

Université de Montréal

**Contribution des protéines issues du liquide synovial
dans la protection et la survie des PMN humains**

**Chimioprotection: Étude comparative des mécanismes d'action
impliqués par rapport au GM-CSF**

par

Sheila Ethier

Études Supérieures, Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Microbiologie et Immunologie

Avril, 2011

© Sheila Ethier, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Contribution des protéines issues du liquide synovial dans la protection et la survie des
PMN humains

présentée par :

Sheila Ethier

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Ali Ahmad, président-rapporteur

Dre. Lyne Gagnon, directeur de recherche

Dre Françoise Le Deist, membre du jury

Dre Claire Dubois, examinateur externe

Dr Kouassi Édouard, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) représentent une arme primordiale dans la défense contre divers agents pathogènes; notamment les bactéries, les champignons, les cellules tumorales de même que les cellules infectées par des virus. Cependant, certaines pathologies reliées à l'inflammation chronique soulèvent l'implication des neutrophiles notamment dans l'arthrite rhumatoïde. La réponse inflammatoire persistante générée par l'activation et la survie des neutrophiles engendre une destruction des tissus environnants suite à la sécrétion non contrôlée de leurs produits cytotoxiques. Même si l'activation chronique des neutrophiles est néfaste dans plusieurs pathologies, elle pourrait s'avérer un bon outil en cas de neutropénie, comme c'est souvent le cas les patients ayant reçu des traitements de chimiothérapie.

Ce projet fait suite aux travaux doctoraux de Lagraoui (1999). Il vise à identifier le(s) facteur(s) du liquide synovial qui augmente la survie des neutrophiles ainsi que le mécanisme d'action impliqué dans ce processus. Similairement au facteur semi-pur isolés par Lagraoui (1999), le milieu conditionné concentré (MCC) augmente la survie des PMNs de 75% ($39\% \pm 9.5$ vs $68\% \pm 2.5$, $p < 0.01$). Suivant le séquençage du MCC parallèlement au facteur semi-pur actif, deux protéines ont été identifiées à la fois dans le MCC et dans le facteur semi-pur soient : l'albumine et la fétuine. Notre projet vise donc à comparer les effets de l'albumine et de la fétuine à ceux du GM-CSF dans l'optique d'une thérapie alternative au GM-CSF en tant qu'adjuvant de chimiothérapie. La présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF chez les PMNs incubés 24 heures avec la Mutamycin® induit une diminution du nombre de cellules en apoptose par rapport à la Mutamycin® (Ctrl : $43\% \pm 10$; A : $74\% \pm 3$; F : ($82\% \pm 6$ et GM : $74\% \pm 7$; $p < 0.01$). L'effet de l'albumine dépend de la voie de la kinase PI3 mais également celle la kinase ERK, alors que celle de la fétuine dépend de la kinase PI3.

Similairement l'EPO, l'albumine et la fétuine supporte la différenciation des HSCs en précurseurs érythrocytaires de type BFU-E. Dans un modèle murin de chiomioprotection, l'albumine augmente la concentration cellulaire rapport au groupe contrôle des leukocytes de la rate ($66 \pm 8 \times 10^6 \text{c/ml}$ vs $81 \pm 16 \times 10^6 \text{c/ml}$) et du sang ($3.6 \pm 0.4 \times 10^6 \text{c/ml}$ vs $5.7 \pm 2.3 \times 10^6 \text{c/ml}$). Donc, *in vitro*, l'albumine et la fétuine sont comparables au GM-CSF au niveau fonctionnalité et mécanismes d'action. Cependant, vu leur manque de spécificité, l'application thérapeutique en tant qu'adjuvant de chiomiothérapie de l'albumine et la fétuine est peu prometteuse. Par contre, les maladies dégénératives et les événements ischémiques pourraient s'avérer de bonnes cibles thérapeutiques, principalement pour l'albumine.

Mots-clés : PMNs, Albumine, Fétuine, Apoptose spontanée, Agent cytotoxique, Cellules hématopoïétiques, Caspases, ROS, Bcl-2, Signalisation intracellulaire

Abstract

Circulating polymorphonuclear neutrophils (PMN) possess a short half-life and are constantly renewed by the bone marrow to ensure the first-line of defense. Therefore, homeostasis must be maintained through a well-regulated process of apoptosis. Survival of PMN can be regulated by several cytokines as well as conditioned media (CM). Although PMN are crucial for protection against microorganisms, activated neutrophils can lead to severe tissue damage in diseases characterized by chronic inflammation. Indeed, in rheumatoid arthritis (RA), activated PMN contribute to tissue damage by releasing a number of destructive agents. On the other hand, chronic activation of PMN could prevent opportunistic infections present in immunosuppressed patients.

This project addresses the isolation and mechanism of action of synovial liquid components on the survival of neutrophils based on previous work (Lagraoui, 1999). Following tangential flow filtration (MW cut off: 30 and 50 kDa), concentrated CM enhanced the viability (75%) of 24-hour cultured human neutrophils isolated from peripheral blood of healthy volunteers ($39\% \pm 9.5$ vs $68\% \pm 2.5$, $p < 0.01$) as seen in Lagraoui (1999) previous work. N-terminal protein sequence analysis of the concentrated CM and fractionated conditioned media from previous work revealed 2 known proteins contained in both analysis: albumin, and fetuin. In view of the importance of neutrophils in immune defense, we compared the benefits of albumin and fetuin to those of granulocytes macrophages-colony stimulating factor (GM-CSF), a growth factor used as an adjunct to cancer chemotherapy. Albumin and fetuin were tested by the AnnexinV-FITC/7-AAD method and displayed an inhibition of neutrophil apoptosis of two to three folds relative to control value. Moreover, albumin (A : $200\mu\text{M}$) and fetuin (F : $200\mu\text{M}$) rescue human PMN from mutamycin-induced apoptosis, comparable to GM-CSF (GM : 10ng/ml); (Ctrl : $43\% \pm 10$; A : $74\% \pm 3$; F : $82\% \pm 6$ et GM : $74\% \pm 7$; $p < 0.01$). Albumin also induces cellular signaling pathways activation via PI3-K and ERK, whereas fetuin acts through PI3-K pathway only. They induce the differentiation of HSCs into erythrocytes

progenitors BFU-E. In immunosuppressed mice, albumin protects white blood cells depletion induced by cytotoxic agent from spleen and blood.

Considering all the benefits of albumin and fetuin, their targeting as an adjunct to cancer chemotherapy could be disappointing in view of their lack of specificity. On the other hand, their multiple benefits could have a major impact on neurodegenerative disorders and ischemic events.

Keywords : Neutrophils, Albumin, Fetuin, PMN Spontaneous apoptosis, Cytotoxic agent, Hematopoietic cells, Cellular signaling pathways, Caspases, ROS, Bcl-2

Liste des Abréviations

7-AAD :	Actinomycine-D
α 1-AT:	Alpha-1-antitrypsine
ACAMP:	“Apoptotic cell associated molecular patter”
Apaf:	“Apoptotic protease activating factor”
ARDS:	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
Bax:	“Bcl-associated X protein”
Bcl-2:	“B cell Lymphoma/leukemia-2”
BFU:	“Burst forming unit”
BH domain	“Bcl-2 homology domain”
BPI:	“Bacterial membrane protein”
C:	Complément
CAD:	“Caspase-activated deoxyribonuclease”
CARD:	“Caspase recruitment domain”
CAM:	Camptothecin
CD:	Classe de différenciation
CFU:	“Colony forming unit”
CFU-GEMM :	“Colony forming unit-Grannulocyte, Erythrocyte, Monocyte/Macrophages, Megacaryocyte”
CGD:	Granulomatose septique chronique
CHX:	Cyclohexemide
Cl ⁻ :	Ions chlorure
CMH :	Complexe majeur d’histocompatibilité
CR:	“Complement receptor”
CSF:	“Colony stimulating factor”
Cu ²⁺ :	Cations cuivre
DAF:	“Decay accelerating factor”

DD:	“Death domain”
DED:	“Death effector domain”
DISC:	“Death-inducing signaling complex”
DQ-BSA	“Bodipy Flurosceine self-quenched Bovine Serum Albumin”
DR:	“Death receptor”
Endo G:	Endonucléase G
EGF:	“Epidermal growth factor”
EPO:	Érythropoïétine
ERK:	“Extracellular signal-regulated kinase”
FAD:	Flavine adénine dinucléotide
FAK:	“Focal adhesion kinase”
FcγR :	Récepteur Fc
Fe ²⁺ :	Cations Fer
FITC :	Fluorescein isothiocyanate
FMLP :	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
hCAP-18:	“human Cathelicidin Antibacterial-binding Proteins-18”
IAP:	“Inhibitor of apoptosis”
ICAD:	“Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease”
ICAM:	“Intracellular adhesion molecule”
ICE:	“IL-1 converting enzyme”
Ig:	Immunoglobuline
IFN-γ :	Interféron gamma
IL :	Interleukine
ITAM:	“Immunoreceptor tyrosin-based activator motif”
GDI:	“Guanine nucleotide dissociation inhibitor”
GM-CSF:	“Granulocyte Macrophage-Colony stimulatinf factor”
GSH:	Glutathion
hCAP-18	“Human cationic antimicrobial protein 18 ”

H ₂ O ₂ :	Péroxyde d'hydrogène
HOCl:	Acide hypochlorique
HSC:	“Hematopoïetic stem cells”
LBP:	“LPS binding protein”
LPS:	Lipopolysaccharide
LTA:	Acide lipoteichoïque
LTB:	Leucotriène
MAPK:	“Mitogen-activated protein kinases”
MC :	Milieu conditionné
MCC :	Milieu conditionné concentré
[M] :	Milieu concentré
Mcl-1:	“Myeloïd cell leukemia-1”
MMP:	Métalloprotéinase
MPO :	Myéloperoxydase
NADPH:	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate réduit
NETs:	“Neutrophil extracellular traps”
NF-κB:	“Nuclear factor-kappa B”
NGAL :	“Neutrophil gelatinase-associated lipocalin”
NK :	“Natural killer”
NOS :	Nitric oxide synthase
O ₂ ⁻ :	Anions superoxyde
OCl ⁻ :	Hypochlorite
PAF:	“Platelet-activating factor”
PARP:	Poly (ADP-ribose) polymérase
PCD:	“Programmed cell death”
PDGF:	“Platelet-derived growth factor”
PECAM:	“Platelet-endothelial cell adhesion molecule”
PEST	“Proline-acide glutamique-sérine-thréonine”

PIG:	Phosphatidyl-inositol-glycan
PI-3K:	Phosphatidylinositol-3 kinase
PKB:	Protéine kinase B
PLC:	Phospholipase C
PMN:	Polymorphonucléaire neutrophile
PNG:	Peptodiglycan
PS:	Phosphatidylserine
PSGL:	“Platelet sialoglycoprotein ligand”
PTP:	“Permeability transition pore”
ROS	“Reactive oxygen species”
SCF:	“Stem cell factor”
SOD:	Superoxyde dismutase
TCR:	“T-Cell receptor”
TGF- β :	“Tumor growth factor”
TNF- α :	“Tumor necrosis factor”
TNFR:	“TNF receptor”
TLR:	“Toll receptor”
TPO:	Thrombopoïétine
TRAIL:	“TNF-related apoptosis-inducing ligand”
UDPGD:	Uridine diphosphoglucose-déshydrogénase
VCAM:	“Vascular cell adhesion molecule”
VSMC:	“Vascular smooth muscle cell”
ZAP:	“Zeta-associated protein”
XIAP:	“X-linked inhibitor of apoptosis”

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Ontogénie	1
1.1.1	Hématopoïèse et granulopoïèse.....	1
1.2	Les Caractéristiques des Neutrophiles	7
1.2.1	Les molécules d'adhésion.	7
1.2.2	Les récepteurs Fc γ	9
1.2.3	Les granules cytoplasmiques.....	9
1.3	Les Fonctions des neutrophiles	14
1.3.1	La Chimiotaxie.....	14
1.3.2	La Phagocytose	17
1.3.3	La formation du NETs (Neutrophil Extracellular Traps).....	26
1.4	La Régulation et l'Homéostasie	29
1.4.1	La mort cellulaire	29
1.4.2	Modèle d'apoptose.....	58
1.4.3	Facteurs et évènements de signalisation cellulaire influençant la survie des neutrophiles.....	60
1.5	Implication du neutrophile dans la réponse inflammatoire.....	72
1.6	Problématique et objectifs du travail.....	74
2	Matériels et Méthode.....	76
2.1	Types cellulaires.....	76
2.1.1	Les cellules primaires.....	76
2.1.2	Les cellules transformées	78
2.2	Les composés utilisés.....	79
2.2.1	Le milieu conditionné concentré (MCC)	79
2.2.2	Le GM-CSF.....	80
2.2.3	Les protéines	80
2.2.4	Les agents cytotoxiques	80

2.2.5	Les inhibiteurs de kinases	81
2.3	La cytométrie en flux	81
2.4	Les Techniques expérimentales	82
2.4.1	Analyses de cytométrie en flux	82
2.4.2	Techniques de biologie moléculaire.....	88
2.4.3	Essais de prolifération et de maturation	91
2.4.4	Études <i>in vivo</i>	92
2.5	Les statistiques	93
3	Résultats	94
3.1	Protection de la survie des neutrophiles humains	94
3.1.1	L'apoptose spontanée.....	95
3.1.2	L'apoptose induite.....	105
3.2	Activité phagocytaire	111
3.2.1	Internalisation via les récepteurs Fc γ	111
3.2.2	Capacité protéolytique	111
3.3	Mécanismes d'action impliqués par rapport au GM-CSF.....	116
3.3.1	Évaluation de l'activation relative des caspases	116
3.3.2	Détection des dérivés oxygénés chez les PMNs humains.....	118
3.3.3	Évaluation de l'intégrité des protéines du cytosquelette.....	120
3.3.4	Évaluation de la contribution des molécules anti-apoptotiques.....	123
3.3.5	Étude de signalisation cellulaire reliée à la survie	137
3.4	Effet de l'albumine et de la fétuine sur les cellules de la moelle osseuse.....	140
3.4.1	Impacte de l'albumine sur la synthèse d'ADN des cellules de la moelle osseuse murine	140
3.4.2	Effet de l'albumine et de la fétuine sur la synthèse de l'ADN des cellules de la moelle osseuse humaine, un indice de la prolifération cellulaire.....	140
3.4.3	Action de l'albumine et de la fétuine sur la différenciation des cellules de la moelle osseuse humaine.....	144

3.5	Activité de l'albumine et de la fétuine dans un modèle murin de chimioprotection	
	146	
4	Discussion	150
4.1	Caractérisation du liquide synovial	150
4.2	Les mécanismes d'action impliqués : Similitudes et différences par rapport au GM-CSF	154
4.2.1	Fonctionnalité	154
4.2.2	Effet de l'albumine et la fétuine sur la famille du Bcl-2	156
4.2.3	Les enzymes protéolytiques	162
4.2.4	Les dérivés oxygénés	167
4.3	Mécanisme d'action de l'albumine et de la fétuine sur la mort cellulaire	169
4.4	Modèle proposé de mort cellulaire chez les PMNs	176
4.5	Voies métabolique et cellulaire dépendantes de l'action de l'albumine et de la fétuine	179
4.5.1	Les kinases	179
4.6	Chimioprotection et hématopoïèse	181
4.6.1	Études <i>In vitro</i>	181
4.6.2	Étude <i>In vivo</i>	185

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux constituants des granules et des vésicules de sécrétion retrouvés chez les neutrophiles	13
Tableau 2 : Évènements morphologiques et moléculaires rencontrés lors de l'apoptose....	33
Tableau 3 : Substrats clivés lors de l'apoptose par les caspases effectrices	37
Tableau 4 : Principaux facteurs activateurs des neutrophiles retrouvés dans le liquide synovial	68
Tableau 5 : Principaux marqueurs exprimés par les synoviocytes macrophagiques et fibroblastiques	71
Tableau 6 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour l'amplification du Bcl-2..	90
Tableau 7 : Expression relative du CD16b chez les neutrophiles humains incubés 24 heures en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF.	102
Tableau 8 : Compilation de l'activité relative des caspases-3, -8 et -9 chez les PMNs incubés 48 heures en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF.....	117
Tableau 9 : Influence de l'albumine, de la fétuine et du GM-CSF après une incubation de 24hres sur l'expression intracellulaire de la vimentine obtenu chez divers donneurs.	122
Tableau 10 : Intensité moyenne de fluorescence générée par la détection du clone C-2 par rapport à celle de l'isotype chez les neutrophiles fraîchement isolés.	130
Tableau 11 : Résultats illustrant l'effet de l'albumine, de la fétuine et du GM-CSF sur l'expression intracellulaire du Bcl-2 par rapport aux neutrophiles suivant une incubation de 24hres.	134
Tableau 12 : Identification des évènements de signalisation cellulaire impliqués dans la protection conférée par l'albumine, la fétuine ou le GM-CSF chez les PMNs incubés 8hres en présence de CHX.	139

Liste des figures

Figure 1 : Diagramme d'hématopoïèse.....	3
Figure 2 : Stages de différenciation des précurseurs des neutrophiles.....	6
Figure 3 : Processus séquentielle de la capture, du roulement, de l'adhésion, de la diapédèse et de la migration des neutrophiles lors de la chimiotaxie.....	16
Figure 4 : Le complexe enzymatique NADPH oxydase.....	22
Figure 5 : La formation du NETs.....	28
Figure 6: Classification des caspases et structures.....	35
Figure 7: Mécanismes d'activation extrinsèque et intrinsèque des caspases durant l'apoptose.....	40
Figure 8: Mécanismes impliqués dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe lors de la mort cellulaire.....	44
Figure 9: Structure et fonction des membres appartenant à la famille du Bcl-2.....	46
Figure 10: Mécanismes d'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak par les protéines BH3-only.....	48
Figure 11: Mécanisme d'interférence des protéines anti-apoptotiques proposé dans l'oligomérisation des membres pro-apoptotiques Bax/Bak.....	50
Figure 12: Mécanismes responsables de la perméabilisation lysosomale.....	55
Figure 13: Mécanismes d'action des lysosomes associés à l'apoptose.....	56
Figure 14: Modèle d'induction de l'apoptose spontanée chez les neutrophiles.....	59
Figure 15: Mécanismes de signalisation cellulaire impliqués dans l'activation des MAPK.....	62
Figure 16: Mécanismes de signalisation cellulaire issus de l'action de la PI3-K impliqué dans l'activation de la PKB (Akt).....	64
Figure 17 : Compilation des résultats obtenus chez différents donneurs concernant l'effet du MCC et du [M] sur la viabilité des PMN humains après 24hres d'incubation.....	96
Figure 18 : Augmentation de la viabilité moyenne des PMNs incubés en présence d'albumine.....	i

Figure 19 : Activité de la fétuine, selon sa concentration, sur l'apoptose spontanée des PMN humains.	i
Figure 20 : Histogramme typique de cytométrie en flux du Fc γ RIIIb (CD16b) évaluant l'apoptose spontanée des PMNs à 24hres.	101
Figure 21: Protection à long terme de la survie des neutrophiles en culture.	104
Figure 22: Viabilité des PMNs, traités ou non à la Mutamycin®, en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF après 24hres d'incubation.....	106
Figure 23: Représentation typique de l'influence du prétraitement des PMNs, incubés 24hres, en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF avant l'induction de la cytotoxicité.....	108
Figure 24 : Effet protecteur post-cytotoxique conféré par l'albumine et la fétuine sur la viabilité des PMN traités en présence de Mutamycin® suivant une incubation de 24hres.	110
Figure 25 : Histogrammes bi-paramétrique typiques de cytométrie en flux mettant en évidence l'internalisation des billes de Fluoresbrite® YG Carboxylate via les récepteurs Fc γ , en fonction de la granularité, chez les PMNs incubés 24 heures.....	113
Figure 26 : Histogramme typique de fluorescence, généré lors du clivage des molécules DQ-BSA, reflétant l'activité protéolytique basale retrouvée chez les PMNs fraîchement isolés.....	114
Figure 27 : Évaluation de la capacité protéolytique, impliquée dans la destruction de l'antigène lors de la phagocytose des PMNs incubés 24 hres en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF par rapport au contrôle.....	i
Figure 28 : Évaluation de la production de ROS chez les neutrophiles incubés en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF.....	i
Figure 29 : Histogramme typique de cytométrie en flux reflétant l'intégrité de la vimentine en relation avec la viabilité observée chez les PMNs fraîchement isolés et ceux incubés 24 hres.....	121

Figure 30 : Résultat typique de la distribution des différentes populations retrouvées dans la préparation de PMNs fraîchement isolés et identification de la population d'intérêt.	125
Figure 31 : Ségrégation typique de la population de neutrophiles intactes parmi les diverses populations retrouvées chez les PMN incubés 24 heures.	126
Figure 32 : Histogrammes typique de fluorescence illustrant l'expression du Bcl-2 intracellulaire selon la spécificité de l'anticorps utilisé chez les PMN fraîchement isolés.....	128
Figure 33 : Histogramme typique de cytométrie en flux typique illustrant l'expression intracellulaire du Bcl-2 chez les neutrophiles fraîchement isolés.....	129
Figure 34 : Profil bi-paramétrique typique de cytométrie en flux mettant en évidence l'expression du Bcl-2 intracellulaire chez les neutrophiles fonctionnels incubés 24hres.	132
Figure 35 : Résultat typique de la superposition des histogrammes de cytométrie en flux de l'expression du Bcl-2 générés par les neutrophiles incubés 24 heures en présence d'albumine ou de fœtuine comparativement au contrôle isotypique.	133
Figure 36 : Expression typique du Mcl-1 mise en évidence par immunobuvardage chez les PMNs fraîchement isolés et ceux incubés 6 heures en présence de GM-CSF, d'albumine ou de fœtuine.....	136
Figure 37 : Effet de l'albumine et de la fœtuine sur la synthèse d'ADN des cellules de moelle osseuse de souris incubées pendant 72hres, mis en évidence par l'incorporation de ³ H-thymidine.	142
Figure 38 : Mesure de la synthèse d'ADN (incorporation de ³ H-thymidine) en présence de l'albumine ou de la fœtuine illustrant la prolifération des cellules progénitrices de la moelle osseuse humaine suivant une incubation de 72hres.	143
Figure 39 : Évaluation de l'activité de l'albumine et de la fœtuine suivant une incubation de 72hres dans la différenciation des cellules hématopoïétiques.....	145

Figure 40 : Concentration cellulaires des globules blancs retrouvés dans le sang chez les souris immunosupprimées traitées en présence d'albumine et de fétuine suivant l'induction d'une immunosuppression dans un modèle murin de chimioprotection comparativement aux souris immunosupprimées (cytoxan) et aux souris normales (contrôles).	147
Figure 41 : Concentration des cellules de la moelle osseuse chez les souris immunosupprimées traitées en présence d'albumine et de fétuine suivant l'induction d'une immunosuppression dans un modèle murin de chimioprotection comparativement aux souris immunosupprimées (cytoxan) et aux souris normales (contrôles).	148
Figure 42 : Concentration des cellules de la rate chez les souris immunosupprimées traitées en présence d'albumine et de fétuine suivant l'induction d'une immunosuppression dans un modèle murin de chimioprotection comparativement aux souris immunosupprimées (cytoxan) et aux souris normales (contrôles).	149
Figure 43: Schématisation hypothétique expliquant les mécanismes de cytoprotection probables de l'albumine sur la viabilité cellulaire.	174
Figure 44: Principaux mécanismes hypothétiques pouvant contribuer à la protection de la viabilité cellulaire conféré par la fétuine.	175
Figure 45: Modèle proposé de mort cellulaire programmé chez les PMN	178

*"Ton souvenir est comme un livre préféré. Un
livre qu'on lit et relit et qui n'est jamais
refermé". En mémoire de ma chère Mère,
Lucille Girard.*

Remerciements

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au docteur Lyne Gagnon, professeur associé, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine et directrice de mon projet de recherche pour la confiance absolue et les judicieux conseils offerts tout au long de ce travail.

Au terme de ce long cheminement, je remercie également tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin. Plus particulièrement à mon conjoint, Eddy Filiatreault, et ma famille, Lucille Girard, Yval Ethier et Sandra Ethier, pour leur support inconditionnel.

Je m'en voudrais de passer sous silence la contribution de la compagnie ProMetic BioSciences, qui m'a soutenu tant financièrement que matériellement tout au long de ce projet de recherche. Grâce à ProMetic, j'ai acquis une bonne expérience scientifique et industrielle parmi ses Chercheurs et Associés de Recherche. Merci pour cette opportunité.

1 Introduction

1.1 Ontogénie

1.1.1 Hématopoïèse et granulopoïèse

Les neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs) sont produits chaque jour en grand nombre (10^{11}) à partir de la moelle osseuse par le phénomène d'hématopoïèse qui assure la génération des cellules du système immunitaire (Borregaard, 2010). Principalement véhiculées par la circulation sanguine, ces cellules, entièrement différenciées, sont aptes à répondre rapidement aux agressions, nécessitant ainsi d'être continuellement renouvelées. Ce processus repose sur la particularité des cellules souches pluripotentes (pluripotent hematopoietic stem cells ou HSCs) (Weissman et al, 2001). En effet, ces cellules souches hématopoïétiques sont caractérisées, d'une part, par leur capacité à se diviser, afin d'assurer le renouvellement de cellules souches pluripotentes, et d'autre part, par leur potentiel de différenciation afin de s'engager dans la lignée myéloïde ou lymphoïde (Shizuru et al., 2005; Weissman, 2000; Weissman et al, 2001). Les HSCs représentent une très faible proportion des cellules de la moelle osseuse et sont marquées par l'absence d'engagement précis (Lin-) (Stem Cells, 2001). Divers facteurs de croissance et cytokines sont indispensables au phénomène d'hématopoïèse. Citons entre autre, L'IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7 et IL-11, le Stem Cell Factor (SCF), les Colony Stimulating Factor (CSFs) dont le Granulocyte-CSF (G-CSF), le Macrophage-CSF (M-CSF) et le GranulocyteMacrophage-CSF (GM-CSF) et le Tumor Growth Factor- β (TGF- β) (Attar, 2004; Dempke et al., 2000; Seita et Weissman,2010). Les cellules souches myéloïdes et lymphoïdes possèdent un pouvoir de renouvellement et de différenciation inférieur à leurs prédécesseurs mais tout de même important (Akashi et al., 2000; Stem Cells, 2001). Ils peuvent donc se différencier, générant ainsi des cellules souches engagés dans une lignée précise (Lin+), soit lymphoïde ou myéloïde. Sous l'influence de certains facteurs, principalement du GM-CSF, de l'IL-1 et de l'IL-3, les progéniteurs myéloïdes (CFU-GEMM) se différencient. Au cours de leur différenciation, ces cellules donnent ainsi naissance aux progéniteurs érythrocytaires (BFU-

E ou Burst Forming Unit), mégacaryocytaires (CFU-Meg ou Colony Forming Unit-megakaryocyte) et myélocytaires (CFU-GM ou Colony Forming Unit-Granulocytes Macrophage) (Figure 1). Pour leur part, les cellules souches lymphoïdes engendrent les lymphocytes B, T, et les cellules NK selon les stimuli et facteurs de croissance sécrétés (Akashi et al, 2000). Les BFU-E, CFU-Meg, CFU-Eosinophile (CFU-Eo) et CFU-Basophile (CFU-Bas) permettront, respectivement, l'élaboration de précurseurs des érythrocytes, des plaquettes, des eosinophiles et des basophiles. Le CFU-GM peut se différencier davantage afin de s'engager dans une des deux lignées qui favorisera, soit la production de macrophages/monocytes ou soit dans la production de neutrophiles, sous l'action du M-CSF et du G-CSF respectivement. La différenciation des précurseurs granulocytaires en cellules matures est ensuite assurée par le phénomène de la granulopoïèse.

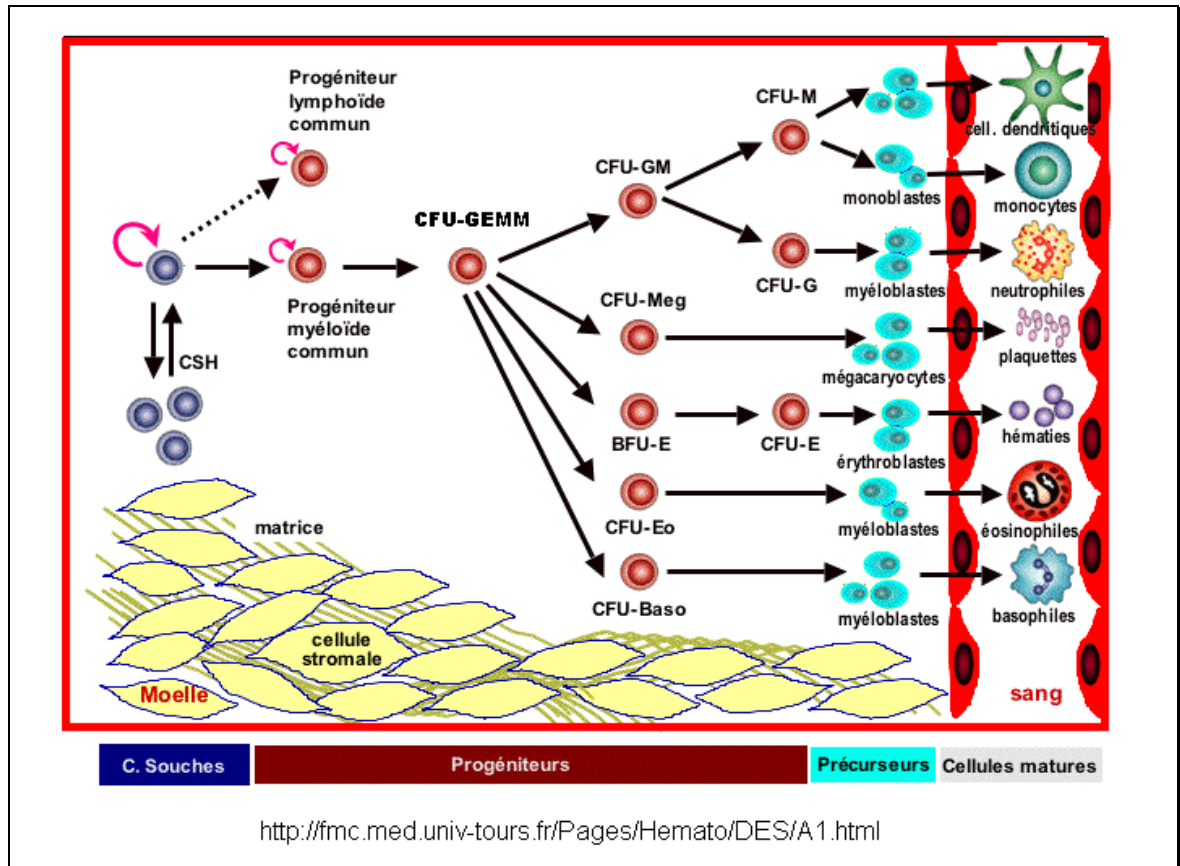


Figure 1 : Diagramme d'hématopoïèse.

La génération des cellules du système immunitaire est assurée par le phénomène d'hématopoïèse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pluripotentes. La présence de cytokines et facteurs de croissance dirige, dans un premier temps, le processus vers la formation des cellules souches myéloïdes ou lymphoïdes. Les cellules myéloïdes matures retrouvées dans la circulation sanguine proviennent d'un même progéniteur soit, les CFU-GEMM (Colony-Forming Unit-Granulocyte, Érythrocyte, Monocyte/macrophage, Megakaryocyte). La présence de facteurs restreints, tels L'Epo, le TPO, le M-CSF et le G-CSF permet ensuite l'élaboration spécifique des précurseurs (<http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DES/A1.html>).

Les neutrophiles acquièrent leurs diverses fonctions ultérieurement lors de leur différenciation en granulocytes : la granulopoïèse (Figure 2). Durant ce phénomène de différenciation, les neutrophiles subissent divers changements caractéristiques de leur développement dont, la conception des granules, l'apparition des molécules de surface et des récepteurs. Les stades myéloblastes, promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, neutrophiles bandes et neutrophiles segmentés permettent l'acquisition des fonctions particulières du neutrophile lors de la différenciation (Borregaard, 2010). Le stade myéloblaste est caractérisé par la présence d'un noyau immature. Son cytoplasme est très peu dense et forme un léger anneau dénudé de granules. Cette étape de maturation est marquée par l'acquisition du CD15 à la surface des neutrophiles (Elghetany, 2002). Ce marqueur granulocytaire est absent des CFU-GM. Les myéloblastes expriment le CD64. Ce n'est qu'au stade promyélocyte que l'on distingue la formation de granules azurophiles (Faurischou et Borregaard, 2003; Hägar et al., 2010). Lors de ce stage, les cellules deviennent plus grosses, possèdent des nucléoles distincts. Il est marqué par l'apparition du CD66b, un marqueur typique des granulocytes impliqué dans les interactions cellulaires (Elghetany, 2002 ; Ge et Elghetany, 2005). Le stade suivant, les myélocytes, fait intervenir l'apparition des granules spécifiques telles la lactoferrin, la gélatinase (Faurischou et Borregaard, 2003; Hägar et al., 2010; Kuijpers, 2002). Des récepteurs de fonctionnalité se développent également, dont le CD11b et CD11c. Ces derniers sont impliqués dans l'adhésion et lient les fragments iC3b produits lors l'activation de la cascade du complément (Elthegeany, 2002). Lors du stade métamyélocyte, le noyau prend la forme d'un rein ou encore d'une fève. Au fur et à mesure que le métamyélocyte se différencie, son noyau s'allonge et se condense. Durant cette progression, l'expression du Fc γ RIIIb, soit le CD16b, se fait de plus en plus importante alors que l'expression du CD49d et du CD49e diminue graduellement pour atteindre de faible niveau. Au stade suivant du neutrophile bande, le noyau possède maintenant la forme d'un S ou d'un C. Il est caractérisé par l'apparition des granules tertiaires (Faurischou et Borregaard, 2003; Hägar et al., 2010; Kuijpers, 2002). Cette étape de maturation est également marquée par la disparition du

CD64, soit le Fc γ RI. Finalement, le neutrophile mature possède un noyau multilobé composé de 3 à 5 segments. Ce sont ces PMNs que l'on retrouve dans la circulation. Typiquement, ces neutrophiles matures expriment le CD11/CD18, CD15, CD16b, CD32, CD35, CD62L, CD66b et le CD162 (Elghetany, 2002).

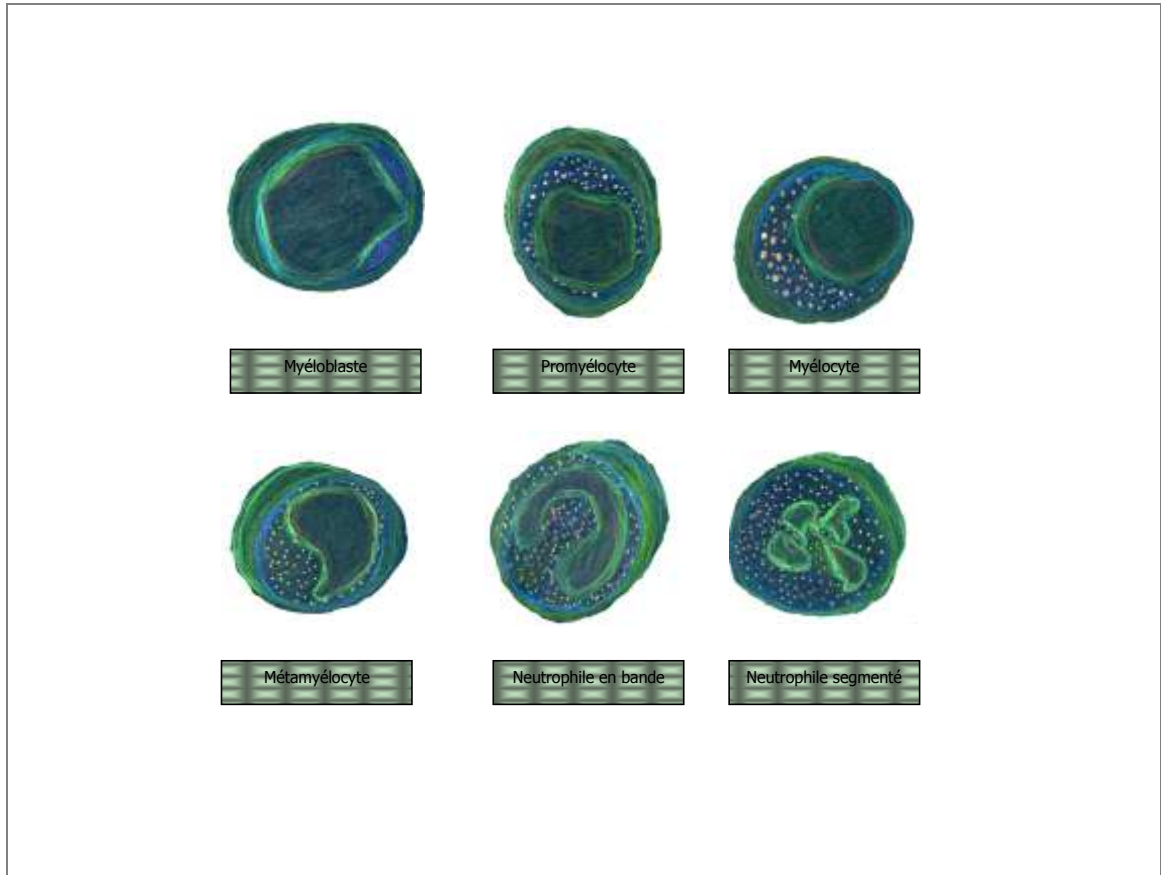


Figure 2 : Stages de différenciation des précurseurs des neutrophiles.

La maturation du neutrophile s'effectue à partir des progéniteurs granulocytaires (CFU-G) qui acquièrent successivement leurs diverses fonctions à travers les stades myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, neutrophile en bande pour finalement produire des neutrophiles matures que l'on retrouve en périphérie.

(Adaptation de Kuijpres, 2002)

1.2 Les Caractéristiques des Neutrophiles

1.2.1 Les molécules d'adhésion.

1.2.1.1 Les Sélectines

Les sélectines représentent des molécules d'adhésion impliquées dans la migration des leucocytes (Simon et Green, 2005). La famille des sélectines (CD62) comporte trois membres: la sélectine-L (CD62L), la sélectine-P (CD62P) et la sélectine-E (CD62E) (Morgan et al., 2005). Les sélectines sont aptes à interagir avec une multitude de ligands dont le plus important est le PSGL-1 (platelet sialoglycoprotein ligand-1) (Morgan et al., 2005; Simon et Green, 2005). Ce ligand est exprimé chez les neutrophiles matures et peut être induit chez les cellules endothéliales activées. La sélectine-L (CD62L) représente la sélectine des leucocytes. Cette dernière est constitutivement exprimée chez les neutrophiles mais peut être induite chez d'autres leucocytes suivant leur activation. On lui attribue un rôle important dans la stabilisation du roulement (Simon et Green, 2005). Les sélectines-P et E sont quant à elles impliquées dans la phase précoce de la migration. Elles font référence aux sélectines exprimées sur les plaquettes et les cellules endothéliales respectivement.

1.2.1.2 Les intégrines

Les intégrines représentent une deuxième famille de molécules d'adhésion essentielles au processus de migration leucocytaire. Ces glycoprotéines transmembranaires de type I sont formées de deux sous-unités, la chaîne α et la chaîne β , liées de façon non-covalente (Plow et al., 2000). Les leucocytes expriment plusieurs membres appartenant à la sous-famille des β_2 -intégrines (CD18). Ces intégrines leucocytaires ont en commun une chaîne β identique, soit la β_2 , associée à une chaîne α différente (CD11a-d). Les leucocytes

expriment, entre autre, les chaînes $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18), $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18), $\alpha_C\beta_2$ (CD11c/CD18) et $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18) (Simon et al., 2009; Wang et al., 2005). Ils expriment également des intégrines appartenant à la sous-famille des β_1 -intégrines (CD29). Les β_1 -intégrines peuvent être associées à six chaînes α différentes soient α_1 - α_6 (CD49a-f/CD29) (Laudanna et Alon, 2006; Simon et Green, 2005). À la surface des neutrophiles, les quatre membres des β_2 -intégrines sont exprimés ainsi que le CD49d/CD29 (Yusuf-Makagiansar et al., 2002). L'implication des intégrines dans le processus de migration dépend de l'interaction de ces molécules d'adhésion avec divers ligands dont la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1 ou CD54) exprimée sur l'épithélium vasculaire activé. Le CD11a/CD18 peut également interagir avec les molécules ICAM-2 et ICAM-3 mais c'est avec l'ICAM-1 qu'il possède le plus d'affinité (Laudanna et Alon, 2006). Quant au CD11b/CD18, il peut lier une variété importante de ligands tels, le fragment iC3b de la cascade du complément, la fibronectine, la vitronectine, la laminine, le collagène, l'ICAM-1, l'ICAM-2, l'albumine, la myéloperoxydase, l'élastase, l'héparine et le zymosan (Simon and Green, 2005).

1.2.2 Les récepteurs Fc γ

Les récepteurs Fc γ (Fc γ R) sont nommés ainsi par leur capacité à lier la partie Fc des immunoglobulines (Ig). L'engagement des Fc γ R avec leur ligand peut engendrer une multitude d'évènements dont la phagocytose, la cytotoxicité dépendante d'anticorps (ADCC) de même que la sécrétion de cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires. Il existe trois catégories de Fc γ R : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIII (CD16). Ces derniers sont responsables de la capture et l'internalisation des corps étrangers opsonisés et des complexes immuns (Nagarajan et al., 2005) Le CD32 et le CD16b sont des Fc γ R constitutivement exprimés chez les neutrophiles (Chuang et al. 2000; Youinou et al., 2002). Bien que le Fc γ RI soit observable lors de la formation des neutrophiles, ce récepteur n'est pas exprimé à la surface du neutrophile mature. Cependant, sous l'influence de l'IFN- γ ou du G-CSF, il est possible d'induire son expression (Garcia-Garcia et Rosales, 2002 ; Elghetany et Davis, 2005). Le CD32 constitue le Fc γ R le plus largement distribué. Le CD16 est le Fc γ R le plus exprimé chez les neutrophiles (Garcia-Garcia et Rosales, 2002). Ces derniers expriment un isoforme bien précis soit le CD16b. (Durand et al., 2002 ; Nagarajan et al., 2005 ; Youinou et al., 2002).

1.2.3 Les granules cytoplasmiques

Les granules constituent un élément important du développement des neutrophiles matures. En effet, le contenu de ces derniers joue un rôle indispensable dans la première ligne de défense lors de nombreuses infections. Ils renferment divers produits bactéricides, bactériostatiques et protéolytiques qui permettent aux neutrophiles d'effectuer une de leurs principales fonctions, soit l'élimination d'un corps étranger. Les neutrophiles sont caractérisés par la présence de trois types majeurs de granules dont les granules azurophiles, les granules spécifiques et finalement, les granules tertiaires. La diversité des granules est acquise à différentes étapes de la granulopoïèse. Leur contenu granulaire est

livré soit au phagosome ou encore à l'extérieur de la cellule par exocytose (Faurischou et Borregaard, 2003).

1.2.3.1 Les granules azurophiles

Les premiers granules formés lors de la différenciation des neutrophiles sont les granules azurophiles. Acquis dès le stade promyélocyte, ces granules sont caractérisés par leur haut contenu en myéloperoxydase (MPO) (Hägar et al., 2010; Faurischou et Borregaard, 2003; Kuijpers, 2002). Ils contiennent plusieurs protéases et peptides possédant un pouvoir antimicrobien. Ces granules, dits aussi primaires, expriment à leur surface la granulophysin soit le CD63 (Botelho et al. 2002). Il existe également d'autres protéines constituant les granules azurophiles qui sont encrées à la membrane. Le CD68, la presenilin, la stomatin ainsi que les pompes à protons de type-V H⁺-ATPase (vacuolar-type H⁺-ATPase) ont été décrits chez les neutrophiles (Feuk-Lagerstedt et al., 2002; Mirinics et al., 2002). La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme prédominante chez les granules azurophiles (Faurischou et Borregaard, 2003; Kuijpers, 2002). Cette enzyme transforme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) généré par la NADPH oxydase en produits encore plus toxiques. Ces dérivés oxygénés, ou Reactive Oxygen Species (ROS), s'attaque à la paroi des différents agents infectieux rencontrés (Klebanoff, 2007). Entre autre, ces ROS modifient les molécules telles les acides gras polyinsaturés des membranes lipidiques, les protéines essentielles ainsi que l'ADN (Hayes et McLellan, 1999). Outre leurs effets antimicrobiens, les ROS sont responsables du dommage tissulaire observé lors de stress oxydatif. Ainsi, ces dérivés, produits par les PMN, peuvent également perturber le potentiel membranaire des mitochondries, causer d'importants dommages tissulaires et participer ainsi au mécanisme de mort cellulaire des PMN (voir section 1.4.1.3) (Lavastre et al., 2002 Von Gunten et Simon, 2007). La défensine et la BPI constituent également un élément important des granules primaires. (Cowland et Borregaard, 1999; Kuijpers, 2002). La BPI et les défensines possèdent une activité anti-microbienne importante contre divers types de pathogènes. On retrouve également dans les granules primaires l'élastase, la cathepsin G de

même que la protéinase-3 faisant partie de la famille des sérines protéases qui sont reconnues pour leur puissant pouvoir protéolytique.

