., M. Shi, D. Luo, and J. M. Koenig. 1998. Spontaneous and Fas-mediated apoptosis are diminished in umbilical cord blood neutrophils compared with adult neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 64:331-336.
67. Liles, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, Klebanoff, and SJ. 1996. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 184:429-440.
68. Bortolussi, R., S. Howlett, K. Rajaraman, and S. Halperin. 1993. Deficient priming activity of newborn cord blood-derived polymorphonuclear neutrophilic granulocytes with lipopolysaccharide

- and tumor necrosis factor-alpha triggered with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Pediatric Research* 34:243-248.
69. Larochelle, B., L. Flamand, P. Gourde, D. Beauchamp, Gosselin, and J. 1998. Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood* 92:291-299.
70. Colamussi, M. L., M. R. White, E. Crouch, and K. L. Hartshorn. 1999. Influenza A virus accelerates neutrophil apoptosis and markedly potentiates apoptotic effects of bacteria. *Blood* 93:2395-2403.
71. Wang, S. Z., P. K. Smith, M. Lovejoy, J. J. Bowden, J. H. Alpers, and K. D. Forsyth. 1998. The apoptosis of neutrophils is accelerated in respiratory syncytial virus (RSV)-induced bronchiolitis. *Clinical & Experimental Immunology* 114:49-54.
72. Roberts, R. L., B. J. Ank, and E. R. Stiehm. 1994. Antiviral properties of neonatal and adult human neutrophils. *Pediatric Research* 36:792-798.
73. Zhang, P., W. R. Summer, G. J. Bagby, and S. Nelson. 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. [Review] [157 refs]. *Immunological Reviews* 173:39-51.
74. Whitley, R., A. Arvin, C. Prober, S. Burchett, L. Corey, D. Powell, S. Plotkin, S. Starr, C. Alford, and J. Connor. 1991. A controlled trial comparing vidarabine with acyclovir in neonatal herpes simplex virus infection. Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *New England Journal of Medicine* 324:444-449.

75. Brown, Z. A., J. Benedetti, R. Ashley, S. Burchett, S. Selke, S. Berry, L. A. Vontver, and L. Corey. 1991. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor [see comments]. *New England Journal of Medicine* 324:1247-1252.
76. Whitley, R. J., L. Corey, A. Arvin, F. D. Lakeman, C. V. Sumaya, P. F. Wright, L. M. Dunkle, R. W. Steele, S. J. Soong, and A. J. Nahmias. 1988. Changing presentation of herpes simplex virus infection in neonates. *Journal of Infectious Diseases* 158:109-116.
77. Hill, H. R. 1987. Biochemical, structural, and functional abnormalities of polymorphonuclear leukocytes in the neonate. [Review] [116 refs]. *Pediatric Research* 22:375-382.
78. Johnston, R. B., Jr. 1998. Function and cell biology of neutrophils and mononuclear phagocytes in the newborn infant. [Review] [90 refs]. *Vaccine* 16:1363-1368.
79. Wilson, C. B. 1986. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. [Review] [118 refs]. *Journal of Pediatrics* 108:1-12.
80. Sacchi, F., N. H. Augustine, M. M. Coello, E. Z. Morris, and H. R. Hill. 1987. Abnormality in actin polymerization associated with defective chemotaxis in neutrophils from neonates. *International Archives of Allergy & Applied Immunology* 84:32-39.
81. Koenig, J. M., J. Simon, D. C. Anderson, E. Smith, and C. W. Smith. 1996. Diminished soluble and total cellular L-selectin in cord blood is

associated with its impaired shedding from activated neutrophils. *Pediatric Research* 39:616-621.

82. Giudicelli, J., P. J. Philip, P. Delque, and P. Sudaka. 1982. A single-step centrifugation method for separation of granulocytes and mononuclear cells from blood using discontinuous density gradient of Percoll. *Journal of Immunological Methods* 54:43-46.
83. Pierre Payment and Michel Trudel. 1989. Isolement et identification des virus. In *Manuel de techniques virologiques*. AUPELF, Sillery, p. 35.
84. Iwai, K., T. Miyawaki, T. Takizawa, A. Konno, K. Ohta, Yachie, A., H. Seki, and N. Taniguchi. 1994. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* 84:1201-1208.
85. Matsumoto, K., R. P. Schleimer, H. Saito, Y. Iikura, Bochner, and BS. 1995. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro. *Blood* 86:1437-1443.
86. Cohen, J. J. 1991. Programmed cell death in the immune system. [Review] [159 refs]. *Advances in Immunology* 50:55-85.
87. Shigeoka, A. O., R. T. Hall, V. G. Hemming, C. D. Allred, and H. R. Hill. 1978. Role of antibody and complement in opsonization of group B streptococci. *Infection & Immunity* 21:34-40.
88. Wilson, C. B., J. Westall, L. Johnston, D. B. Lewis, S. K. Dower, and A. R. Alpert. 1986. Decreased production of interferon-gamma by