1.2.3.2 Les granules spécifiques

Les granules spécifiques font leur apparition à partir du stade myélocyte. Ils possèdent une bonne activité bactéricide conférée par divers constituants tels le lysozyme, la lactoferrine, NGAL et hCAP-18 (human Cathelicidin Antibacterial-binding Proteins-18) (Faurischou et Borregaard, 2003). Elles sont également caractérisées par la présence de collagénase (MMP-8), du cytochrome b558 de même que par les molécules d'adhésion CD11b/CD18 formant le complexe de signalisation du CR3. La lactoferrine est une composante majeure des granules spécifiques. Cette glycoprotéine de 78kDa possède une activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries gram+ et gram- (van der Velden et al., 2008; Ward et al., 2008). Tout comme la lactoferrine, le peptide NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) possède lui aussi une activité bactériostatique. Ce peptide de 25kDa se lie aux sidérophores des bactéries (Chakraborty et al., 2008; Goetz et al., 2002; Karlsen et al., 2010). Bien que les lysozymes soient présents dans plus d'un type de granules dont les granules azurophiles, spécifiques et tertiaires, leur concentration s'accroît chez les granules spécifiques (Cowland et Borregaard, 1999). Les granules spécifiques sont aussi constituées du cytochrome b558. Comme chez les granules azurophiles, on y trouve également des enzymes protéolytiques, principalement la collagénase (MMP-8). En plus des divers produits bactéricides et bactériostatiques, les granules spécifiques renferment des molécules de surface telles CD15, CD11b/CD18 et CD66 (Borregaard et al., 2007).

1.2.3.3 Les granules tertiaires

Les granules tertiaires sont caractérisés par leur haut contenu en gélatinase ou (métalloprotéinase-9 MMP-9). La concentration en MMP-9 atteint de haut niveau lors des stades bande et segmenté du développement du neutrophile (Faurischou et Borregaard,

2003; Kuijpers, 2002). Elles sont spécialisées dans la dégradation de composantes primordiales de la matrice extracellulaire. On leur attribue également un rôle important dans l'extravasation et la migration des neutrophiles (Kang et al, 2001; Owen et Campbell, 1999) Ces granules comportent également une quantité appréciable de leucolysine (MMP-25) (Kang et al., 2001; Pei, 1999). Les neutrophiles renferment également des vésicules de sécrétion. Les vésicules sont les premières à être mobilisées lors d'une réponse inflammatoire. Elles sont particulièrement importantes puisqu'elles contiennent plusieurs récepteurs membranaires essentiels à l'interaction cellulaire. Parmi ces dernières, citons la présence de molécules de surface dont le CD16, le CD11b/CD18, le CR1, le C1q-R (récepteur pour le fragment C1q de la cascade du complément) et le fmlp-R (récepteur *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) (Borregaard et al., 2007; Faurschou et Borregaard, 2003).

Tableau 1 : Principaux constituants des granules et des vésicules de sécrétion retrouvés chez les neutrophiles

Granules Azurophiles	Granules Spécifiques	Granules Tertiaires	Vésicules de Sécrétion
Localisation Membranaire			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	CD11b/CD18
CD68	CD15	Cytochrome b ₅₅₈	CD16
Preseniline	CD66	Leukolysine (MMP-25)	CD14
Stomatine	Cytochrome b ₅₅₈	V-type H ⁺ -ATPase	CR1
V-type H ⁺ -ATPase	Trombospondine-R		C1q-Rc Fmlp-Rc Leukolysine (MMP-25)
Localisation matricielle			
α1-antitrypsine	Collagénase (MMP-8)	Gélatinase (MMP-9)	Protéines sériques :
BPI	hCAP-18		Albumine
MPO	Lactoferrine		
Élastase	Lysozyme		
Cathepsines	NGAL		
Défensine			
Azurocidine			
Protéinase-3			

(Adaptation de Cowland et Borregaard, 1999; Faurschou et Borregaard, 2003)

1.3 Les Fonctions des neutrophiles

1.3.1 La Chimiotaxie

La chimiotaxie représente un phénomène de migration qui fait intervenir plusieurs interactions cellulaires indispensables au processus. Elle permet aux neutrophiles de quitter la circulation sanguine pour se rendre au site de lésion afin d'agir comme première ligne de défense envers divers agents infectieux. On peut séparer le chimiotactisme en cinq phases distinctes, soient la capture, le roulement, l'adhésion, la diapédèse et finalement, la migration. Ces étapes sont, entre autre, étroitement régulées par les chémokines, les molécules d'adhésion et les granules cytoplasmiques.

Afin de quitter la circulation sanguine, les neutrophiles doivent d'abord interagir avec l'endothélium vasculaire pour faciliter leur ralentissement face au flot sanguin auquel ils sont soumis. La capture et le rapprochement des neutrophiles avec d'endothélium vasculaire s'effectuent grâce aux interactions hétérotypiques des sélectines avec leur ligand. Suivant un stimulus inflammatoire, l'expression du PSGL-1 est induite à la surface des cellules épithéliales. Ce ligand interagit avec la sélectine-L (CD62L) qui est constitutivement exprimée sur les neutrophiles. L'étape de capture et rapprochement est davantage amplifiée par des interactions homotypiques (Borregaard, 2010; Simon et Green, 2005). La présence de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires tels la thrombine et l'histamine vont également agir au niveau des cellules endothéliales afin de solliciter les granules cytoplasmiques qui permettront l'expression des sélectine-E (CD62E) et des sélectine-P (CD62P). Ces sélectines sont particulièrement importantes dans le phénomène de roulement des leucocytes sur l'épithélium vasculaire. La progression du roulement vers une adhésion ferme constitue une étape critique du processus chimiotactisme (Reedy et al., 2010). Cette transition est possible grâce à la mobilisation des intégrines. Les neutrophiles

ainsi activés vont exprimer à leur surface les β_2 -intégrines par la mobilisation des vésicules de sécrétion. Parallèlement, les cellules endothéliales vasculaires vont présenter à leur surface les ligands de ces intégrines, plus particulièrement les ICAM-1 et ICAM-2. La présence de peptides chimiotactiques et de facteurs de croissance, tels le platelet activating factor (PAF), l'interleukine-8 (IL-8), le macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1 β) et le granulocytes-macrophages colony stimulating factor (GM-CSF) est également responsable de la progression du roulement vers l'adhésion ferme en augmentant l'affinité et l'avidité des β_2 -intégrines envers leur ligand (Simon et Green, 2005). Mis à part les intégrines, d'autres membres appartenant à la superfamille des Ig, sont également impliqués lors de la chimiotaxie, soit le platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) et le junctional adhesion molecule-A (JAM-A). Ces molécules sont présentes sur la région apicale des jonctions inter-endothéliales ainsi que sur les neutrophiles (Borregaard, 2010; Kakkar et Lefer, 2004; Weber, 2003). L'interaction de ces molécules avec leurs homologues dirige la diapédèse. Le passage des neutrophiles à travers l'épithélium vasculaire et par la suite la migration vers le site de lésions nécessitent également la mobilisation des granules tertiaires contenues dans les neutrophiles (Fauschou et Borregaard, 2003). Ces granules renferment plusieurs protéases qui permettront la digestion des composantes cellulaires de la membrane basale et des composantes matricielles, dont le collagène de type-IV et V.

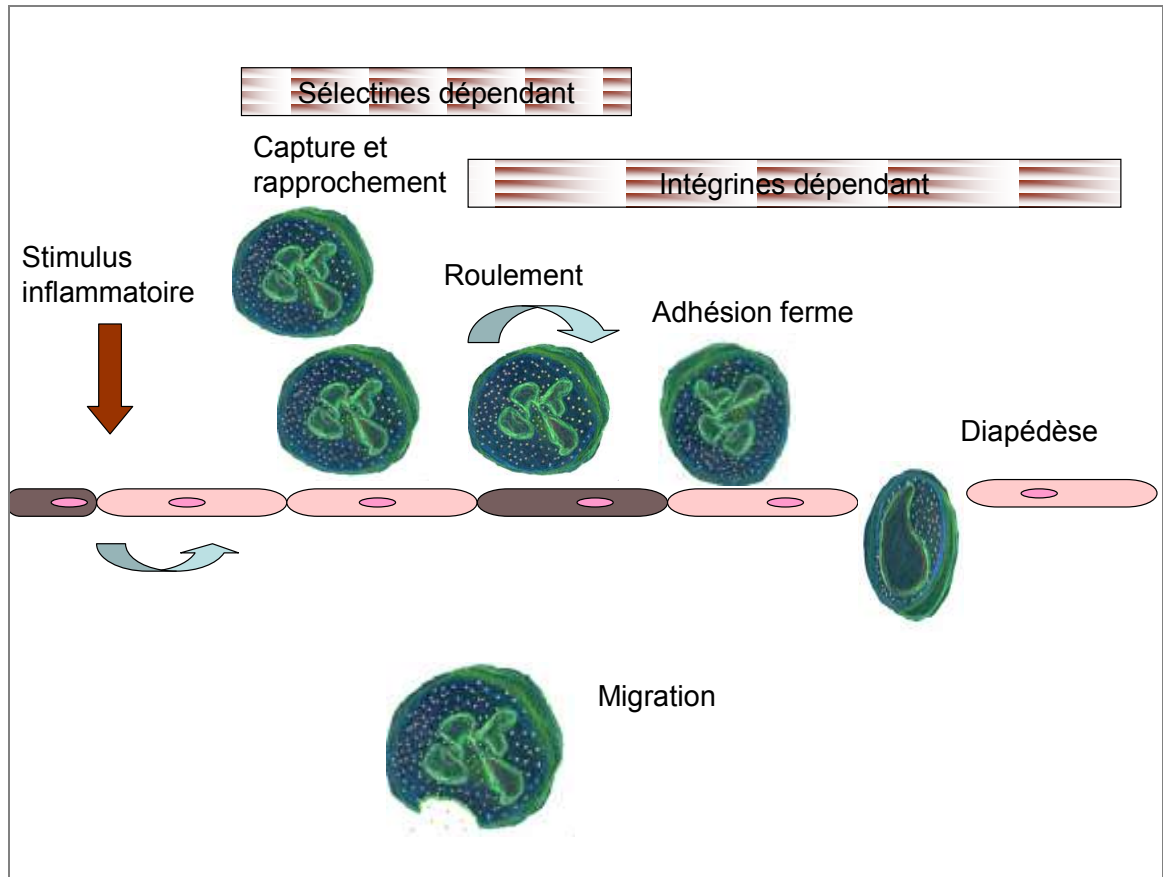


Figure 3 : Processus séquentielle de la capture, du roulement, de l'adhésion, de la diapédèse et de la migration des neutrophiles lors de la chimiotaxie.

La première phase de capture et de rapprochement des neutrophiles avec l'épithélium vasculaire ainsi qu'avec les neutrophiles circulants dépend de l'interaction des sélectines avec leurs ligands. L'étape de roulement est également dépendante des sélectines, dont le CD62P et CD62E mais également des intégrines. L'activation des intégrines permet l'adhésion ferme des neutrophiles et la mobilisation des granules cytoplasmiques nécessaires à la diapédèse et à la migration (Adaptation de Wright et al., 2010).

1.3.2 La Phagocytose

Une fois sur les lieux, le neutrophile peut remplir sa tâche via de multiples fonctions. L'une des principales fonctions est la phagocytose. Ce mécanisme s'effectue en diverses étapes soit : la reconnaissance, l'internalisation et l'élimination de l'agent infectieux rencontré.

1.3.2.1 La Reconnaissance et la Capture

Afin d'interagir avec le corps étranger dans le but de l'éliminer, les neutrophiles possèdent différentes stratégies permettant la reconnaissance d'antigènes. Le processus de reconnaissance et de capture peut être dépendant ou indépendant des opsonines (Botelho et al., 2004).

1.3.2.1.1 *Processus indépendant des opsonines*

En absence d'opsonine, certaines composantes conservées des pathogènes, les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), peuvent être directement reconnues par les neutrophiles (Barton et Medzhitov, 2002 ; Medzhitov, 2001). Ces structures complexes font souvent partie intégrante de la paroi des organismes. Le LPS est une composante intégrale de la membrane des bactéries Gram-. Chez les bactéries Gram+ et les mycobactéries, ce sont les peptidoglycans (PNG), l'acide lipoteichoïque (LTA), les glycoprotéines de même que les lipoprotéines qui sont considérés antigéniques (Takeda et Akira, 2004). L'interaction des organismes avec les PMN est possible grâce à l'existence de molécules de surface liant ces structures conservées dont le CD14, les récepteurs dits "scavenger", les récepteurs à mannose, galactose, β -glucan et les récepteurs Toll (TLRs) retrouvés à la surface des neutrophiles qui permettent la distinction et la reconnaissance des antigènes étrangers (Hayashi et al., 2003 ; Kwiatkowska et Sobota, 1999; Schutt, 1999 ;

Underhill et Ozinsky, 2002). Les TLRs lient plusieurs composantes pathogéniques dont le LPS, le PNG, lipoprotéines bactériennes, le zymosan ainsi que les acides nucléiques. Il existe présentement dix récepteurs Toll humains connus. Ainsi, on sait maintenant que la reconnaissance du LPS des bactéries Gram- s'effectue principalement via le TLR-4. Ce mécanisme a recours à des molécules accessoires solubles et de surface dont, la protéine liant le LPS (LBP), la protéine MD-2 et le CD14 (Barton et Medzhitov ; 2002 ; Medzhitov, 2001 ; Parker et al., 2005). La protection contre les bactéries Gram+ est en partie assurée par le TLR-2. Il est impliqué dans la reconnaissance des peptidoglycans, d'acide lipoteichoïque (LTA), des lipoprotéines, et du zymosan. Quant au TLR-9, ce dernier reconnaît les nucléotides ou motifs CpG de l'ADN bactérien. On croit que ces motifs peuvent lier et engager le TLR-9 (Aliprantis et al., 2000). Les flagelles des bactéries peuvent également servir de ligands pour les récepteurs Toll. En effet, le TLR-5 lie la flagelline, protéine constituant les flagelles bactériens. L'engagement des TLRs engendre une cascade de signalisation cellulaire conduisant à l'activation du facteur de transcription NF κ B (Aliprantis et al., 2000). Bien que l'on croyait que la reconnaissance des antigènes dans l'immunité innée s'effectuait de façon non spécifique, aujourd'hui, on constate l'existence de récepteurs spécifiques élaborés afin d'évoquer une réponse immunitaire suivant la nature du corps étranger. (Barton et Medzhitov, 2002 ; Takeda et Akira, 2004)

1.3.2.1.2 Processus dépendant des opsonines

Les neutrophiles peuvent également interagir de façon indirecte avec le corps étranger dans le but de l'éliminer. Ce processus est possible grâce à la présence d'opsonines produites par l'hôte (Kobayashi et al., 2003). Parmi ces opsonines, les immunoglobulines G (IgG) ainsi que les fragments issus de l'activation de la cascade du complément (iC3b) représentent des molécules typiques de cette famille (Lee et al., 2003 ; Vieira et al., 2002). L'interaction des neutrophiles avec ces opsonines s'effectue principalement via les récepteurs de surface Fc de même que les intégrines appartenant à la famille des β_2 -intégrines (Lee et al., 2003). Les principaux récepteurs Fc γ exprimés à la surface des

neutrophiles sont le CD32 (Fc γ RIIA) et le CD16b (Fc γ RIIIb). Les neutrophiles expriment également le CD64 (Fc γ RI) une fois activés (Garcia-Gracia et Rosales, 2002). Le fragment iC3b est, quant à lui, reconnu par la β_2 -intégrine CD11b/CD18. La capture de l'antigène peut donc être dirigée. L'engagement des récepteurs Fc permet alors à la cellule hôte d'enclencher le processus suivant soit : l'internalisation (Lee et al., 2003).

1.3.2.2 L'Internalisation

La cascade de signalisation cellulaire engendrée lors de l'engagement d'un récepteur avec son ligand permet l'activation d'une multitude de médiateurs. Premièrement, cet engagement provoque le recrutement des Fc γ R dans un même endroit de la membrane plasmique, soit au niveau des lipides raft (Aman et Ravichandran, 2000; Brown et London, 2000; Cheng et al., 1999; Garcia-Garcia et Rosales, 2002; Guo et al., 2000; Kwiatkowska et Sobota, 2001; Lee, 2003; Petrie et al., 2000). Les tyrosines kinases, appartenant à la famille Src (Rous sarcoma virus), sont ensuite responsables de la phosphorylation des résidus tyrosine retrouvés sur le domaine cytoplasmique des Fc γ R. Ceci permettra alors la mobilisation et la phosphorylation d'une autre tyrosine kinases appartenant à la famille ZAP-70 (zeta-associated protein), la Syk (Cooney et al., 2001; Korade-Mirnic et Corey, 2000; Turner et al., 2000). Cette dernière peut agir sur une multitude de substrats, dont la phospholipase C γ (PLC γ), la PI-3K ainsi que de petites GTPases appartenant à la famille Rho (Barabé et al., 2002; Garcia-Gracia et Rosales, 2002). De plus, un rôle pour la kinase ERK dans la phagocytose a été proposé (Garcia-Gracia et Rosales, 2002). La cascade de signalisation cellulaire engendrée permettra la formation du phagosome. Durant sa maturation, ce dernier interagit avec les vésicules cytoplasmiques de la cellule hôte. Ainsi le phagosome subira une acidification du lumen par acquisition de pompe de type ATPase (Lee, 2003). Éventuellement, le phagosome acquiert des propriétés lytiques par fusion ou échange de matériels avec les granules cytoplasmiques. Ces vésicules contiennent une multitude d'enzymes permettant l'élaboration de mécanismes de lyse indispensables à l'élimination du corps étranger.

1.3.2.3 L'Élimination

Les propriétés lytiques du neutrophile sont conférées par l'acquisition de granules lors de la granulopoïèse. Ainsi, il peut détruire le corps étranger en faisant appel à divers mécanismes, dépendants et indépendants de l'oxygène.

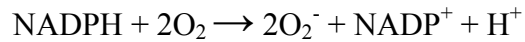
1.3.2.3.1 Les mécanismes dépendants de l'oxygène

Les principaux systèmes enzymatiques utilisés dans le mécanisme dépendant de l'oxygène sont la NADPH oxydase, la superoxyde dismutase (SOD), la myéloperoxidase (MPO) et la NO-synthase (nitric oxide synthase) (Babior, 2000). Lorsque ces systèmes sont activés, on assiste à la production de dérivés oxygénés et nitriques toxiques telles peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les anions superoxyde (O_2^-), les radicaux hydroxyles (OH), chlore monoxide (OCL), l'acide hypochlorique (HCL) et le monoxyde d'azote (NO). Ces derniers perturbent le corps étranger en altérant ses diverses composantes. Ainsi, ils modifient les lipides, les protéines, les glycans et les acides nucléiques.

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique formé par l'association de trois éléments indispensables à son activité. Le cytochrome b_{558} représente l'élément membranaire de ce complexe. Il est formé de deux sous-unités soient : une sous-unité α ($p22^{PHOX}$) et une sous-unité β ($gp91^{PHOX}$) (Babior et al., 2002). Les sous-unités $p67^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$, $p40^{PHOX}$ représentent les trois sous-unités cytoplasmiques formant le second élément. L'activité de cet enzyme dépend également de la présence d'un troisième élément soit d'une protéine de liaison de GTP telle Rac2 (Babior, 2004; Bokoch, 2005). La présence de médiateurs pro-inflammatoires (C_{5a} , fmlp, LTB_4 , chémokines) ou la capture d'un antigène par les neutrophiles engendre leur activation ce qui permet l'association du complexe NADPH oxydase nécessaire à sa fonction enzymatique (Figure 4). (Bokoch et Diebold, 2002; DerMardirossian et al., 2004). La NADPH oxydase est responsable de la production d'anions superoxyde (O_2^-) par la transformation de l'oxygène moléculaire (O_2)

via l'apport d'électrons libres (Klebanoff, 1999). Les anions superoxyde (O_2^-) ainsi formés dans les granules sont ensuite livrés au phagosome par contact transitoire communément appelé la théorie du "Kiss and run".

(NADPH oxydase)



Certains patients peuvent présenter une déficience de la NADPH oxydase. Cette condition pathologique héréditaire, la granulomatose septique chronique (CGD), est marquée par la défectuosité des phagocytes à élaborer les dérivés oxygénés appropriés nécessaires à l'action microbicide. Les patients atteints de cette maladie sont donc très vulnérables à plusieurs infections bactériennes et fongiques. La granulomatose septique chronique est liée à la défectuosité des différents éléments composant le complexe enzymatique de la NADPH oxydase (Lee et al., 2003).

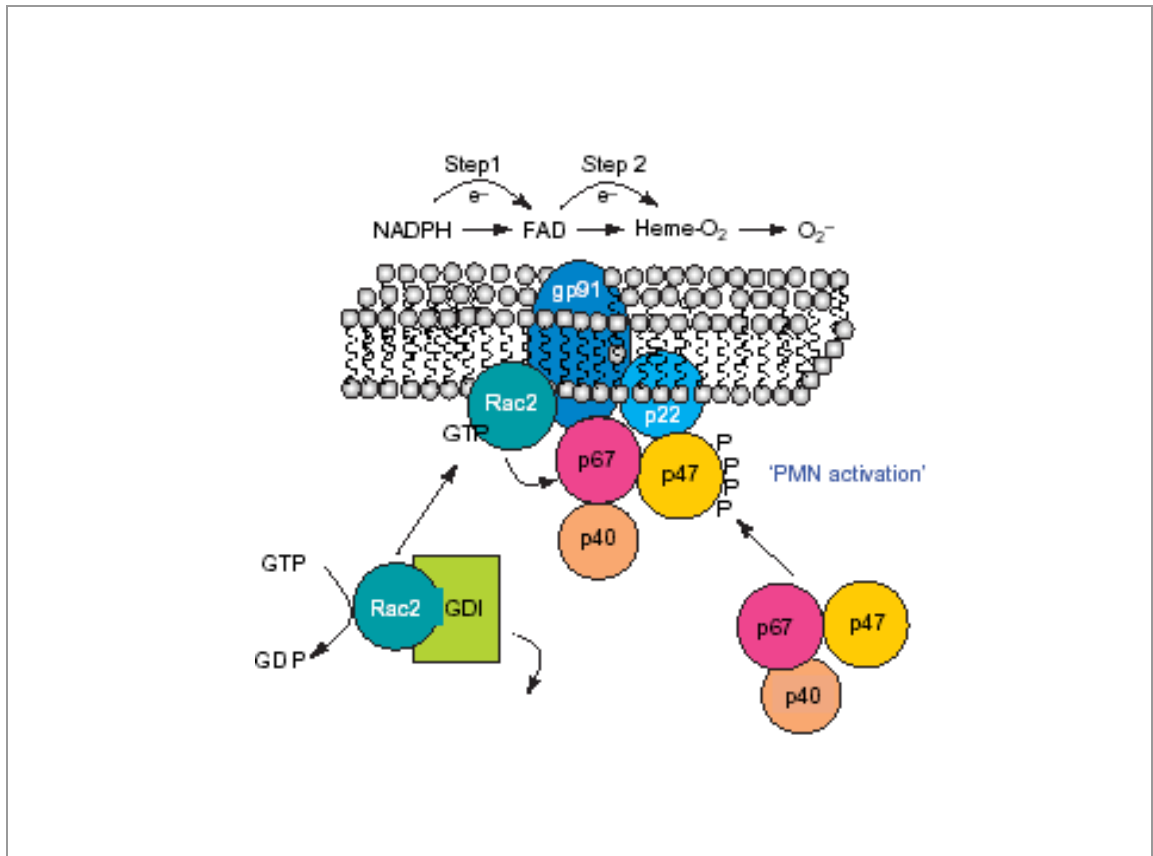
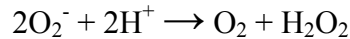


Figure 4 : Le complexe enzymatique NADPH oxydase.

La structure du complexe NADPH oxydase au repos est constituée seulement de l'élément membranaire, le cytochrome b₅₅₈. Suivant l'activation des phagocytes en présence des chémokines, des facteurs chimiotactiques ou d'antigènes particuliers, la NADPH oxydase est activée, entraînant ainsi l'assemblage des facteurs cytosoliques (Rac2, p47^{phox} et p67^{phox}) à l'élément membranaire. De cette association résulte une transition de conformation du flavocytochrome b₅₅₈ qui passe d'un état dormant à un état activé. Ainsi, la NADPH oxydase catalyse le transfert d'électrons de son substrat, le NADPH, à l'accepteur final, l'oxygène, entraînant la production d'anions superoxyde et ses dérivés de réduction : le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet. (Bokoch, 2005).

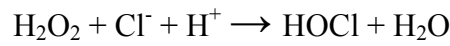
Quant à la superoxyde dismutase (SOD), découvert par McCord et Fridovich (1969), elle catalyse la dismutation des anions superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Babior, 2002).

(SOD)



La myéloperoxidase (MPO) est un enzyme typique des granules azurophiles. En présence d'halogénures tels le chlore (Cl^-), l'iode (I^-) et le brome (Br^-), la MPO transforme le H_2O_2 en acide hypochlorique ($HOCl$) (Klebanoff, 2005). L'acide hypochlorique ainsi formé représente un important mécanisme lytique dans la destruction des microorganismes par les PMN.

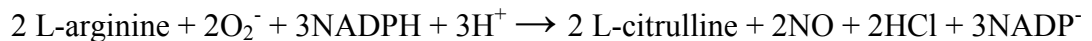
(MPO)



Des mutations génétiques peuvent affecter l'activité de la MPO menant à sa déficience. La déficience de cet enzyme est une condition pathologique commune et héréditaire. La déficience de la MPO est souvent asymptomatique. Les patients cliniquement diagnostiqués pour cette déficience sont davantage susceptibles aux candidoses (Babior, 2000).

La NO-synthase représente l'enzyme responsable de la génération de monoxyde d'azote. Il existe trois isoformes de la NO-synthase : deux exprimés constitutivement, dans l'endothélium (eNOS) et dans le système nerveux (nNOS) et un isoforme inductible (iNOS), exprimé par les phagocytes (Klebanoff, 2005). La production de monoxyde d'azote par la NO-synthase s'effectue à partir de l'arginine, de l'oxygène et du NADPH.

(NO-synthase)



La génération de ces divers dérivés nitriques et oxygénés lors du processus oxydatif, détient un rôle primordial dans la défense de l'hôte contre plusieurs agents infectieux. Leur nature toxique et réactive engendre plusieurs modifications physiologiques de l'agent ingéré. Entre autres, ces dérivés altèrent les lipides (peroxydation des lipides), les protéines, les glycans et les acides nucléiques. La toxicité de ces réactifs oxygénés peut également être néfaste pour l'hôte. D'ailleurs, elle est fortement impliquée dans diverses conditions pathologiques dont l'emphysème du fumeur, le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS), l'athérosclérose, la re-perfusion associée aux ischémies, le cancer et l'arthrite rhumatoïde (Babior, 2000).

1.3.2.3.2 Les mécanismes indépendants de l'oxygène

Les mécanismes indépendants de l'oxygène jouent également un rôle important dans la destruction du pathogène. Les granules cytoplasmiques des neutrophiles renferment une variété de polypeptides et d'enzymes lytiques acquis lors de la granulopoïèse qui participent à l'élimination de l'agent infectieux. Parmi ces derniers, on retrouve entre autre les α -défensines, la protéine BPI (bacterial membrane protein), les sérines protéases, l'azurocidine, le lysozyme et la lactoferrine.

Les défensines, contenues dans les granules azurophiles, possèdent une activité antimicrobienne importante. Elles perturbent l'intégrité membranaire de plusieurs pathogènes dont celle de certaines bactéries, des champignons, de certains virus enveloppés et des protozoaires. Leur pouvoir antimicrobien réside dans leur aptitude à former des pores transmembranaires (Ganz, 2003; Lundy et al., 2008;). Les défensines dégradent également le peptidoglycan des bactéries Gram+.

Les granules azurophiles contiennent également la protéine BPI. Elle s'attaque à la paroi des bactéries Gram- en liant et en modifiant le LPS. La liaison de la BPI au LPS des bactéries Gram- induit un réarrangement des lipides membranaires ce qui perturbe la croissance bactérienne et provoque des dommages membranaires importants (Steiner et al., 2009). De plus, les granules azurophiles renferment également de l'élastase, des cathepsines et la protéinase-3 qui possèdent une action protéolytique envers diverses composantes retrouvées dans la matrice extracellulaire dont l'élastine, la fibronectine, la laminine, la vitronectine et le collagène de type IV (Fauschou et Borregaard, 2003). L'azurocidine représente également un important polypeptide des granules azurophiles qui détient une action microbicide envers différents microorganismes dont *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Il est impliqué dans l'opsonisation et la phagocytose des bactéries gram+ *Staphylococcus aureus* par les

monocytes. Il est également impliqué dans le recrutement et l'activation des monocytes (Soehnlein et Lindbom, 2008).

Les granules spécifiques sont caractérisés par la présence de la lactoferrine et des lysozymes. La lactoferrine est une glycoprotéine de 78 kDa pouvant lier le fer ce qui lui permet de perturber la croissance bactérienne par séquestration du fer. Non seulement elle lie le fer, mais la lactoferrine peut également se lier aux membranes des bactéries par sa partie N-terminale. Ainsi, elle induit des dommages membranaires irréversibles qui entraînent la lyse des bactéries (van derVelden et al, 2008; Ward et al. 2008). Quant aux lysozymes, ils représentent de puissants peptides antimicrobiens (14 kDa) retrouvés dans tous les types de granules. Ces peptides agissent sur les parois des bactéries Gram+ en digérant les polymères de peptidoglycans leur conférant ainsi un pouvoir bactéricide. Les lysozymes peuvent également se lier au LPS des bactéries Gram- et modifier l'immunogénicité des lipides A (Callewaert et Michiels, 2010).

1.3.3 La formation du NETs (Neutrophil Extracellular Traps)

En 2004, Brinkmann et collaborateurs (2004) propose un mécanisme de lyse antimicrobien propre aux neutrophiles reposant sur la génération d'un réseau extracellulaire fibreux nommé NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Les observations décrites par les auteurs suggèrent que les neutrophiles stimulés en présence de cytokines ou d'endotoxines bactériennes produisent un réseau extracellulaire fibreux qui se lie aux bactéries Gram+ et Gram- empêchant ainsi leur propagation. Ce réseau est composé d'ADN d'histones ainsi que de protéines provenant des granules cytoplasmiques telles l'élastase, la cathepsine G, la myéloperoxydase, la lactoferrine et la gélatinase (Borregaard, 2010; Brinkmann et Zychlinsky, 2007). Le mécanisme exacte de la formation des NETs n'est pas complémenet connu. Lee et Grinstein (2004) proposent un modèle selon lequel les neutrophiles activés

auraient développé un processus actif d'extrusion de matériel nucléaire et d'exocytose des granules cytoplasmiques (Figure 5). Ce mécanisme pourrait également représenter un mécanisme de mort cellulaire alternatif à l'apoptose et à la nécrose (Yousefi et al., 2009).

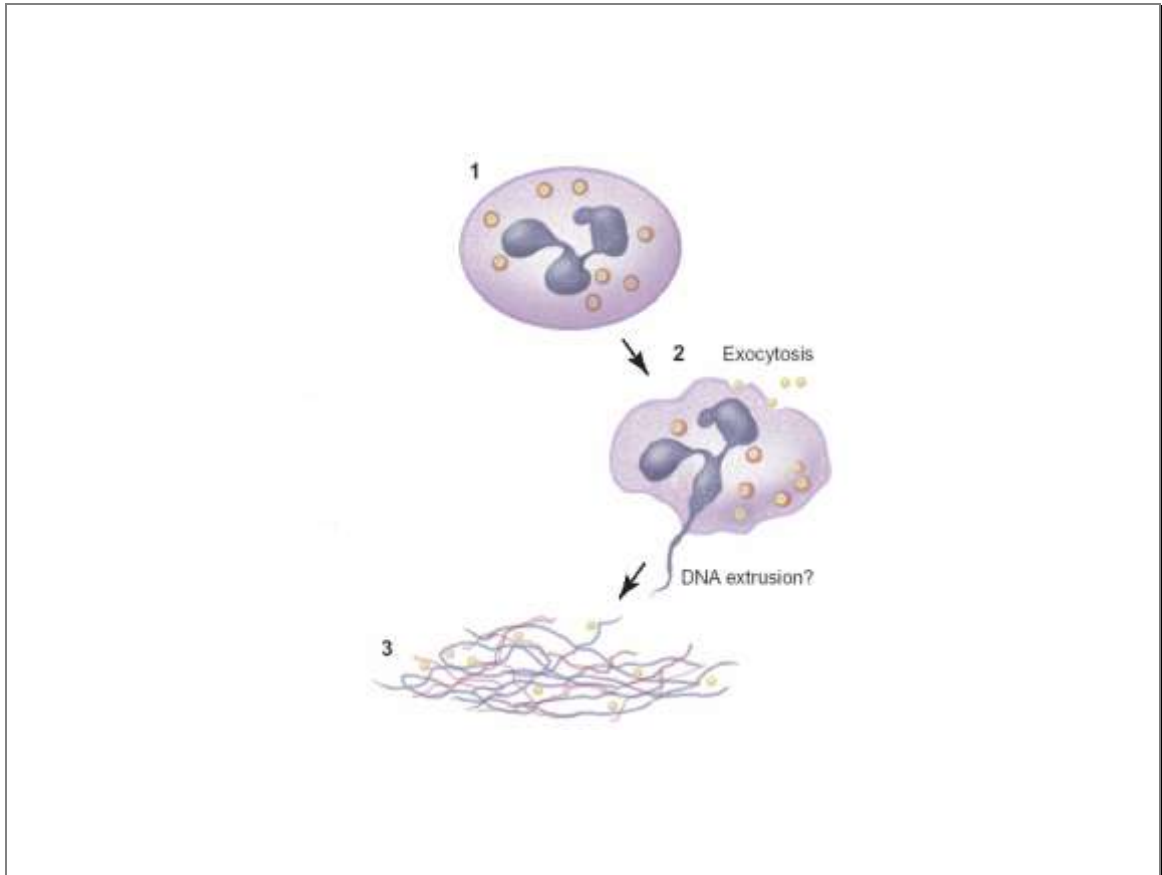


Figure 5 : La formation du NETs.

La stimulation des neutrophiles en présence de cytokines ou d'endotoxines bactériennes permet la formation d'un réseau extracellulaire fibreux, le NET. Ce réseau provient de l'extrusion active du matériel génétique et de la dégranulation des granules cytoplasmiques. Le NET ainsi formé emprisonne les bactéries et détruit les facteurs de virulence, limitant alors la propagation des bactéries.

(Adaptation de Brinkmann et al, 2004; Lee et Grinstein, 2004)

1.4 La Régulation et l'Homéostasie

Une fois l'internalisation et la destruction de l'agent infectieux accomplies par les neutrophiles, les divers produits toxiques que renferment les PMN doivent être éliminés judicieusement envers l'hôte. Ainsi les neutrophiles sont caractérisés par une courte durée de vie. La demi-vie des neutrophiles en circulation se situe entre 4hres et 10hres. Cette courte durée de vie est compensée par une production importante de PMN à partir de la moelle osseuse chaque jour. Elle produit environ 10^{11} PMN matures par le phénomène d'hématopoïèse afin de maintenir l'homéostasie. La mort cellulaire est impliquée dans plusieurs phénomènes physiologiques dont l'embryogenèse et la différenciation. Elle représente un mécanisme normal et indispensable au maintien de l'homéostasie des organismes.

1.4.1 La mort cellulaire

C'est au milieu des années 1960 que le terme de mort cellulaire programmée ou Programmed Cell Death (PCD) fait surface (Lockshin et et Zakeri, 2002). La forme de PCD la mieux définie et la plus commune est sans aucun doute l'apoptose, si bien que plusieurs investigateurs confondent souvent les deux termes (Jaattela et Tschopp, 2003). Anciennement, les formes de mort cellulaire se classifiaient en deux grands volets soient : l'apoptose et la nécrose. Cette classification repose sur les modifications morphologiques propres à chacun des processus. L'apoptose est une forme de PCD qui fait plutôt référence à un état morphologique particulier tributaire de l'activation des caspases (Lockshin et Zaheri, 2001). Maintenant, on reconnaît que des mécanismes de PCD puissent survenir indépendamment de l'activation des caspases (Liest et Jaattela, 2001a, 2001b; Lockshin et Zakeri, 2002; Von Gunten et Simon, 2007). Ces observations poussent donc la communauté scientifique à redéfinir les mécanismes de mort cellulaire. Il existe

présentement cinq formes différentes de mort cellulaire soit : l'apoptose, la nécrose, l'autophagie, la sénescence et la catastrophe mitotique (Okada et Mak, 2004). Parmi ces différents mécanismes, les plus approfondis sont, la nécrose, l'apoptose et récemment, l'autophagie.

1.4.1.1 L'autophagie

L'autophagie représente un mécanisme de mort cellulaire contrôlé souvent confondu avec la nécrose (Lockshin et Zakeri, 2002). Le démembrement cellulaire observé dans le processus autophagique est assuré par les enzymes lysosomiaux et protéosomiaux. Ces enzymes jouent un rôle indispensable dans le renouvellement de la réserve protéique (Kim et Klionsky, 2000; Klionsky, 2000). Bien que l'apoptose soit la forme de PDC la plus répandue, d'autres formes existent également notamment une forme indépendante de l'activation des caspases. Récemment, il a été proposé que l'autophagie constitue un mécanisme alternatif de PDC chez les PMNs stimulés en présence de chémokines et cytokines pro-inflammatoires (von Gunten et Simon, 2007). Il a été démontré *in vitro* que les PMNs, issus des patients atteints d'AR, meurent par un processus indépendant de l'activation des caspases (von Gunten et al., 2005). Tout comme l'apoptose, l'autophagie requiert la participation de molécules accessoires. Chez les PMNs, les ROS seraient impliqués dans ce mécanisme. Cependant, beaucoup d'information reste à obtenir concernant l'autophagie chez les neutrophiles ainsi que les mécanismes de PDC indépendants des caspases observés chez ces derniers.

1.4.1.2 La nécrose

La nécrose représente un mécanisme de mort cellulaire accidentelle et désorganisée. Elle est caractérisée par le gonflement des membranes cellulaires suivi de leur rupture. Cette rupture provoque ainsi un relâchement du contenu cytoplasmique dans l'environnement cellulaire. La lyse cellulaire engendrée lors de la nécrose active la réponse immunitaire contrairement à l'apoptose (Blagosklonny, 2000; Danial, 2004; Zornig et al.,

2001). Elle survient souvent par l'action de différents facteurs tels les poisons, les agents infectieux et le manque d'oxygène. Chez les neutrophiles, ce mécanisme de mort cellulaire représente un danger éminent étant donné l'arsenal enzymatique retrouvé dans les granules cytoplasmiques des PMN.

Ainsi, les neutrophiles adoptent plutôt certaines caractéristiques morphologiques leur permettant d'être reconnus et détruits par les cellules phagocytaires. Les changements, dont l'expression des résidus PS à la surface externe de la membrane cytoplasmique, la disparition du CD16b, du CD36, du CD14 et l'apparition de CD43, sont impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques. En effet, l'expression de motifs ACAMP (apoptotic cell associated molecular pattern), parmi lesquels figurent l'expression des résidus PS, du CD43 et de l'annexine-I, permet la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes (Gregory et Devitt, 2004). La présence de lipides peroxydés au niveau de la membrane représente également une caractéristique morphologique typique. De plus, les cellules phagocytaires sécrètent la thrombospondine qui forme un pont entre la cellule apoptotique et le phagocyte. Les cellules phagocytaires peuvent interagir avec la thrombospondine via certains récepteurs, dont le CD36 et le récepteurs de vitronectine (intégrine $\alpha\beta3$) ce qui engendre la production du TGF- β supprimant ainsi l'inflammation (Freire-de-Lima et al., 2000).

1.4.1.3 **L'apoptose**

L'état morphologique apoptotique est caractérisé par la condensation de la chromatine suivi de sa fragmentation. L'apoptose est également marquée d'une diminution dans la taille de la cellule, d'un changement dans sa forme ainsi que de la formation de corps apoptotiques (Darzynkiewicz, 2004). Les changements morphologiques observés lors de l'apoptose dépendent d'évènements biochimiques particuliers parmi lesquels l'activation des caspases détient un rôle central (Tableau 2). Parmi la multitude de molécules impliquées dans la régulation de l'apoptose, deux familles de protéines, soit la famille du Bcl-2 et celle des caspases, détiennent un rôle prédominant dans le mécanisme central de l'apoptose (Adams et Cory, 2007; Becker et al., 2004; Shi, 2002).

Tableau 2 : Évènements morphologiques et moléculaires rencontrés lors de l'apoptose

Évènements morphologiques	Évènements moléculaires et biochimiques
Rétrécissement de la taille cellulaire	Augmentation de l'influx calcique
Modification de la forme cellulaire (sphérique)	Déshydratation cellulaire
Condensation de la chromatine (Structure nucléaires invisibles, DNA hyperchromocity)	Déstabilisation des lipides membranaires (Exposition des résidus phosphatidylsérine (PS) à la surface cellulaire)
Ségrégation du nucléole	Activation de la cascade enzymatique des caspases (Activité protéolytique envers divers substrats)
Dissolution de l'enveloppe nucléaire	Activation des sérines protéases
Fragmentation nucléaire	Dégradation des filaments d'actine (F-actine)
Condensation du cytoplasme	Déstabilisation de la double-hélice d'ADN (Présence de fragment d'AND simple-brin)
Disparition des pseudopodes et microvilli	Dégradation de l'ADN sous l'action endonucléases (fragments de 50-300kb, Internucleosomal DNA cleavage)
Formation et bourgeonnement des corps apoptotiques	Activation des transglutaminases (tissue transglutaminases)
Élimination de cellules apoptotiques par phagocytose	
Détachement des cultures cellulaires de leur support de croissance	

(Adaptation de Darzynkiewicz, 2004)

1.4.1.3.1 *Les caspases*

Les caspases détiennent un rôle primordial dans le mécanisme apoptotique, influençant autant l'enclenchement du processus apoptotique, par les caspases initiatrices, que le démembrement cellulaire, par les caspases effectrices. L'enzyme responsable de la maturation de l'interleukine-1 β vers sa forme active, soit l'IL-1 β converting enzyme (ICE ou caspase-1) représente le premier membre de la famille des caspases à être identifié (Pop et Salvesen, 2009). Les études d'homologie ont rapidement mené à la découverte d'une grande famille de protéases, les caspases, qui se compose de quatorze membres différents tous exprimés sous forme de pro-enzyme (Wolf et Green, 1999).

1.4.1.3.1.1 Structure et fonction

Les divers membres de la famille des caspases partagent plusieurs similitudes de par leur structure et leur spécificité. Ces protéases sont exprimées sous forme zymogène constituées de trois domaines : un pro-domaine dans sa partie N-terminale, une grande sous-unité, qui contient le site enzymatique actif, suivie d'une petite sous-unité dans sa partie C-terminale (Figure 6). Le site actif se trouve dans la grande sous-unité à l'intérieur d'un motif tétra peptidique bien conservé (QACXG) (Salvesen et Riedl, 2008; Wolf and Green, 1999; Zimmermann et al., 2001). Les caspases sont des protéases hautement spécifiques dont l'activité dépend du clivage protéolytique suivant un résidu d'acide aspartique. Le pro-domaine et la grande sous-unité sont séparés par un site de clivage protéolytique alors que la grande et la petite sous-unité sont reliées par une région "linker" qui contient un ou deux site de clivage. Deux clivages protéolytiques sont donc essentiels à leur activation. Un premier clivage sépare la grande et la petite sous-unité alors que le second permet la libération du pro-domaine (Wolf and Green, 1999). La présence d'acide aspartique aux sites de clivage impliqués dans la maturation des caspases leur confère l'habilité de s'auto-activer ou d'être activées par d'autres caspases ce qui produit une amplification par cascade (Zimmermann et al., 2001).

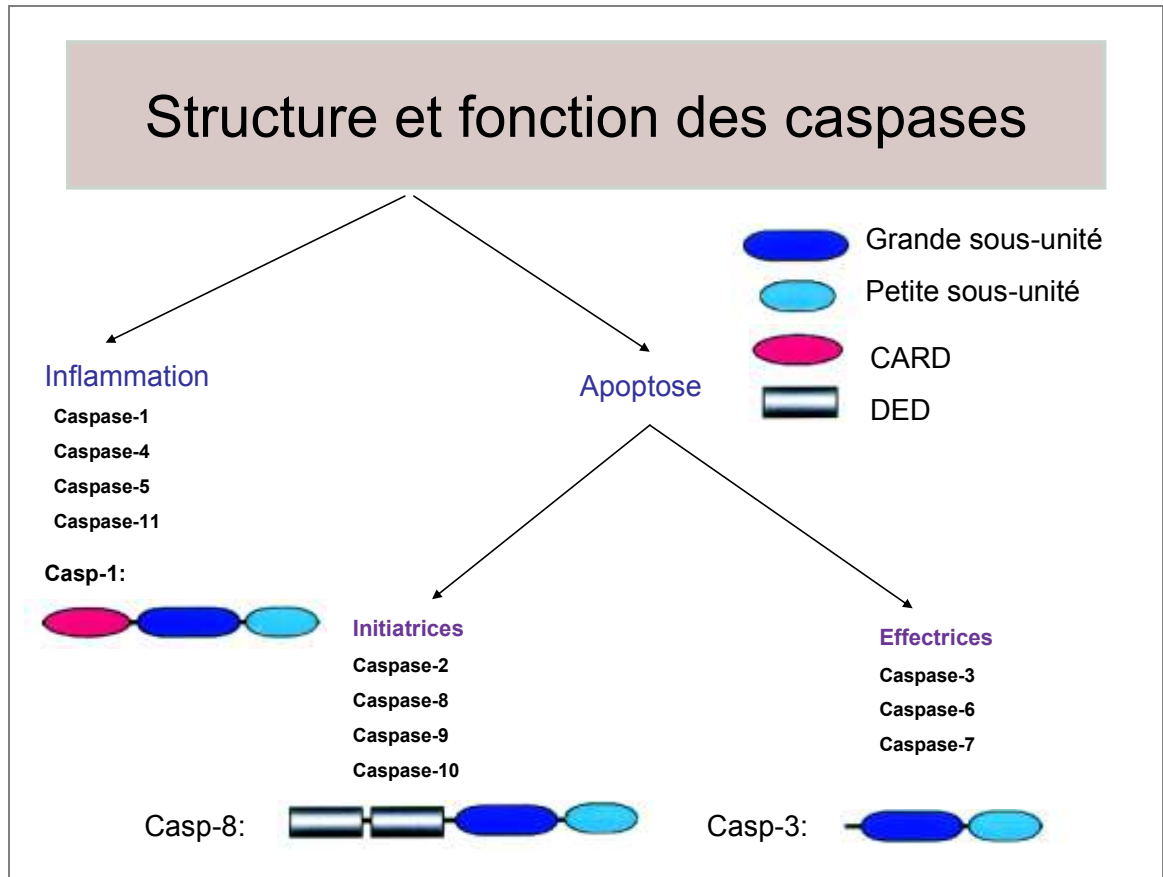


Figure 6: Classification des caspases et structures.

Les caspases se divisent en deux groupes possédant des fonctions différentes, soit pro-inflammatoire et apoptotique. Les caspases -1, -4, -5 et -10 représentent les membres appartenant au groupe pro-inflammatoire. Les caspases impliquées dans l'apoptose peuvent se subdiviser en deux autres catégories. Les caspases initiatrices sont impliquées dans l'activation de la cascade de caspases. Quant aux caspases effectrices, elles sont responsables du démembrement cellulaire.

(Adaptation de Salvesen et Riedl, 2008; Zimmermann et al., 2001).

Outre les membres impliqués dans l'apoptose, on retrouve, à l'intérieur de cette même famille enzymatique, certains membres qui détiennent une activité pro-inflammatoire, dont la caspase-1, en agissant sur la maturation des cytokines par clivage protéolytique du pro-peptide (Zimmermann et al., 2001). La famille des caspases peut davantage être subdivisée en deux catégories impliquées dans le processus d'apoptose, soit les caspases initiatrices et les caspases effectrices (Figure 6). Contrairement aux caspases effectrices, les caspases apicales sont dotées d'un pro-domaine plus important contenant des motifs d'interaction protéiques [caspase recruitment domains (CARDs) ou death effector domains (DEDs)] (Salvesen et Riedl, 2008; Tait et Green, 2010). Parmi les caspases initiatrices, la caspase-8 et la caspase-9 représente les membres les plus étudiés.

1.4.1.3.1.2 Les substrats clivés par les caspases

L'activation de ces enzymes dans la mort cellulaire engendre des événements morphologiques, moléculaires et biochimiques caractérisant les cellules apoptotiques. En effet, les caspases apicales sont sollicités lors de l'initiation du mécanisme d'apoptose pour assurer une activation des caspases effectrices tout en créant une importante cascade d'amplification. Ensuite, les caspases effectrices clivent divers substrats spécifiques qui organisent le démantèlement cellulaire observé lors de l'apoptose (Adrain et Martin, 2001). Plus particulièrement, les caspases effectrices clivent diverses protéines cytoplasmiques et nucléaires, des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, la prolifération, dans le métabolisme et la réparation de l'ADN et dans la signalisation cellulaire (Tableau 3). De plus, les caspases effectrices agissent sur le facteur I^{CAD}/DFF45, un inhibiteur de la nucléase CAD (Caspase-Activated Deoxyribonuclease), responsable de la fragmentation de l'ADN (Fischer et al., 2003; Lüthi et Martin, 2007; Zimmermann et al., 2001).

Tableau 3 : Substrats clivés lors de l'apoptose par les caspases effectrices

Substrats clivés par la caspase-3	
Protéines structurales	Protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation d'ADN
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Gelsoline ➤ Fodrine (α-spectrine) ➤ β II-spectrine ➤ β-Catenine ➤ Laminine A et B ➤ Vimentine ➤ NuMa 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ PARP ➤ DNA-PK ➤ ICAD ➤ Topoisomérase II
Protéines kinases	Protéines membres de la famille du Bcl-2
<ul style="list-style-type: none"> ➤ PKCγ ➤ Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV ➤ p21-activated kinase-2 ➤ Focal adhesion kinase (FAK) ➤ MEKK-1 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bad ➤ Bax ➤ Bid ➤ Bcl-2 ➤ Bcl-X_L

(Adaptation de Lüthi et Martin, 2009)

1.4.1.3.1.3 Mécanismes d'apoptose dépendants de l'activation des caspases

L'activation des caspases engendrée lors de l'apoptose par divers stimuli peut emprunter trois voies principales : la voie engagée par les récepteurs de mort cellulaire (DRc), la voie mitochondriale par la formation de l'apoptosome et finalement, la voie dépendante de la présence des granzymes B induite par les cellules T cytotoxiques ou encore par les cellules Natural Killer (NK). D'autres mécanismes d'activation des caspases ont également été décrits (Creagh et al., 2003). Parmi ces derniers, citons l'implication de réticulum endoplasmique dans l'activation des caspases observée lors de la mort cellulaire programmée.

1.4.1.3.1.3.1 Engagement des récepteurs de mort cellulaire

L'activation de la caspase-8 représente le mécanisme extrinsèque de l'activation de la cascade des caspases. Ce mécanisme est régi par l'engagement de récepteurs de mort membranaires (Death receptor ou DRc) appartenant à la superfamille du TNF tels le CD95 (Fas), le récepteur du TNF (TNFR) et les récepteurs TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Boatright et Salvesen, 2003). Suivant l'engagement d'un récepteur de mort avec son ligand respectif (FasL, TNF- α , TRAIL/Apo-2L), on assiste à une oligomérisation des DRc membranaires. La portion cytoplasmique des DRc contient des domaines de mort ou death domaine (DD). L'engagement des DRc permet le recrutement de molécules accessoires dont FADD (Fas-associated death domain protein) (Algeciras-Schimmich et al., 2002; Carrington et al., 2006). Ces molécules accessoires contiennent également des motifs DD (death domain) et DED qui agissent en tant qu'intermédiaire dans le recrutement de la pro-caspase-8 au niveau des DRc (Figure 7). Ceci engendre la formation d'un complexe de signalisation intracellulaire, le DISC (death-inducing signaling complex), où deux ou plusieurs molécules de pro-caspase-8 se côtoient. Le rapprochement de ces zymogènes est suffisant pour induire leur propre activation (Chang et al., 2003; Pop

et Salvesen, 2009). Suivant l'activation de la caspase-8, deux voies de signalisation, dépendamment du type cellulaire, peuvent être favorisées. La première voie, dit extrinsèque, agit directement sur l'activation des caspases effectrices suivant une activation intense de la caspase-8 (Creagh et al., 2003). La seconde voie intrinsèque intervient lorsque l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC est trop faible pour permettre le clivage de la pro-caspase-3 (Figure 7). Dans ces conditions, la caspase-8 agit sur une protéine appartenant à la famille du Bcl-2. Elle engendre le clivage de la protéine Bid qui génère une forme tronquée (tBid). La forme tronquée de Bid permet sa translocation dans la membrane mitochondriale, induisant le relâchement du cytochrome c, ce qui engendre l'activation de la voie mitochondriale (Cheng et al, 2001; Esposti, 2002). Cette seconde voie est initiée par l'activation d'une seconde caspase initiatrice, la caspase-9 qui gouverne la voie mitochondriale.

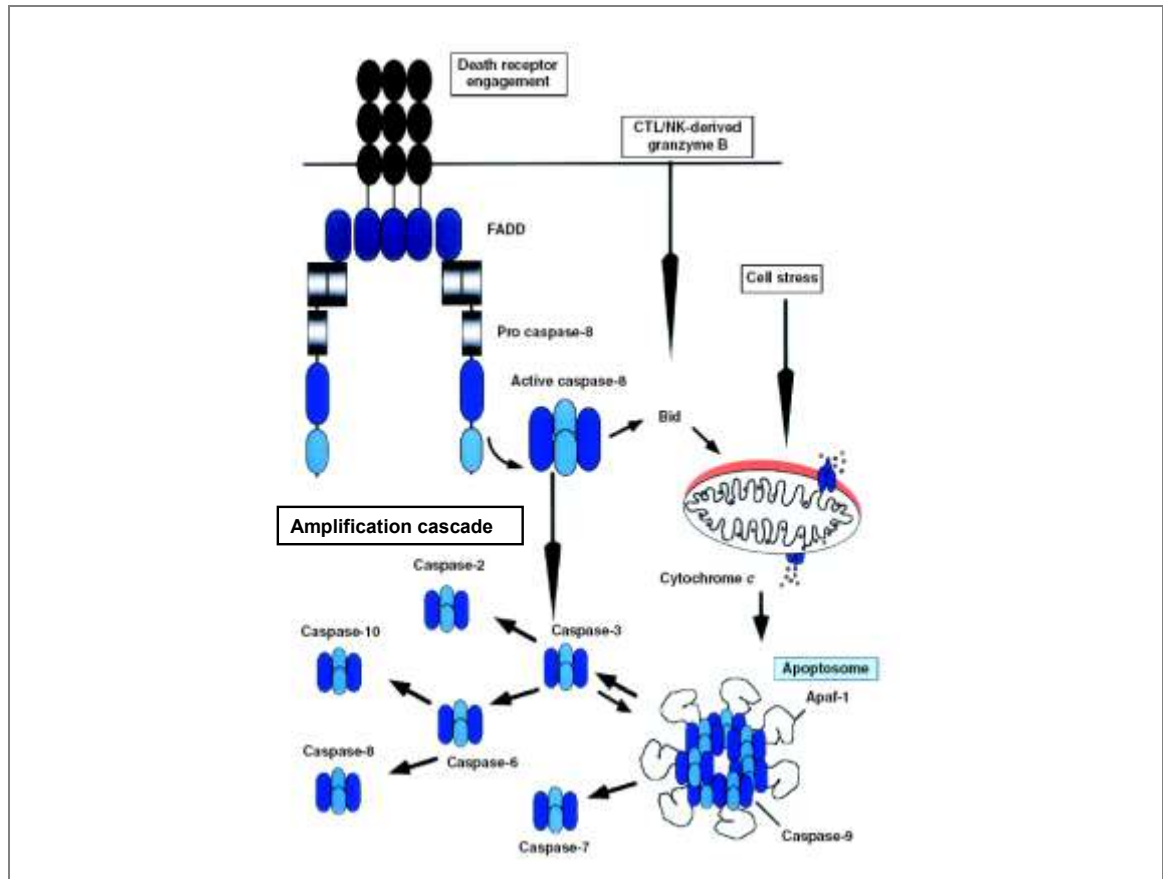


Figure 7: Mécanismes d'activation extrinsèque et intrinsèque des caspases durant l'apoptose.

Le premier mécanisme, dit extrinsèque, dépend de l'engagement des récepteurs de mort cellulaire qui permet le recrutement et l'activation de la pro-caspase-8. La caspase-8 peut également influencer le mécanisme intrinsèque en clivant la protéine pro-apoptotique Bid. L'activation intrinsèque des caspases dépend de la perméabilisation mitochondriale. Elle survient, entre autre, sous l'action des granzymes, d'un influx calcique, des radiations UV et d'agents chimiothérapeutiques. Cette seconde voie d'activation permet la formation de l'apoptosome, ce qui engendre l'activation de la caspase-9.

(Creagh et al., 2003)

1.4.1.3.1.3.2 La voie mitochondriale

Parmi les caspases initiatrices, la caspase-9 est responsable du mécanisme intrinsèque d'activation des caspases (Adams, 2003). L'engagement de cette voie métabolique est plus complexe. Le processus intrinsèque repose sur la perméabilisation des membranes mitochondriales, nécessaire à la libération de facteurs apoptogéniques compartementalisés à l'intérieur de ces organelles (Figure 7). Le relâchement du cytochrome c à partir des mitochondries vers le cytoplasme est responsable de l'activation de la caspase-9 (Creagh et al., 2003). La présence du cytochrome c dans le cytosol initie la formation d'un complexe multimérique, nommé apoptosome, constitué de trois éléments essentiels : du cytochrome c, de l'ATP et du apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) (Cain et al., 2002, Shi 2006). Le cytochrome c se lie au domaine de régulation C-terminal de l'Apaf-1, alors que les nucléotides d'ATP ou de dATP vont interagir avec le domaine de liaison aux nucléotides ce qui induit un changement de conformation du domaine de régulation. Ce changement de conformation engendre l'activation de l'apoptosome nécessaire au recrutement de la pro-caspase-9 via l'interaction homotypique entre les molécules d'Apaf-1 et de pro-caspase-9 (Salvesen et Riedl, 2008; Stennicke et al., 1999). En effet, le domaine N-terminale des molécules d'Apaf-1 renferme des motifs CARD également retrouvés en position N-terminale des molécules de pro-caspase-9. Le complexe actif apoptosome/caspase-9 est composé de sept molécules d'Apaf-1 en association avec un nombre similaire de dimères de caspase-9 (Acehan et al., 2002). L'oligomérisation d'Apaf-1 implique donc une juxtaposition des molécules de pro-caspase-9 ce qui force le recrutement de plusieurs molécules de pro-caspase-9 en un même endroit. Tout comme la pro-caspase-8, le rapprochement de ces zymogènes est suffisant pour induire une transactivation par clivages protéolytiques (Shi, 2004). Une fois activé au cœur de l'apoptosome, la caspase-9 peut maintenant agir sur les caspases effectrices. En effet, l'activation de la caspase-9 permet le clivage des pro-caspases -3 et -7.

1.4.1.3.1.3.3 Les granzymes B

L'activation des caspases induite par l'action des granzymes B est une voie impliquant le relâchement du contenu enzymatique des granules cytoplasmiques sur les cellules cibles pour provoquer leur mort cellulaire. Ce sont les cellules T cytotoxiques et les cellules NK qui sont responsables de ce mécanisme d'activation des caspases (Figure 7). La dégranulation provoque le relâchement de granzymes et perforines. Les perforines ainsi libérées forme un pore permettant l'entrée des granzymes à l'intérieur de la cellule cible. Les granzymes B sont des sérines protéases très spécifiques agissant suivant un résidu (aspartate ou acide aspartique). Comparativement aux caspases -3 et -8 les granzymes B clivent préférentiellement la protéine Bid (Creagh et al., 2003; Pinkoski et al., 2001). La forme tronquée de la protéine Bid (tBid) favorise la perméabilisation des membranes mitochondriales suivi du relâchement du cytochrome c régissant la voie d'activation intrinsèque des caspases (Barry et al., 2000; Heibein et al., 2000; Sutton et al., 2000).

1.4.1.3.1.3.4 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique peut également intervenir dans l'activation des caspases initiatrices. Ce mécanisme d'activation des caspases agit principalement sur la caspase-8 et la caspase-12 (Breckenridge et al., 2002; Nakagawa et al., 2000). Lorsque le réticulum endoplasmique subit un stress, tel un bris de l'homéostasie du calcium ou l'accumulation de protéines défectueuses, l'activation de la caspase-12 entraîne celle de la pro-caspase-9 indépendamment du facteur Apaf-1 (Morishima et al., 2002; Rao et al., 2002).

1.4.1.3.1.4 Régulation de l'activation des caspase

Les mitochondries jouent un rôle primordial dans diverses formes de mort cellulaire. Plusieurs mécanismes, dont ceux extrinsèque et intrinsèque d'activation des caspases convergent tous deux vers la route dépendante des mitochondries (Adams, 2003; Shi, 2006). La perméabilisation de la membrane mitochondriale représente l'évènement crucial et décisif dans plusieurs formes de mort cellulaire qui compromet la compartimentalisation cellulaire (Parson et Green, 2009). Cette perméabilisation est induite par la formation de pores principalement via deux mécanismes (Green et Kroemer, 2005). Le premier est médié par l'action des protéines pro-apoptotiques membres de la famille du Bcl-2, alors que le second dépend de la formation de pores de perméabilisation transitoire ou PTP (permeability transition pore) (Figure 8). La formation de pores est impliquée tant dans la mort cellulaire autant dépendante, qu'indépendante des caspases (Chipuk et al., 2006). L'intégrité membranaire représente donc un mécanisme central dans le phénomène de mort cellulaire. Il est, entre autre, gouverné par les protéines appartenant à la famille du Bcl-2 (Chipuk et Green, 2008; Green et Evan 2002). Il existe également certaines protéines cytoplasmiques et mitochondriales impliquées dans la régulation de l'activation des caspases telles les protéines inhibitrices d'apoptose (Inhibition of Apoptosis Protein ou IAPs), smac/Diablo et Omi/Htr2 (Parson et Green, 2009).

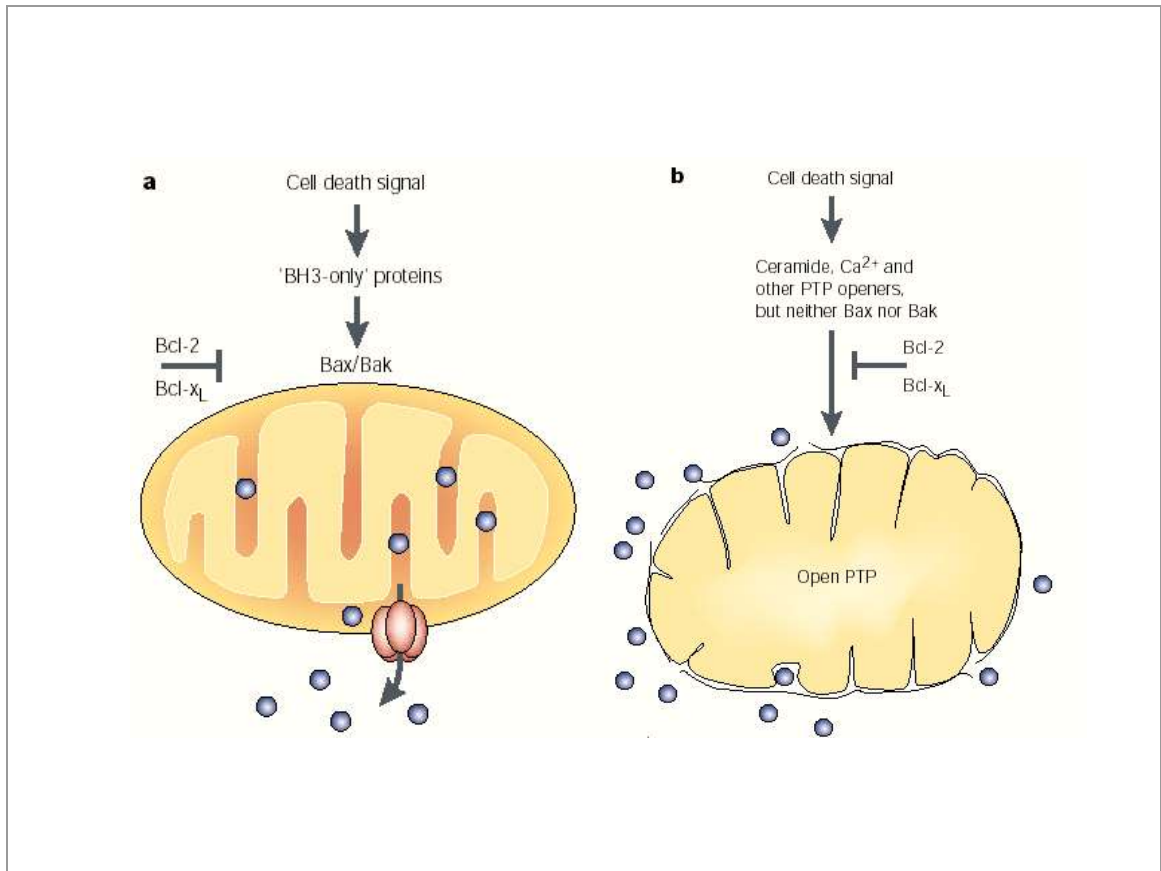


Figure 8: Mécanismes impliqués dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe lors de la mort cellulaire.

a) Implication des protéines pro-apoptotiques. La perméabilisation des membranes mitochondriales par les protéines Bax ou Bak est initiée par les protéines BH3-only. Ces dernières sont responsables de l'insertion de Bax ainsi que de l'oligomérisation de Bax et Bak, un processus menant à la formation de canaux membranaires. b) Rôle des pores transitoires de perméabilisation (PTP). Divers stimuli peuvent conduire à l'ouverture de ces pores dont la génération de céramides et l'influx calcique. Cette ouverture produit une variation du potentiel membranaire mitochondrial, suivi d'une rupture de la membrane externe permettant le relâchement des protéines contenues dans l'espace intermembranaire. Ces deux processus peuvent être bloqués par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. (Martinou et Green, 2001).

1.4.1.3.2 *La famille du Bcl-2*

Plusieurs membres appartenant à la famille du Bcl-2 ont été identifiés. Chacun des membres est caractérisé par la présence d'au moins un motif conservé nommé domaine d'homologie Bcl-2 ou "Bcl-2 homology domain" (BH 1 à 4). La structure et la fonction des divers membres permettent leur ségrégation en trois catégories soient : 1- les membres anti-apoptotiques, 2-les membres pro-apoptotiques et 3- les membres pro-apoptotiques contenant seulement un domaine d'homologie BH3 (Zimmermann, 2001). Parmi les membres anti-apoptotiques, nous retrouvons des protéines telles Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et A1 (Bfl-1). Ces membres impliqués dans la survie possèdent plusieurs motifs conservés similaires tels BH1 et BH2. La plupart des membres compte jusqu'à quatre domaines d'homologies identiques (BH1 à BH4) (Adams et Cory, 2007). La seconde catégorie inclut les membres pro-apoptotiques qui partagent une homologie de séquence dans les domaines BH1, BH2 et BH3 (Figure 9), dont les protéines Bak, Bax et Bok. Finalement, on retrouve des membres pro-apoptotiques tels Bid et Bad, qui sont caractérisés par la présence d'un seul domaine d'homologie, soit le BH3 seulement (BH3-only) (Hinds et Day, 2005). La structure cristallographique de divers membres de la famille du Bcl-2 révèle la présence de domaines permettant la formation de pores similaires aux domaines caractérisant l'action de certaines toxines bactériennes. D'ailleurs, le Bcl-x_L, le Bcl-2, Bax et la forme tronquée de Bid (tBid) peuvent former des canaux ioniques fonctionnels traversant les membranes lipidiques (Chipuk et al., 2010; Desagher et Martinou, 2000).

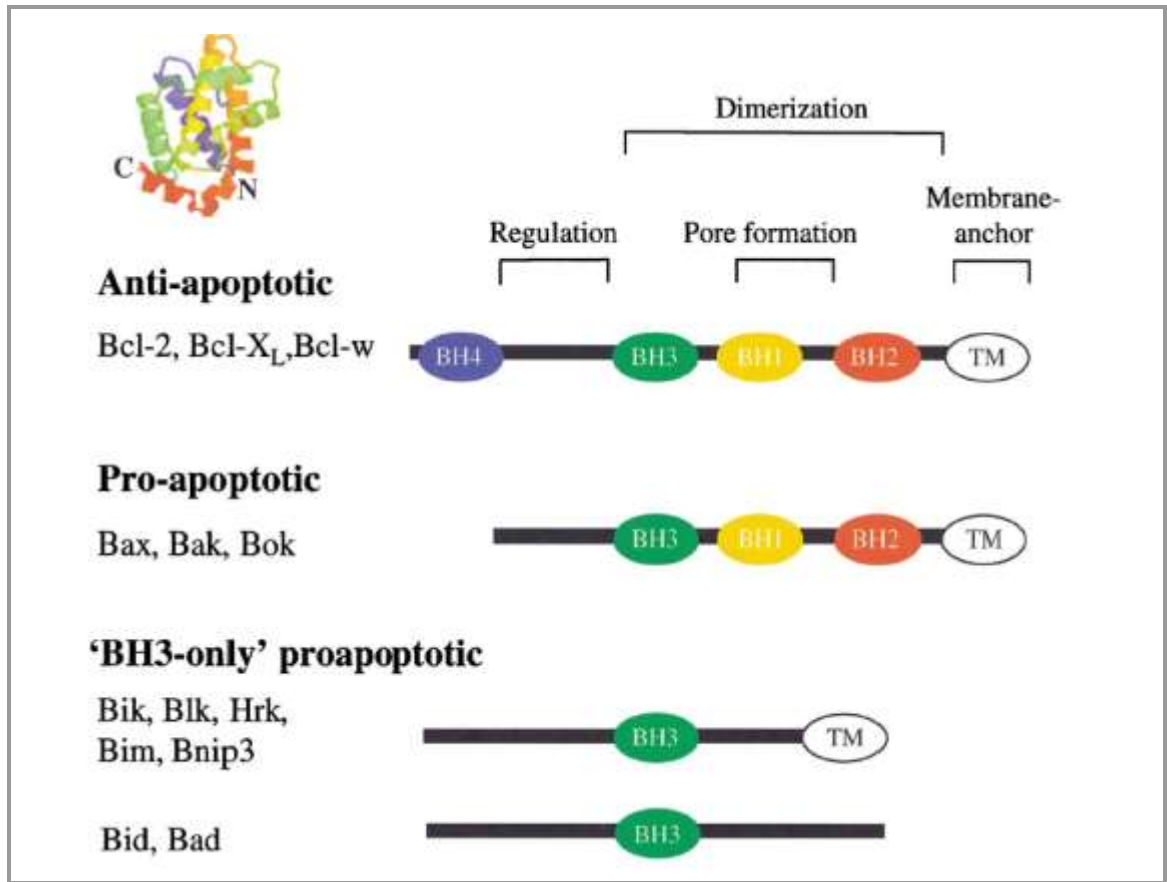


Figure 9: Structure et fonction des membres appartenant à la famille du Bcl-2

Dans un premier temps, la famille du Bcl-2 se subdivise en deux catégories selon leur action anti ou pro-apoptotique. Parmi les divers membres, certains domaines d'homologie Bcl-2 sont conservés, soient de BH1 à BH4. Certains sont également caractérisés par la présence d'un domaine transmembranaire permettant leur encrage aux membranes (Zimmermann, 2001).

1.4.1.3.2.1 Les protéines pro-apoptotiques

La perméabilité membranaire mitochondriale dépend de l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax/Bak (Figure 10). Ces protéines peuvent s'activer de façon transcriptionnelle ou sous l'action des membres BH3-only (Bid). Par exemple, la protéine tronquée Bid (tBid) peut se lier directement aux protéines Bax/Bak pour induire leur activation (Letai et al., Kuwana et al., 2005; Certo et al., 2006; Walensky et al., 2006; Oh et al., 2006; Kim et al., 2006). Le changement de conformation engendré par l'interaction de tBid permet la translocation et l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale où les divers monomères de Bax s'oligomérisent pour former un pore (Antonsson et al., 2000; Chipuk, 2010; Hardwick et Polster, 2002). La perméabilité membranaire mitochondriale ainsi générée permet donc le relâchement du cytochrome c, qui initie la voie intrinsèque d'activation des caspases dépendante de la formation de l'apoptosome (Parson et Green, 2009; Kuwana et al., 2002). En plus d'agir sur le mécanisme d'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, la protéine BH3-only Bad détiennent une fonction antagoniste envers les protéines anti-apoptotiques telles Bcl-2 et Bcl-xL supprimant ainsi leur protection (Adams et Cory, 2007; Chipuk, 2010; Henry-Mowatt et al., 2004; Huang et Strasser, 2000; Wang et Youle, 2009). En effet, tout comme les protéines Bax et Bcl-2, sa structure tridimensionnelle est caractérisée par la présence d'hélices α . Cette structure ressemble à une région particulière des toxines bactériennes colicine et diphtérie impliquée dans la formation d'un pore (Desagher et Martinou 2000; Suzuki et al., 2000).

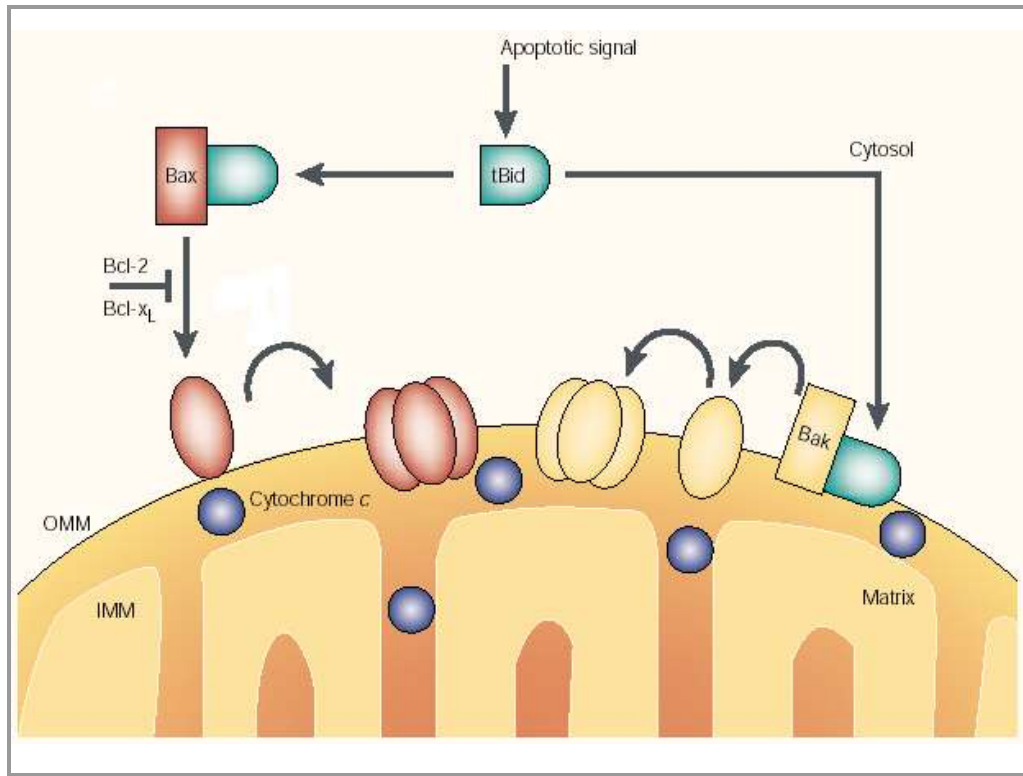


Figure 10: Mécanismes d'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak par les protéines BH3-only.

Les membres anti-apoptotiques Bax et Bak sont activés soit directement dans le cytosol ou au niveau de la membrane externe des mitochondries, sous l'action des protéines BH3-only telle Bid. Suivant l'interaction cytosolique de la forme tronquée de la protéine Bid (tBid) avec la protéine Bax, cette dernière subit un changement de conformation qui permet sa translocation à partir du cytosol vers la membrane externe des mitochondries. La protéine tBid peut également s'insérer dans la membrane externe afin d'interagir avec la protéine pro-apoptotique Bak qui est constitutivement encreée à cette membrane. Tout comme Bax, Bak subit un changement de conformation permettant ainsi l'oligomérisation et la formation de pores mitochondriaux responsables de la perméabilisation.

(Martinou, 2001)

1.4.1.3.2.2 Les protéines anti-apoptotiques

Les membres anti-apoptotiques de la famille du Bcl-2, dont les plus connus sont le Bcl-2 et le Bcl-xL, confèrent une résistance face à l'apoptose à de nombreux tissus et types cellulaires (Hedrick et al., 2010; Thomas et al., 2010, Portt et al., 2010). Leur mécanisme d'action est en partie lié à l'inhibition de l'oligomérisation des isomères de Bax ou Bak indispensable à la perméabilité membranaire mitochondriale, un mode d'interaction compétitif entre les agonistes et antagonistes communément nommé le modèle rhéostat (Brenner et Mak, 2009). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et le Bcl-xL interfèreraient dans l'oligomérisation des protéines Bax ou Bak en prévenant l'élongation de la chaîne et la fermeture du complexe transmembranaire (Kuwana et al., 2002; Reed, 2006) (Figure 11). En plus de compétitionner avec les protéines Bax et Bak, le Bcl-2 et le Bcl-xL peuvent empêcher leur activation en séquestrant les protéines BH-3 only telles Bid et Bim (Adams, 2007 et Cory; Danial et Korsmeyer, 2004).

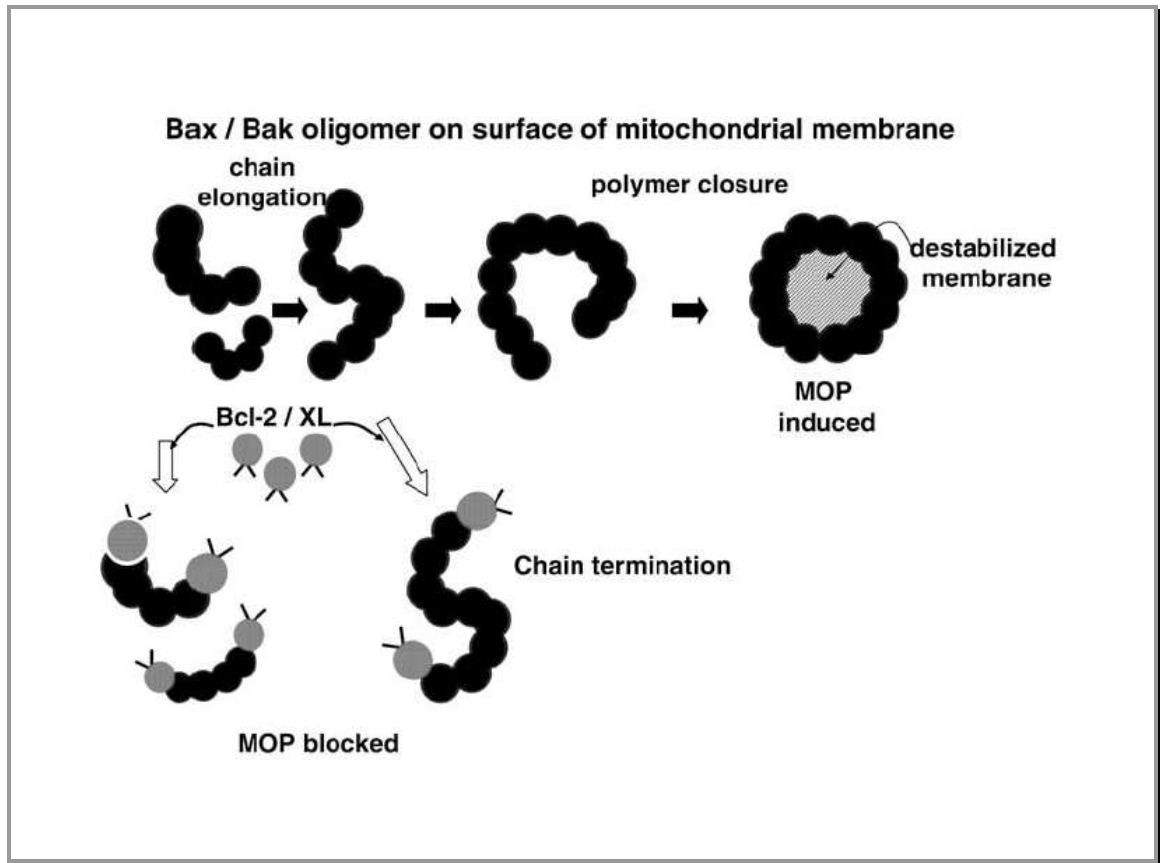


Figure 11: Mécanisme d'interférence des protéines anti-apoptotiques proposé dans l'oligomérisation des membres pro-apoptotiques Bax/Bak.

L'activation ou l'insertion des protéines pro-apoptotiques au niveau de la membrane externe des mitochondries permet leur oligomérisation. Le présent modèle suggère que les protéines Bax et Bak forment un polymère dans la membrane qui lorsque complété, déstabilise la membrane. L'action anti-apoptotique des protéines Bcl-2 et Bcl-xL réside dans l'inhibition du polymère en empêchant l'élongation de la chaîne.

(Reed, 2006)

Le Mcl-1 représente un membre particulier des molécules anti-apoptotiques appartenant à la famille du Bcl-2 (Craig, 2002). En effet, contrairement à la plupart des ces membres, le Mcl-1 ne possède aucun domaine BH4 (Chipuk, 2010; Edwards et al., 2004). De plus, la protéine Mcl-1 et ses transcrits d'ARNm sont très labiles contrairement au bcl-2 (Akgul et al., 2001). En effet, cette protéine possède une demi-vie d'environ 3-4 heures comparativement à 10-14 heures pour le bcl-2 (Craig, 2002; Moulding et al., 2001). Similairement au Bcl-2, le Mcl-1 interfère dans le processus d'apoptose en se liant aux protéines pro-apoptotiques Bax/Bak, empêchant ainsi la formation de pores mitochondriales. Il peut également prévenir l'apoptose par séquestration des protéines BH3-only, telle tBid. Bien que sa partie C-terminale soit similaire à celle du bcl-2, la partie N-terminale du Mcl-1 diffère grandement. En effet, le Mcl-1 possède une séquence signal riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), and threonine (T) (PEST) qui dirige le catabolisme des protéines vers le protéasome, ce qui justifie sa courte durée de vie (Moulding et al., 2001; Thomas et al., 2010). Tout comme le Mcl-1, le gène anti-apoptotique A1 (Bfl-1) est également caractérisé par l'absence de domaine BH4 (Edwards et al., 2004). Les transcrits d'ARNm de A1 possèdent, eux aussi, une courte durée de vie (Akgul et al., 2001). Similairement au Mcl-1, la présence de ce gène est restreinte à certaines lignées cellulaires spécifiques, notamment aux cellules hématopoïétiques (Craig, 2002). De plus, tout comme le Mcl-1 et le Bcl-2, la régulation de ce gène est influencé par la présence de cytokines pro-inflammatoires (Moulding et al., 2001).

1.4.1.3.2.3 Mécanismes d'apoptose indépendants de l'activation des caspases

Bien que la définition de la mort cellulaire programmée était auparavant basée sur l'activation des caspases, on sait maintenant qu'elle peut évoluer selon un mécanisme indépendant de ces enzymes (Shimizu et al., 2007). Les dommages protéolytiques engendrés non seulement par les caspases mais également par une multitude de protéases sont à l'origine de la mort cellulaire (Lockshin et Zakeri, 2004). Ainsi, d'autres protéases participent également à ce mécanisme. Parmi ces protéases, citons les sérines protéases, les calpaïnes, les cathepsines et les enzymes protéosomales. D'autres facteurs apoptogéniques, d'origine mitochondrial, peuvent également contribuer aux mécanismes de mort cellulaire caspases-indépendant dont le facteur apoptosis-inducing factor (AIF) et l'endonucléase G (Endo G) (Li et Hoffman, 2001; van Loo et al., 2001).

1.4.1.3.2.3.1 Les calpaïnes

Les calpaïnes sont des endopeptidases activées en présence de calcium et distribuées ubiquitairement (Chowdhury et al., 2008). Les isoformes des calpaïnes-1 et -2, aussi nommées μ -calpaïne et m-calpaïne respectivement, sont les plus étudiés. Ces enzymes font partie de la même classe de protéases que les caspases soit des protéases à cystéine (Wang, 2000). Ainsi, les calpaïnes et les caspases partagent plusieurs substrats communs. Parmi ces derniers, on retrouve en autres les fodrines, focal adhesion kinases (FAK), l'actine et la vimentine. Chez les neutrophiles, les calpaïnes sont impliquées dans divers processus tels que ceux de migration et de phagocytose (Dewitt et Hallett, 2002; Kobayashi et al., 2002; Lokuta et al., 2003). L'activation de la calpaïne dans le processus d'apoptose des PMN est un phénomène précoce. En effet, les PMN fraîchement isolés sont dotés d'une activité constitutive de la calpaïne renforçant l'idée qu'il existe d'autres mécanismes d'activation des caspases que ceux induits par les DRc et la voie mitochondriale (Altnauer et al., 2004; Kobayashi et al., 2002; Luo et Loison, 2008). De plus, la calpaïne dégrade efficacement la

molécule XIAP, une protéine endogène qui inhibe efficacement l'activation de la caspase-3, la casp-7 et la casp-9. La calpaïne pourrait donc représenter un des mécanismes par lequel la caspase-3 est activée chez les PMN. La perturbation du système régulant l'activité des calpaïnes est d'ailleurs impliquée dans diverses pathologies, notamment chez les patients atteints de leucémie chronique à neutrophiles (chronic neutrophilic leukemia ou CNL), les maladies neurodégénératives, les différentes formes d'ischémies et la perfusion associée à ces ischémies (Altzauner et al., 2004; Kobayashi et al., 2002). L'implication des enzymes lysosomales est également un phénomène prépondérant lors des stades de développement ainsi qu'au sein de conditions pathologiques telles les maladies neurodégénératives (Lockshin et Zakeri, 2002).

1.4.1.3.2.3.2 Les enzymes lysosomales et protéosomales

Parmi la multitude d'enzymes qui participent aux divers processus de mort cellulaire indépendamment des caspases, citons les métalloprotéinases, les enzymes protéosomales et les cathepsines (Johansson et al., 2010; Lambert et al., 2003). Ces enzymes contribuent également au renouvellement de la réserve protéique en assurant la dégradation des protéines de courte durée de vie, via le système ubiquitine-protéasome, alors que les protéines de longue durée de vie et les organelles sont ciblées vers les lysosomes (Reggiori et Klionsky, 2002). Ces deux systèmes sont indispensables au maintien de l'homéostasie entre le catabolisme et l'anabolisme des protéines afin de promouvoir le développement et la croissance cellulaire.

Les enzymes lysosomales font partie des premières protéases décrites associées au démantèlement cellulaire relativement au mécanisme de mort cellulaire (Lockshin et Zakeri, 2001 et 2002). Pendant plusieurs années, la communauté scientifique considère les lysosomes comme des vacuoles suicidaires impliquées dans des mécanismes de mort cellulaire désorganisée. Maintenant, on reconnaît le rôle des enzymes lysosomales dans le mécanisme de PDC (Johansson et al., 2010). Leur action dépend du degré de perméabilisation lysosomales et donc de la quantité de protéases relâchées dans le cytosol

(Bursch, 2001; Li et al, 2000; Turk et al., 2002). Une fois au niveau du cytosol, les enzymes peuvent contribuer au processus apoptotique en clivant directement d'importants substrats cellulaires dont les protéines du cytosquelette et les enzymes indispensables tel PARP, ou encore en activant les caspases (Boya et al., 2003a, b; Leist et Jaattela, 2001a,b; Lockshin et Zakeri, 2004). La perméabilité partielle des lysosomes (Figure 12), provenant, entre autre, de la génération intracellulaire de sphingosines, serait impliqué dans ce processus (Guicciardi et al., 2000, 2004). Les sphingosines s'accumulent dans les lysosomes et perméabilisent les membranes par leur fonction de détergent, permettant ainsi la fuite des enzymes vers le cytosol (Kagedal et Zhao, 2001). Les enzymes lysosomales, renferment également la cathepsine impliquées dans l'activation directe ou indirecte des caspases (Ishidoh et Kominami, 2002; Johansson et al., 2010; Katunuma et al., 2001; Stoka et al., 2001; Turk et al., 2002). D'autres études démontrent également que les protéases lysosomales perturbent la fonctionnalité mitochondriale, entre autre, en clivant la protéine Bid (Bidere et al., 2003; Boya et al., 2003a,b; Cirman et al., 2004; Guicciardi et al., 2000; Stoka et al., 2001; Zhao et al., 2003). De plus, la cathepsine D induit l'activation et la relocalisation mitochondriale de la protéine pro-apoptotique Bax (Boya et al., 2003, a,b; Johansson et al., 2010). Ainsi, les différentes études réalisées sur l'implication des cathepsines dans la mort cellulaire suggèrent un mécanisme d'action multiple qui, souvent, converge vers l'activation des caspases et la régulation des protéines appartenant à la famille du Bcl-2 (Guicciardi et al., 2004; Johansson et al., 2010) (Figure 13).