- human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *Journal of Clinical Investigation* 77:860-867.
89. Hemming, V. G., J. C. Overall, Jr., and M. R. Britt. 1976. Nosocomial infections in a newborn intensive-care unit. Results of forty-one months of surveillance. *New England Journal of Medicine* 294:1310-1316.
90. Hemming, V. G., D. W. McCloskey, and H. R. Hill. 1976. Pneumonia in the neonate associated with group B streptococcal septicemia. *American Journal of Diseases of Children* 130:1231-1233.
91. Katzenstein, A. L., C. Davis, and A. Braude. 1976. Pulmonary changes in neonatal sepsis to group B beta-hemolytic *Streptococcus*: relation of hyaline membrane disease. *Journal of Infectious Diseases* 133:430-435.
92. Henson, P. M., G. L. Larsen, J. E. Henson, Newman, SL, R. A. Musson, and C. C. Leslie. 1984. Resolution of pulmonary inflammation. *Federation Proceedings* 43:2799-2806.
93. Christensen, R. D. and G. Rothstein. 1980. Exhaustion of mature marrow neutrophils in neonates with sepsis. *Journal of Pediatrics* 96:316-318.
94. Faden, H. and P. Ogra. 1986. Neutrophils and antiviral defense. [Review] [89 refs]. *Pediatric Infectious Disease* 5:86-92.
95. Faden, H., J. J. Hong, and P. L. Ogra. 1984. Interaction of polymorphonuclear leukocytes and viruses in humans: adherence of

- polymorphonuclear leukocytes to respiratory syncytial virus-infected cells. *Journal of Virology* 52:16-23.
96. Visser, M. R., H. S. Jacob, J. L. Goodman, J. B. McCarthy, L. T. Furcht, and G. M. Vercellotti. 1989. Granulocyte-mediated injury to herpes simplex virus-infected human endothelium. *Laboratory Investigation* 60:296-304.
97. Ramsay, A. J., J. Ruby, and I. A. Ramshaw. 1993. A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immunology Today* 14:155-157.
98. Tortorella, D., B. E. Gewurz, M. H. Furman, D. J. Schust, Ploegh, and HL. 2000. Viral subversion of the immune system. [Review] [418 refs]. *Annual Review of Immunology* 18:861-926.
99. Lalani, A. S., J. W. Barrett, and G. McFadden. 2000. Modulating chemokines: more lessons from viruses. [Review] [56 refs]. *Immunology Today* 21:100-106.
100. Spriggs, M. K. 1996. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. [Review] [207 refs]. *Annual Review of Immunology* 14:101-130.
101. Chou, J., E. R. Kern, R. J. Whitley, and B. Roizman. 1990. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250:1262-1266.
102. Chou, J. and B. Roizman. 1992. The gamma 1(34.5) gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total

- shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:3266-3270.
103. Everett, H. and G. McFadden. 1999. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. [Review] [57 refs]. *Trends in Microbiology* 7:160-165.
104. Jeurissen, S. H., F. Wagenaar, J. M. Pol, A. J. van der Eb, and M. H. Noteborn. 1992. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. *Journal of Virology* 66:7383-7388.
105. Noteborn, M. H., D. Todd, C. A. Verschueren, H. W. de Gouw, Curran, WL, S. Veldkamp, A. J. Douglas, M. S. McNulty, A. J. van der Eb, and G. Koch. 1994. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology* 68:346-351.
106. Marcellus, R. C., J. G. Teodoro, T. Wu, D. E. Brough, G. Ketner, G. C. Shore, and P. E. Branton. 1996. Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *Journal of Virology* 70:6207-6215.
107. Teodoro, J. G., G. C. Shore, and P. E. Branton. 1995. Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* 11:467-474.
108. Groux, H., G. Torpier, D. Monte, Y. Mouton, A. Capron, and J. C. Ameisen. 1992. Activation-induced death by apoptosis in CD4<sup>+</sup> T



- cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *Journal of Experimental Medicine* 175:331-340.
109. Li, C. J., D. J. Friedman, C. Wang, V. Metelev, and A. B. Pardee. 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268:429-431.
110. Finkel, T. H., G. Tudor-Williams, N. K. Banda, M. F. Cotton, T. Curiel, C. Monks, T. W. Baba, R. M. Ruprecht, and A. Kupfer. 1995. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes [see comments]. *Nature Medicine* 1:129-134.
111. Morey, A. L., D. J. Ferguson, and K. A. Fleming. 1993. Ultrastructural features of fetal erythroid precursors infected with parvovirus B19 in vitro: evidence of cell death by apoptosis. *Journal of Pathology* 169:213-220.
112. Watson, R. W., A. O'Neill, A. E. Brannigen, R. Coffey, Marshall, JC, H. R. Brady, and J. M. Fitzpatrick. 1999. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Letters* 453:67-71.
113. Akgul, C., D. A. Moulding, and S. W. Edwards. 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. [Review] [68 refs]. *FEBS Letters* 487:318-322.
114. Weinmann, P., P. Gaetgens, and B. Walzog. 1999. Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood* 93:3106-3115.