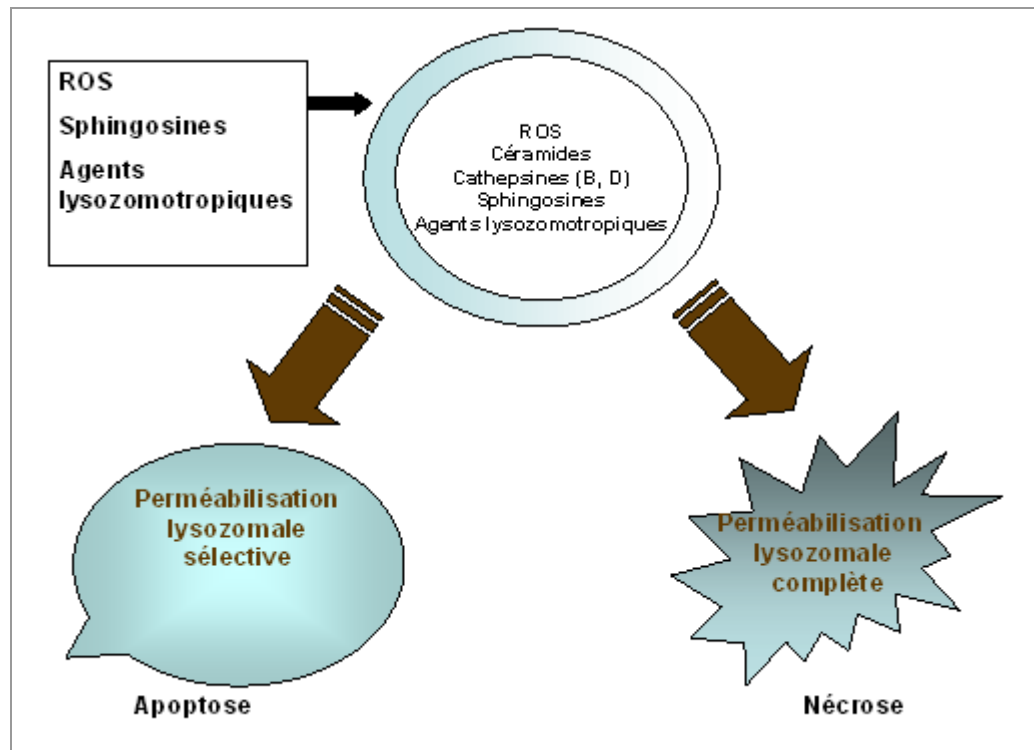


Figure 12: Mécanismes responsables de la perméabilisation lysosomale.

Représentation schématique des différents concepts régissant la perméabilité des lysosomes. La perméabilisation des membranes lysosomales survient en réponse à divers stimuli tels les ROS, les agents lysozomotropiques ainsi que les médiateurs lipidiques. La génération intracellulaire de céramides engendre également l'activation des cathepsines D. L'accumulation de ces substances et/ou l'activation des cathepsines au sein du lysosome induit des dommages membranaires importants qui altèrent l'intégrité lysosomale engendrant ainsi le relâchement des protéases dans le cytosol. La perméabilisation des lysosomes peut également provenir de translocation des protéines pro-apoptotiques en réponse à divers stimuli apoptotiques. La perméabilisation partielle des lysosomes est associée au processus apoptotique, alors que le relâchement excessif engendre la nécrose cellulaire (Adaptation de Guicciardi et al, 2004).

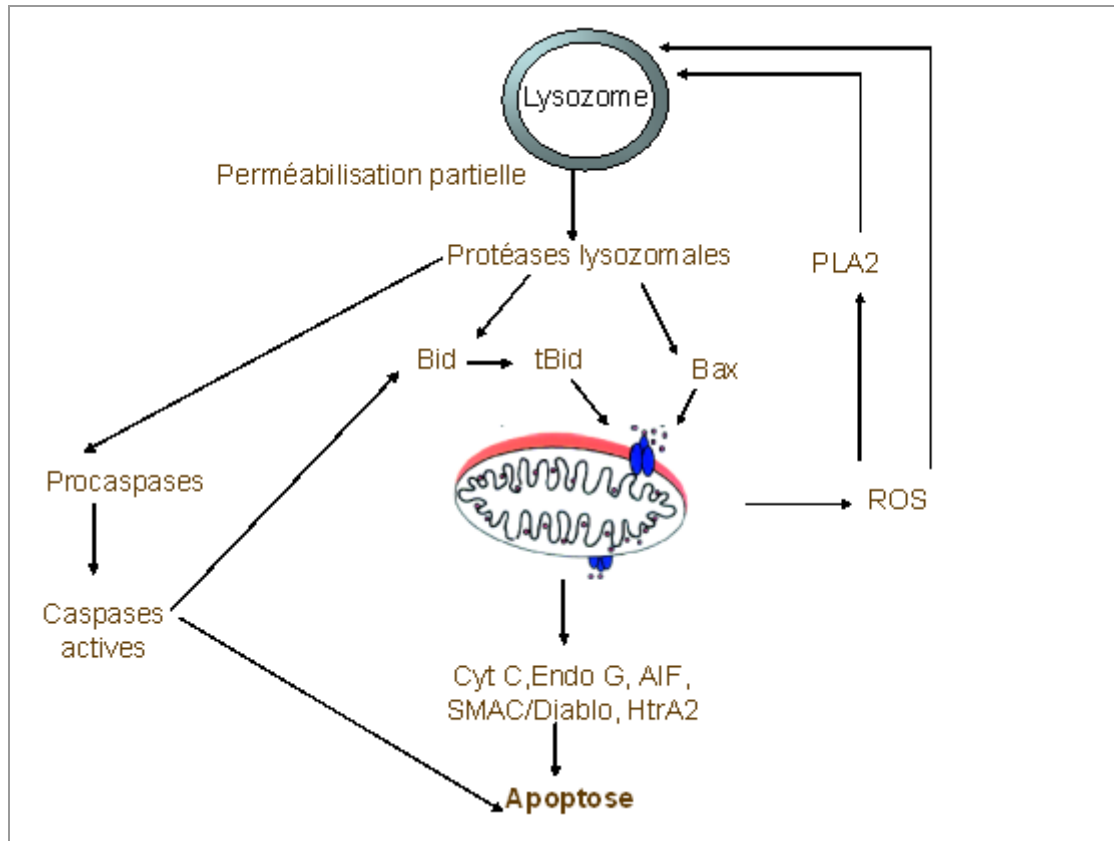


Figure 13: Mécanismes d'action des lysosomes associés à l'apoptose

Implication des protéases lysosomales dans l'activation des caspases et dans l'engagement de la voie intrinsèque. Les extraits lysosomales ainsi que les cathepsines purifiées sont responsables du clivage et de l'activation des protéines pro-apoptotiques telles Bid et Bax. La cathepsine D induit l'activation et la translocation de la protéine Bax vers les mitochondries où elle engendre la formation de pores mitochondriaux. En agissant sur la perméabilité mitochondriale, les enzymes lysosomales contribuent indirectement à l'activation des caspases par le relâchement de facteurs apoptogéniques. Puisque les cathepsines et les caspases agissent sur des substrats communs, les enzymes lysosomales pourraient également contribuer à l'activation directe des caspases. De plus, la présence de ROS amplifie le phénomène en activant la phospholipase A₂ impliquée dans la déstabilisation membranaire des organelles. (Adaptation de Guicciardi et al., 2004)

Mis à part les sphingosines, d'autres mécanismes peuvent également influencer la perméabilité lysosomale parmi lequel est impliquée la génération de dérivés oxygénés (Johansson et al., 2010). En effet, le stress oxydatif induit plusieurs dommages cellulaires provoquant la déstabilisation lysosomale et la fuite de son contenu enzymatique (Antunes et al., 2001; Dare et al., 2001; Persson et al., 2003). De plus, les ROS influencent indirectement l'intégrité lysosomale en engendrant l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Figure 13). Cette dernière induit une déstabilisation progressive des membranes formant les organelles en dégradant les phospholipides membranaires dont ceux des mitochondries et des lysosomes, plus particulièrement, les cardiolipines et les phosphatidylétholamines (PE) (McMillin et Dowhan, 2002; Zhao et al., 2001). D'ailleurs, les cellules neuronales en vieillissement sont marquées par une dysfonction lysosomale. Ce sont les dérivés oxygénés (ROS) produits lors du vieillissement qui sont responsables de leur apoptose (Bahr et Bendiske, 2002; Raha et Robinson, 2000). Il est suggéré que la perméabilité lysosomale induite par les ROS précède souvent la dysfonctionnalité mitochondriale (Guicciardi et al., 2000; Johansson et al., 2010).

1.4.1.3.3 Le stress oxydatif (ROS)

Le stress oxydatif est donc également un facteur important dans l'induction de l'apoptose (Johansson et al., 2010; Vandenabeele et al., 2010). Il se produit lors d'une augmentation de la production d'agents oxydants, tels les ROS, lorsque les protections anti-oxydantes sont diminuées, ou encore lorsque la cellule est incapable de réparer les dommages tissulaires. Outre leurs effets antimicrobiens, les ROS sont responsables du dommage tissulaire observé lors du stress oxydatif. Entre autre, ces derniers perturbent le potentiel membranaires des mitochondries, modifient les molécules telles les acides gras polyinsaturés des membranes lipidiques, les protéines essentielles ainsi que l'ADN (Martinou et Green, 2001). Étant donné l'importante diversité des granules cytoplasmiques

retrouvées chez les PMN, ces derniers renferment un pouvoir oxydatif considérable qui influence les mécanisme de mort dont l'apoptose et l'autophagie (Lavastre et al., 2002; Von Gunten et al., 2005). D'ailleurs, les patients atteints de granulomatose septique chronique (chronic granulomatous disease ou CGD) sont caractérisés par une diminution importante dans la capacité oxydative. Ils présentent également une résistance accrue face à l'apoptose spontanée (Holland, 2010).

1.4.2 Modèle d'apoptose

Dans leur publication, Scheel-Toellner et al. (2004) proposent un modèle concernant l'induction de l'apoptose spontanée des PMN. Ce dernier pointe vers une accumulation des ROS qui engendreraient la production de céramides (Figure 14). Le modèle proposé repose sur une étude qui démontre, qu'en présence d'agents chimiothérapeutiques, on assiste à la production de ROS (Huang et al., 2003). La formation de ces dérivés toxiques provoque le recrutement des récepteurs de mort cellulaire CD95 (Fas), ce qui permet l'activation de la caspase-8 et donc l'induction de l'apoptose. Ce modèle complète celui proposé par Altnauer et al. (2004) qui présente une lacune concernant l'activation de la caspase-8 et de la calpaïne dans l'apoptose constitutive. Selon ce modèle, la caspase-8 engendre l'activation de la calpaïne en clivant la calpastine, son inhibiteur endogène. Les auteurs stipulent que la calpaïne est responsable de l'activation de la voie mitochondriale en clivant la protéine Bid pour générer la forme tronquée (tBid). Cependant, les auteurs ne pouvaient expliquer l'implication des récepteurs de mort cellulaire, nécessaire à l'activation de la caspase-8, dans leur modèle d'apoptose spontanée. Ainsi, les ROS peuvent influencer directement l'intégrité membranaire et donc la survie par le recrutement de plusieurs récepteurs de mort cellulaire à un même endroit permettant ainsi l'activation de la caspase-8. À ces modèles s'ajoute l'influence des ROS dans la perméabilisation des lysosomes. En effet, les ROS, agissent sur les lipides membranaires (peroxydation), ce qui engendre le relâchement partiel des protéases au niveau du

cytoplasme, lesquelles peuvent activer directement les caspases ou agir sur la voie mitochondriale.

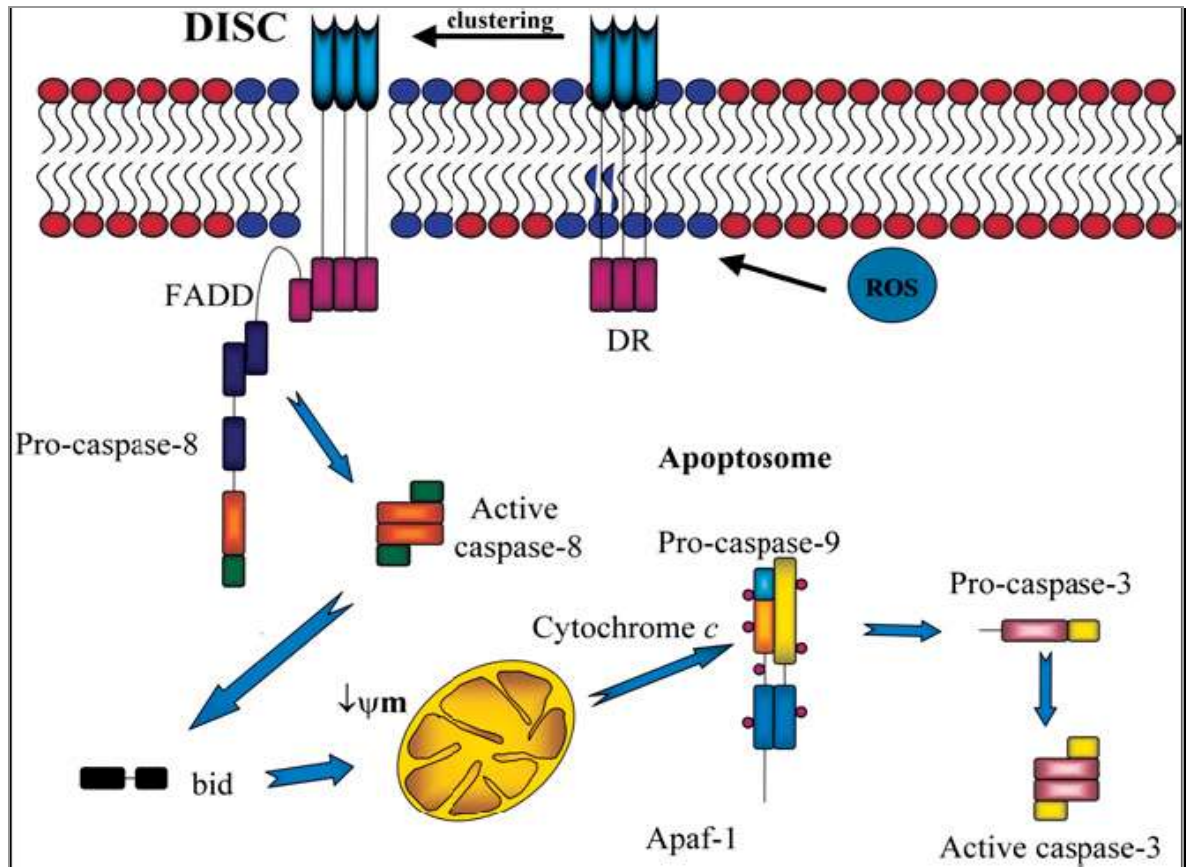


Figure 14: Modèle d'induction de l'apoptose spontanée chez les neutrophiles

Le présent modèle décrit l'action des ROS et leur accumulation dans l'apoptose des neutrophiles. Selon leur modèle, les ROS et les céramides agiraient conjointement dans le recrutement des DRs (death receptor) au niveau des lipides rafts. Ainsi, ce complexe de signalisation permettrait l'activation de la procaspase-8. La caspase-8 pourrait ensuite amplifier le phénomène apoptotique en contribuant à l'activation des autres caspases, particulièrement, la caspase-3 et la caspase-9, via la voie mitochondriale. (Scheel-Toellner et al., 2004)

1.4.3 Facteurs et évènements de signalisation cellulaire influençant la survie des neutrophiles

La survie et la mort cellulaire sont constamment influencées par divers signaux externes et facteurs environnementaux qui interviennent dans plusieurs mécanismes de signalisation cellulaire faisant appel aux kinases en tant que molécules accessoires. Ainsi lors de la maturation cellulaire et sous l'influence d'agents externes, on assiste à la stimulation des kinases. Ces dernières sont responsables de transmettre les signaux cellulaires gouvernant les évènements de prolifération, de survie, de mort cellulaire (Wada et Penninger, 2004).

1.4.3.1 Les MAPKs (mitogen-activated protein kinases)

Les kinases MAP (mitogen-activated protein kinases ou MAPKs) représentent une famille de kinases impliquée dans la transduction de signaux à partir de la membrane cellulaire jusqu'au noyau en réponse à divers stimuli (Chang and Karin, 2001; Davis, 2000; Johnson and Lapadat, 2002; Werlen et al., 2003). Les MAPKs sont des kinases qui, lorsque stimulées, engendrent la phosphorylation spécifique de certains substrat aux résidus serine/thréonine. La cascade de signalisation cellulaire engendrée par l'activation des MAPKs régule l'expression de certains gènes, des évènements de mitose, de prolifération, de motilité, de métabolisme et de mort cellulaire programmée (Chang and Karin, 2001; Davis, 2000; Johnson and Lapadat, 2002; Werlen et al., 2003). La famille de MAPKs se compose principalement de trois membres dont la kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase), la kinase JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) et la p38-MAPK. Chacun de ces membres possède une sous-famille : ERK (ERK1 et ERK2), JNK (JNK1, JNK2 et JNK3) et p38-MAPK (p38-MAPK α , p38-MAPK β , p38-MAPK γ , p38-MAPK δ) (Wada et Penninger, 2004). Contrairement à la kinase ERK, les kinases p38 et JNK possèdent une double-activité, soit anti- et pro-apoptotique (Figure 15). L'activation de la kinase ERK survient lorsque cette dernière est phosphorylée aux résidus threonine 202 et tyrosine 204

sous l'action des MAPK kinases MEK1 et MEK2 (Boutros et al., 2008, Wada et Penninger, 2004). ERK1 et ERK2 sont activées sous l'influence d'une variété de facteurs de croissance favorisant la survie, la progression du cycle cellulaire, la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration.

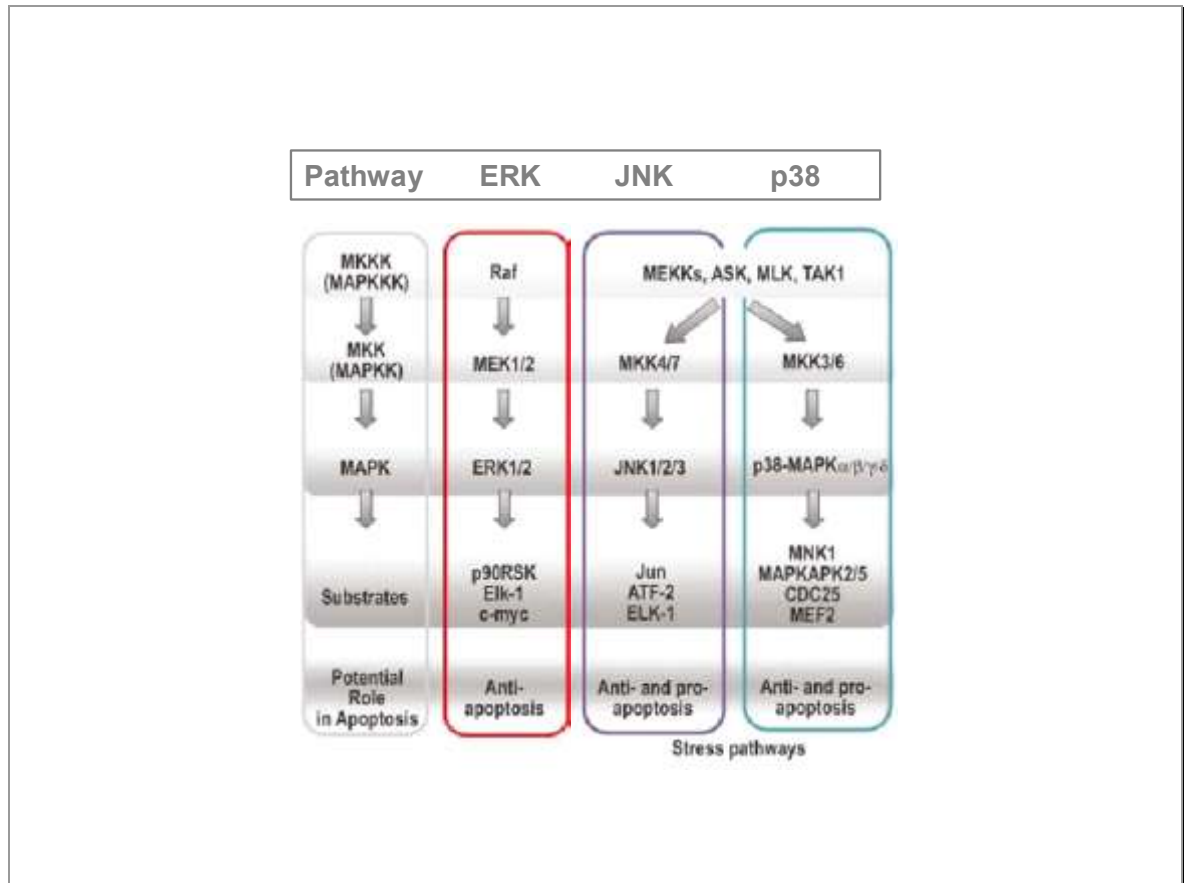


Figure 15: Mécanismes de signalisation cellulaire impliqués dans l'activation des MAPK

Les MAPK sont activées en réponse au stress ou suivant l'engagement d'un récepteur cellulaire dont ceux liés à la protéine G ou aux protéines kinases (PKR). Ainsi, les MAPK sont impliquées dans les cascades de signalisation cellulaire engendrées par l'activation des récepteurs de cytokines, de facteurs de croissance, d'hormones et de neurotransmetteurs. Leur mécanisme d'action repose sur la phosphorylation séquentielle menant soit à l'activation ou l'inhibition de certains substrats cytosoliques et facteurs de transcription aux résidus tyrosine et threonine. Selon la nature des stimuli, les kinases JNK et p38 influencent les événements pro- et/ou anti-apoptotiques.

(Adaptation de Wada et Penninger, 2004)

1.4.3.2 La PI3-K

La PI3-K est une kinase agissant spécifiquement sur les lipides en phosphorylant le groupement inositol à la position 3'. Cette kinase, sollicitée suivant l'engagement de nombreux facteurs de croissance, agit rapidement sur la protéine kinase B (PKB), aussi nommée Akt ou Rac, afin de maintenir l'équilibre entre la survie et l'apoptose (Carlos et al., 2010). En effet, suivant l'engagement d'un récepteur de cytokines, tels l'IL-3R, l'IL-5R ou le GM-CSFR, on assiste à l'activation de la PKB, un processus dépendant de la PI3-K chez les neutrophiles (Klein et al., 2001). L'action de la PKB promeut la survie cellulaire en phosphorylant et inactivant divers substrats tels la caspase-9 et la protéine pro-apoptotique BAD (Figure 16). En inhibant le facteur de transcription FOXO, elle bloque également l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (Manning et Cantley, 2007). De plus, cette kinase est essentielle dans la régulation de la synthèse du glycogène (Cantley, 2002). La PKB influence également le cycle cellulaire et la synthèse protéique en agissant sur les inhibiteurs de kinases cycline-dépendants (p21 et p27) et sur l'inhibiteur de la kinase Tor (tuberin ou TSC2) (Gesbert et al., 2000; Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002; Zhou et al., 2001). Elle est également impliquée dans la respiration oxydative en induisant la phosphorylation de la sous-unité cytosolique $p47^{phox}$, indispensable à l'activation de la NADPH oxydase. L'activité de la PKB est sensible à la présence de wortmanin, un inhibiteur spécifique de la PI3-K. La PI3-K représente donc un important régulateur des événements de signalisation membranaires. Ainsi, lors de la phagocytose, elle agit également sur la réorganisation du cytosquelette afin de permettre l'extension des pseudopodes, nécessaires à l'internalisation d'antigènes (Garcia-Gracia et Rosales, 2002; Marshall et al., 2001).

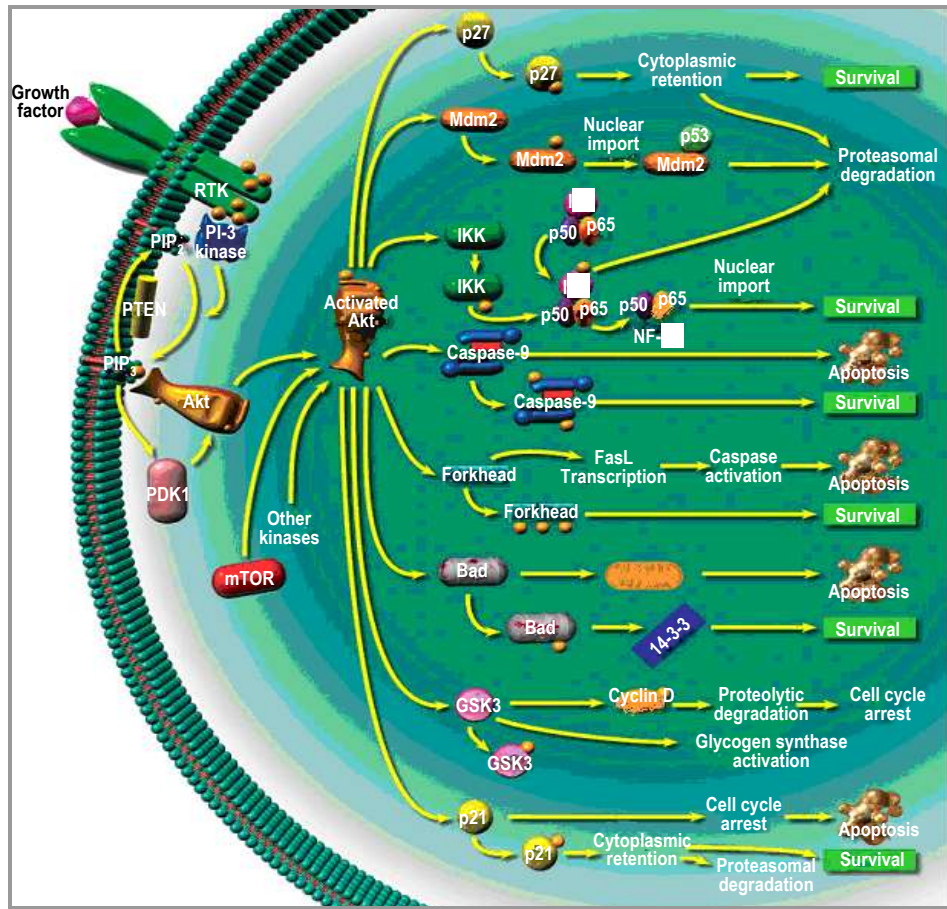


Figure 16: Mécanismes de signalisation cellulaire issus de l'action de la PI3-K impliqué dans l'activation de la PKB (Akt).

L'activation de la PI3-K, suivant l'engagement d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) par divers facteurs de croissance, favorise la survie en agissant sur une autre kinase, la protéine kinase B (PKB ou Akt). La PKB inhibe l'apoptose en phosphorylant divers substrats cellulaires tels la caspase-9 et la protéine pro-apoptotique Bad. Elle favorise également la progression du cycle cellulaire en agissant sur les inhibiteurs de kinases cycline-dépendant (p21, p27) et en protégeant la cycline D contre la dégradation protéosomale. Cette kinase influence également le métabolisme du glucose, l'activation du facteur de transcription NFκB et empêche l'activation du p53. (www.Calbiochem.com/akt)

L'activité des PMN peut être modifiée selon le contexte environnemental. Ainsi, plusieurs agents activateurs produits, soit par l'agent infectieux ou par l'hôte, incluant les cellules immunitaires et celles peuplant le foyer inflammatoire, ont été identifiés. Parmi les facteurs dérivés de l'hôte, citons : l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , le TGF- β , GRO, l'ENA-78, le PDGF, le PAF, le NAP-2 et le PF-4 (Lagraoui, 1999; Lenoir et al., 2004; Wright et al., 2010). Ces facteurs gouvernent, entre autre, la synthèse de nouvelles cytokines, le chimiotactisme, l'activation d'enzymes ainsi que la dégranulation. Chez les patients atteints d'AR, les PMN sont attirés au niveau des articulations par l'action de facteurs chimiotactiques communément retrouvés dans le liquide synovial dont le LTB₄, C5a, IL-8, MIP-1 α , SDF-1 α et TGF- β (Cross et al., 2005; Hanyuda et al., 2003; Lenoir et al., 2004, Wright et al., 2010). Les synoviocytes, formant la membrane synoviale, sont une source majeure de médiateurs pro-inflammatoires et participent activement à la pathogénèse de l'AR (Noss et Brenner, 2008). Une fois sur le site d'inflammation, les PMN s'exposent localement à une grande variété de cytokines telles IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , IL-15 et IL-6 (Tableau 4) (Cross et al., 2005; Firestein, 2003; Wright et al., 2010). À leur tour, les PMN produisent des cytokines, chemokines et facteurs de croissance qui influencent le processus inflammatoire tant de façon paracrine qu'autocrine. Les principales cytokines et facteurs de croissance produits par les neutrophiles sont : l'IL-1, le TNF- α , l'IL-6, l'IFN- α (Interféron α), le TGF- β , l'IL-8 ainsi que les CSFs (Colony-Stimulating Factor) (Cross et al., 2005; Lagraoui, 1999). Parmi ces facteurs, le G-CSF et le GM-CSF représentent une famille importante de facteurs de croissance influençant la production, l'infiltration, l'activation des PMNs et leur survie (Cornish et al., 2009).

1.4.3.2.1 Le Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)

Le GM-CSF est une glycoprotéine (22kDa) impliquée dans le contrôle de l'hématopoïèse. Ce facteur hématopoïétique stimule la formation des colonies issues de la lignée myéloïde (multi-CSF) et est principalement responsable de la formation de colonies de types macrophagiques et granulocytaires (Metcal et al., 2010). Mis à part son rôle dans la différenciation cellulaire, le GM-CSF influence également les fonctions du neutrophile de même que leur survie. Ainsi, en présence de cette cytokine pro-inflammatoire, la durée de vie et l'activation des neutrophiles sont accentuées (Cornish et al., 2009). Le récepteur du GM-CSF est composé de deux sous-unités, une sous-unité α et une β . La sous-unité α du GM-CSFR (GM-CSFR α) est directement impliquée dans la liaison spécifique du ligand (GM-CSF) contrairement à la sous-unité β qui détient un rôle crucial dans la transduction de signal. (Cornish et al., 2009). L'engagement du GM-CSF à son récepteur engendre rapidement la phosphorylation de tyrosine kinases, l'activation de Ras, Raf-1, des kinases MAP, ainsi que la transcription de proto-oncogènes dont *c-myc*, *c-fos* et *c-jun* (Roberts, 2005; Tortorella et al., 2007). Parmi les différentes kinases impliquées dans les événements de signalisation cellulaire contribuant à la survie et à la fonctionnalité des neutrophiles, les kinases ERK et PI-3K sont fréquemment étudiées. D'ailleurs, l'engagement du GM-CSF à son récepteur dans divers types cellulaires engendre l'activation de ces deux voies (Klein et al., 2000; Xu et al., 2009). Chez les neutrophiles, l'activation d'ERK et de la PI-3K est également essentielle à la survie attribuable aux cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-8 et le GM-CSF (Klein et al., 2000). Habituellement, les taux sériques du G-CSF et du GM-CSF sont plutôt bas, mais ils augmentent dramatiquement lors d'infections bactériennes ou en situation d'inflammation. Chez les patients atteints AR, le taux de ces facteurs de croissance augmentent autant dans le sérum que dans le liquide synovial et corrént avec l'exacerbation (Eyles et al., 2006; Hamilton, 2008; Nakamura et al., 2000).

En raison de leurs intéressantes propriétés, les facteurs hématopoïétiques, tels le G-CSF et le GM-CSF font l'objet d'applications thérapeutiques, notamment, dans les cas de

neutropénie, souvent associées à l'immunosuppression provoquée par les traitements de chimiothérapie. De plus, chez ces patients, l'administration du GM-CSF ou du G-CSF stimule les fonctions des PMNs protégeant ainsi davantage les sujets contre diverses infections opportunistes.

Tableau 4 : Principaux facteurs activateurs des neutrophiles retrouvés dans le liquide synovial

	Activation	Adhésion/ Chimiotaxie	ROS/ Dégranulation	Inhibition apoptose	CMH II	Production médiateurs pro- inflammatoires
C5a		X				
G-CSF	X	X	X	X		X
GM-CSF	X		X	X	X	X
IFN-γ	X			X	X	X
IgG/IgM			X			
IL-1β	X	X	X	X		
IL-6		X				
IL-8	X	X	X			
IL-15				X		
TNF-α	X	X	X	X		X

Wright et al., 2010

1.4.3.2.2 *Les interactions cellulaires*

Non seulement l'activité des PMN peut être modifiée par les médiateurs solubles, mais les interactions cellulaires représente également un moyen efficace de moduler leur survie et leurs fonctions. En effet, les PMN interagissent avec plusieurs types cellulaires dont les plaquettes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, les cellules T, les cellules épithéliales et les synoviocytes par l'entremise de molécule d'adhésion.(Cross et al., 2005, Hanyuda et al., 2003, Lee et al., 2004, Magnarin et al., 2000, Majai et al., 2010, Manfredi et al., 2010, Maugeri et al., 2009, Müller et al., 2009, Pelletier et al., 2010). Chez les patients atteints d'AR, on assiste à une infiltration massive des PMN dans la cavité synoviale. Les synoviocytes de type fibroblastique interagissent avec les PMN en favorisant leur recrutement, leur activation et leur survie (Auer et al., 2007). Ces synoviocytes jouent un rôle important dans la pathogénèse de l'AR en contribuant à la fois à l'inflammation et la destruction des articulations. Leur activation détient donc un rôle central (Noss et Brenner, 2008). Normalement, la membrane synoviale est formée d'une mince couche de cellules responsables de produire le liquide synovial impliqué dans la lubrification des articulations et dans l'apport nutritionnel des chondrocytes (Edwards, 2000, Noss et Brenner, 2008). Cette membrane, dépourvue de cellules épithéliales ou endothéliales, est plutôt composée de deux types cellulaires soit les synoviocytes de type macrophagique et ceux de type fibroblastique. Les synoviocytes de type macrophagique sont dérivés des précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse et sont caractérisés par la présence importante de lysosomes. Leur principale fonction est d'éliminer les débris cellulaires et les agents infectieux. Quant au synoviocytes fibroblastiques, ils sont d'origine mésenchymal et caractérisés par la présence d'un RER développé (Bartok et Firestein 2010). Ainsi, ils produisent des composantes de la matrice extracellulaire, des cytokines, des facteurs de croissance et sécrètent l'acide hyaluronique et la lubricine, qui compose le liquide synovial (Chang et Brenner, 2010; De Bari et al., 2001; Kiener et al., 2010; Haerdi-Landere et al., 2011; Iwanaga et al., 2002; Mor et al., 2005).

L'interaction homotypique entre les synoviocytes fibroblastiques (FLS) est médiée par la cadhérine-11 qui assure le développement normal de la membrane synoviale (Lee et al., 2007). Ces cellules expriment également des molécules impliquées dans l'adhésion tels ICAM-1 et VCAM-1 permettant ainsi l'interaction avec les leucocytes (Bartok et Firestein, 2010). Dans l'AR, on assiste à une hyperplasie de la membrane synoviale attribuable à la prolifération, au recrutement, à l'invasion et à la survie de synoviocytes fibroblastiques (Bartok et Firestein, 2010, Kiener et al., 2010). Dans ce contexte, les synoviocytes fibroblastiques (FLS) interagissent avec les synoviocytes macrophagiques (MLS) et contribuent activement à l'inflammation plutôt que de répondre simplement aux stimuli pro-inflammatoires (Lee et al., 2007; Ritchlin, 2000). Ils sont également aptes à interagir avec les, PMN, les cellules T, les cellules B, les cellules endothéliales, les ostéoclastes et les chondrocytes, mais également à supporter la survie des monocytes et des neutrophiles (Wright et al., 2010, Kiener et al., 2010, Noss et Brenner, 2008).

Les FLS, isolés à partir de membrane synoviale, peuvent se développer *in vitro* et servir d'outil pratique permettant d'approfondir les interactions cellulaires, comprendre la pathogénèse de l'AR et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (Bartok et Firestein, 2010). Suite à la digestion enzymatique de la membrane synoviale, la suspension cellulaire ainsi obtenue est mise en culture pour permettre l'adhésion des cellules FLS et MLS. Puisque les MLS sont entièrement différenciés, leur durée de vie est limitée *in vitro* et ils ne survient que quelques semaines. Ainsi, après environ 3 passages, on obtient une population relativement homogène de FLS jusqu'aux passages 10-12 (Rosengren et al., 2007). L'origine exacte des FLS en culture ne peut cependant être précisée car il est possible que ces cellules proviennent également des tissus formant les articulations, notamment des cartilages et des structures osseuses principalement composés de chondrocytes et ostéoblastes (Bartok et Firestein, 2010).

Tableau 5 : Principaux marqueurs exprimés par les synoviocytes macrophagiques et fibroblastiques

Marqueurs	Synoviocytes de type macrophagiques (MLS)	Synoviocytes de type fibroblastiques (FLS)
Communs	CD45	Collagène Type IV/V
	CD14	Vimentine
	CMH II	CMH II
	CD11b/CD18	ICAM-1
	CD68	Thy-1
Spécifiques		UDPGD (Uridine diphosphoglucose-déshydrogénase)
		VCAM-1
		DAF (Decay accelerating factor) CD55
Uniques		Cadhérine-11

(Bartok et Firestein, 2010)

1.5 Implication du neutrophile dans la réponse inflammatoire

Lors de la phase aiguë de l'inflammation, les PMN sont rapidement recrutés sur les sites inflammatoires afin de répondre aux diverses agressions rencontrées par l'hôte. Deux types de mécanismes de défense existent chez le neutrophile. Le premier est un mécanisme non oxydatif généralement conféré par des enzymes telles l'hydrolase et la protéinase. Le second fait intervenir des mécanismes oxydatifs pouvant générer divers produits toxiques (H_2O_2 , HOCL, NO_2). Bien que ce système de protection soit bénéfique, il peut également causer des dommages tissulaires importants chez l'hôte. Si l'homéostasie est perturbée, une accumulation (neutrophilie) ou un déficit (neutropénie) s'installe.

L'accumulation des PMN peut être d'ordre primaire, comme dans le cas des leucémies myéloïdes chroniques et des troubles de Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD), ou encore d'ordre secondaire, tels que les infections sévères, le stress, les brûlures, les infarctus du myocarde et les crises cardiaques, le traitement aux glucocorticoïdes, ainsi que dans l'inflammation chronique dont l'Arthrite Rhumatoïde (AR) (Cornish et al., 2009; Lawrence et al., 2007; Abel et al., 2005; Yilmaz et al., 2010). L'AR est une maladie autoimmune caractérisée par la destruction massive des articulations, principalement celle des mains, des genoux et des pieds, marquée par une inflammation chronique. Cette inflammation persistante perturbe la qualité de vie des patients tout en affectant leur espérance de vie par la progression de l'athérosclérose. L'éthiologie précise de cette maladie est encore méconnue mais la dérégulation de l'immunité acquise, l'activation chronique de l'immunité innée et l'hyperplasie des membranes synoviales contribuent indéniablement au processus (Bartok et Firestein, 2010). Dans les dernières années, un intérêt grandissant s'est développé envers le rôle des PMN vis-à-vis l'AR (Cornish et al., 2009; Cross, 2005; Iking-Konert 2005; Wright et al., 2010). En effet, on remarque une infiltration massive des PMN au niveau des membranes synoviales et du liquide synovial

chez les patients atteints d'AR (Makowski et Ramsbi 2003, Auer et al., 2007; Hanyuda 2003). Non seulement les PMN sont abondants, mais ils représentent également un joueur redoutable dans la persistance de l'inflammation et dans la contribution des dommages articulaires. En effet, via la sécrétion de protéases, de ROS, de cytokines, de chémokines, de prostaglandines et de leucotriènes, ils peuvent induire la destruction massive des os et des cartilages (Cornish et al., 2009; Iking-Konert 2005; Wright et al., 2010). De plus, les PMN contribuent davantage à la pathogénèse de l'AR par la stimulation des cellules T via la présentation antigénique (Sandilands et al., 2010). Leur persistance au site d'inflammation est également accompagnée d'une inhibition de l'apoptose spontanée.

La neutropénie est un trouble hématologique caractérisé par un taux de PMN circulants bas. Elle peut être aiguë ou chronique, d'origine héréditaire ou acquise, qui prédispose les patients à des infections récurrentes et voir même mortelles. Plusieurs causes peuvent être à l'origine d'une neutropénie dont certains traitements pharmacologiques, certaines maladies autoimmunes et infectieuses, les agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie, la présence d'une déficience en vitamine B 12 ou en fer, l'hémodialyse et les radiations (Dale et Link, 2009; Lima et al., 2006). Les antibiotiques et les facteurs de croissance sont largement utilisés afin de prévenir les infections et stimuler la production de PMN par hématopoïèse (Rezaei et al., 2009; Akhtari et al., 2009). Ainsi, le GM-CSF et le G-CSF sont cliniquement utilisés depuis plus de 20 ans pour traiter les neutropénies d'origine héréditaire ou acquise et réduire les épisodes induits par les traitements intensifs de chimiothérapie (Dale et Link, 2009). La neutropénie est l'effet secondaire le plus fréquemment rencontré chez les patients recevant de la chimiothérapie, d'où l'importance de prévenir ce phénomène par l'administration de facteurs de croissance tel le G-CSF et le GM-CSF (Bhana 2007; Metcalf, 2010). Cependant, des effets secondaires potentiels ont récemment été soulevés concernant le traitement à long terme avec ces facteurs de croissance, notamment chez les enfants atteints de neutropénie congénitale sévère, soulevant un besoin pour une thérapie alternative (Beekman et Touw, 2010).

1.6 Problématique et objectifs du travail

Plusieurs études ont démontré que les interactions cellulaires entre les PMN et les cellules avoisinantes jouent un rôle important dans la réponse des PMN (Hanyuda et al., 2003; Lee et al., 2004; Maugarie et al., 2009; Pelletier et al., 2010; Soehnlein et al., 2009). Ainsi, les travaux doctoraux antérieurs de Lagraoui (1999) effectués dans nos laboratoires ont permis d'éclaircir certains aspects de ces interactions cellulaires. Plus particulièrement, ils ont démontré, à l'aide de co-culture (24 heures), qu'une interaction entre synoviocytes/neutrophiles entraîne une augmentation de la survie des PMNs (Lagraoui, 1999). Non seulement la co-culture dénotent cette survie, mais l'effet est également retrouvé dans les milieux conditionnés (MC) générés à partir des cultures de synoviocytes. Leurs résultats suggèrent que l'activité observée est due à l'action de(s) facteur(s) soluble(s) retrouvé(s) dans le surnageant des cultures de synoviocytes. De plus, ce(s) facteur(s) démontre(nt) une stabilité à la chaleur ainsi qu'à certains traitements enzymatiques comme la trypsine et la chymotrypsine (Lagraoui et Gagnon., 1995). Lors de ces travaux antérieurs, ils ont constaté que le(s) facteur(s) soluble(s) provenant du MC, est distinct de l'IL-1 α , l'IL-8, du GM-CSF et du TGF- β (Lagraoui et Gagnon., 1997, 1999). Leurs résultats indiquent également que le(s) facteur(s) influence (nt) les protéines anti-apoptotiques appartenant à la famille du Bcl-2. L'isolation du (des) facteur(s) provenant du MC a été effectué par centrifugation ultradifférentielle, FPLC et électrophorèse suivie d'une élution des bandes du gel natif pour finalement donner un facteur semi-pur. Cependant, lors de ces travaux antérieurs, nos laboratoires n'ont pu identifier de façon concluante le(s) facteur(s) en question. Pour faire suite à ces travaux, notre projet de recherche tente, dans un premier temps, de produire, purifier et séquencer le(s) facteur(s) responsables de la survie des neutrophiles à partir des MC issus de cultures de synoviocytes tel que décrit par Lagraoui (1999). Dans un second temps, cette étude s'intéresse au

mécanisme d'action responsable de la survie des neutrophiles conférée par le(s) facteur(s). En outre, cette recherche vise à comparer l'effet du (des) facteur(s) par rapport à celui du GM-CSF dans la maturation, l'activation et la survie des neutrophiles, dans l'optique d'une thérapie alternative au GM-CSF. Plus précisément nous avons:

- 1- Isolé et mis en culture des synoviocytes issus des membranes synoviales provenant de rats
- 2- Concentré le MC (MCC) par ultrafiltration tangentielle et valider son effet sur la survie des PMN suivant une incubation de 24 heures
- 3- Produit suffisamment de MC pour permettre le séquençage des facteurs
- 4- Séquencé les protéines contenues dans le MCC
- 5- Comparé l'action des protéines à celle du GM-CSF dans :
 - L'apoptose des neutrophiles (24 et 48 heures)
 - La cytoprotection des neutrophiles humains envers les agents chimiothérapeutiques
 - L'internalisation et la dégradation d'antigènes lors de la phagocytose
 - L'expression du CD16b
 - L'activation des caspases
 - Le clivage des protéines du cytosquelette (vimentine)
 - L'expression des molécules appartenant à la famille du Bcl-2 (Mcl-1, Bcl-2, Bax)
 - La génération de ROS
 - Le pouvoir de différenciation sur les précurseurs hématopoïétiques humains
- 6- Étudié l'implication des protéines sur la prolifération des cellules de la moelle osseuse d'origine humaine et murine
- 7- Évalué l'effet des protéines dans un modèle murin de chimiothérapie
- 8- Développé une méthode de ségrégation des neutrophiles humains par cytométrie en flux à partir d'une population cellulaire semi-pure

2 Matériels et Méthode

2.1 Types cellulaires

2.1.1 Les cellules primaires

2.1.1.1 Isolation et culture de synoviocytes

Les synoviocytes sont isolés à partir des membranes synoviales chez le rat selon une légère modification de la technique décrite par Lafyatis et al. 1989. Le milieu de culture utilisé constitue un milieu enrichi [DMEM-F12 (Invitrogen) supplémenté de 20% FBS, additionné de gentamycine (100µg/ml) et de 0.2% de fungizone (Invitrogen)]. Suivant la dissection des genoux de rat femelle Lewis (Harlan), les membranes synoviales accolées au corps gras sont recueillies. On procède ensuite à la digestion de ce corps gras en présence de collagénase. Les cellules ainsi isolées représentent des synoviocytes de type macrophagique et fibroblastique. Maintenues dans une atmosphère humide (37°C, 5% CO₂), les synoviocytes de type macrophagique diminuent considérablement lors des trois premiers passages (Haerdi-Landerer et al. 2011.). Les synoviocytes de type fibroblastique, quant à eux, prolifèrent et sont enrichis par les passages répétés. Au passage 3, ils constituent >95% des cellules. (Rosengren et al. 2007.). Lorsqu'ils atteignent 80% de confluence, les synoviocytes sont trypsinisés. L'utilisation des cultures cellulaires de synoviocytes au-delà du passage 9 n'est pas recommandée due à la sénescence cellulaire. Le milieu conditionné, c'est-à-dire le surnageant des cultures de synoviocytes, est recueilli, clarifié et conservé à 4°C.

2.1.1.2 **Isolation des neutrophiles humains**

Les polymorphonucléaires (PMNs) sont obtenus à partir du sang périphérique humain. Les divers donneurs consentants et sains proviennent d'une cohorte aléatoire de volontaires de l'Institut Armand Frappier. L'isolation s'effectue par le biais d'un gradient de densité en une seule étape soit le lympholyte-poly (densité de 1.113 g/ml, Cedarlane, #CL-5070). Cette technique d'isolation est une variante de la technique élaborée par Boyum en 1964. Elle permet l'isolation simultanée des lymphocytes et macrophages ainsi que des granulocytes à partir de sang humain complet (Boyum, 1968; Ferrante et Thong, 1980). La phase du plasma et l'anneau de PBML généré lors du fractionnement du sang (500g, 30min, 25°C) sont éliminés par aspiration afin de limiter la contamination lymphocytaire. La phase comportant les PMNs est alors recueillie et lavée deux fois dans un tampon physiologique de phosphate (PBS) ne contenant pas de calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}). Suivant le dernier lavage, on procède à l'élimination des globules rouges persistants par lyse hypotonique. Les PMNs sont ensuite resuspendus dans du milieu RPMI 1640 additionné de 10% FBS décomplémenté. La viabilité de la suspension cellulaire, mise en évidence par l'extrusion du bleu de trypan, est supérieure à 97%. Les PMNs fraîchement isolés représentent 95% et plus de neutrophiles. La concentration cellulaire de la suspension est déterminée par l'entremise du Particule Counter Z1[®] de Beckman Coulter. Les paramètres de compte cellulaire utilisés proviennent d'un protocole clinique établi par le manufacturier pour les leucocytes humains.

2.1.1.3 **Les cellules de la moelle osseuse**

Les cellules issues de la moelle osseuse murines sont obtenues à partir des fémurs (Coligan et Coico, 1994; Kadhim et al., 2000). Les fémurs sont recueillis et nettoyés à l'aide d'une gaze. En insérant une aiguille 27G 1/2" raccordée à une seringue de 3ml, la

moelle osseuse est rincée en présence de 3ml de PBS. Les cellules de la moelle osseuse contenues dans le PBS forment une suspension cellulaire hétérogène.

Les cellules de moelle osseuse humaine sont commercialement disponibles (Cambrex). Les cellules utilisées lors de cette étude (2M-12C, Cambrex), représentent des cellules mononuclées isolées par Ficoll-HypaqueTM à partir de la moelle osseuse complète. Les cellules de la moelle osseuse sont maintenues en culture en présence de RPMI 1640 additionné de 10% FBS selon le besoin.

2.1.2 Les cellules transformées

2.1.2.1 Les cellules de type HL-60

Les cellules de type HL-60 (ATCC CCL-240) représentent une lignée cellulaire provenant de patients atteints d'une leucémie promyélocytaire. Ces cellules non-adhérentes sont maintenues en culture en présence de RPMI 1640 additionné de 10% FBS. Les cellules sont divisées lorsque la densité atteint 1×10^6 cellules par ml. La densité de la culture cellulaire est minutieusement contrôlée de façon à respecter les recommandations du manufacturier soit un minimum de 1×10^5 cellules par ml et un maximum de 1×10^6 cellules par ml.

2.1.2.2 Les cellules de type MCF-7

Les cellules de type MCF-7 (ATCC) représentent une lignée cellulaire provenant d'un patient atteint d'un cancer du sein (breast carcinoma). Ces cellules adhérentes, cultivées dans du milieu RPMI 1640 additionné de 10% FBS, sont trypsinisées lorsque la culture atteint une confluence de 80%.

2.2 Les composés utilisés

2.2.1 Le milieu conditionné concentré (MCC)

La production du milieu conditionné s'effectue à partir d'une culture primaire de synoviocytes adhérents (Lagraoui, 1999). Les divers surnageants des cultures confluentes (80%) de synoviocytes sont d'abord recueillis et clarifiés par centrifugation (10 minutes à 200g). Ces différents surnageants, produits entre les passages 4 à 15, sont ensuite combinés et soumis à l'ultrafiltration tangentielle afin de caractériser davantage le ou les facteurs actifs sécrétés. Ce procédé utilise une membrane permettant la filtration de diverses molécules selon leur poids moléculaire (P.M.) par l'entremise d'une pompe péristaltique. Le système de filtration utilisé est établi selon les recommandations du manufacturier et en collaboration avec ce dernier (Pall Corporation). Un milieu de culture non-conditionné, (DMEM-F12 20% FBS) est également concentré à titre de contrôle ([M]). Ainsi, ce procédé de filtration permet la concentration des molécules de poids moléculaire supérieur à 50kDa, alors que les autres molécules ne sont pas retenues. Suivant la production du MCC, ce dernier est soit évalué ou davantage caractérisé. Sa caractérisation s'effectue par l'entremise du séquençage des protéines. Brièvement, le MCC est soumis à l'électrophorèse par gel natif (12%). Les bandes migrées sont ensuite transférées à haut voltage sur une membrane de nitrocellulose pendant 15min dans du tampon CAPS. La présence des bandes est mise en évidence par l'entremise d'une solution de bleu de Coomassie R-250 (0.1% R-250 dans 50% MeOH). Elles sont ensuite découpées et séquencées par PE Applied Biosystems 494cLC Protein Sequencer.

2.2.2 Le GM-CSF

Le GM-CSF représente un facteur hématopoïétique important pour les granulocytes et macrophages. Il est également utilisé à titre de contrôle positif au niveau de la survie et l'activation des neutrophiles (Brach et al., 1992). Le GM-CSF est commercialement disponible. La formulation de BioSource est privilégiée par rapport aux différents distributeurs. En effet cette préparation est dénudée de protéines stabilisatrices telle l'albumine.

2.2.3 Les protéines

Suivant le séquençage du MCC, trois protéines ressortirent du profil de séquences soient l'albumine, la fétuine et l' α 1-antitrypsine. Des préparations commerciales sont disponibles pour chacune des protéines. L'albumine utilisée lors de cette étude représente de l'albumine sérique humaine (HSA) mieux connue sous le nom albumine, fraction V (Sigma-Aldrich). Cette préparation est obtenue à partir du plasma par un procédé de fractionnement élaboré en 1946 par Cohn Edwin. Quant à la fétuine (Sigma-Aldrich), elle est obtenue à partir du sérum de veau foetal (FCS) par précipitation en présence de persulfate d'ammonium (Pederson, 1944). L' α 1-antitrypsine utilisée lors de cette étude est une protéine recombinante humaine produite dans un système de levure (Arriva Pharmaceutical).

2.2.4 Les agents cytotoxiques

Afin d'évaluer l'implication des protéines identifiées dans le MCC dans la chimioprotection, deux agents cytotoxiques sont employés. La formulation utilisée pour l'induction de la cytotoxicité constitue des formulations pharmaceutiques actuellement utilisées pour divers traitements de chimiothérapie chez l'homme. La Mutamycine® est utilisée pour induire une cytotoxicité *in vitro* chez les PMNs humains. Le Cytosan® est

utilisé pour induire une immunosuppression *in vivo*. La Mutamycine et le Cytosan sont des marques déposées par Bristol-Myers Squibb (Montréal, Canada). Un autre composé toxique, la camptothécine (Calbiochem), est utilisé à titre d'inducteur d'apoptose chez les cellules de type HL-60 pour mettre en évidence l'activation des caspases.

2.2.5 Les inhibiteurs de kinases

Parmi le vaste éventail d'inhibiteurs perméables, trois inhibiteurs spécifiques de kinases dont la wortmanin, le PD98059 et le SB202190 (Calbiochem) sont évalués. L'implication des kinases dans diverses réponses cellulaires, notamment dans la protection contre l'apoptose est démontré dans la littérature (Cantley, 1997; Coffey et al, 1998a; Datta et al, 1999; Franke et Jarpe et al., 1998; Wei et al, 1996). La wortmanin est utilisée à titre d'inhibiteur spécifique de la PI-3K, le PD98059 pour inhiber la kinase extracellulaire-regulated kinase (ERK) et le SB202190 pour interrompre les événements de signalisation passant par la p38.

2.3 La cytométrie en flux

Les échantillons sont préparés, fixés et analysés par cytométrie en flux à l'aide du cytomètre Epics XL-MCL de Beckman Coulter. La standardisation du cytomètre est continuellement vérifiée précédant son utilisation par l'entremise de billes contrôles fournies par le manufacturier de l'appareil (Flow-Check et Flow-Set). Cet appareil est équipé d'un laser ion-argon capable d'exciter les fluorochromes à une longueur d'onde de 488nm. Les PMNs sont identifiés suivant leur profil particulier de taille (FS) et de granularité (SS). Les débris sont d'abord exclus de l'analyse par discriminateur selon leur taille. Les lymphocytes contaminants persistants sont également éliminés de l'analyse selon leur taille et leur profil de granularité. Pour chaque type cellulaire étudié, des cellules non marquées sont analysées pour déterminer l'autofluorescence intrinsèque de la population.

2.4 Les Techniques expérimentales

2.4.1 Analyses de cytométrie en flux

2.4.1.1 Évaluation de l'apoptose

2.4.1.1.1 *L'apoptose constitutive*

L'apoptose spontanée des PMNs est étudiée afin de mettre en évidence l'effet protecteur du MCC et des protéines séquencées sur la viabilité des PMNs. Les neutrophiles sont incubés dans un milieu RPMI 1640 additionné de 10% FBS à raison de 2×10^6 cellules pendant 24hrs en présence ou absence de MCC et de [M] (200 μ l) dans un volume finale de 1ml. Dans certaines expériences, les neutrophiles sont incubés en présence de 200 μ M d'albumine, de fétuine, de différentes dilutions de ces dernières protéines ou encore de GM-CSF à 10ng/ml. L'effet des protéines est également évalué à 48 heures. Suivant l'incubation, les cellules sont lavées en présence de PBS en absence de calcium et magnésium. L'apoptose est mise en évidence par la méthode d'annexinV-FITC (Martin et al., 1995; Homburg et al., 1995; Velde et al., 1996). Brièvement, les cellules sont resuspendues dans du tampon de liaison contenant 10mM d'HEPES/NaOH, pH 7.4, 140mM de NaCl et 2.5mM de CaCl₂. L'annexinV-FITC (BioSource) est ajoutée à raison de 2 μ l par échantillon. Afin de discerner les cellules mortes ou ayant perdues leur intégrité membranaire (Schmid et al, 1992) un colorant nucléaire est également utilisé soit le 7-AAD (1 μ g par 1×10^6 cellules). Les cellules sont incubées pendant 15 minutes. Après incubation, les cellules sont fixées à 4°C en présence de formaldéhyde (1%). Aussitôt fixés, les échantillons sont conservés sur glace et analysés par cytométrie en flux. La moyenne obtenue des triplicatas est ensuite compilée et comparée à celle du contrôle ne contenant pas de protéines séquencées ou de MCC.

2.4.1.1.2 *L'apoptose induite*

L'apoptose induite est étudiée afin d'évaluer si l'effet protecteur des protéines séquencées persistent en présence de composés cytotoxiques utilisés en chimiothérapie. Trois protocoles sont utilisés pour évaluer la chimioprotection *in vitro* des PMNs. Dans le premier protocole, les PMNs sont incubés à raison de 2×10^6 cellules par ml en présence ou en absence de Mutamycin ($4 \times 10^{-5} \text{M}$). L'albumine, la fétuine ou le GM-CSF sont ajoutées au temps 0. L'apoptose induite par la Mutamycin® chez les PMNs est évaluée à 24 heures par la méthode d'annexinV-FITC/7-AAD. Le second protocole évalue l'effet du prétraitement des neutrophiles en présence des protéines mis en évidence par la méthode d'annexinV-FITC/7-AAD. La technique implique d'abord une incubation en présence des protéines séquencées ou du GM-CSF pendant 4 heures. Suivant l'incubation, les cellules sont lavées et resuspendues dans du milieu RPMI 1640 frais additionné de 10% FBS. La Mutamycine® ($4 \times 10^{-5} \text{M}$) est ajoutée aux PMNs, qui sont incubés pendant 20 heures. Le dernier protocole évalue l'effet des protéines séquencées et du GM-CSF au temps 4 heures. Lors de cette étude, les PMNs sont incubés en présence de Mutamycine® ($4 \times 10^{-5} \text{M}$) pendant 4 heures. Après 4 heures d'incubation, l'albumine, la fétuine ou le GM-CSF sont ajoutés. L'incubation se poursuit jusqu'à 24 heures et l'analyse est effectuée par la méthode d'annexinV-FITC/7-AAD.

2.4.1.1.3 *Essai de signalisation cellulaire relié à la survie*

L'essai de signalisation cellulaire vise à mettre en évidence les évènements responsables de l'inhibition de l'apoptose des PMNs observée en présence des protéines séquencées par rapport au GM-CSF. L'essai élaboré est une procédure inspirée de Derout et al. (2004) ainsi que Klein et al. (2000). Les concentrations d'inhibiteurs utilisées reflètent celles employées chez les neutrophiles dans la littérature. Deux suspensions cellulaires de PMNs sont préparées dont l'une contenant de la cyclohexemide (CHX) ($10 \mu\text{g/ml}$) afin de limiter la synthèse *de novo* des protéines. Les PMNs (2×10^6 cellules par ml) sont incubés en

présence d'inhibiteurs de kinases perméables dont la wortmanin (100nM), le PD 98059 (50µM) et le SB 202190 (5µM) pendant 1 heure. Le groupe contrôle est incubé en absence d'inhibiteurs. Les neutrophiles sont ensuite stimulés ou non en présence du GM-CSF, de l'albumine et de la fétuine pendant 8 heures aux concentrations déterminées ultérieurement. L'apoptose spontanée est déterminée par la méthode d'AnnexinV-FITC/7-AAD décrite ci-haut.

2.4.1.2 **Détection d'antigènes leucocytaires de surface**

La détection des antigènes leucocytaires de surface permet de vérifier la pureté et la fonctionnalité de la suspension des PMNs par cytométrie en flux. Les PMNs (2×10^6 cellules) sont incubés en présence d'albumine, de fétuine et du GM-CSF, aux concentrations déjà définies, ou d'un volume équivalent de RPMI 10% FBS (contrôle). Après une incubation de 24 heures, les PMNs sont lavés à l'aide de 3ml de PBS additionné de 3% FBS. Les cellules sont resuspendues en présence de 1µg d'anticorps spécifiques pour 1×10^6 cellules (anti-CD16b/FITC, anti-CD66/FITC, anti-CD9PerCPCy5.5). Les neutrophiles sont alors incubés en présence des anticorps conjugués pendant 30 minutes. Les cellules lavées sont ensuite fixées en présence de formaldéhyde (1%) à 4°C pendant 30 minutes. Les contrôles isotypiques respectifs recommandés par les manufacturiers sont utilisés afin de déterminer la portion de liaison non spécifique. L'autofluorescence des cellules à analyser est, quant à elle, déterminée en présence de cellules non marquées (contrôle négatif).

2.4.1.3 **Mesure de l'activité phagocytaire**

L'activité phagocytaire des PMNs est étudiée afin de mettre en évidence l'effet des protéines séquencées sur leur fonctionnalité.

2.4.1.3.1 *Internalisation d'antigènes*

L'internalisation d'antigènes constitue une étape importante de la phagocytose. Ainsi, afin d'évaluer ce processus d'internalisation, le modèle de phagocytose en présence de particules de latex décrit dans la littérature est utilisé (Dunn et Tyrer, 1981; Nagel et al., 1986; Ogle et al, 1988; Steinkamp et al., 1982). Les particules de carboxylate utilisées (Fluoresbrite® YG Carboxylate Microspheres, Polysciences) sont ensuite liées de façon covalente (Carbodiimide kit, Polysciences) à des molécules d'IgG afin de former des complexes immuns d'après les recommandations du manufacturier (Singer et al., 1965; Sluis et al., 1985; van Snick et Masson, 1978). Dans un volume de 100µl, 2×10^5 PMNs sont incubés en présence de billes opsonisées par des IgG humains (ratio 1:130) pendant 30min à 37°C. Suivant l'incubation, les neutrophiles sont placés sur glace afin d'arrêter le processus d'internalisation ou de phagocytose. Pour camoufler la fluorescence des billes liées mais non ingérées par les cellules, 100µl de solution de quenching (0.25mg/ml de bleu de trypan) est ajouté à chacun des échantillons. Les cellules sont lavées à deux reprises (PBS) et fixées dans 500µl de formaldéhyde (1%). Elles sont également maintenues sur glace lors de leur analyse.

2.4.1.3.2 *Activité protéolytique*

La présence de diverses enzymes et produits toxiques dans les granules des neutrophiles contribue à son activité protéolytique spécialement, lors des événements de migration et de phagocytose. Afin d'étudier le clivage d'un antigène chez les neutrophiles, on utilise un principe élaboré par Reis et al., (1998). Ce concept est également utilisé chez

les neutrophiles par divers auteurs (Kindzelskii et al., 1998; Ryan et al., 1990; Seetoo et al., 1997). L'activité protéolytique est d'abord déterminée chez les neutrophiles fraîchement isolés. Dans un volume de 100µl, 2×10^5 PMNs sont incubés en présence de différentes concentrations de DQ-BSA (10µg/ml à 100µg/ml) de 0 à 4 heures à 37°C. Le contrôle négatif est incubé sur glace. La DQ-BSA (Bodipy Flurosceine self-quenched Bovine Serum Albumin) est une molécule de BSA hautement conjuguée au Bodipy FL, un substrat fluorescent photostable et insensible au pH acide, qui émet une fluorescence (verte) suivant la protéolyse de la BSA. Les cellules sont ensuite lavées et fixées afin de poursuivre l'analyse. Les conditions optimisées chez les neutrophiles frais (100µg/ml de DQ-BSA pendant 4 heures) sont employées chez les neutrophiles incubés 24 heures en présence du GM-CSF (10ng/ml), de l'albumine (200µM) et de la fétuine (200µM).

2.4.1.4 **Évaluation de l'activation relative des caspases**

Les caspases sont responsables de l'amplification du processus d'apoptose, d'où l'importance de les étudier afin d'élucider le mécanisme d'action des protéines séquencées. L'activation relative des caspases est évaluée chez les cellules HL-60 et les PMNs par l'entremise des trousse spécifiques de détection CaspGlow Green Caspase staining kit (BioVision, Mountain View, CA). Cette méthode tire profit de l'utilisation d'inhibiteur spécifique de caspases conjugués au FITC (Bedner et al, 2000; Amstad et al., 2001; Smolewski et al., 2001). L'induction de l'apoptose chez les cellules HL-60 (1×10^6 cellules/ml) se fait en présence de CAM (2µM) pendant 16 heures. Un inhibiteur de caspases large spectre, le Z-VAD-FMK, est utilisé à titre de contrôle négatif selon les recommandations du manufacturier. Chez les PMNs, l'activation des caspase-3 (FITC-DEVD-FMK), caspase-8 (FITC-IETD-FMK) et caspase-9 (FITC-LEHD-FMK) est évaluée après 48 heures d'incubation. Les PMNs (2×10^6 cellules) sont incubés en présence ou non d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF. Suivant l'induction, un aliquot de 300µl par échantillon est marqué pendant 1 heure à 37°C en présence de 1µl de substrat FITC-DEVD-

FMK spécifique pour la caspase-3, 1µl de substrat FITC-IETD-FMK spécifique pour la caspase-8 ou 1µl de substrat FITC-LEHD-FMK spécifique pour la caspase-9. L'excédent est éliminé par lavage et les cellules fixées (1% formaldéhyde) sont conservées sur glace lors de l'analyse.

2.4.1.5 **Détection des dérivés oxygénés chez les neutrophiles humains**

Les dérivés oxygénés contribuent également à la mortalité cellulaire. Leur présence intracellulaire est donc évaluée chez les neutrophiles par l'entremise d'une technique cytométrique développée par Bass et al., (1983). Ce principe utilise un substrat perméable non-fluorescent ($H_2DCF-DA$) qui, une fois oxydé par les estérases ou peroxydases cellulaires, libère un composé hautement fluorescent (DCF). Suivant l'incubation des neutrophiles pendant 24 heures, les PMNs (1×10^6) sont lavés et mis en présence de $5 \mu M$ de $H_2DCF-DA$. On ajoute également $1 \mu g$ de 7-AAD à titre de colorant nucléaire afin de discriminer la fluorescence des cellules viables de la fluorescence des cellules mortes. L'incubation s'effectue à $37^\circ C$ pendant 15 minutes. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 0.003%) est utilisé à titre de contrôle positif de l'oxydation. La MFI (intensité de fluorescence moyenne) des cellules viables est ensuite compilée.

2.4.1.6 **La détection des antigènes intracellulaires**

Afin d'approfondir davantage le mécanisme d'action de l'albumine et de la fétuine sur la survie des PMNs, une étude des protéines intracellulaires s'impose. La méthode utilisée afin de mettre en évidence la présence d'antigènes intracellulaires chez les neutrophiles est une méthode adaptée de Sander et al, (1991). Suivant la stimulation des PMNs par l'albumine, la fétuine ou le GM-CSF, les cellules sont lavées et fixées en présence de formaldéhyde (4%) pendant 15-20 minutes à $4^\circ C$. Un deuxième lavage est effectué dans un tampon PBS ne contenant pas de calcium et de magnésium et additionné de 3% FBS. Le surnageant des cellules fixées est aspiré. Les cellules ainsi fixées peuvent

être conservées à 4°C dans la solution de lavage (PBS, 3% FBS) pour une perméabilisation et un marquage subséquent (maximum 72heures). La perméabilisation s'effectue en présence d'un tampon Perm/Wash 1x (BD Biosciences, San Diego) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules perméabilisées sont ensuite incubées (30minutes) en présence d'anticorps monoclonaux spécifiques pour le Bcl-2 (clone 100 et clone C2), le Bcl-xL, la vimentine, le Mcl-1 et le Bax. Tel que recommandé par les manufacturiers, des contrôles isotypiques (selon l'isotype de l'anticorps utilisé) sont prévus afin de déterminer la portion de liaison non spécifique. Les anticorps intracellulaires utilisés sont directement conjugués à la phycoérythrine (PE) ou à la biotine. La révélation des anticorps conjugués à la biotine s'effectue en présence de streptavidine-PE (Cederlane, Honrby, Canada) pendant 15 minutes. L'excédent d'anticorps ou de substrat est éliminé par lavage (Perm/Wash) et les cellules sont resuspendues dans 1ml de tampon Perm/Wash (1x) afin de poursuivre l'analyse.

2.4.2 Techniques de biologie moléculaire

2.4.2.1 Immunobuvardage

La présence de protéines intracellulaires peut également être mise en évidence par la méthode d'immunobuvardage. La séparation des protéines par électrophorèse, leur transfert et leur immunodétection sont des méthodes d'analyse couramment utilisées et bien définies (Ausubel, 1990; Laemmli, 1970). La technique de lyse employée est inspirée des protocoles décrits chez les neutrophiles par plusieurs auteurs (Maianski et al., 2003; Moulding et al., 2001; Weinmann et al., 1999). Les PMNs fraîchement isolés ou stimulés par l'albumine, la fétuine ou le GM-CSF sont directement lysés pendant 5 minutes en présence de tampon de dénaturation Laemmli 2x (5% 2-Mercaptoethanol) préalablement chauffé (95°C). Les extraits cellulaires sont ensuite rapidement congelés à -80°C. La séparation des protéines

(provenant de 0.5×10^6 PMNs par puits) par l'électrophorèse est réalisée sur un gel SDS-PAGE de 8 à 12% selon le poids moléculaire de la protéine à mettre en évidence. À noter que les tampons utilisés pour la séparation des protéines contiennent des solutions d'inhibiteurs de protéases et phosphatases. Les protéines migrées sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioTrace NT, Pall) à 100V pendant 1 heure. Afin d'évaluer le poids moléculaire des protéines séparées, un standard visible (Full Range RainbowTM Molecular Weight Marker, Amersham) est parallèlement migré. Le Bcl-2 est détecté par l'entremise d'un anticorps monoclonal 1:200 produit chez la souris (mouse anti-Bcl-2 clone 100, Oncogene Research). La détection du Mcl-1 se fait en présence d'un anticorps polyclonal 1:1000 (anti-Mcl-1 BD Bioscience). L'immunodétection suivi de sa révélation (ECL Western blotting protocols) sont effectuées selon les recommandations du manufacturier Amersham. Le ratio Mcl-1/Actine est obtenu par l'entremise du programme AlphaEase FC.

2.4.2.2 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Afin d'évaluer la présence de transcrit d'ARNm codant pour la protéine Bcl-2 chez les PMNs, un RT-PCR est réalisé. L'extraction d'ARN chez les PMNs humains s'effectue en présence de Trizol[®] Reagent (Invitrogen), combinée à l'utilisation d'un gel (Phase Lock-gel, Eppendorf) afin de maximiser la quantité d'ARN recueilli. Suivant son extraction et son dosage, l'intégrité de l'ARN extrait est vérifiée par électrophorèse (Ausubel, 1990). L'amplification des fragments d'intérêt s'effectue en une étape par l'entremise du TitanTM One Tube RT-PCR System (Roche) selon les recommandations du manufacturier. La réaction de PCR se fait en présence de 10pmol de chacune des amorces, 0.2mM de dNTP, 10nM Tris, 50mM KCl et 1.5mM dans un volume de 50µl contenant 2-5µg d'ARN comme suit :

Tableau 6 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour l'amplification du Bcl-2

	Oligonucléotide (5' (r)3')	Taille du fragment (pb)	Température et profil de l'amplification
Bcl-2	(S) TGCACCTGACGCCCTTAC (AS) AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG	293	94°C(1 min)- 50°C(1min)- 72°C(2min) ; 40 cycles

(Kim et al., 2001)

Suivant l'amplification, un aliquot de la réaction de PCR est migré sur un gel d'agarose 2% afin de visualiser les fragments de PCR attendus parallèlement à un standard de paire de bases (pb) (Ez Load PCR Molecular Ruler, BioRad).

2.4.3 Essais de prolifération et de maturation

Afin de comparer davantage l'effet de l'albumine et de la fétuine à celle du GM-CSF, nous étudions leur impact sur la prolifération et la différenciation des cellules de la moelle osseuse.

2.4.3.1 Mesure de la synthèse d'ADN

La synthèse de l'ADN est évaluée à titre d'indice de prolifération (Coligan et Coico, 1994). Cette dernière est mesurée par rapport à l'incorporation de thymidine^{3-[H]} (Amersham) par l'entremise d'un compteur de radiation β (Wallac). Les cellules de la moelle osseuse entière de souris ou les cellules mononucléées de la moelle osseuse humaine sont incubées à raison de 200 000 cellules par puits en quadruplicata et ce, en présence ou en absence d'albumine (200 μ M) ou de fétuine (200 μ M) pendant 72 heures à 37°C, 5% CO₂. Durant le dernier 8 heures, on ajoute 0.5 μ Ci par puits de 3^H-thymidine. L'aspiration et la lyse des cellules sur une membrane fibreuse (Filtermat) à l'aide du TOMTECTM permettent par la suite de quantifier la synthèse d'ADN par rapport aux coups par minutes (CPM) obtenus.

2.4.3.2 Formation de colonies en milieu méthylcellulose

L'élaboration des divers progéniteurs issus des cellules souches de la moelle osseuse humaine s'effectue en milieu semi-solide (Iscove et al., 1974). Le milieu utilisé représente un milieu composé de méthylcellulose (MethocultTM H4434, StemCell Technologies, Vancouver, Canada), élaboré pour supporter la formation des colonies CFU-

E/BFU-E (Clony Forming Unit-Erythroïd, Burst Forming Unit- Erythroïd), des CFU-GM (Clony Forming Unit-Granulocytes Monocytes) et des CFU-GEMM (Clony Forming Unit-Granulocytes Erythrocytes Monocytes Megacaryocytes). Les cellules mononucléaires issues de la moelle osseuse (#2M-12C, Cambrex) sont d'abord incubées (1×10^6 cellules par ml) en présence d'albumine ($200 \mu\text{M}$), de fétuine ($200 \mu\text{M}$), de GM-CSF (10 ng/ml) ou d'EPO (1 U/ml) pendant 3 jours. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues dans du milieu Iscove 2% FBS de façon à obtenir 8×10^3 cellules par pétris. Les cellulesensemencées dans le Methocult™ sont incubées 14 jours pendant lesquels la température (37°C) et le taux de CO_2 (5%) sont rigoureusement surveillés selon les recommandations du fabricant. Les colonies formées sur chacun des pétris sont ensuite identifiées et comptées selon le manuel Atlas of Human Hematopoietic Colonies (#28700, StemCell Technologies, Vancouver, Canada).

2.4.4 Études *in vivo*

Après avoir étudié l'effet de l'albumine et de la fétuine dans des modèles de cytotoxicité, de prolifération et de maturation *in vitro*, nous vérifions leur impact dans un modèle *in vivo* de chimioprotection selon Zacharie et al., (1997) et Kadim et al., (2000). Brièvement, différentes concentrations d'albumine (14 mg/kg et 7 mg/kg) et de fétuine (10 mg/kg et 5 mg/kg) sont administrées quotidiennement par voie intraveineuse pendant 3 jours (J-3, J-2 et J-1) chez des souris femelles C57BL/6 de 6 à 8 semaines d'âge. Au jour 0 (J-0), l'immunosuppression est induite par une injection intraveineuse de Cytoxan® à raison de 200 mg/kg dans la veine latérale de la queue des souris. Les souris sont sacrifiées par exsanguination sous anesthésie au J-5. Le sang est récolté par ponction cardiaque. On prélève également le thymus, la rate ainsi que le fémur. À partir de ces organes, des suspensions cellulaires sont préparées et leur densité cellulaire est évaluée à l'aide du Particule Counter® Z1 (Beckman Coulter, Fullerton, Californie).

2.5 Les statistiques

Les résultats présentés sont des moyennes \pm l'écart-type. La significativité des différences entre les résultats obtenus d'une expérience à l'autre a été analysée par le test t de Student pour des données non-pairées. Un niveau de probabilité avec $p < 0.05$ a été considéré significatif.

3 Résultats

3.1 Protection de la survie des neutrophiles humains

Baser sur les travaux doctoraux antérieurs de Lagraoui (1999) et du modèle de culture des synoviocytes fibroblastiques établi, nous avons d'abord recueilli en quantité suffisante le milieu conditionné (MC), afin de caractériser davantage l'effet anti-apoptotique. Une fois produit, le MC est soumis à l'ultrafiltration tangentielle afin de retenir les protéines de poids moléculaire (PM) supérieures à 50kDa. Ensuite, les protéines contenues dans ce milieu conditionné concentré (MCC) et le facteur semi-pur isolé par Lagraoui (1999) (ré-évalué et toujours actif) sont séparées par électrophorèse native. Les bandes sont alors soumises au séquençage. À partir du profil de séquençage obtenu, deux protéines connues sont mises en évidence, autant à partir du facteur semi-pur que du MCC, soient: l'albumine et la fétuine. Bien que ces protéines soient essentiellement des protéines sériques, aucune donnée ne documente l'effet de ces dernières sur les PMN, contrairement à d'autres systèmes, notamment chez les cellules endothéliales et les cellules vasculaires des muscles lisses. De plus, chez les patients atteints d'AR, la présence de protéines sériques dans le liquide synovial est également augmentée. Ainsi, on entreprend d'évaluer l'efficacité du MCC et des protéines identifiées sur les PMNs en étudiant leur activité sur l'apoptose spontanée, comparativement au GM-CSF, également retrouvé dans le liquide synovial.

3.1.1 L'apoptose spontanée

3.1.1.1 Protection de la survie des neutrophiles en présence du MCC

Les PMNs possèdent une vie de courte durée dans la circulation. Ils sont produits en grande quantité par la moelle osseuse chaque jour (10^{11}) et meurent principalement par apoptose. Cette caractéristique est facilement appréciable *in vitro*. En effet, suivant une incubation de 24hres, la viabilité des PMN contrôles est de 39% \pm 9. (Figure 17). La compilation des différentes expériences met en évidence la viabilité des neutrophiles à partir des histogrammes bi-paramétriques de cytométrie en flux (AnnexinV-FITC/7-AAD) qui évaluent l'état précoce des PMN en apoptose. En présence du MCC, la viabilité des PMN est significativement soutenue (68% \pm 3, $p < 0.01$) comparativement au neutrophiles contrôles (39% \pm 9). Le DMEM-F12 20% FBS concentré ([M]) améliore la viabilité mais son effet est non-significatif (48% \pm 8, $p > 0.05$). De plus, l'effet du MCC est statistiquement différent du [M] (68% \pm 3 vs 48% \pm 8, $p < 0.01$).

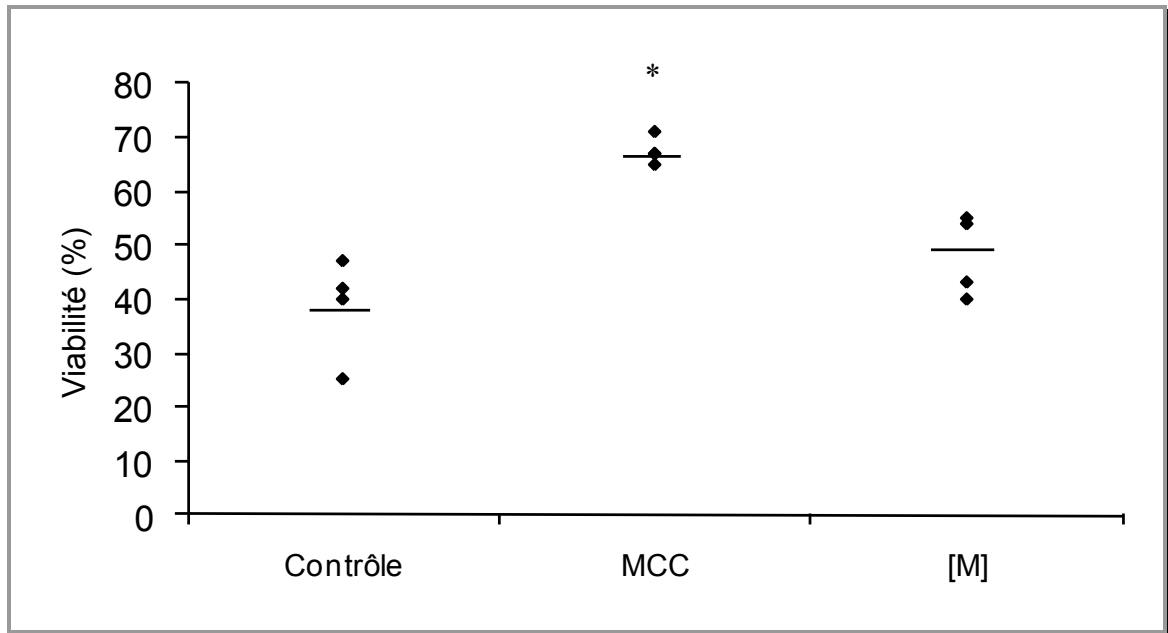


Figure 17 : Compilation des résultats obtenus chez différents donneurs concernant l'effet du MCC et du [M] sur la viabilité des PMN humains après 24hres d'incubation.

(* $p < 0.01$) (n=4).

3.1.1.2 **Activité des protéines séquencées sur la survie des neutrophiles humains**

Suivant le séquençage du MCC et du facteur semi-pur actif, deux protéines ressortirent du profil de séquences. Ainsi, l'effet de l'albumine (Figure 18) et la fétuine, (Figure 19) est illustré afin de vérifier leur contribution dans la survie des PMN. Les différentes concentrations étudiées indiquent que seule la concentration $2 \times 10^{-4} \text{M}$ ($p < 0.01$) de l'albumine et de la fétuine induit une protection significative des PMNs contre l'apoptose spontanée. Ainsi, en présence de $200 \mu\text{M}$ d'albumine ou de fétuine, le taux de viabilité des PMNs atteint $67\% \pm 12$ et $62\% \pm 8$ respectivement. Les résultats obtenus chez les PMNs traités à l'albumine et à la fétuine sont similaires à ceux obtenus en présence du MCC ($68\% \pm 3$ viabilité) (Figure 17). Aucun effet additif n'a été observé en combinant les deux protéines à diverses concentrations lors des essais d'apoptose (résultat non illustré). Selon les résultats obtenus en présence d'albumine et de fétuine, la concentration $200 \mu\text{M}$ est utilisée dans les expériences subséquentes, sinon, précisée.

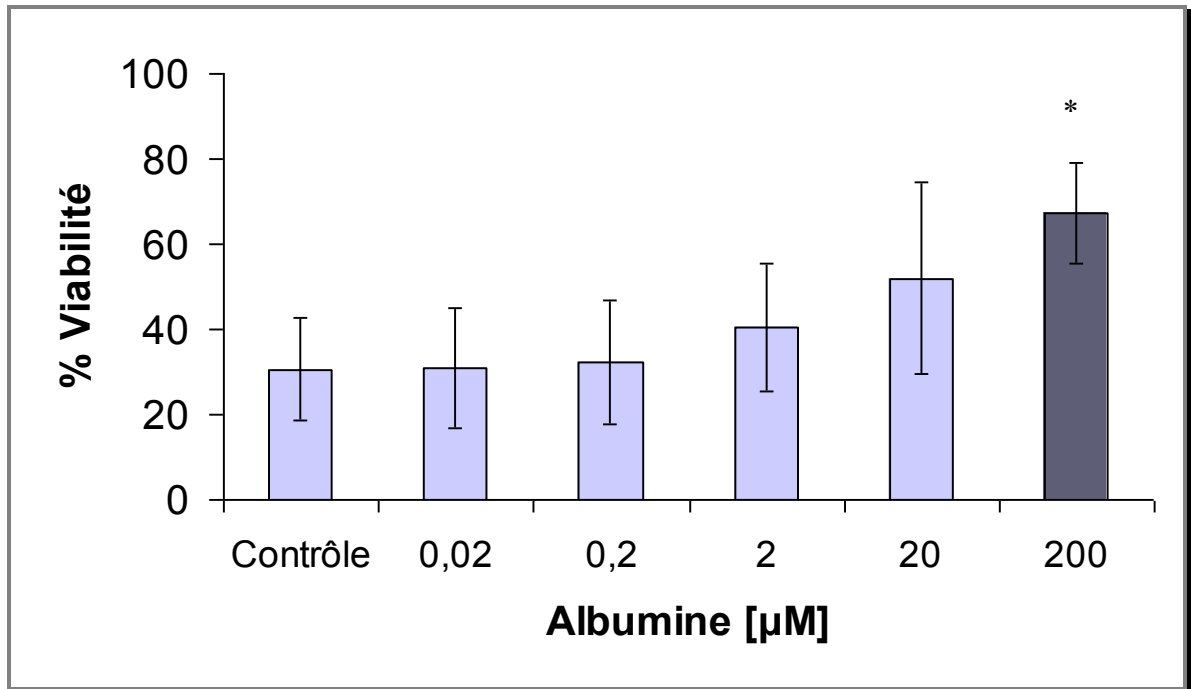


Figure 18 : Augmentation de la viabilité moyenne des PMNs incubés en présence d'albumine.

La survie observée est évaluée chez les PMNs incubés 24 heures en présence ou en absence de diverses concentrations d'albumine (0.02 à 200 μM). La survie est mise en évidence par la méthode d'AnnexineV-FITC/7-AAD.

(n=4) (*= $p < 0.01$).

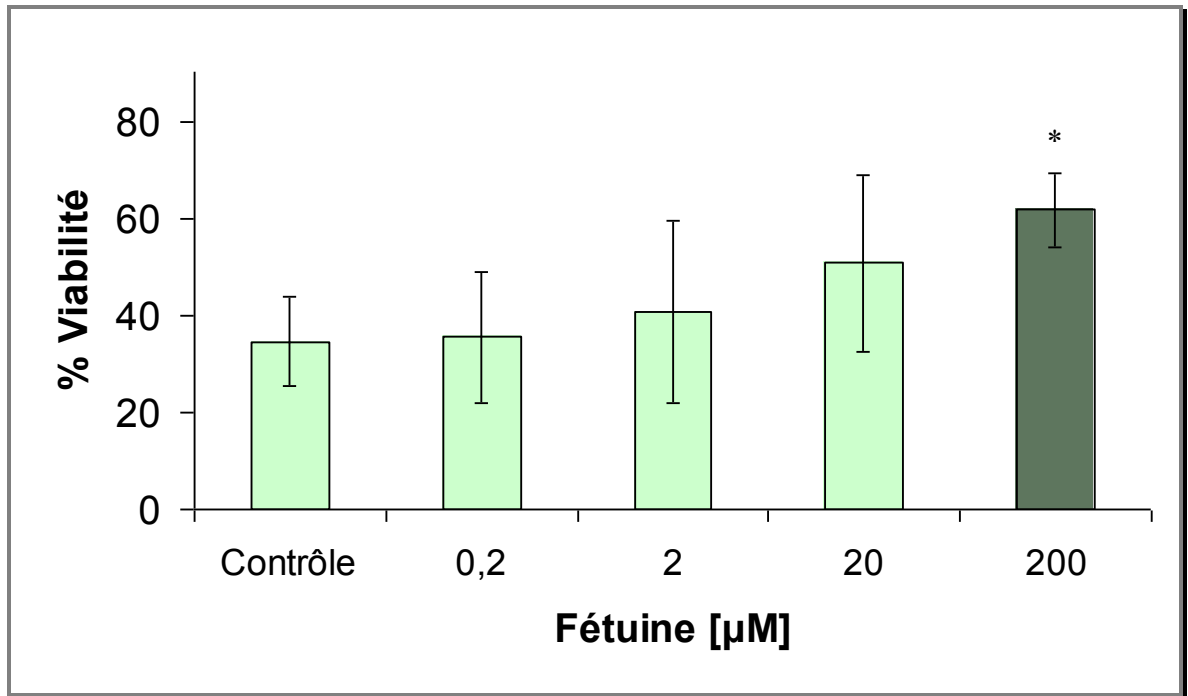


Figure 19 : Activité de la fétuine, selon sa concentration, sur l'apoptose spontanée des PMN humains.

L'effet de la fétuine sur la viabilité des PMNs incubés 24hres est observé entre 0.2 et 200µM (n=4) (*= $p < 0.01$).

3.1.1.3 Expression du CD16b chez les neutrophiles humains en relation avec l'apoptose en présence d'albumine ou de fœtuine

Chez les neutrophiles, la viabilité peut également être mise en évidence par l'expression du CD16b à la surface des PMNs, indication de leur fonctionnalité. En effet, les neutrophiles fraîchement isolés expriment de façon dense le Fc γ R (Fc γ RIIIb) comme le démontre les histogrammes de cytométrie en flux (Figure 20). Suivant une incubation de 24 heures, le niveau d'expression diminue drastiquement (18 \pm 9%). Cependant, lorsque les neutrophiles sont incubés en présence d'albumine ou de fœtuine (200 μ M), l'expression relative du CD16b chez les neutrophiles traités est de 57% \pm 8 et 58% \pm 18 respectivement, qui est nettement supérieur ($p < 0.01$) à celle des neutrophiles contrôles (18% \pm 9) (Tableau 7). Le GM-CSF (10ng/ml), utilisé à titre de contrôle positif, procure un effet similaire (55% \pm 2, $p < 0.01$). En présence d'albumine, de fœtuine ou encore de GM-CSF, l'expression du CD16b atteint 3 fois celle du contrôle. La concentration 10ng/ml de GM-CSF fût préalablement établie selon son efficacité à protéger contre l'apoptose spontanée chez différents donneurs par rapport aux autres concentrations.

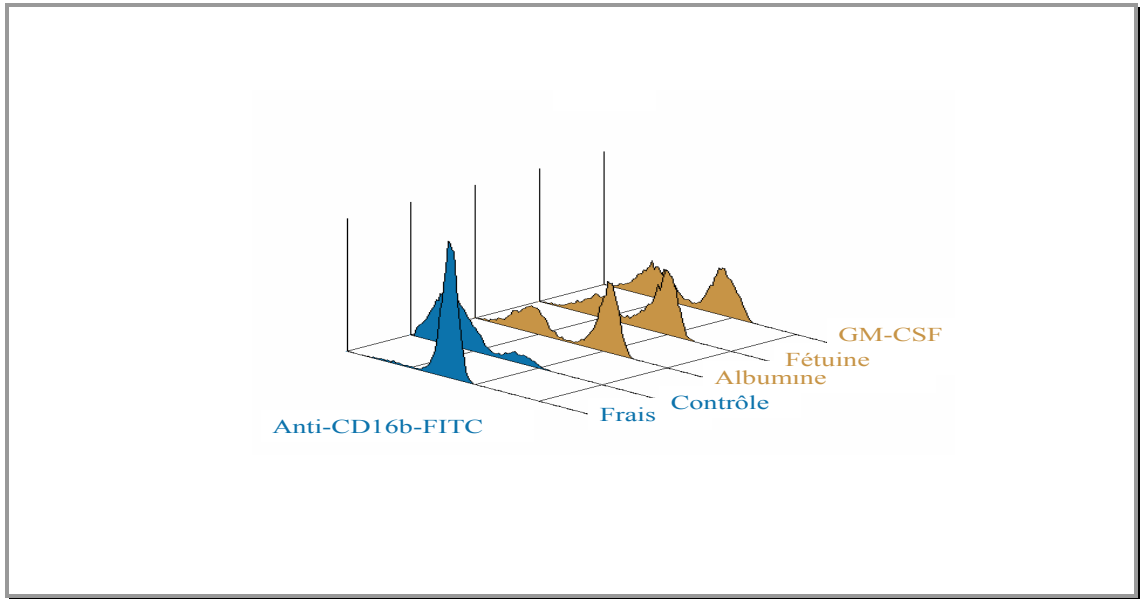


Figure 20 : Histogramme typique de cytométrie en flux du Fc γ RIIIb (CD16b) évaluant l'apoptose spontanée des PMNs à 24hres.

	Expression relative du CD16b (% ± ET)	Valeur <i>p</i>
Contrôle	18 ± 9	
Albumine 200µM	57 ± 8	< 0.01
Fétuine 200µM	58 ± 18	< 0.01
GM-CSF 10ng/ml	55 ± 2	< 0.01

Tableau 7 : Expression relative du CD16b chez les neutrophiles humains incubés 24 heures en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF.

(n=4)

3.1.1.4 **Protection à long terme des neutrophiles en culture**

L'effet des composés (albumine, fétuine ou GM-CSF) est également présent lors de période d'incubation prolongée (Figure 21). En effet, lors d'une incubation de 48 heures, $21\% \pm 5$ de la population de PMN se compose de cellules viables. Cependant, lorsque les PMNs sont incubés en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF, la viabilité augmente d'environ 2.5 fois comparativement au contrôle. La compilation des différentes moyennes obtenues au cours des quatre expériences nous indique que l'albumine ($50\% \pm 13$), la fétuine ($50\% \pm 14$) et le GM-CSF ($60\% \pm 7$) supportent statistiquement la survie des neutrophiles lors d'incubation prolongée de 48 heures mise en évidence par la méthode d'annexineV-FITC/7-AAD ($p \leq 0.01$).

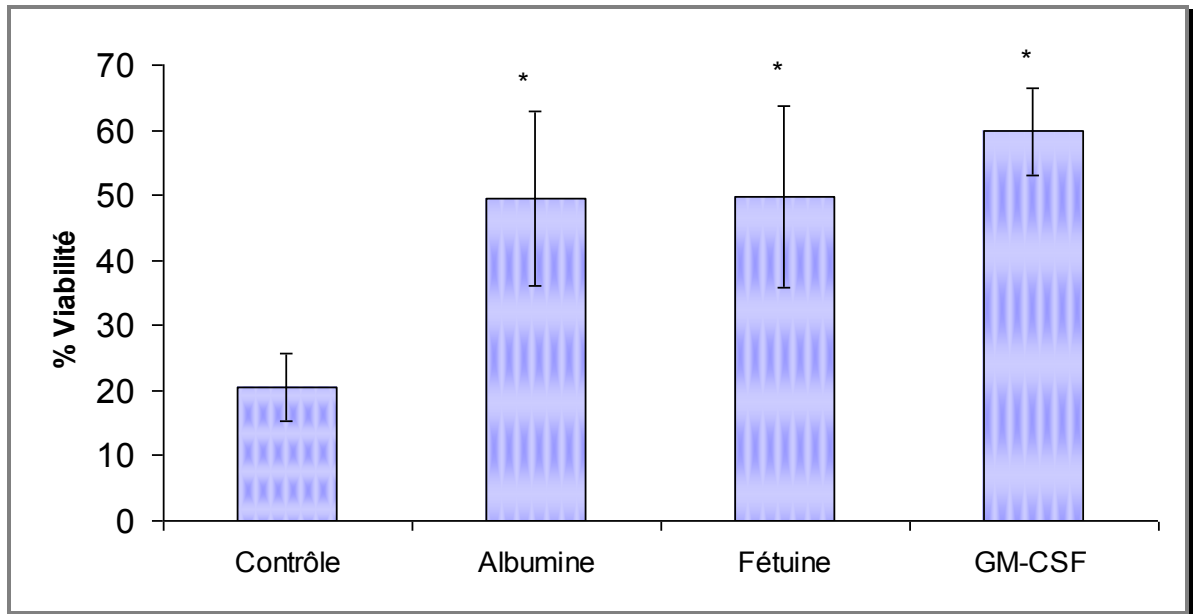


Figure 21: Protection à long terme de la survie des neutrophiles en culture.

La viabilité des PMNs, mise en évidence par la méthode d'AnnexineV-FITC/7-AAD, est déterminée chez les cellules incubées pendant 48hres ($*p < 0.01$, $n=4$).

3.1.2 L'apoptose induite

3.1.2.1 Protection de l'apoptose spontanée et celle induite par un agent cytotoxique en présence d'albumine et de fétuine

La concentration de Mutamycin® utilisée lors de nos études fût préalablement établie chez divers donneurs (non illustré). Cette dernière correspond à la concentration nécessaire pour induire une cytotoxicité d'environ 50% par rapport au contrôle. Ainsi, en présence de $4 \times 10^{-5} \text{M}$ de Mutamycin®, la viabilité moyenne des PMNs de différents donneurs après 24 heures d'incubation passe de $43\% \pm 10$ à $23\% \pm 9$ (Figure 22). La présence d'albumine (200 μM), de fétuine (200 μM) ou de GM-CSF (10ng/ml) chez les PMNs incubés 24 heures avec la Mutamycin® induit une diminution du nombre de cellules en apoptose par rapport à la Mutamycin® seule. L'effet protecteur de l'albumine ($74\% \pm 3$), de la fétuine ($82\% \pm 6$) et du GM-CSF ($74\% \pm 7$) sur la viabilité des PMNs contrôles ($43\% \pm 10$) est une fois de plus illustré à la Figure 22 ($p < 0.01$). Lorsque les neutrophiles sont également incubés en présence de Mutamycin®, la viabilité des PMNs traités se situe à $46\% \pm 12$ pour l'albumine ($p < 0.01$), $52\% \pm 5$, pour le fétuine ($p < 0.01$), alors que pour le GM-CSF, elle se situe à $34\% \pm 7$ ($p = 0.04$). Ainsi, l'albumine et la fétuine procure un effet similaire au GM-CSF dans un modèle *in vitro* de cytotoxicité en présence de Mutamycin® chez les neutrophiles.

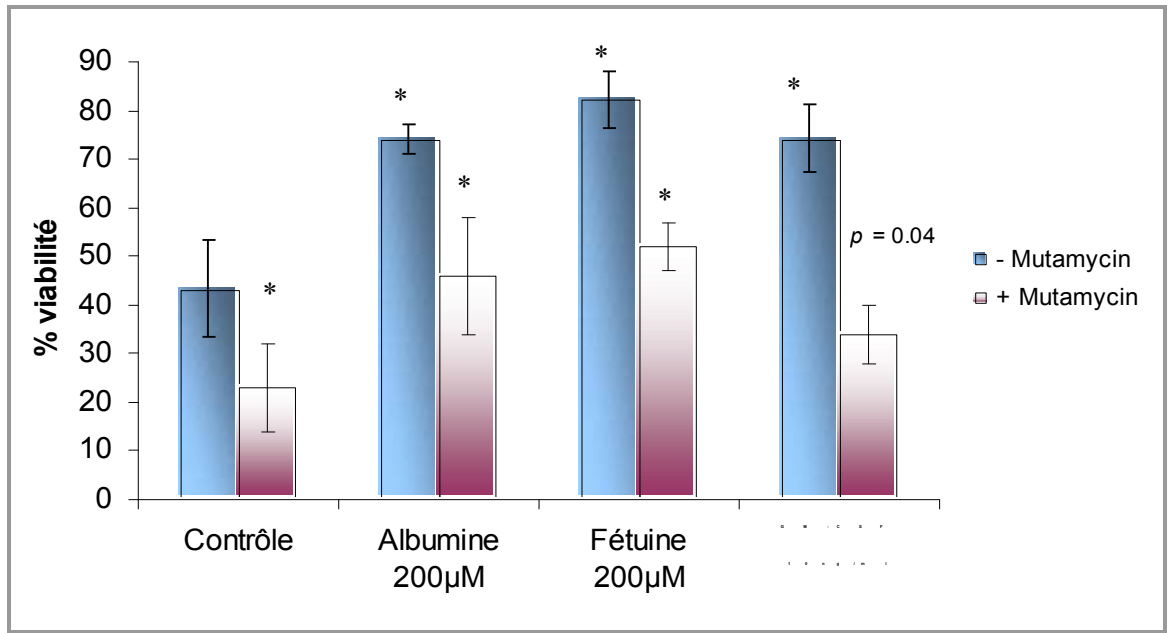


Figure 22: Viabilité des PMNs, traités ou non à la Mutamycin®, en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF après 24hres d'incubation

(n=4, * $p < 0.01$).

Afin de caractériser davantage la protection de l'apoptose conférée par d'albumine, la fétuine et le GM-CSF dans un modèle *in vitro* de cytotoxicité, deux études sont entreprises. Celles-ci visent à étudier l'effet des protéines et du GM-CSF relativement au temps d'exposition et d'induction de la cytotoxicité.

3.1.2.2 Pré-stimulation des neutrophiles en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF précédant l'induction de la cytotoxicité

Contrairement à l'étude de la cytotoxicité, celle du prétraitement implique tout d'abord une courte exposition (4 heures) des neutrophiles aux différentes protéines avant l'induction. L'effet de la Mutamycin® est évalué par la méthode d'apoptose déjà établie suivant une incubation de 20 heures en présence de cet agent. Lorsque les neutrophiles contrôles sont incubés en présence de Mutamycin®, la viabilité moyenne des PMNs diminue de moitié, passant de 45% \pm 5 à 26% \pm 1 ($p < 0,01$) (Figure 23). L'effet cytotoxique de cet agent est une fois de plus validé. Cependant, lorsque les neutrophiles sont exposés pendant 4 heures seulement, en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF, l'effet de la Mutamycin® s'atténue significativement. Ainsi, les PMNs traités à l'albumine possèdent une viabilité moyenne de 40% \pm 4 ($p < 0,01$), alors que celle des cellules traitées en présence de fétuine ou de GM-CSF se situe à 56% \pm 6 ($p < 0,01$) et 34% \pm 2 respectivement ($p < 0,01$). La compilation des différentes expériences (non-illustré) nous indiquent que les neutrophiles stimulés pendant 4 heures en présence d'albumine (200 μ M), de fétuine (200 μ M) ou de GM-CSF (10ng/ml) protège (statistiquement significatif) contre l'action cytotoxique de la Mutamycin® (Ctrl : 35% \pm 7; Muta : 18% \pm 7; Alb : 27% \pm 10; Fet : 35% \pm 14; GM : 29% \pm 7, $p < 0.01$, n = 6). L'effet de l'albumine et de la fétuine est donc comparable au GM-CSF, cliniquement utilisé lors de traitements de chimiothérapie.

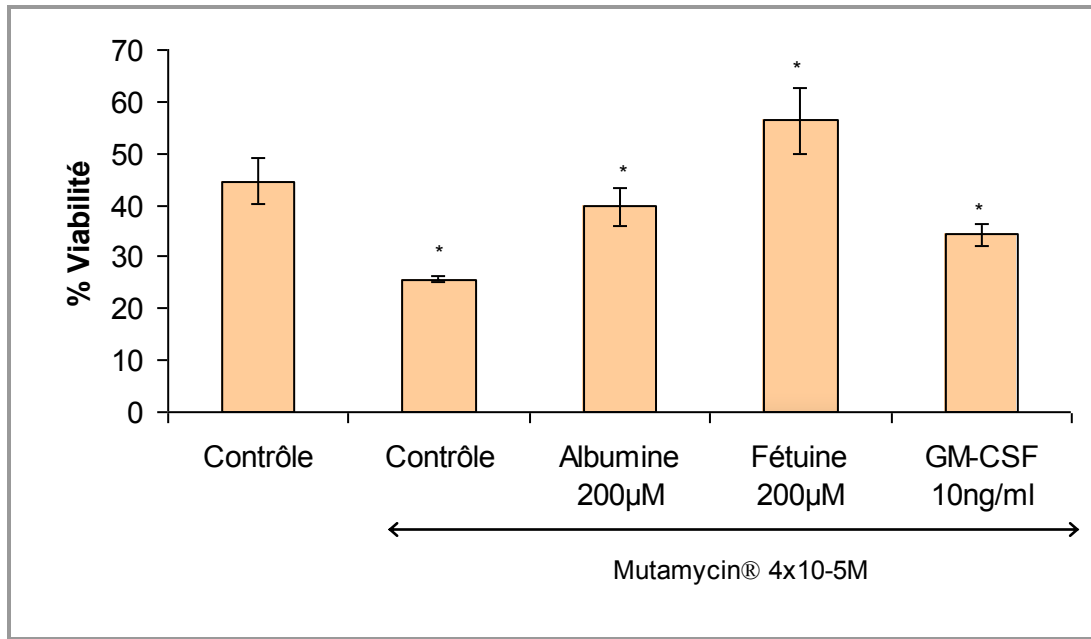


Figure 23: Représentation typique de l'influence du prétraitement des PMNs, incubés 24hres, en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF avant l'induction de la cytotoxicité.

(* $p \leq 0.01$)

3.1.2.3 Effet protecteur de l'albumine et de la fétuine suivant l'induction de la cytotoxicité

Dans la seconde étude, l'effet protecteur post-cytotoxique des protéines sur la survie des PMNs est évalué et comparé au GM-CSF (Figure 24). Après une première incubation de 4 heures avec la Mutamycin®, les neutrophiles sont mis en présence d'albumine (200µM), de fétuine (200µM) ou de GM-CSF (10ng/ml). L'effet de diminution de la viabilité des PMNs par la Mutamycin® est bien illustré (48% ±20 vs 23% ±11, $p=0,05$). Le GM-CSF apporte une protection d'environ 1,65x par rapport au contrôle (23% ±11 à 38% ±12). Cependant, contrairement aux résultats du pré-traitement, cette dernière est non significative ($p=0,06$). Lorsque l'albumine et la fétuine sont ajoutées aux PMNs traités 4 heures à la Mutamycin® ($4 \times 10^{-5}M$), on assiste à une augmentation significative de la viabilité ($p < 0.01$). En effet, en présence d'albumine et de fétuine, on atteint respectivement des taux de viabilité de 50% ±11 et 54% ±13. Ces pourcentages sont très similaires à celui obtenu chez les PMNs n'ayant reçu aucun agent cytotoxique soit de 48% ±20.

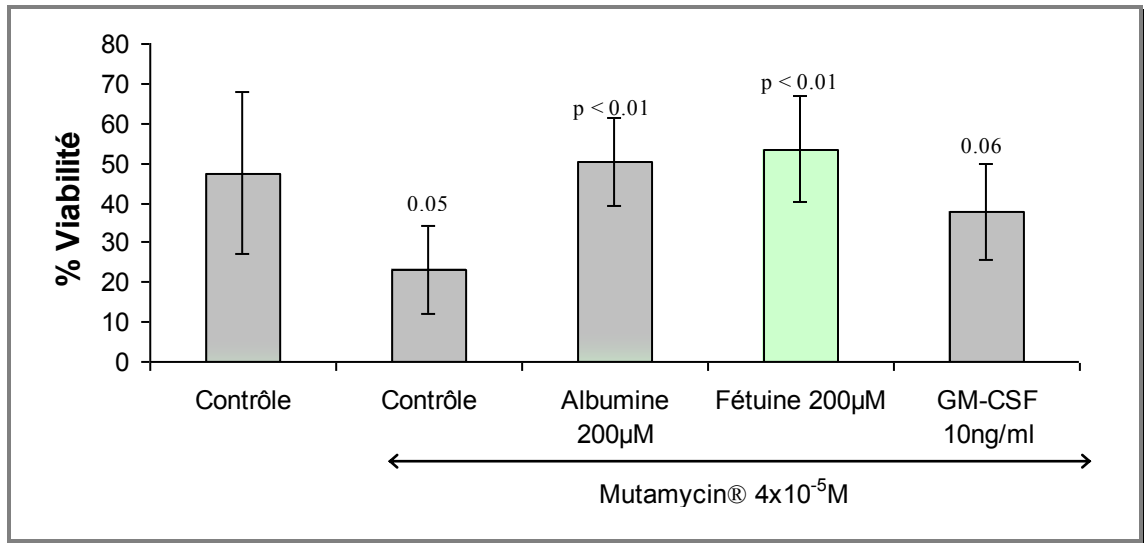


Figure 24 : Effet protecteur post-cytotoxique conféré par l'albumine et la fétuine sur la viabilité des PMN traités en présence de Mutamycin® suivant une incubation de 24hres.

(n=4).

3.2 Activité phagocytaire

L'importance des PMNs dans la première ligne de défense contre de nombreuses infections nous amène à évaluer l'effet de l'albumine et de la fétuine sur l'activité phagocytaire comparativement à celle du GM-CSF. Deux facettes du processus de phagocytose sont abordées soit l'internalisation via les récepteurs Fc γ et la capacité protéolytique.

3.2.1 Internalisation via les récepteurs Fc γ

Dans un premier temps, on étudie brièvement le processus d'internalisation médié par les récepteurs Fc γ par l'entremise de billes fluorescentes liées de façon covalente à des IgG humains. Lorsque les PMNs sont incubés pendant 24 heures, la capacité d'ingestion de particules est faible, soit de 17% \pm 2 (Figure 25) comparativement à 95% chez les cellules fraîches (résultat non illustré). Cependant, les PMNs incubés en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF ingèrent une quantité accrue de particules. À partir des histogrammes typiques de cytométrie en flux, on obtient des taux d'ingestion de 74% \pm 2 et 70% \pm 2 lorsque les PMNs sont traités 24 heures en présence d'albumine ou de fétuine respectivement. Quant au GM-CSF, il soutient également cette internalisation (64 \pm 1%).

3.2.2 Capacité protéolytique

Suivant l'internalisation du corps étranger, la destruction de ce dernier constitue un processus important du phénomène de phagocytose. Ainsi, dans un deuxième temps, nous comparons l'effet du GM-CSF à celui de l'albumine et de la fétuine sur l'activité protéolytique des PMNs nécessaire à cette étape de dégradation. La technique est d'abord établie chez les PMNs fraîchement isolés (Figure 26). Lorsque ces PMNs sont incubés

pendant 4 heures en présence de 10 μ g/ml de DQ-BSA, on perçoit l'activité protéolytique par rapport aux PMNs incubés à 4°C. La capacité protéolytique est illustrée suivant l'intensité de fluorescence générée lors du clivage des molécules de DQ-BSA chez les PMNs incubés à 37°C. Lorsque l'activité protéolytique est étudiée chez les PMNs incubés 24 heures, l'efficacité obtenue par rapport aux PMNs frais est altérée (Figure 26). En effet, seulement 29% \pm 13 des PMNs à 24 heures dégradent efficacement l'antigène internalisé. Cependant, lorsque les PMNs sont traités en présence de 200 μ M d'albumine, 200 μ M de fétuine ou 10ng/ml de GM-CSF, l'efficacité est récupérée. Ainsi, on atteint des pourcentages de dégradation de 81% \pm 8, 70% \pm 10 et 68% \pm 7 pour l'albumine, la fétuine et le GM-CSF respectivement (Figure 27). L'efficacité accrue observée sur les PMNs traités chez quatre donneurs différents nous indique qu'elle est significative ($p < 0.01$).

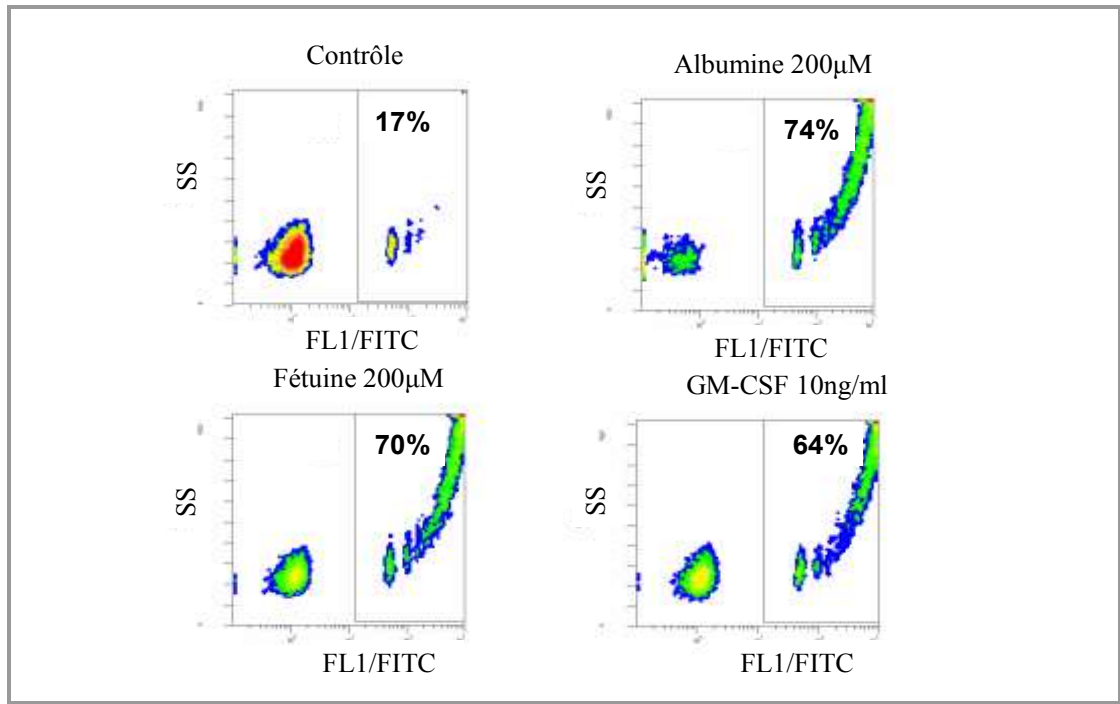


Figure 25 : Histogrammes bi-paramétrique typiques de cytométrie en flux mettant en évidence l'internalisation des billes de Fluoresbrite® YG Carboxylate via les récepteurs Fcγ, en fonction de la granularité, chez les PMNs incubés 24 heures.

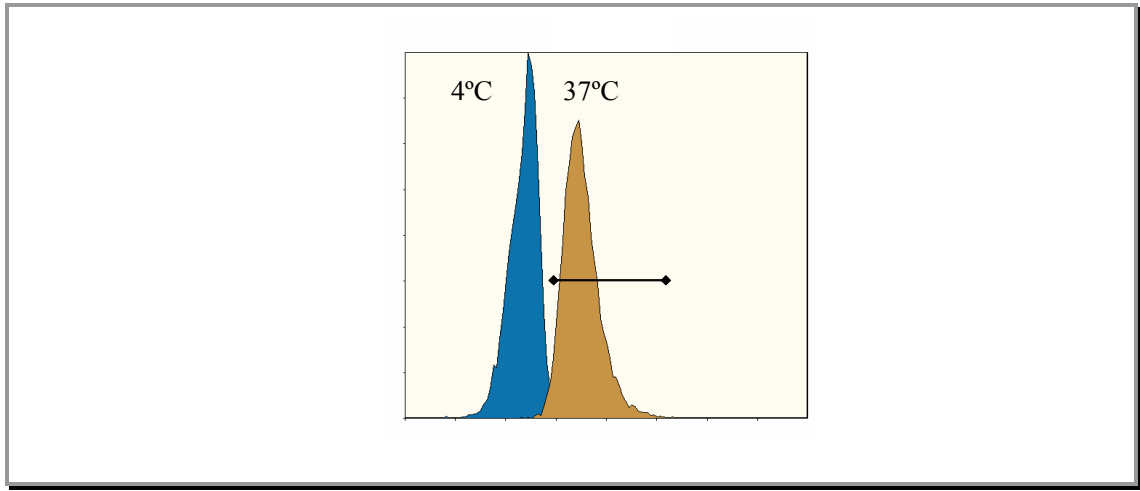


Figure 26 : Histogramme typique de fluorescence, généré lors du clivage des molécules DQ-BSA, reflétant l'activité protéolytique basale retrouvée chez les PMNs fraîchement isolés.

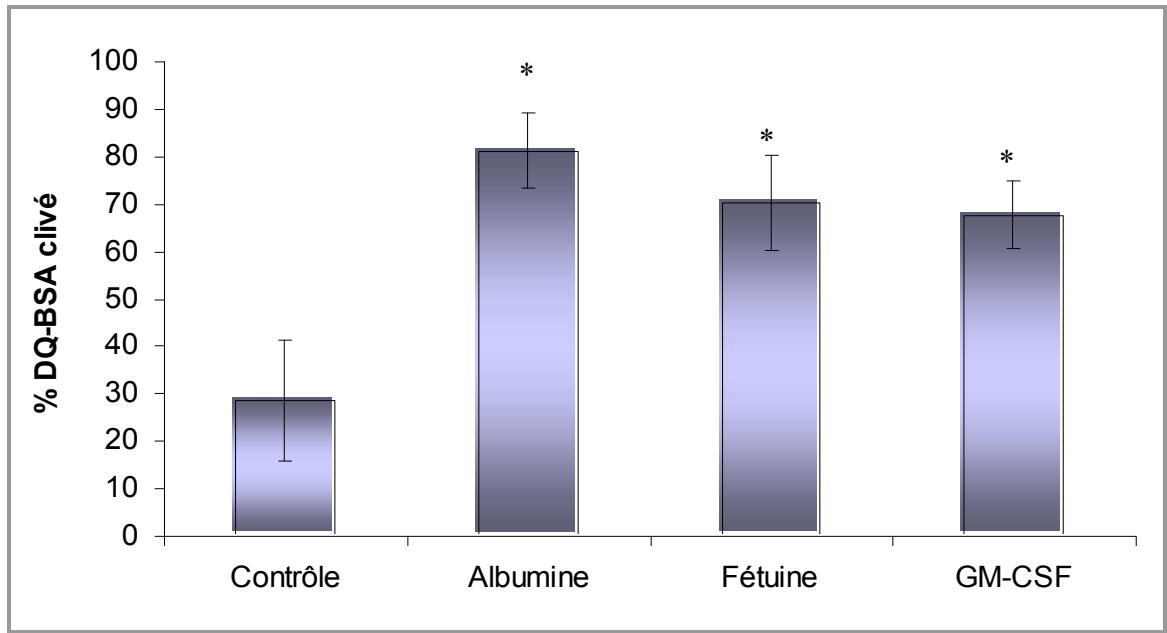


Figure 27 : Évaluation de la capacité protéolytique, impliquée dans la destruction de l'antigène lors de la phagocytose des PMNs incubés 24 hres en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF par rapport au contrôle.

(n=4, * $p < 0.01$).

3.3 Mécanismes d'action impliqués par rapport au GM-CSF

Afin de définir davantage l'effet anti-apoptotique de l'albumine et de la fétuine par rapport au GM-CSF, cinq principaux aspects du mécanisme d'apoptose sont évalués soit: l'activation des caspases, la production de dérivés oxygénés, l'intégrité des protéines du cytosquelette (la vimentine), l'expression de certaines molécules anti-apoptotiques, de même que les évènements de signalisation cellulaire impliqués.

3.3.1 Évaluation de l'activation relative des caspases

L'importance des caspases au sein du mécanisme apoptotique nous incite à évaluer l'effet de trois caspases importantes retrouvées chez les PMNs soit la caspase-3, -8 et la caspase-9. L'étude intracellulaire de l'activité relative des différentes caspases est mise en évidence suivant une incubation de 48 heures en présence de 200 μ M d'albumine, 200 μ M de fétuine ou 10ng/ml de GM-CSF (Tableau 8). L'activation relative moyenne de la caspase-3 obtenue chez quatre donneurs différents se situe autour de 60% \pm 9. Lorsque les PMNs sont incubés en présence d'albumine 200 μ M, de fétuine 200 μ M ou de GM-CSF 10ng/ml, l'activation de cette caspase diminue drastiquement. Ainsi, on obtient respectivement des pourcentages d'activation de 16% \pm 13, 21% \pm 7 et 26% \pm 10 ($p < 0.01$) donc une activité relative de 2 fois moins à 4 fois moins par rapport au contrôle. Tout comme la caspase-3, l'activation des caspases -8 et -9 est diminuée en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF. L'albumine représente la protéine la plus efficace des trois composés évalués avec des pourcentages d'activation se situant entre 10% \pm 3 et 16% \pm 13.

	Caspase-3		Caspase-8		Caspase-9	
	Activité (% ± ET)	Valeur <i>p</i>	Activité (% ± ET)	Valeur <i>p</i>	Activité (% ± ET)	Valeur <i>p</i>
Contrôle	60 ± 9		51 ± 11		52 ± 10	
Albumine	16 ± 13	< 0.01	10 ± 3	< 0.01	15 ± 9	< 0.01
Fétuine	21 ± 7	< 0.01	19 ± 5	< 0.01	22 ± 8	< 0.01
GM-CSF	26 ± 10	< 0.01	29 ± 8	0.01	29 ± 8	< 0.01

Tableau 8 : Compilation de l'activité relative des caspases-3, -8 et -9 chez les PMNs incubés 48 heures en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF.

(n=4).

3.3.2 Détection des dérivés oxygénés chez les PMNs humains

Outre leur utilité lors d'évènements de phagocytose, les ROS peuvent être également impliqués dans le mécanisme apoptotique, d'où l'intérêt de leur étude. Afin de mettre en évidence l'effet de l'albumine et de la fétuine sur la présence intracellulaire de tels dérivés, on utilise un substrat fluorescent perméable et détectable par cytométrie en flux. Les intensités de fluorescence moyennes (MFI) des PMNs viables, c'est-à-dire 7-AAD négatives (non illustré) sont alors compilés pour les quatre donneurs à l'étude (Figure 28). Lorsque les PMNs sont incubés 24 heures en présence d'albumine, on assiste à une diminution significative ($p=0.02$) de la MFI passant de 1875 ± 375 à 1245 ± 286 . Le GM-CSF, utilisé à titre de contrôle positif, augmente significativement cette production (2908 ± 900 , $p=0.05$). Contrairement à l'albumine, la fétuine procure un effet similaire au GM-CSF. En effet, la MFI des PMNs passe de 1875 ± 375 à 2845 ± 820 lorsque traités en présence de fétuine ($p=0.05$).

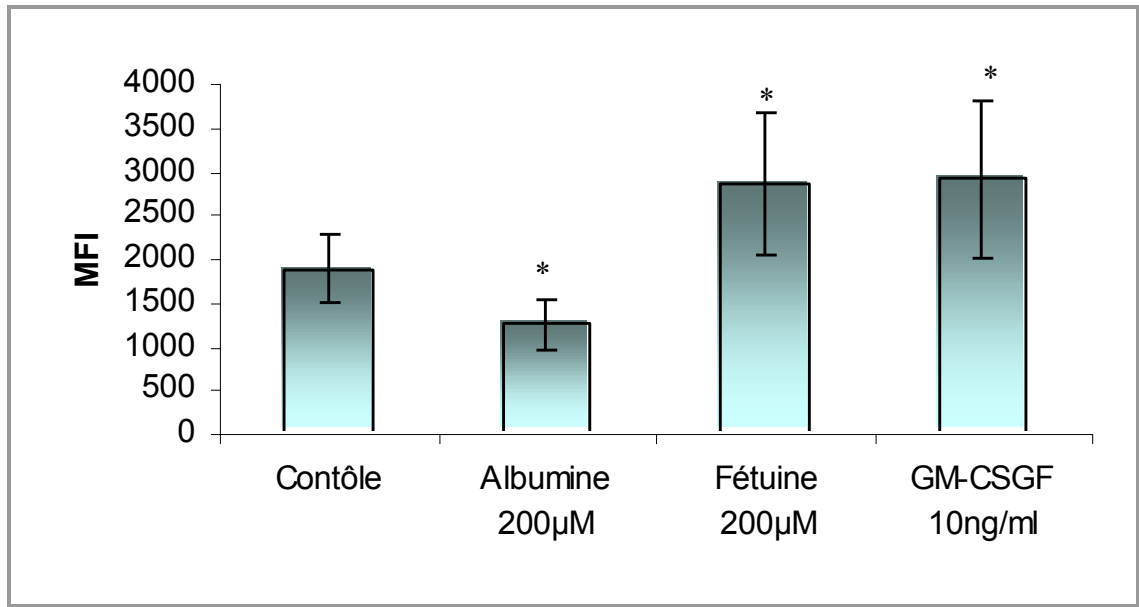


Figure 28 : Évaluation de la production de ROS chez les neutrophiles incubés en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF.

L'intensité de fluorescence moyenne illustrée met en évidence l'hydrolyse du substrat par les dérivés oxygénés intracellulaires présents chez les PMNs incubés 24 heures.

($n=4$, $p \leq 0.05$)

3.3.3 Évaluation de l'intégrité des protéines du cytosquelette

L'intégrité membranaire étant assurée par les composantes du cytosquelette dont la vimentine, justifiant ainsi l'étude de son expression intracellulaire. Comme le démontrent les histogrammes de cytométrie en flux, l'expression de la vimentine chez les PMNs fraîchement isolés est importante et son intégrité est intacte (Figure 29). Cependant, lorsque les PMN sont incubés pendant 24 heures, le profil d'expression de cette protéine est altéré. En effet, la vimentine est clivée et sa détection génère ainsi une intensité de fluorescence inférieure. Cette différence nous permet d'apprécier l'effet protecteur de l'albumine et de la fétuine sur l'intégrité de la vimentine, également retrouvée en présence de GM-CSF. Suivant une incubation de 24 heures, 46% \pm 9 de l'expression de la vimentine est intacte comparativement aux PMNs fraîchement isolés (Tableau 9). Par contre, lorsque les PMNs sont incubés en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF, on observe une augmentation significative ($p < 0.01$) et importante de l'intégrité de la vimentine de l'ordre de 1.5 à 2 fois celle du contrôle. En effet, chez les PMNs traités en présence d'albumine, on obtient une expression de 82% \pm 9 alors qu'en présence de fétuine, le taux de vimentine intacte atteint 91% \pm 7 par rapport à 46% \pm 9 chez les PMN contrôle. Le GM-CSF conserve, quant à lui, 74% \pm 8 de l'expression initialement retrouvée chez les PMNs fraîchement isolés. L'effet protecteur sur le clivage de la vimentine apporté par la fétuine est statistiquement ($p = 0.01$) supérieur à celui du GM-CSF.

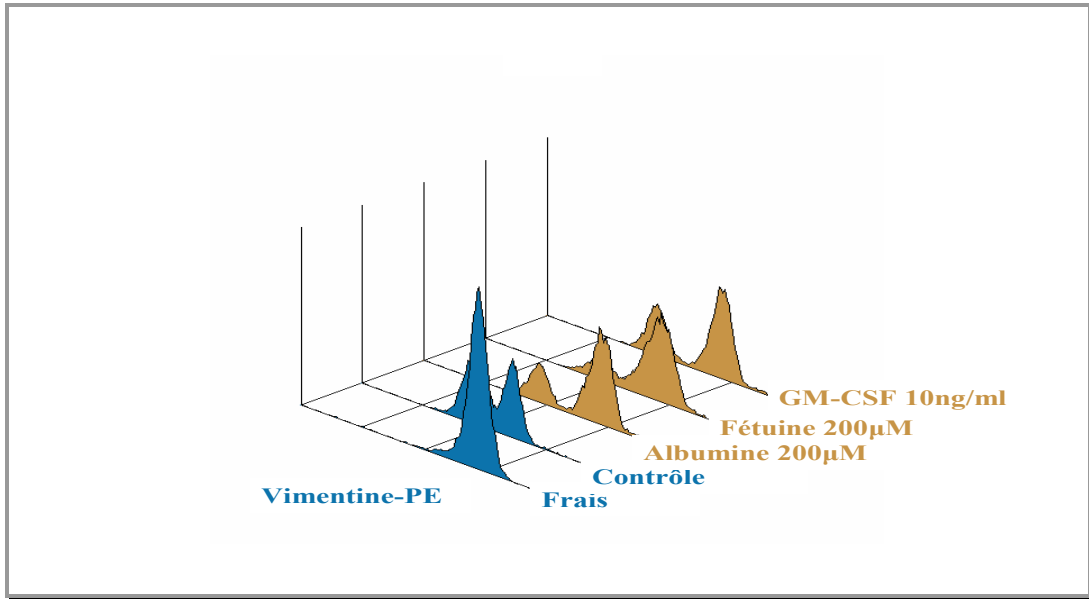


Figure 29 : Histogramme typique de cytométrie en flux reflétant l'intégrité de la vimentine en relation avec la viabilité observée chez les PMNs fraîchement isolés et ceux incubés 24 hres.

	Expression relative moyenne de la vimentine (% ± ET)	Valeur <i>p</i>
Contrôle	46 ±9	
Albumine 200µM	82 ±9	< 0.01
Fétuinee 200µM	91 ±7	< 0.01
GM-CSF 10ng/ml	74 ±8	< 0.01

Tableau 9 : Influence de l'albumine, de la fétuine et du GM-CSF après une incubation de 24hres sur l'expression intracellulaire de la vimentine obtenu chez divers donneurs.

(n=4)

3.3.4 Évaluation de la contribution des molécules anti-apoptotiques

Afin d'élucider le mécanisme de survie impliqué chez les PMNs traités en présence d'albumine et de fétuine, on préconise l'étude des molécules anti-apoptotiques. Parmi ces molécules appartenant à la famille du Bcl-2, on cible plus précisément le Bcl-2, et le Mcl-1.

3.3.4.1 Le Bcl-2

Une des premières molécules impliquées dans le processus anti-apoptotique étudié est le Bcl-2. Afin de vérifier l'existence du Bcl-2 chez les neutrophiles, l'ARN des cellules MCF-7 (adénocarcinome du sein) est d'abord isolé et amplifié pour valider le protocole de RT-PCR établi (résultat non illustré). Tout comme pour les PMNs, l'isolation d'ARN s'effectue en présence de Trizol combiné au dispositif PhaseLock gel. Suivant une amplification en une seule étape, les produits de PCR sont migrés et visualisés sur un gel d'agarose 2% parallèlement à un standard de paire de base (pb). Ainsi, chez les MCF-7, le seul fragment amplifié selon les conditions utilisées se situe entre 200 et 300pb. Le même fragment est amplifié à partir d'ARN provenant de PMNs frais et incubés. Lorsque les PMNs sont incubés en présence de 200 μ M d'albumine pendant 24 heures, le fragment de PCR obtenu possède une intensité considérable par rapport à celui obtenu pour les PMNs contrôles. Cependant, des colorations subséquentes de Wright-Giemsa chez les PMNs frais et incubés révèlent la présence de cellules indésirables (résultat non-illustré) qui nuisent et biaisent l'analyse, surtout chez les PMNs incubés où l'on retrouve une proportion plus importante de cellules viables de types granulocytes dont des éosinophiles, quelques lymphocytes et monocytes. Parfois, on remarque également la présence de cellules endothéliales.

Afin de minimiser la contribution des cellules contaminantes, l'expression intracellulaire du Bcl-2 est davantage caractérisée par cytométrie en flux. En effet, la cytométrie en flux nous permet d'identifier les populations contenues dans notre suspension

suivant leur taille et leur granularité. L'histogramme de distribution de la Figure 30 démontre bien la composition cellulaire de cette suspension de PMNs (résultat typique). De plus lorsqu'on utilise un marqueur spécifique, tel le CD16b, il devient possible de cibler la population de PMNs d'intérêt. Ainsi, chez les PMNs frais, 98% de la population ciblée exprime ce récepteur Fc γ RIIIb (Figure 30). Par contre, chez les PMNs incubés 24 heures, la présence de cellules apoptotiques modifie les profils de distribution. En effet, comme le démontre l'histogramme de distribution de populations de la figure suivante (Figure 31), la ségrégation des populations est davantage complexe. Afin de s'assurer de la pureté et de la viabilité de la population d'intérêt analysée chez les PMNs incubés 24 heures, on établit d'abord la contribution des cellules CD16b et CD9 positives. Ainsi, les histogrammes bi-paramétriques de cytométrie en flux nous indiquent que la présence de cellules CD9 positives représente 4-5% de la population totale (Figure 31). Lorsqu'on analyse plus spécifiquement la population des PMNs d'intérêt (Figure 31, population B), la contribution des cellules CD9+ est faible, soit de 1%.

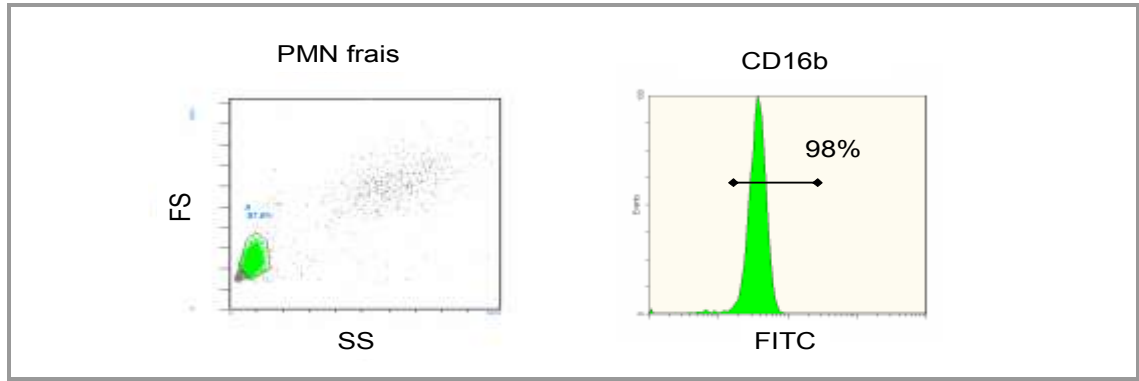


Figure 30 : Résultat typique de la distribution des différentes populations retrouvées dans la préparation de PMNs fraîchement isolés et identification de la population d'intérêt.

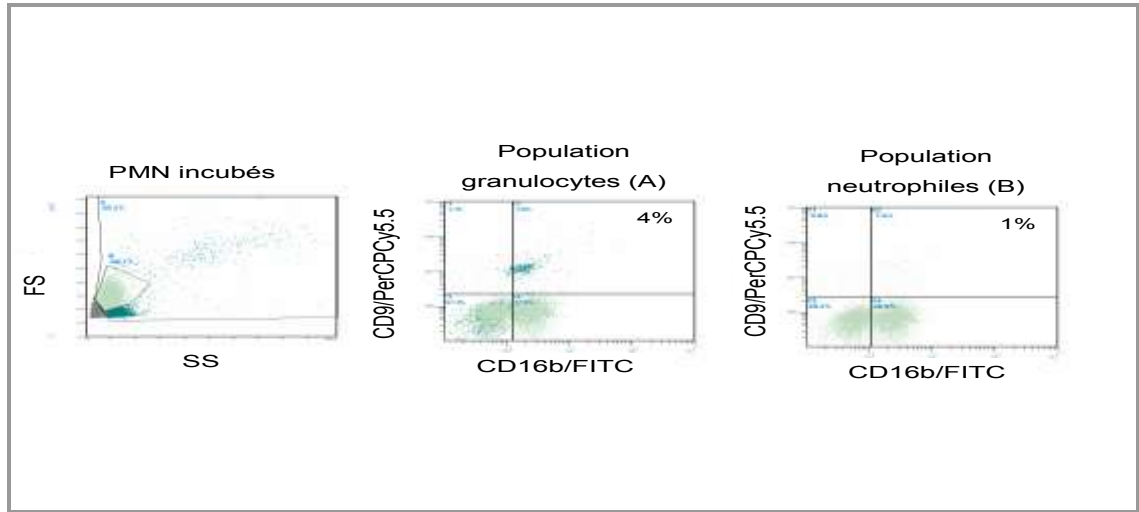


Figure 31 : Ségrégation typique de la population de neutrophiles intactes parmi les diverses populations retrouvées chez les PMN incubés 24 heures.

En ciblant la population de PMNs d'intérêt, on étudie ensuite l'expression intracellulaire basale du Bcl-2 retrouvée chez les PMNs fraîchement isolés. Afin d'évaluer l'expression du Bcl-2, on a recours à deux anticorps monoclonaux de spécificité différente, soit le clone 100 et le clone C-2 (Figure 32). Lorsqu'on analyse l'expression du Bcl-2 intracellulaire chez les PMNs fraîchement isolés, la fluorescence observée, correspondant au curseur D, représente la fluorescence générée par l'anticorps isotypique, (résultat non illustré). Quand les PMNs sont marqués en présence d'anti-Bcl-2, le comportement des deux clones utilisés diffère. En effet, comme le démontre la Figure 32, le clone 100 génère une fluorescence identique à celle de l'anticorps isotypique identifiée par le curseur D (résultat typique parmi 3 donneurs différents). Par contre, si on analyse l'expression du clone C-2, la fluorescence observée est, quant à elle, supérieure. Elle correspond au curseur C. La Figure 33 permet d'apprécier davantage la différence existant entre l'anticorps isotypique (vert) et l'anti-Bcl-2 (clone C-2) (bleu). En effet, les histogrammes de fluorescence se démarquent parfaitement l'un de l'autre. La translation de la fluorescence observée nous mène à analyser l'intensité de fluorescence moyenne (MFI). Ainsi, lorsqu'on compare la fluorescence de l'isotype à celle du Bcl-2 (C-2) entre quatre donneurs différents, on constate qu'elle passe de 435 ± 205 à 1090 ± 272 . Cette différence est statistiquement significative ($p < 0.01$) (Tableau 10). La fluorescence générée par l'anti Bcl-2 clone C-2 correspond généralement à 3 fois celle émise par l'anticorps isotypique correspondant. Bien qu'exprimé, cet antigène est présent en faible densité chez les PMNs fraîchement isolés. La spécificité du clone C-2 permettant la détection du Bcl-2 est préalablement vérifiée sur un lysat cellulaire de cellules de type promyélocytes HL-60 par immunobuvardage (résultat non illustré).

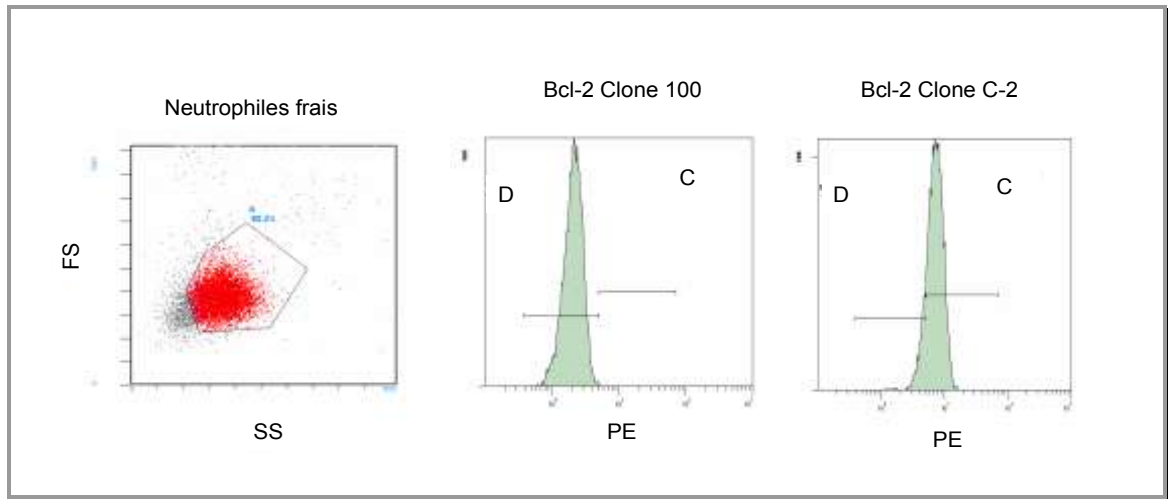


Figure 32 : Histogrammes typique de fluorescence illustrant l'expression du Bcl-2 intracellulaire selon la spécificité de l'anticorps utilisé chez les PMN fraîchement isolés.

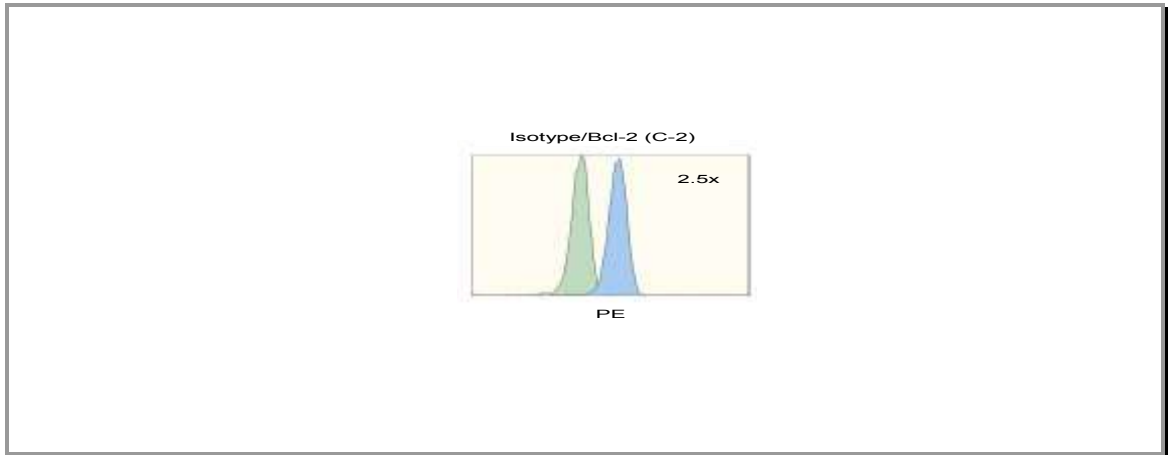


Figure 33 : Histogramme typique de cytométrie en flux typique illustrant l'expression intracellulaire du Bcl-2 chez les neutrophiles fraîchement isolés.

	Intensité moyenne de fluorescence (U ± ET)	Valeur <i>p</i>
Autofluorescence	31 ± 7	
Isotype	435 ± 205	
Bcl-2 C-2	1090 ± 272	< 0.01

Tableau 10 : Intensité moyenne de fluorescence générée par la détection du clone C-2 par rapport à celle de l'isotype chez les neutrophiles fraîchement isolés.

(n=4)

Afin d'évaluer l'expression intracellulaire du Bcl-2 chez les neutrophiles incubés 24 heures, on analyse la fluorescence du Bcl-2 sur la population CD16b+/CD9- à partir des histogrammes bi-paramétriques de cytométrie en flux (Figure 34). Cette figure représente les histogrammes bi-paramétriques typiques de cytométrie en flux obtenus chez les neutrophiles contrôles et ceux traités en présence d'albumine, de fétuine ou de GM-CSF. Chez les neutrophiles incubés, la fluorescence émise par l'isotype et l'anti-Bcl-2 n'est pas aussi bien définie contrairement aux neutrophiles frais (Figure 35). En présence d'albumine ou de fétuine, il est plus facile d'apprécier l'expression du Bcl-2. En comparant les fluorescences moyennes (MFI) obtenues pour le Bcl-2 chez les neutrophiles incubés 24 heures à celle générée par l'isotype (493 ± 110), nous obtenons une expression significative ($p \leq 0.01$) du Bcl-2. Les valeurs de fluorescence obtenues en présence d'albumine sont en moyenne 2 fois celle de l'isotype alors que pour la fétuine, on se situe autour de 1.9 fois (Figure 35). Quant au GM-CSF, il atteint des valeurs d'environ 1.7fois ($p < 0.01$) de celle de l'isotype (résultat non-illustré). Les échantillons analysés expriment donc tous le Bcl-2. Cependant, si on compare les MFI obtenues chez les neutrophiles incubés (778 ± 147) à celles des neutrophiles traités en présence soit d'albumine (978 ± 156) ou de fétuine (932 ± 205), les différences observées par rapport aux PMN contrôles ne sont pas statistiquement significatives (Tableau 11). Les résultats obtenus en présence de GM-CSF sont similaires au contrôle. Ainsi, aucune différence significative n'est observée (848 ± 175 , $p = 0.29$).

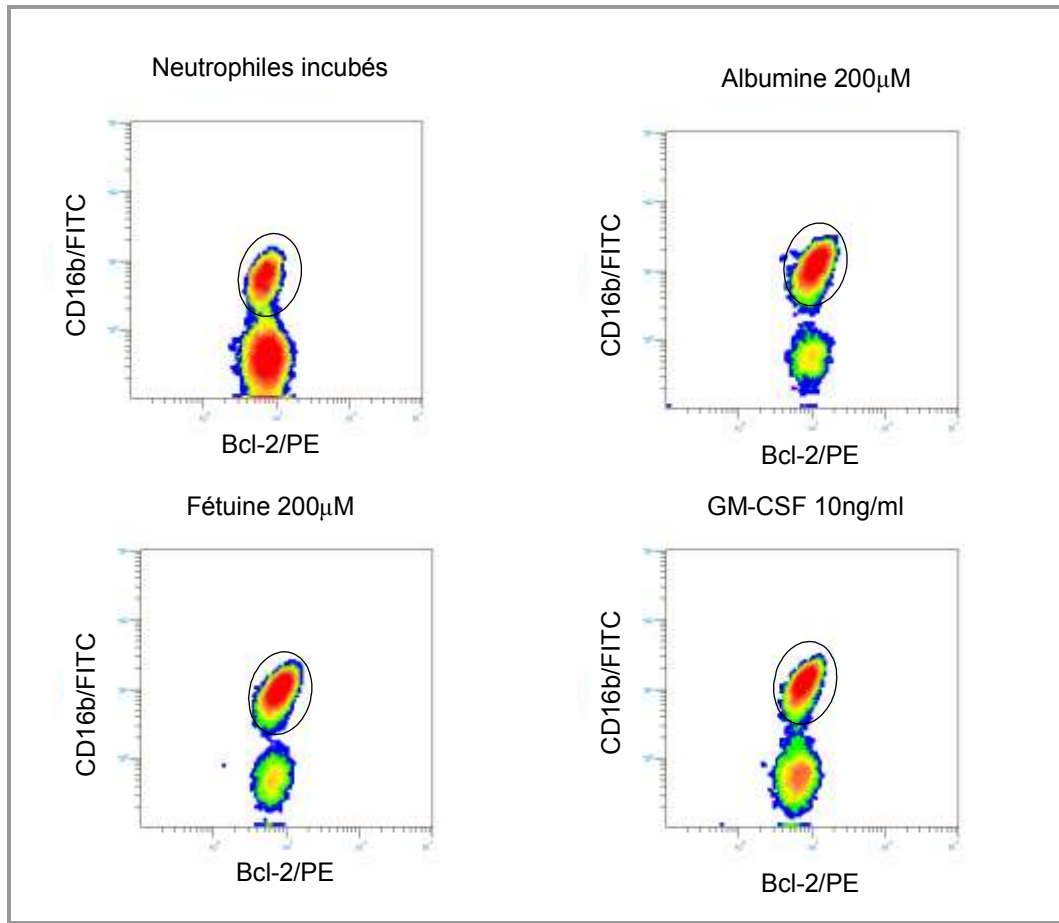


Figure 34 : Profil bi-paramétrique typique de cytométrie en flux mettant en évidence l'expression du Bcl-2 intracellulaire chez les neutrophiles fonctionnels incubés 24hres.

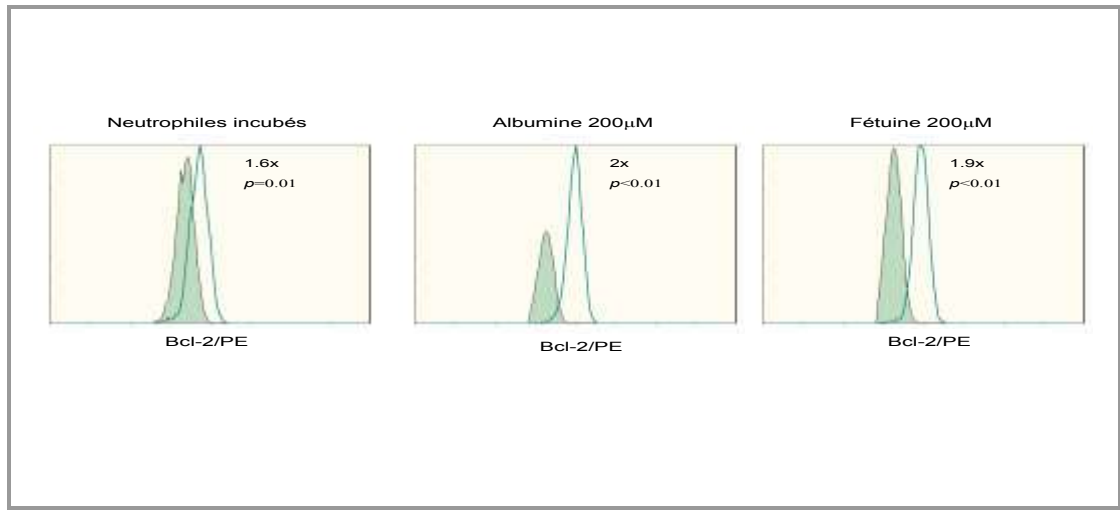


Figure 35 : Résultat typique de la superposition des histogrammes de cytométrie en flux de l'expression du Bcl-2 générés par les neutrophiles incubés 24 heures en présence d'albumine ou de fétuine comparativement au contrôle isotypique.

	Intensité de fluorescence moyenne (U ± ET)	Valeur <i>p</i>
Autofluorescence	30 ± 1	
Isotype	493±110	
Contrôle	778 ±147	≤0.01 vs isotype
Albumine 200µM	978 ±156	0.055 vs contrôle
Fétuine 200µM	932 ±205	0.14 vs contrôle
GM-CSF 10ng/ml	846 ±175	0.20 vs contrôle

Tableau 11 : Résultats illustrant l'effet de l'albumine, de la fétuine et du GM-CSF sur l'expression intracellulaire du Bcl-2 par rapport aux neutrophiles suivant une incubation de 24hres.

(n=4)

3.3.4.2 Le Mcl-1

Afin de raffiner le mécanisme de survie impliqué dans l'action de l'albumine et de la fétuine, l'expression du Mcl-1 est observée et comparée à celle du GM-CSF. La spécificité de l'anticorps utilisé est d'abord évaluée sur un lysat cellulaire de cellules K-562 (érythroleucémie humaine, résultat non illustré). La modulation de l'expression de la protéine Mcl-1 est étudiée chez les neutrophiles frais ainsi qu'incubés en présence d'albumine (Al : 200 μ M), de fétuine (Fe : 200 μ M) ou de GM-CSF (GM : 10ng/ml). L'autoradiographie ci-présente illustre un résultat typique d'essai par immunobuvardage de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 parmi 4 donneurs différents (Figure 36). Ce sont chez les PMNs fraîchement isolés, que cette protéine est le plus exprimée (F) (Ratio Mcl-1/Actine = 0.457). Visiblement, l'expression de cette dernière est altérée à 6 heures (CT) (Ratio Mcl-1/Actine = 0.238). Cependant, en présence de GM-CSF (Ratio Mcl-1/Actine = 0.386), d'albumine (Ratio Mcl-1/Actine = 0.390), ou de fétuine (Ratio Mcl-1/Actine = 0.417), l'expression est maintenue.

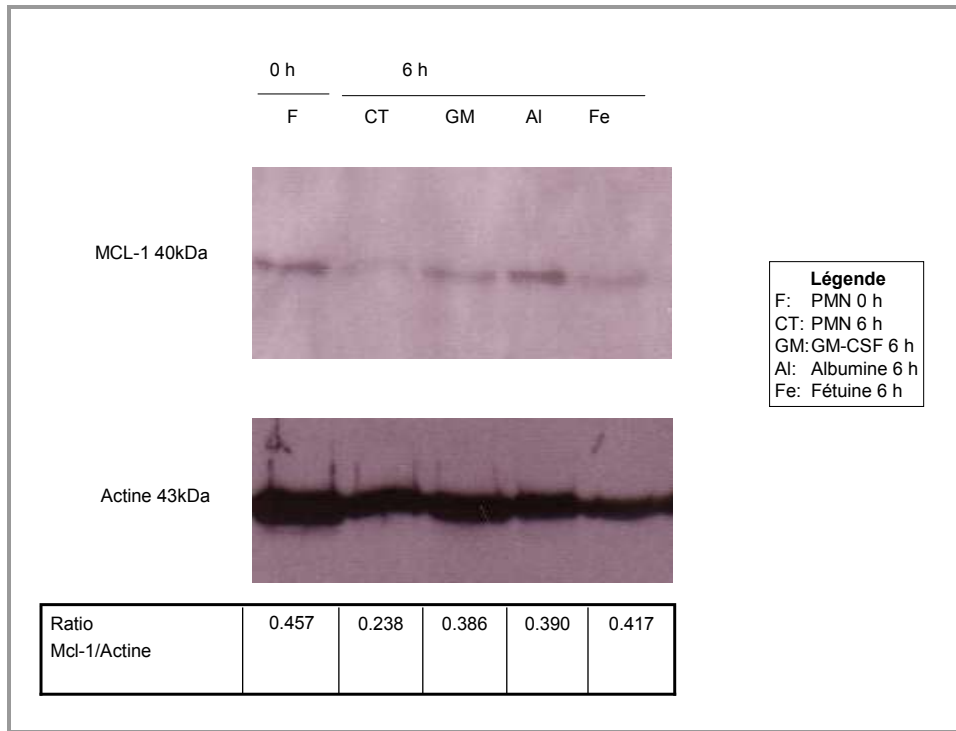


Figure 36 : Expression typique du Mcl-1 mise en évidence par immunobuvardage chez les PMNs fraîchement isolés et ceux incubés 6 heures en présence de GM-CSF, d'albumine ou de fétuine.

3.3.5 Étude de signalisation cellulaire reliée à la survie

La survie des PMNs observée en présence de composés inhibant leur apoptose, dont le GM-CSF, peut également être associée à des événements de signalisation cellulaire. Ainsi, l'implication de trois voies de signalisation cellulaire dont la kinase 3-phosphoinositol (PI-3K), l'extracellular regulated kinase (ERK) et la phosphorylation de la p38 sont étudiés chez les PMNs traités en présence d'albumine ou de fétuine parallèlement au GM-CSF.

Le Tableau 12 nous renseigne sur trois principaux mécanismes de signalisation cellulaire associés à la survie des PMNs soit : la kinase 3-phosphoinositol (PI-3K), l'extracellular regulated kinase (ERK) et la phosphorylation de la p38. Ici, la cycloheximide (CHX) à 10µg/ml est utilisé pour limiter la synthèse *de novo* des protéines tout en permettant d'accélérer l'apoptose spontanée pour bien évaluer les mécanismes de signalisation cellulaire. Tout d'abord, nous remarquons qu'en inhibant la PI-3K par l'action de la wortmannin, l'effet protecteur des composés à l'étude est perdu. Nous obtenons des taux de viabilité de 65 ±5%, 65 ±9% et 60 ±7% chez les PMNs incubés en présence d'albumine, de fétuine et de GM-CSF respectivement (Tableau 12). Cependant, les résultats obtenus en présence de GM-CSF ne sont pas significatifs ($p=0.23$) contrairement aux résultats obtenus en présence d'albumine et de fétuine ($p\leq 0.05$). Les données présentes dans le tableau (Tableau 12) illustrent également l'importance de la kinase ERK dans l'effet protecteur conféré par l'albumine. En inhibant la kinase ERK par l'entremise du PD 98059, nous observons une diminution significative de la protection apportée par l'albumine. Les pourcentages de viabilité passent de 77 ±7% à 67 ±7% ($p=0.05$). Contrairement à l'albumine, l'activité protectrice de la fétuine persiste en présence de l'inhibiteur PD 98059. L'implication de la phosphorylation du p38 dans le mécanisme d'action de l'albumine, de la fétuine et du GM-CSF est étudiée par l'entremise de

l'inhibiteur SB 202190. La présence de cet inhibiteur n'empêche pas l'action protectrice induite par les composés à l'étude.

	Viabilité (%) ±ET			
	CHX	CHX + Wortmannin	CHX + PD98059	CHX + SB202190
Contrôle	62 ±7	63 ±8	64 ±8	64 ±4
Albumine 200µM	77 ±7*	65 ±9†	64 ±6†	74 ±6
Fétuine 200µM	74 ±6*	60 ±7‡	71 ±4	74 ±5
GM-CSF 10ng/ml	69 ±4	65 ±5	64 ±6	70 ±7

Tableau 12 : Identification des évènements de signalisation cellulaire impliqués dans la protection conférée par l'albumine, la fétuine ou le GM-CSF chez les PMNs incubés 8hres en présence de CHX.

(* $p/CHX \leq 0.01$, † $p/CHX + Albumine \leq 0.05$, ‡ $p/CHX + Fétuine = 0.03$, n=5).

3.4 Effet de l'albumine et de la fétuine sur les cellules de la moelle osseuse

Bien que le GM-CSF protège les PMNs contre l'apoptose spontanée et induite, il possède également une activité proliférative sur les cellules de la moelle osseuse. Nous avons donc étudié l'effet de l'albumine et de la fétuine sur la synthèse d'ADN et la différenciation des cellules progénitrices de la moelle osseuse.

3.4.1 Impacte de l'albumine sur la synthèse d'ADN des cellules de la moelle osseuse murine

L'effet de l'albumine et de la fétuine est d'abord étudié sur les cellules progénitrices de la moelle osseuse d'origine murine. Une concentration de 200 μ M d'albumine augmente significativement la synyhèse d'ADN de ces cellules, tel que déterminé par l'incorporation de ^3H -thymidine, qui représente un indice de l'augmentation de la prolifération (Figure 37). L'albumine augmente par 2 fois le nombre de CPM (coups par minute) obtenu ($p=0.01$, $n=4$). À l'opposé, lorsque les cellules de la moelle osseuse de souris sont incubées en présence de fétuine (200 μ M), le nombre de CPM obtenus est similaire à celui du contrôle.

3.4.2 Effet de l'albumine et de la fétuine sur la synthèse de l'ADN des cellules de la moelle osseuse humaine, un indice de la prolifération cellulaire

La capacité de l'albumine et la fétuine à soutenir la prolifération est également évaluée en présence de cellules provenant de la moelle osseuse humaine. Lorsque ces dernières sont incubées pendant 72 heures en combinaison avec l'albumine ou la fétuine, on

assiste à une incorporation significativement plus élevée de ^3H -thymidine ($p < 0.01$) (Figure 38). Cet indice de prolifération, qui se situe à 1300 ± 145 pour les puits contrôles, augmente à 3186 ± 428 et 3095 ± 305 chez les cellules traitées à l'albumine et la fétuine respectivement.

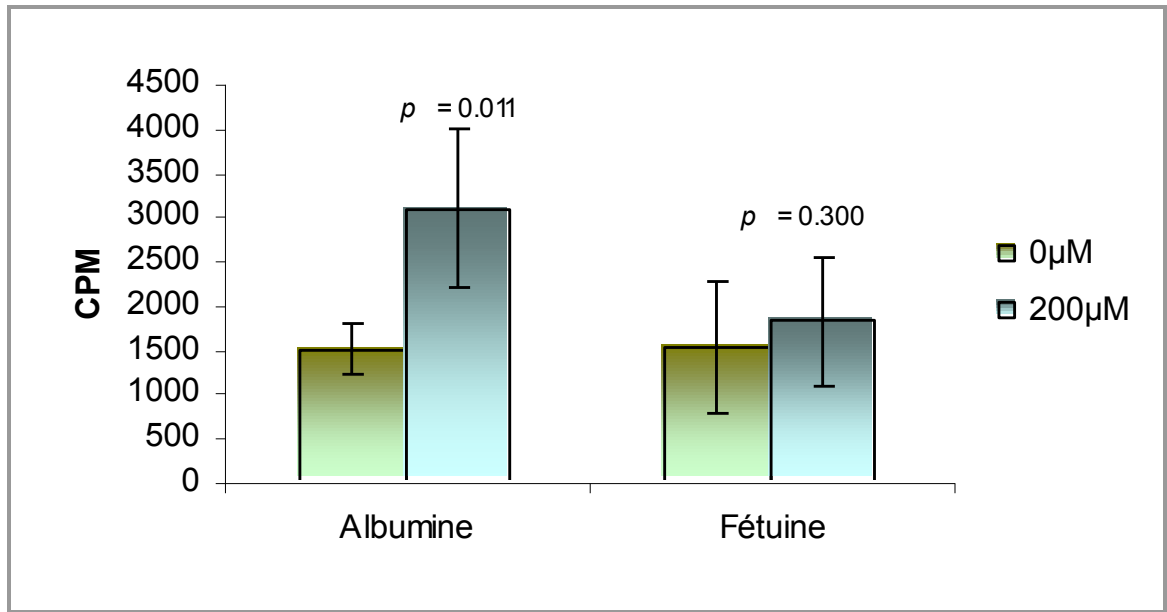


Figure 37 : Effet de l'albumine et de la fétuine sur la synthèse d'ADN des cellules de moelle osseuse de souris incubées pendant 72hres, mis en évidence par l'incorporation de ^3H -thymidine.

(n=4)

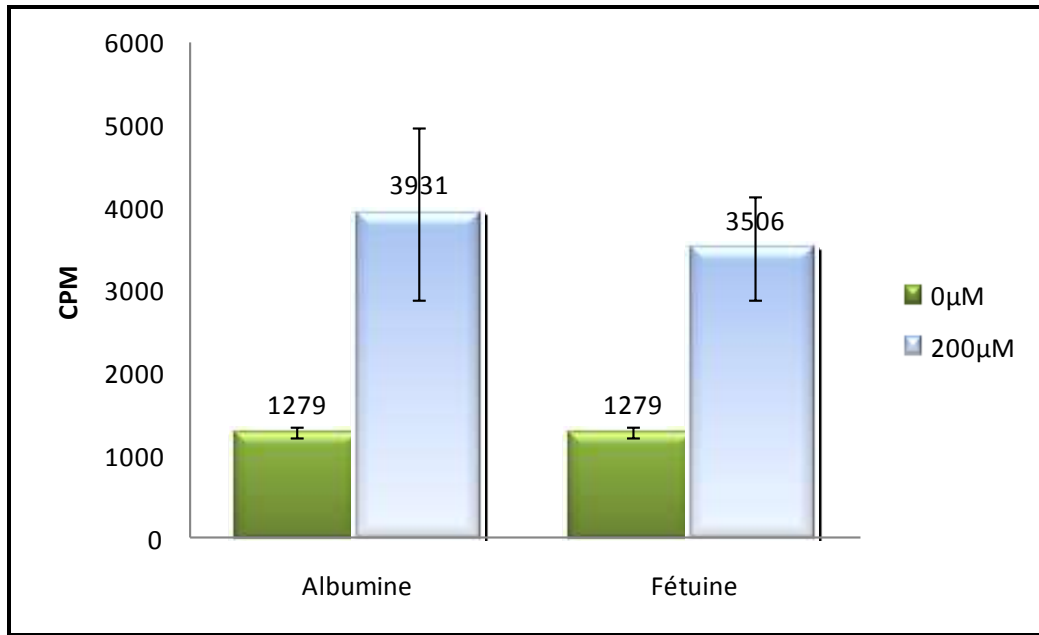


Figure 38 : Mesure de la synthèse d'ADN (incorporation de ^3H -thymidine) en présence de l'albumine ou de la féтуine illustrant la prolifération des cellules progénitrices de la moelle osseuse humaine suivant une incubation de 72hres.

(n=2, $p<0.01$)

3.4.3 Action de l'albumine et de la fétuine sur la différenciation des cellules de la moelle osseuse humaine

Les cellules hématopoïétiques possèdent un pouvoir pluripotent qui leur permet autant de se diviser que de se différencier. Afin d'étudier l'action de l'albumine et de la fétuine sur la maturation des cellules souches de la moelle osseuse humaine, on utilise un système bien établi en milieu méthylcellulose qui permet de compter les divers types de précurseurs générés (Stem cell). Les cellules sont incubées 72 heures en présence d'albumine et de fétuine. Ces cellules sont par la suite incubées pour 14 jours dans un milieu semi-solide (Methocult) afin d'évaluer le pouvoir hématopoïétique de ces protéines. L'érythropoïétine (Epo) et le GM-CSF sont également évalués à titre de contrôles positifs pour les lignées érythrocytaires et macrophagiques-granulocytaires respectivement. En présence d'Epo, on obtient 3 fois plus de colonies appartenant à la lignée érythrocytaire, les CFU-E et les BFU-E, par rapport aux pétris contrôles (51 ± 3 vs 17 ± 0) (Figure 39). Quant aux colonies de type BFU-E, on retrouve 57 ± 2 , 43 ± 4 et 41 ± 6 colonies de ce type lorsque les cellules sont traitées en présence d'albumine, de fétuine et d'Epo respectivement, par rapport à 17 ± 0 colonies chez les cellules contrôles.

En ce qui concerne les colonies de type CFU-GM, on remarque que le GM-CSF induit seulement un faible accroissement de ce nombre de colonies. Ainsi, en présence du GM-CSF, on obtient 79 ± 6 CFU-GM comparativement au contrôle (absence de GM-CSF, 66 ± 8 colonies). L'albumine et la fétuine n'affecte pas le nombre de colonies CFU-GM. Une faible activité sur les CFU-GEMM est toutefois perceptible en présence de GM-CSF et de l'albumine.

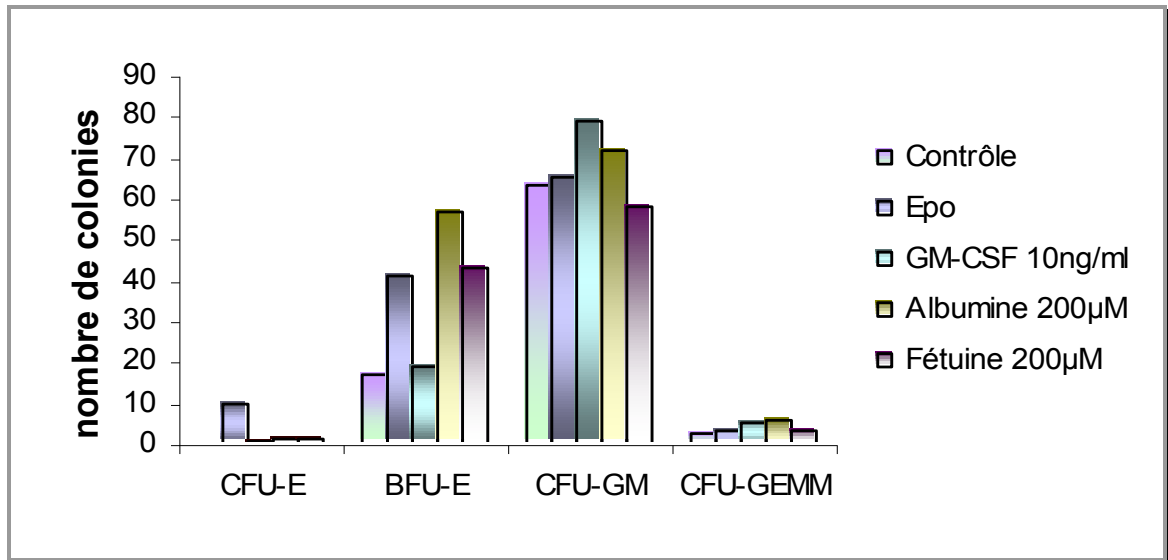


Figure 39 : Évaluation de l'activité de l'albumine et de la fétuine suivant une incubation de 72hres dans la différenciation des cellules hématopoïétiques.

(n=1)

3.5 Activité de l'albumine et de la fétuine dans un modèle murin de chimioprotection

Les précédents résultats, décrits jusqu'à maintenant, illustrent l'effet de l'albumine et de la fétuine dans divers systèmes d'analyse *in vitro*. Nous avons donc tenté d'étudier l'impact de leur utilisation dans un système *in vivo* soit dans un modèle murin de chimioprotection. Les organes lymphatiques (dont la moelle osseuse, la rate et le thymus), ainsi que le sang sont récupérés afin de comparer leur densité cellulaire comparativement aux groupes contrôles et ceux traités. Lorsque les souris sont immunosupprimées en présence de cytoxan (200mg/kg, administration intraveineuse), la densité cellulaire des leucocytes circulants (sang) diminue de moitié, passant de $9 \times 10^6 \text{c/ml} \pm 1$ à $3.6 \times 10^6 \text{c/ml} \pm 0.4$. Cette diminution (50%) est significative ($p < 0.01$) (Figure 40). Le traitement par la fétuine (10mg/kg) n'empêche pas cette diminution engendrée par le cytoxan. Cependant, les souris immunosupprimées traitées à l'albumine (14mg/kg) possèdent une densité cellulaire supérieure de leucocytes circulants comparativement au groupe cytoxan (Cytoxan : $3.6 \times 10^6 \text{c/ml} \pm 0.4$, Albumine : $5.7 \times 10^6 \text{c/ml} \pm 2.3$, $p = 0.035$). Cet accroissement correspond à une augmentation de 58%. Nous observons également une diminution significative de la densité cellulaire de la moelle osseuse par le cytoxan (Contrôle: $56 \times 10^6 \text{c/ml} \pm 9$, Cytoxan: $35 \times 10^6 \text{c/ml} \pm 5$, $p < 0.01$) (Figure 41). Le traitement par l'albumine et la fétuine n'empêche pas la diminution de la densité cellulaire des cellules de la moelle osseuse induite par le cytoxan. Des résultats similaires sont aussi obtenus chez le thymus (résultat non illustré) Quant à la densité cellulaire des cellules de la rate chez les souris immunosupprimées traitées par l'albumine (Figure 42), elle est légèrement supérieure comparativement aux souris immunosupprimées non traitées ($81 \times 10^6 \text{c/ml} \pm 16$ vs $66 \times 10^6 \text{c/ml} \pm 8$, $p = 0.04$).

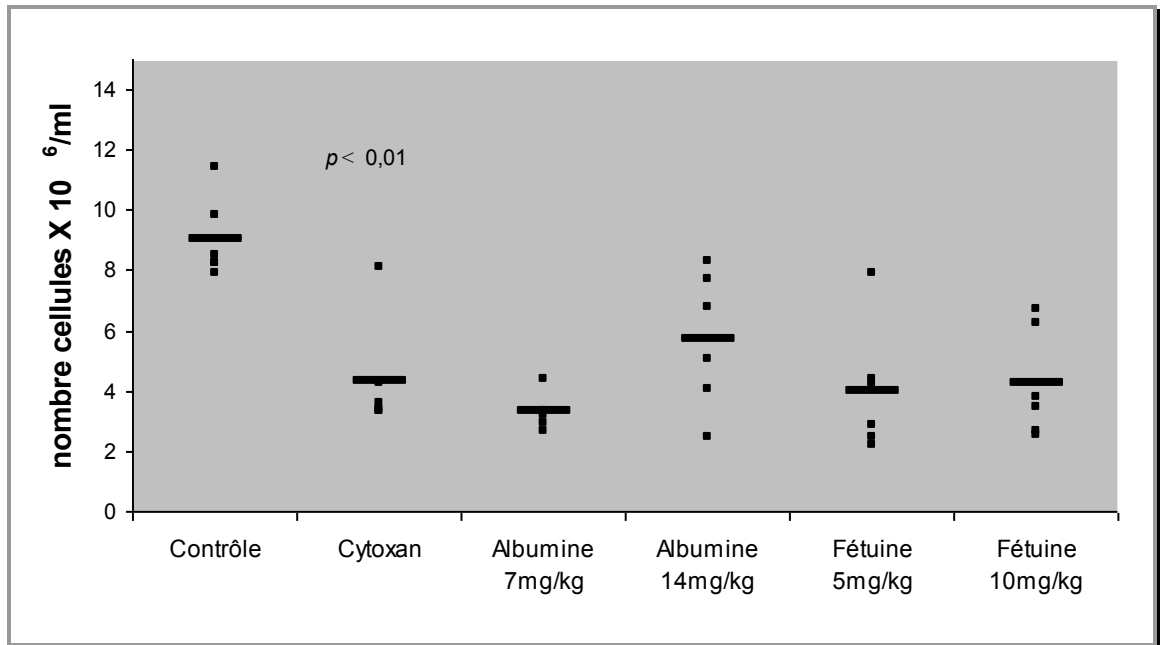


Figure 40 : Concentration cellulaires des globules blancs retrouvés dans le sang chez les souris immunosupprimées traitées en présence d'albumine et de fétuine suivant l'induction d'une immunosuppression dans un modèle murin de chimioprotection comparativement aux souris immunosupprimées (cytoxan) et aux souris normales (contrôles).

(* $p < 0.01$, ** $p/\text{cytoxan} = 0.035$, $n = 1$)

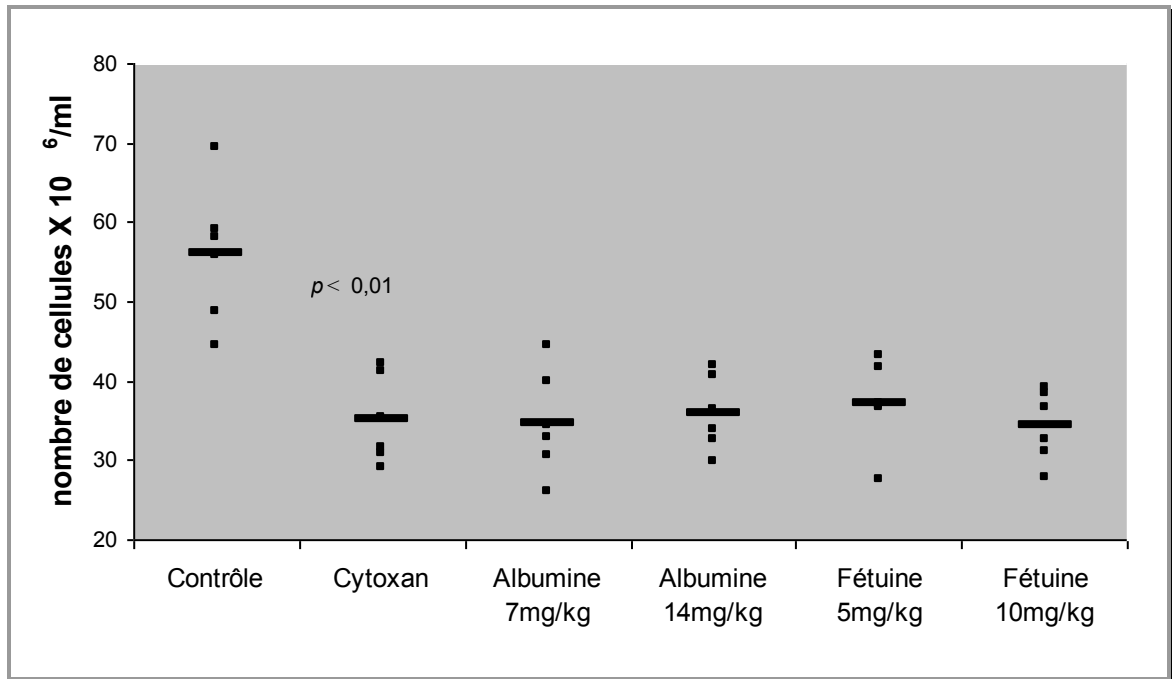


Figure 41 : Concentration des cellules de la moelle osseuse chez les souris immunosupprimées traitées en présence d'albumine et de fétuine suivant l'induction d'une immunosuppression dans un modèle murin de chimioprotection comparativement aux souris immunosupprimées (cytosan) et aux souris normales (contrôles).

(n=1)

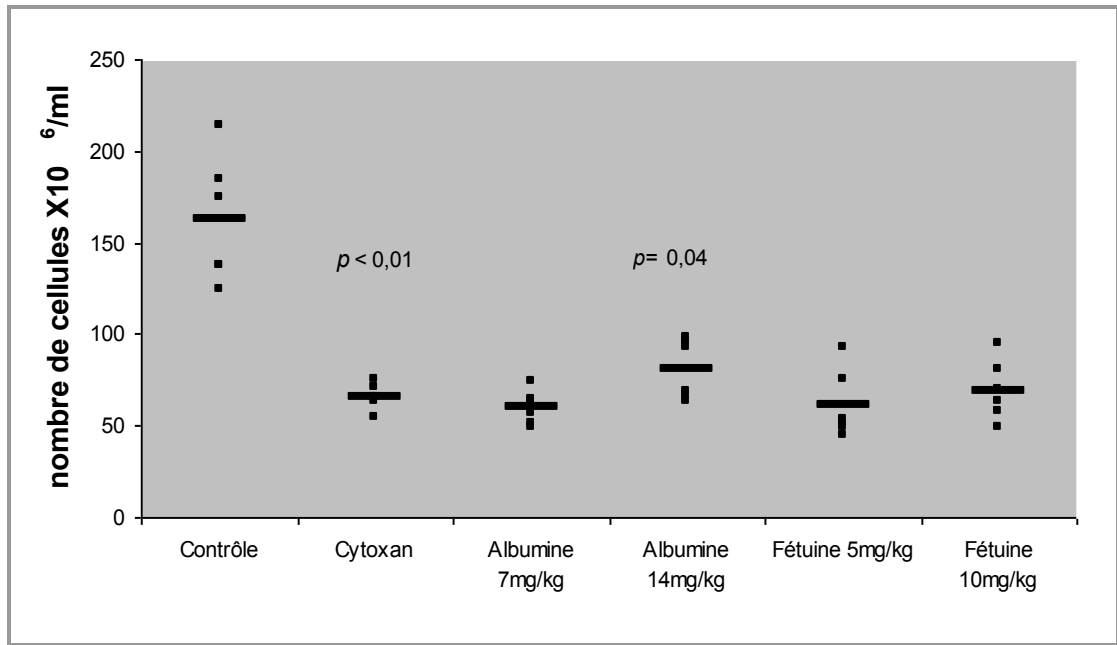


Figure 42 : Concentration des cellules de la rate chez les souris immunosupprimées traitées en présence d'albumine et de fétuine suivant l'induction d'une immunosuppression dans un modèle murin de chimioprotection comparativement aux souris immunosupprimées (cytoxan) et aux souris normales (contrôles).

(n=1)

4 Discussion

4.1 Caractérisation du liquide synovial

Les études réalisées en présence du milieu de culture conditionné (MCC) provenant des cultures cellulaires de synoviocytes nous indiquent que ce dernier inhibe efficacement l'apoptose spontanée des PMNs. Nos résultats font suite aux travaux de Lagraoui et Gagnon (1995) qui soutiennent que l'activation des PMNs et leur survie sont influencées par le MC recueilli à partir de cultures de synoviocytes. Plusieurs composantes du liquide synovial ont été identifiées en tant que facteur de survie des PMN, dont l'IFN- γ , le GM-CSF, les complexes immuns, l'IL-1, l'IL-15 et le TNF- α (Fossati et al., 2002; Ottonello et al., 2002; Scheel-Toellner et al., 2000; Wright, 2010). Afin de caractériser l'effet anti-apoptotique conféré par le MCC, les surnageants des synoviocytes sont soumis à l'ultrafiltration tangentielle. L'Ultrafiltration (UF) est une forme de filtration où le liquide traverse une membrane semi-perméable grâce à une différence de pression (pression transmembranaire ou TMP). Les particules en solution ou en suspension de haut poids moléculaire sont retenues, tandis que l'eau et les molécules de faible poids moléculaire passent à travers la membrane. Ce processus est utilisé pour purifier et concentrer des solutions. Il nous permet donc de retenir les protéines retrouvées dans les surnageants de synoviocytes en fonction de leur poids moléculaire. Selon les résultats antérieurs de Lagraoui, 1999, nous avons choisi d'utiliser une membrane de 50kDa pour concentrer le MC, afin d'éliminer la majorité des cytokines et facteurs de croissance. En effet, leurs résultats indiquent que le(s) facteur(s) du MC possède un poids moléculaire élevée et qu'il(s) est(sont) différent(s) de IL-1, IL-8, GM-CSF et du TGF- β . Suivant le séquençage du MCC parallèlement au facteur semi-pur actif, deux protéines ont été identifiées à la fois dans le MCC et dans le facteur semi-pur soient : l'albumine et la fétuine.

Bien que ces protéines soient essentiellement des protéines sériques, plusieurs éléments nous incitent à poursuivre notre étude afin d'évaluer l'effet de l'albumine et de la

fétuine sur les PMNs. En effet, l'albumine est la protéine la plus abondante retrouvée dans la composition du liquide synovial (Heuberger et al., 2005; Saikko et Ahlroos, 2000; Yamagiwa et al., 2003). Normalement, sa concentration se situe autour de 8mg/ml dans le fluide synovial, de 40mg/ml dans le sérum et de 0.47mg/ml dans le fluide cérébrospinal (Heuberger et al., 2005; Marshall et Williams, 2001; Zoellner et al., 1999). Quant à la fétuine, sa concentration plasmatique chez l'adulte se situe autour de 0.5mg/ml. En condition d'inflammation leur concentration augmente dans divers fluides extracellulaires (Demetriou et al., 1996; Mathur, 2000; Rozin et al., 2006; Harris et al., 2009; Vörös et al., 2011). Similairement, la concentration de la lactoferrine, une protéine sérique également contenue dans les granules cytoplasmiques, augmente dans le fluide synovial chez les patients atteints RA (Caccavo et al., 1999). De plus, Wong et al., (2009) ont démontré que la lactoferrine, présente dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, augmentait la survie des PMNs au même titre que le GM-CSF. Les protéines plasmatiques jouent donc un rôle important en condition d'inflammation. Bien qu'une littérature exhaustive existe sur l'albumine et la fétuine, aucune de ses études n'a évalué leur rôle dans la régulation de l'apoptose chez les PMNs. Ainsi, nous entreprenons alors de comparer leurs effets sur la survie des PMNs par rapport au GM-CSF, un important facteur de croissance et de survie chez les PMNs.

Lorsque les PMNs sont incubés en présence de 200 μ M de fétuine, nous observons une inhibition de l'apoptose spontanée. L'inhibition obtenue est similaire à celle retrouvée en présence du MCC. Non seulement, la fétuine agit sur des cellules complètement différenciées, telles les neutrophiles, mais elle possède également une activité sur plusieurs types de cellules normales et lignées cellulaires. Elle est impliquée dans la différenciation et la transformation des cellules (Dziegielewska et al., 2000; Ix et al., 2008). La fétuine est principalement synthétisée par le foie, mais aussi par les ostéoblastes (Ishida et al., 2004). Elle est distribuée dans divers organes dont la moëlle osseuse, les os, le cerveau, les tissus calcifiés et les tissus originaires du mésenchyme (Dziegielewska et al., 2000; Ishida et al., 2004; Kwak et al., 2004;). Reynolds et collaborateur (2005) observent également une

inhibition de l'apoptose des cellules vasculaires des muscles lisses (vascular smooth muscle cell ou VSMC) en présence de fétuine, ce qui concorde avec nos résultats. Leurs résultats démontrent, qu'en présence de fétuine, une inhibition importante de l'apoptose, induite par la présence d'ions calcium et phosphate (milieu CaPi), est observée. La plupart des études réalisées sur la fétuine démontrent une activité en présence de 0.1mg/ml à 10mg/ml de fétuine. Dans notre méthode expérimentale, l'inhibition de l'apoptose est obtenue en présence de 10mg/ml similairement aux autres auteurs, ce qui coïncide avec les concentrations physiologiques retrouvées dans le sérum d'origine fœtal (10mg/ml) ou le sérum adulte (0.5mg/ml). Évalué à deux reprises sur l'apoptose constitutive des PMNs (résultat non-illustré), l'homologue humain de la fétuine, l' α 2-HS glycoprotéine à 2 μ M (0.13mg/ml), inhibe également l'apoptose des PMNs. Nos résultats en présence de l'homologue humain coïncident avec ceux de Reynolds (2005) qui démontrent une activité importante en présence de 2 à 10 μ M. L'origine de la fétuine utilisée dans leur étude n'est cependant pas décrite bien que le système utilise des cellules humaines. Il est possible que l'homologue humain soit davantage actif lorsque évalué chez les PMNs, ces derniers étant également d'origine humaine.

Lorsque nous incubons les PMNs en présence de 200 μ M d'albumine, nous assistons à une inhibition de l'apoptose spontanée des PMNs. L'activité de l'albumine sur les PMNs est d'autant plus concevable étant donné leur position stratégique. En effet, les PMNs représentent environ 65% des leucocytes retrouvés dans le sang périphérique. Ils sont donc en étroite relation avec les divers constituants du sérum, dont l'une des principales protéines est l'albumine. Elle représente environ 60% du contenu en protéines sériques, soit entre 35-50mg/ml. Sa concentration dans le fluide synovial est d'environ 8mg/ml ce qui correspond à une concentration 5 fois moins importante. Chez les patients atteints d'AR, la concentration de l'albumine dans le liquide synovial augmente (Rozin et al., 2006). Les hépatocytes sont principalement responsables de sa synthèse mais elle est également retrouvée dans une multitudes de tissus notamment, les muscles, les dents, les reins, le

cerveau et le pancréas (Yamagushi et al., 2003; Wagatsuma et al., 2001). Son expression est présente chez les ostéoblastes, les chondrocytes, les monocytes et les PMNs (Borregaard et al., 1992; Calafat et al., 1997; Faurschou et Borregaard, 2003; Ishida et al., 2004; Yang et al., 1991). Les cellules endothéliales de l'épithélium vasculaire (EC) de même que les cellules endothéliales isolées à partir de cordon ombilical (HUVEC) sont également en contact direct avec l'albumine. D'ailleurs, Zoellner et al (1996) ont démontré une inhibition de l'apoptose des cellules EC et HUVEC en présence d'albumine. L'hypothèse émise par ces auteurs est davantage soutenue par l'analyse de tissus extraits chez les rongeurs de même que chez l'humain. Ces tissus, ainsi cultivés *in vitro*, permettent de recréer un milieu similaire à celui présent *in vivo* afin de mettre en évidence l'effet de l'albumine sur différents types d'épithélium vasculaires en tant que tissus (Zoellner et al., 1999). L'inhibition de l'apoptose observée par Zoellner et al (1996 et 1999) est visible entre 0,4% et 4% d'albumine, mais l'effet maximal est atteint en présence de 4% d'albumine. Cette dernière représente une concentration d'environ 600 μ M. Nos résultats coïncident avec leurs résultats qui révèlent un effet protecteur de l'albumine, à des concentrations physiologiques, sur les cellules qui entrent en contact direct (Bolitho et al., 2007). Dans notre étude, l'inhibition de l'apoptose observée chez les PMNs est atteinte à 200 μ M, soit environ 14mg/ml. Dans une analyse conduite sur des cultures primaires de macrophages péritonéaux, la viabilité de ces cellules après 72 heures d'incubation est maintenue par la présence de 10mg/ml d'albumine (Iglesias et al., 1999). Les concentrations actives, utilisées par les différents auteurs, sont similaires à la concentration déterminée chez les PMNs. Contrairement à nos études, les travaux effectués concernant l'action de l'albumine sur les macrophages péritonéaux évaluent l'effet de deux préparations différentes d'albumine, dont l'une a été traitée pour en extraire les lipides (albumine délipidé). Leur résultat pointe vers une double activité de l'albumine, soit une dépendante de la présence d'acides gras, dont l'acide lysophosphatidique (LPA), ainsi qu'un mécanisme indépendant de la présence de ces faibles contaminants. Cependant, des études comparatives, effectuées par Zoellner et al (1999) en présence de 4% d'albumine recombinante versus 4%

d'albumine native, démontrent que les deux préparations possèdent une activité identique. Ainsi, les auteurs concluent qu'il est peu probable que l'activité observée en présence d'albumine native soit due à la présence de contaminants. Il demeure possible que l'action de l'albumine sur les PMNs soit, en partie, dépendante de la présence d'acides gras. Cependant, l'albumine circulante est rarement retrouvée à l'état délipidé. Ainsi, afin de mieux évaluer l'effet de l'albumine présente dans la circulation sanguine sur les PMNs, il est plus judicieux d'utiliser une préparation qui concorde avec ses propriétés physiologiques. L'albumine possède également une activité sur les fibroblastes murins L929. En effet, lorsque les cellules L929 sont incubées 24 à 48 heures en présence de 1 à 10mg/ml d'albumine, une dose-réponse est observée. Ceci provoque alors un accroissement de la viabilité des fibroblastes murins de 15 à 50% (Fischer et al., 2003). De plus, il existe dans la littérature d'intéressantes études portant sur l'action neuroprotectrice de l'albumine (Belayev et al., 2001; Huh et al., 1998; Taberno et al., 2002). Les travaux complémentaires réalisés *in vivo* par Belayev et al. (2002) soutiennent l'importance et l'utilité de l'albumine dans le traitement des ischémies.

4.2 Les mécanismes d'action impliqués : Similitudes et différences par rapport au GM-CSF

4.2.1 Fonctionnalité

Chez les neutrophiles, le niveau d'expression du CD16b est un moyen simple et efficace de distinguer les cellules apoptotiques des cellules saines. En effet, la disparition de ce récepteur Fc γ est parallèlement accompagnée d'une perte de fonctionnalité des neutrophiles intimement liée à l'apoptose (Dransfield et al., 1994). Plusieurs cytokines peuvent cependant moduler le processus apoptotique des PMNs observé *in vitro* tel le GM-CSF, IL-2, IL-6 et IL-15 (Biffl et al., 1995; Bouchard et al., 2004; Brach et al., 1992;

Colotta et al., 1992; Gasmi et al., 1996; Girard et al., 1996; Lee et al., 1993; Pericle et al., 1999). En effet, le GM-CSF, reconnu pour ses propriétés de survie envers les PMNs, protège l'expression de ce récepteur (Buckle et Hogg, 1989; Moulding et al., 1996). Les études réalisées par Moulding et al. (1996) démontrent également l'efficacité accrue du sodium butyrate envers l'expression du CD16b comparativement au GM-CSF. Nous avons donc entrepris d'évaluer l'effet de l'albumine et de la fétuine sur l'expression de surface de ce récepteur Fc γ relativement au GM-CSF. Nos résultats révèlent que l'albumine et la fétuine sont aussi efficaces que le GM-CSF dans la protection de l'expression du CD16b. Ces résultats concordent avec ceux précédemment obtenus par la méthode d'annexinV-FITC/7-AAD visant à mettre en évidence l'effet anti-apoptotique des composés à l'étude. Ces derniers confirment également le lien déjà établi entre la fonctionnalité et la survie des PMNs. La disparition du CD16b à la surface des PMNs suivant leur activation ou lors de l'apoptose est due à l'action des protéases, dont les métalloprotéinases, qui produit un clivage protéolytique (Middelhoven et al., 1997). Les inhibiteurs de protéases, tel le phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) et le diisopropylfluorophosphate (DFP) peuvent également protéger l'expression du CD16b ce qui confirme qu'une protéolyse est responsable de la disparition de ce récepteur (Huizinga et al., 1990). De plus, l'élastase altère également l'expression du CD16b chez les PMNs (Tosi et Zakem, 1992). La fétuine est une protéine appartenant à la superfamille des cystatines (Brown et Dziegielewska, 1997; Dziegielewska et al, 2000; Rawlings et Barrett, 1990). Parmi les multiples fonctions attribuées à la fétuine, plusieurs publications démontrent une activité inhibitrice envers diverses protéases dont la trypsine et l'élastase, d'où l'effet protecteur observée sur l'expression du CD16b (Dziegielewska et al, 1990; Yamamoto et Sinohara, 1993; Yoshida et al., 1996). Bien qu'aucune fonction inhibitrice envers les protéases ne soit décrite dans la littérature concernant l'albumine, cette protéine prévient cependant l'inactivation des anti-protéases induite par les radicaux libres (Carp et Janoff, 1979; Travis et Salvesen, 1983; Wasil et al., 1987).

4.2.2 Effet de l'albumine et la fétuine sur la famille du Bcl-2

Parmi la multitude de molécules impliquées dans la régulation de l'apoptose, deux familles de protéines, soit la famille du Bcl-2 et celle des caspases, détiennent un rôle prédominant dans le mécanisme central de l'apoptose. Ainsi, plusieurs publications supportent l'implication des protéines appartenant à la famille du Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose chez les PMNs (Bouillet et al., 1999; Hamasaki et al., 2000; Lagasse et Weissman, 1994; Lindsten et al., 2000; Villunger et al., 2003). Plus particulièrement, certains auteurs démontrent que les PMNs expriment de façon appréciable certaines molécules pro-apoptotiques dont Bax et Bak (Dibbert et al., 1999; Moulding et al., 2001; Weinmann et al., 1999). En effet, la délétion simultanée de Bax et Bak chez les souris entraîne une accumulation exhaustive de PMNs, démontrant ainsi l'importance de ces protéines dans la régulation de l'apoptose (Lindsten et al., 2000). Cependant, il a été démontré que l'action de la protéine Bax n'est pas due à son expression, mais plutôt à sa localisation. En effet, la translocation du Bax cytosolique dans la membrane des mitochondries est responsable de son action pro-apoptotique (Maianski et al., 2002). Il nous a été impossible de détecter une modulation de l'expression de Bax par cytométrie en flux (résultat non illustré). Similairement, Maianski et al. (2002) ne décèlent aucun changement dans le niveau d'expression des protéines Bax, Bak et Bcl-X entre les PMNs fraîchement isolés et ceux cultivés pendant 20 heures.

Bien que l'expression de la molécule Bcl-X est décrite par plusieurs auteurs (Dibbert et al., 1999; Villunger et al., 2000; Weinmann et al., 1999), d'autres études n'ont pu mettre en évidence cette protéine appartenant à la famille du Bcl-2 chez les PMNs (Cowburn et al., 2002; Moulding et al., 1998, 2001). L'expression réelle et significative de cette protéine n'a pu être démontrée parmi la panoplie d'anticorps disponibles sur le marché. Bien que certains auteurs obtiennent parfois un faible signal par

immunobuvardage, il est suggéré que la provenance de ce signal soit attribuable à la présence de cellules contaminantes dont les monocytes et lymphocytes (Edwards et al., 2004). De notre côté, nous avons obtenu des données inconsistantes sur l'expression du Bcl-X_L par cytométrie en flux. Malgré que les PMNs humains contiennent également de l'ARNm codant pour le gène anti-apoptotique A1, la présence de cette protéine chez ces cellules n'a pu être démontrée (Edwards et al., 2004).

Les divers travaux existants portant sur l'expression et l'implication des protéines appartenant à la famille du Bcl-2 sont une fois de plus controversés. En effet, certains auteurs décrivent un rôle modulateur du GM-CSF sur l'expression du Mcl-1 alors que d'autres ne perçoivent aucune régulation de cette protéine anti-apoptotique en présence de ce facteur de croissance (Epling-Burnette et al, 2001; Maianski et al., 2002; Moulding et al, 1998, 2001). Cependant, le Mcl-1 constitue le seul membre de la famille appartenant au Bcl-2 à être, sans contredit, présent chez les PMNs (Edwards et al., 2004). Les résultats divergents concernant sa modulation via le GM-CSF peuvent en partie venir du modèle expérimental utilisé. En effet, certains auteurs ont étudié l'expression du Mcl-1 chez les PMNs incubés pendant 20 heures. Or, il a été démontré que cette protéine possède une demi-vie très courte (Craig, 2002; Moulding et al., 2001; Yang et al., 1995). Afin de bien apprécier l'expression du Mcl-1, il est préférable d'étudier son expression dans les 6 heures suivant la culture ou la stimulation. Ainsi, il est possible que les contradictions obtenues concernant son expression et son implication dans le mécanisme de survie associé au GM-CSF soient dues à cette différence. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de l'albumine et de la fétuine sur l'expression de Mcl-1 suite à une stimulation de 6 heures. Tout au long de nos travaux, nous avons préconisé l'évaluation des PMNs et l'effet de l'albumine et de la fétuine dans l'inhibition d'apoptose par cytométrie en flux au détriment des techniques de biologie moléculaire. Nous avons également utilisé les anticorps disponibles directement conjugués afin de limiter la liaison non spécifique d'un deuxième anticorps, qui est particulièrement problématique chez les PMNs. Aucun anti-Mcl-1

directement conjugué n'est disponible sur le marché. Nous avons alors utilisé l'immunobuvardage pour cette étude puisque les divers auteurs s'entendent sur l'expression du Mcl-1 chez les PMNs, mais divergent quant à sa modulation. Les résultats obtenus dans nos laboratoires confirment que l'inhibition de l'apoptose conféré par le GM-CSF est liée au maintien de la protéine Mcl-1. Nos études démontrent également que l'albumine et la fétuine procurent un effet similaire à celui du GM-CSF. Derouet et al., 2004 ont démontré que l'effet protecteur du GM-CSF sur les PMNs provient plutôt d'une augmentation de la stabilité de la protéine Mcl-1 que d'une synthèse protéique *de novo*. Les auteurs stipulent que le GM-CSF prévient la protéolyse du Mcl-1, qui est habituellement rapidement ciblée vers le protéasome (Derouet et al., 2004). D'ailleurs, les PMNs fraîchement isolés sont ceux qui détiennent le plus haut niveau d'expression du Mcl-1 ce qui suggère une régulation au niveau de la dégradation plutôt que de l'expression de cette protéine anti-apoptotique (Pelletier et al., 2002). Il est à noter que nous avons évalué trois anti-Mcl-1 de sources différentes avant de mettre en évidence son expression soutenue en présence du GM-CSF. Il est donc possible que l'anticorps utilisé par les différents auteurs soit la cause des publications contradictoires observées dans la littérature. De plus, les auteurs ont également recours à diverses techniques dont l'immunofluorescence indirecte. Or, bien que cette technique soit souvent adéquate dans plusieurs systèmes, chez les neutrophiles, elle s'avère plus ou moins applicable. En effet, la détection d'antigènes intracellulaires par l'entremise d'un second anticorps chez les PMNs augmente souvent le phénomène de liaison non spécifique. D'une part, par l'abondance des récepteurs Fc exprimés par les PMNs, et d'autre part, par la présence de cellules apoptotiques qui peuvent lier les anticorps de façon non spécifique, ce qui réduit de façon importante la détection d'évènement précis.

Le Bcl-2 est, sans aucun doute, la molécule la plus fréquemment étudiée durant l'observation du phénomène anti-apoptotique dans divers systèmes. Cependant, l'existence de cette protéine chez les PMNs matures n'a pu, jusqu'à ce jour, être démontrée bien que

leurs précurseurs en contiennent (Benito et al. 1995; Weinmann et al., 1999). Par contre, les études réalisées dans un modèle de souris transgénique sur-exprimant le Bcl-2 mettent en évidence une viabilité accrue des PMNs, liée à une inhibition d'apoptose, par rapport aux souris normales (Lagasse et Weissman, 1994). Nous nous sommes donc penchés sur l'étude de cette molécule anti-apoptotique chez les PMNs comme plusieurs auteurs (Dibbert et al., 1998; Iwai et al., 1994; Moulding et al., 2001). Nous avons tout d'abord constaté que l'isolation des PMNs par gradient de densité ne permettait pas d'obtenir une suspension pure de PMNs. Les colorations de Wright-Giemsa réalisées sur les suspensions de PMNs fraîchement isolés et ceux incubés révèlent la présence d'une population hétérogène. En effet, les suspensions fraîchement isolés de PMNs renferment environ 5% de cellules contaminantes. Nous obtenons un fort enrichissement en PMNs mais il est impossible d'éliminer totalement les cellules indésirables. Chez les PMNs incubés 24 heures, la pureté est davantage compromise étant donné que le nombre de PMNs viables diminue durant la culture. Ainsi, lorsqu'on désire analyser le mécanisme de l'apoptose spontanée des PMNs par rapport aux cellules fraîchement isolées, on ne peut omettre la présence de cellules contaminantes que ce soit les lymphocytes, les monocytes, ou encore les granulocytes moins nombreux tels les basophiles et les éosinophiles. De plus, Moulding et al (2001) s'interrogent également sur le sujet et concluent que les techniques conventionnelles de biologie moléculaire ne permettent pas d'affirmer avec certitude, chez les PMNs, l'existence d'une protéine faiblement exprimée. Premièrement, la diversité des granules confère aux PMNs un arsenal enzymatique puissant qui peut engendrer une lyse non spécifique lors de la préparation d'échantillons, spécialement lors de l'utilisation de tampon de lyse (Maianski et al., 2004; McDonald et al., 1998; Pryde et al, 2000). De tels tampons sont, entre autre, conçus pour l'isolation d'ADN, d'ARN et des protéines. Deuxièmement, nous savons que les PMNs renferment un nombre limité de mitochondries (Borregaard et Kragballe, 1980; Clark et al., 1980; Maianski et al., 2004). Ainsi, la détection des protéines comprises dans les membranes mitochondriales (Bcl-2, Bcl-x, Omi) chez les PMNs est plus ardue. C'est pourquoi les résultats de plusieurs auteurs divergent quant à l'existence et à

l'importance des protéines anti-apoptotiques étudiées chez les PMNs. Afin de limiter ces problèmes, nous avons choisi d'analyser la présence intracellulaire du Bcl-2 par cytométrie en flux par l'entremise de deux anticorps différents, directement conjugués, soit le clone 100 et le clone C-2. Cette méthode procure divers avantages dont : 1- La possibilité de cibler la population de PMN par discrimination selon la taille et la granularité, éliminant dans un premier temps les monocytes et lymphocytes contaminants, 2- D'écarter la contribution des autres granulocytes de faible importance (basophiles et éosinophiles), par ségrégation du CD9, afin de s'assurer que l'expression du Bcl-2 provient véritablement de la population des PMNs, et finalement, 3- D'analyser la présence d'une protéine d'intérêt sur une population de cellules viables exprimant le CD16b, puisque les cellules apoptotiques peuvent lier les anticorps de façon non spécifique, ce qui risque d'introduire des artefacts. De plus, l'anti-CD16b choisi est spécifique aux PMNs, ceci renforce notre ségrégation. En effet, le clone 1D3 (Immunotech) est un IgM spécialement conçu pour les PMNs contrairement aux autres clones disponibles sur le marché. De plus, l'équipe de Zhu et al (1998) a démontré que ces autres clones réagissaient avec une portion d'éosinophiles, justifiant ainsi l'utilisation du clone 1D3 dans notre modèle expérimental. Parmi les deux clones d'anti-Bcl-2 étudiés, seul le clone C-2 permet de mettre en évidence la présence du Bcl-2 chez les PMNs fraîchement isolés. Le clone 100 réagit cependant très bien avec les lymphocytes et les monocytes (résultat non illustré). Nos résultats confirment l'information obtenue par divers manufacturiers du clone 100 concernant l'absence de réactivité avec les granulocytes (Communication personnelle de Beckman Coulter). Cet anticorps monoclonal est le plus largement utilisé par divers investigateurs afin de mettre en évidence le Bcl-2 d'origine humaine. Lorsque nous portons une attention particulière à l'immunogène employé dans la fabrication de ces deux anticorps, nous constatons que le clone 100 est généré à partir des acides aminés 41 à 54 et qu'il est dédié à la détection du Bcl-2 d'origine humaine (Pezzella et al, 1990). Le clone C-2, quant à lui, réagit avec les acides aminés 1 à 205 possédant ainsi une spécificité moins restreinte. Afin de s'assurer de la spécificité du produit utilisé, le clone C-2 a été préalablement testé par immunobuvardage sur des cellules

de types HL-60. Ce clone peut détecter le Bcl-2 dans plus d'une espèce autant chez l'humain que chez les rongeurs. Chez les PMNs fraîchement isolés, la translocation complète de la fluorescence nous indique que, bien qu'existante, l'expression du Bcl-2 est plutôt faible. Il est possible que la structure tertiaire adoptée par le clone C-2 soit différente, permettant ainsi la réactivité de cet anti-Bcl-2 avec les PMNs contrairement au clone 100. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Moulding et al (2001) qui détectent une faible quantité de Bcl-2 par la méthode RPA (RNase Protection Assay). Cependant, les techniques de biologie moléculaire utilisées par ces auteurs ne permettent pas d'éliminer la présence de cellules contaminantes mais seulement d'évaluer leur contribution. Ils concluent donc que le signal provient de cette contamination. Notre ségrégation, quant à elle, permet d'exclure les cellules indésirables. Notre méthode de cytométrie en flux nous a permis de démontrer que, chez les PMNs incubés 24 heures, une population viable et fonctionnelle exprime le Bcl-2 faiblement. Lorsque les PMNs sont incubés en présence d'albumine, de fœtine ou de GM-CSF, nous constatons également l'existence de cette protéine. Cependant, nous n'obtenons aucune augmentation significative entre les cellules viables du contrôle incubé et les cellules viables des groupes expérimentaux. Il est important de mentionner que l'expression du Bcl-2 est analysée sur la population de cellules positives pour le CD16b, c'est-à-dire les cellules fonctionnelles. Les différences obtenues entre les MFI proviennent probablement du protocole de cytométrie. En effet, l'acquisition d'évènements s'effectue sur la population de PMN qui présente une taille et une granularité normale, alors que l'intensité de fluorescence moyenne du Bcl-2 provient des cellules CD16b+. Les cellules viables (CD16b+) sont d'ailleurs plus nombreuses chez les cellules incubées en présence d'albumine et de fœtine d'où l'augmentation de l'intensité de fluorescence moyenne par rapport au contrôle (mais non-significative). Le plus haut niveau d'expression du Bcl-2 est retrouvé chez les PMNs fraîchement isolés, dont 98% des PMNs sont CD16b+. Donc, le GM-CSF, qui contient une portion inférieure de PMN CD16b+ comparativement à l'albumine, confère une intensité de fluorescence moyenne intermédiaire par rapport aux cellules incubées et aux cellules viables des groupes

expérimentaux. Nous avons réalisé ces expériences au temps 0, PMNs frais, et 24 heures, PMNs incubés en absence ou présence de composés. Il aurait pu être pertinent d'effectuer ces analyses à un temps plus précoce pour faciliter la détection du Bcl-2 chez les PMNs traités. En effet, similairement au Mcl-1, ce sont les PMN frais qui contiennent le plus haut niveau d'expression du Bcl-2. Ainsi, il aurait été intéressant d'évaluer si la stabilité du Bcl-2 au temps 6hres en présence CHX joue un rôle dans l'effet anti-apoptotique des composés à l'étude. Cependant, puisque les PMNs frais expriment le Bcl-2 faiblement, confirmé par la translocation complète de la fluorescence, il est probable qu'il soit difficile de percevoir une différence entre les groupes expérimentaux et le contrôle, contrairement au Mcl-1. Nous pouvons donc conclure que les PMNs, autant ceux fraîchement isolés que ceux incubés, expriment faiblement le Bcl-2, mais que ni l'albumine, ni la fétuine et ni le GM-CSF ne permet de moduler l'expression de cette protéine chez les PMNs fonctionnels, c'est-à-dire non-apoptotiques.

4.2.3 Les enzymes protéolytiques

La courte durée de vie des neutrophiles en circulation conjuguée à la présence d'un arsenal enzymatique impressionnant suggèrent un rôle important des protéases dans le processus apoptotique. Parmi ces enzymes, la famille des caspases représente une classe enzymatique des plus étudiée. D'ailleurs, l'existence des caspases -1, -3, -8 et -9 chez les neutrophiles a été démontrée (Sanghavi et al., 1998; Watson et al, 1998; Yamashita et al., 1999). Puisque la caspase-1 est reconnue pour son action pro-inflammatoire, nous nous sommes donc attardés sur l'effet de l'albumine et de la fétuine concernant l'activation des caspases -3, -8 et -9 comparativement au GM-CSF (Wolf et Green, 1999).

Parmi les nombreux membres que contient la famille des caspases, la caspase-3 est sans aucun doute la plus étudiée chez les PMNs (Khwaja et Tatton, 1999; Maianski et al,

2002; Ottonello et al., 2002b; Pongracz et al., 1999; Weinmann et al., 1999). Son rôle central dans l'accomplissement du processus apoptotique provient de la multitude de substrats que cet enzyme clive, ce qui en fait la principale caspase effectrice. Étant donné l'importance des caspases dans le processus apoptotique, diverses équipes ont étudié l'effet protecteur conféré par le GM-CSF sur les PMNs relativement à l'activité enzymatique de la caspase-3 (Maianski et al., 2002; Ottonello et al., 2002; Weinmann et al., 1999; Yamashita et al., 1999). Nos résultats et ceux obtenus par les différentes équipes démontrent que la présence du GM-CSF prévient l'activation de la caspase-3. Cependant, contrairement à ces auteurs dont les analyses sont effectuées à partir de lysats cellulaires issus de PMNs incubés entre 18 et 24 heures, notre système nécessite une incubation prolongée afin de mettre en évidence une activation considérable des caspases -3, -8 ou -9. Cette différence peut provenir du modèle expérimental que nous avons mis au point et qui utilise un substrat perméable. Le substrat employé dans notre étude et dans celle de Yan et al. (2004) ne nécessite aucune manipulation ce qui préserve l'intégrité des PMNs. Dans un système similaire, l'équipe de Yan et al (2004) remarque également une activation importante des caspases (61%) chez les PMNs suivant une incubation de 44 heures. Ainsi, il est donc possible que les différentes techniques utilisées dans la préparation des échantillons par les divers laboratoires soient à l'origine d'une disparition hâtive non-spécifique de plusieurs substrats de la caspase-3 lors de la préparation de lysats cellulaires issus des PMNs par l'action protéolytique des produits enzymatiques contenus dans les granules, tel que suggéré par certains auteurs (Sanghavi et al., 1998; Maianski et al, 2004). Malgré que notre étude porte sur les PMNs incubés 48 heures, nos résultats obtenus en présence du GM-CSF sont en accord avec ceux retrouvés dans la littérature (Maianski et al., 2002; Ottonello et al., 2002; Weinmann et al., 1999; Yamashita et al., 1999).

Bien qu'essentiel au développement normal du cerveau, la caspase-9 est également impliquée dans les lésions cérébrales induites lors d'ischémie (Hakem et al., 1998; Krajewski et al., 1999). Étant donné l'effet protecteur de l'albumine sur les cellules

neuronales et son utilité dans le traitement post-ischémique, plusieurs auteurs ont démontré que la présence d'albumine diminuait l'activation de la caspase-9 (Belayev et al., 2001; Gum et al., 2004; Huh et al., 1998; Taberno et al., 2002). De plus, chez les cellules de neuroblastome, l'albumine prévient également la dépolarisation des mitochondries (Gallego-Sandin et al., 2005). Les résultats obtenus dans nos laboratoires révèlent une importante inhibition des caspases -3, -8 et -9 chez les PMNs incubés en présence d'albumine. Quant à la fétuine, une étude réalisée par Reynolds et collaborateurs (2005) appuie également nos résultats. En effet, ces auteurs démontrent que l'inhibition de l'apoptose des vascular smooth muscle cells (VSMC) conférée par la présence de la fétuine est associée à une diminution de l'activité de la caspase-3, -8 et -9. On remarque également que l'albumine procure un effet supérieur à celui du GM-CSF, alors que la fétuine se situe à mi-chemin entre l'albumine et le GM-CSF. Bien que le G-CSF et le GM-CSF soient reconnus pour leur pouvoir anti-apoptotique chez les PMNs, leur effet sur la viabilité des PMNs n'est pas absolu, mais plutôt intermédiaire. D'autres agents, spécialement les inhibiteurs de caspases, sont davantage efficaces pour prévenir l'induction de l'apoptose spontanée (Maianski et al., 2002). En effet, l'évaluation de l'apoptose constitutive des cytoplastes issus des PMNs pointe vers l'existence d'un mécanisme tant dépendant qu'indépendant des mitochondries. Ces cytoplastes constituent des cellules dépourvues de noyaux, de granules et de mitochondries (Maianski et al., 2002; Roos et al., 1983). Bien que ces structures de signalisation soient absentes, les cytoplastes présentent une activation importante de la caspase-3 et une induction constitutive de l'apoptose similairement à celle observée chez les PMNs. De plus, le G-CSF ne procure aucun effet bénéfique sur l'apoptose spontanée des cytoplastes, contrairement au z-VAD-fmk, un inhibiteur de caspases à large spectre. Ainsi, il est possible que l'efficacité accrue de l'albumine et de la fétuine comparée à celle du GM-CSF provienne d'une protection envers les deux mécanismes d'activation des caspases.

D'autres études supportent également une activation des caspases indépendamment du processus mitochondrial (Nopp et al., 2002; Stennicke et al., 1998; Yan et al., 2004). Les études réalisées chez les cytoplastes suggèrent l'existence de structures cytoplasmiques qui pourraient prendre part au processus d'apoptose spontanée des PMNs. Parmi ces dernières, la calpaïne constitue probablement un élément clef de ce phénomène. Cet enzyme cytosolique participe à plusieurs phénomènes physiologiques allant de la prolifération à l'apoptose, en passant par la différenciation. (Carafoli et Molinari, 1998; Huang et Wang, 2001; Saido et al., 1994; Sorimashi et al., 1997; Sorimashi et Suzuki, 2001). L'effet de l'albumine et de la fétuine sur l'activité des calpaïnes chez les PMNs n'a cependant pas été abordé lors de nos études. Malgré ceci, il semble plausible de croire que l'albumine et la fétuine agissent également sur cet aspect du mécanisme apoptotique des PMNs. En effet, ces protéines s'avèrent très efficaces dans l'inhibition de l'apoptose spontanée au même titre que le z-VAD-fmk. Cet inhibiteur de caspases possède également une activité inhibitrice face à l'activation des calpaïnes (Kobayashi et al., 2002; Wolf et al., 1999). Il est probable que son efficacité à inhiber l'apoptose constitutive des cytoplastes provienne en partie de cette capacité. De plus, l'activation de cette protéase est dépendante de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} . Une simple augmentation du Ca^{2+} cytosolique permet d'initier la mort cellulaire programmée médiée par cette protéase (Jäättelä et Tschopp, 2003). Puisque l'albumine et la fétuine se lient au Ca^{2+} , notamment à l'intérieur de la matrice osseuse, il est possible que ces protéines puissent inhiber l'activation des calpaïnes chez les PMNs via leur affinité envers cet ion (Mbuyi et al., 1982; Peters et Feldhoff, 1975; Peters et al., 1995; Yang et al., 1991). D'ailleurs, chez les cellules de neuroblastome, où l'apoptose est induite par le biais de composés reconnus pour provoquer un relâchement du Ca^{2+} à partir du RE, l'albumine procure un effet bénéfique, à 10mg/ml et une protection totale à 29mg/ml (Gallego-Sandin et al., 2005).

L'effet protecteur accru observé en présence d'albumine et de fétuine, comparée à l'effet du GM-CSF, dans certains de nos résultats, provient probablement du fait que ces protéines agissent sur plus d'une facette du processus. Bien qu'un mécanisme dépendant des caspases soit évident chez les PMNs, un second, dépendant des calpaïnes peut exister également (Squier et al., 1999). Il est très peu probable qu'un seul mécanisme soit impliqué dans l'apoptose spontanée des PMNs (Hakem et al., 1998; Sanghavi et al., 1998). Mis à part les caspases et les calpaïnes, les enzymes lysosomales, plus particulièrement les cathepsines, peuvent également participer à ce processus (Jäättelä et Tschopp, 2003; Lockshin et Zakeri, 2002). Les lysosomes sont doublement impliqués dans la digestion des composantes cellulaires. D'une part, soit par la translocation ou la diffusion des enzymes qu'ils renferment dans le cytosol. D'autre part, par autophagie, c'est-à-dire par digestion des organelles ou des composantes cellulaires endommagés séquestrés à l'intérieur des autophagolysosomes (Lockshin et Zakeri, 2002; Reggiori et Klionsky 2002). La contribution des lysosomes peut conduire à une mort cellulaire tant dépendante qu'indépendante de l'activation des caspases (Foghsgaard et al., 2001; Guicciardi et al., 2000; Roberg et al., 2002). Les protéines à l'étude, particulièrement la fétuine, pourraient non seulement procurer un effet bénéfique en tant que facteur de croissance, mais également en tant qu'inhibiteur de protéases (Galembeck et Cann, 1974; Rohrlich et Rifkin, 1981; Trevani et al., 1996; Yamamoto et Sinohara, 1993).

De toute évidence, le phénomène d'apoptose est régi par différents aspects dont les caspases, les sérines protéases, les calpaïnes et le protéasome (Dawson et al., 1995; Knepper-Nicolai et al., 1998; Salvesen et Dixit, 1997; Zhivotovsky et al., 1997). D'ailleurs, les structures ciblées par ces protéases sont parfois identiques. Parmi ces dernières, les protéines du cytosquelette représentent un substrat important. Nous avons donc étudié l'intégrité de la protéine vimentine, une protéine du cytosquelette formant les filaments

intermédiaires. Comme le démontrent les histogrammes de cytométrie en flux, les PMNs cultivés pendant 24 heures présentent un profil d'expression différent de celui des PMNs fraîchement isolés. Curieusement, le clivage de la vimentine se produit à 24 heures alors que l'activation des caspases est visible seulement à 48 heures. Ces résultats suggèrent donc un rôle important des calpaïnes et des enzymes lysosomales dans la dégradation de ce substrat. D'ailleurs, chez les cellules particulièrement riches en cytoplasme, la dégradation des composantes cytoplasmiques par les enzymes lysosomales et protéosomales précède souvent l'activation des caspases (Lockshin et Zakeri, 2002). Il existe donc une redondance enzymatique parmi ces protéases à l'intérieur du mécanisme de mort cellulaire programmée. Ainsi, il est possible que l'effet protecteur conféré par l'albumine et la fétuine soit attribuable, non seulement à l'inhibition des caspases mais également à l'inhibition d'une variété de protéases.

4.2.4 Les dérivés oxygénés

Puisque l'implication des ROS dans l'apoptose spontanée des PMNs est un phénomène connu et étudié par divers auteurs, nous nous sommes donc penchés sur l'effet de l'albumine et de la fétuine envers les dérivés oxygénés (Fadeel et al., 1998; Hannah et al., 1995; Kasahara et al., 1997; Lavastre et al., 2002). Seule l'albumine permet une inhibition significative des ROS intracellulaires présents chez les PMNs par rapport au contrôle. Contrairement à l'albumine, les PMNs traités à la fétuine et au GM-CSF renferment une quantité supérieure de ROS. En effet, mis à part sa fonction de survie, le GM-CSF augmente également les fonctions phagocytaires des PMNs, dont la génération de ROS nécessaires à la destruction de pathogènes (Weisbart et al., 1985, 1986). Ainsi, la présence du GM-CSF augmente à la fois la viabilité des PMNs, en tant que facteur de survie, mais produit également une activation qui génère des ROS. Bien que l'albumine et la fétuine soient tous deux des protéines sériques, leur activité diffère concernant leur pouvoir antioxydant. Comme la catalase, l'albumine inhibe l'apoptose spontanée en

limitant la toxicité des dérivés oxygénés produits (Aoshiba et al., 1999; Kasahara et al., 1997). Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Igléssias et al (1999) qui décrivent un effet antioxydant de l'albumine dans la viabilité des macrophages péritonéaux. Plusieurs études supportent également le rôle de l'albumine dans la capture des ROS, limitant ainsi leur action néfaste. Certains peuvent s'étonner de voir que l'albumine augmente la phagocytose mais n'induit pas la génération de ROS, alors que, normalement, c'est deux fonctions sont associées. Il est à noter que, lors de la mise au point des essais d'internalisation et d'activité protéolytique, nous n'avons pas incubés l'albumine, la fétuine ou le GM-CSF simultanément avec les billes ou la DQ-BSA. Ainsi, nous n'avons donc pas mesuré directement l'impacte des traitements sur la phagocytose, mais plutôt leur effet sur la fonctionnalité des PMNs. Dans le même sens, l'essai de ROS développé détecte la présence intracellulaire de ROS au détriment de la capacité à induire une respiration oxydative. Cette différence dans la méthodologie comparativement aux essais standards explique la divergence obtenue entre la phagocytose et les ROS chez les PMNs traités à l'albumine. L'efficacité accrue de l'albumine comparativement au GM-CSF (Albumine/GM-CSF : $p < 0.05$) dans l'inhibition des caspases (caspase-8 et -9) provient probablement de son effet sur les ROS. En effet, puisque ces dérivés oxygénés sont également impliqués dans l'activation des caspases via la voie mitochondriale, une plus grande inhibition de cette famille d'enzyme est obtenue en présence d'albumine (Green, 1998). L'albumine inhibe également l'apoptose spontanée et celle induite par le stress oxydatif chez les cellules B-CLL (B-chronic lymphocytic leukaemia) *in vitro* (Moran et al., 2002). De plus, chez les cellules de neuroblastome, elle prévient la dépolarisation des mitochondries. Les auteurs stipulent que l'action de l'albumine est probablement liée à son important pouvoir antioxydant (Gallego-Sandin et al., 2005). D'ailleurs, l'albumine représente un antioxydant plus efficace que la vitamine E (Belayev et al., 2001). Elle contrecarre également la neurotoxicité induite par le stress oxydatif chez les cellules neuronales d'origine murine (Gum et al., 2004). Finalement, l'albumine est considérée

comme une protéine "scavenger", c'est-à-dire, qui interagit avec les radicaux libres (Igléssias et al., 1999; Kouoh et al., 2007; Moran et al., 2002; Soriani et al., 1994).

4.3 Mécanisme d'action de l'albumine et de la fétuine sur la mort cellulaire

À la lumière des divers résultats obtenus concernant l'inhibition d'apoptose des PMNs, nous constatons que l'albumine et la fétuine possèdent une efficacité accrue comparée au GM-CSF qui, pourtant représente un facteur de survie et de différenciation important chez les granulocytes. Bien que le GM-CSF prévient la dégradation protéosomale de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 chez les PMNs, cellules entièrement différenciées, l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques n'est probablement pas le mécanisme central par lequel la survie de ces cellules puisse être normalement modifiée. Cependant l'action protectrice peut venir de fonctionnalités autres que l'expression.

Ainsi, tout comme la protéine Bcl-2, l'albumine et la fétuine inhibent significativement l'activation des caspases. La fétuine possède d'ailleurs une action inhibitrice envers diverses protéases. Le Bcl-2 agit également par ses capacités de liaison envers divers métaux (Kane et al., 1993). Or, certains auteurs attribuent l'action anti-oxydante de l'albumine à son pouvoir chélateur (Emerson, 1989; Sutherland et al., 2002). Dans une série d'études, Bar-Or et al (2001 a, b, c,) démontre que quatre acides aminés sont impliqués dans ce site de liaison unique à l'albumine humaine, soit l'aspartate, l'alanine, l'histidine et la lysine (DAHK). Les auteurs affirment que ces acides aminés (DAHK) préviennent l'oxydation des lipides et que le complexe cuivre-DAHK est un mimétique fonctionnel de l'enzyme superoxyde dismutase augmentant ainsi le pouvoir antioxydant de l'albumine. Tout comme l'albumine et la fétuine, le Bcl-2 possède un spectre d'activité

envers les ions intracellulaires. Finalement, le bcl-2 contribue également au métabolisme des lipides en diminuant la peroxydation de ces derniers et en prévenant l'oxydation des cardiolipins (Zamzami et al, 1998). Dans le même sens, en piègeant les ROS, l'albumine prévient la peroxydation des lipides membranaires, essentiels à l'intégrité membranaire (Emerson, 1989). L'action protectrice conférée par l'albumine lors d'ischémie cérébrale provient également de la contribution d'une variété de mécanismes (Belayev et al., 2005). Parmi ces mécanismes, la fonction anti-oxydante, l'affinité pour divers métaux et ions ainsi que l'apport en acide gras essentiels représentent des mécanismes importants de la neuroprotection (Emerson, 1989; Halliwell et Gutteridge, 1990; Igléssias et al., 1999; Katsuma et al., 2005; Koh et al., 1998; Kouoh et al., 2007; Moran et al., 2002; Rodriguez et al. 2002; Soriani et al., 1994). En effet, l'albumine est une protéine catabolisée par la quasi-totalité des cellules et majoritairement retrouvée liée à différents acides gras. Elle représente donc une source importante d'acides aminés et de lipides, ce qui lui confère des fonctions nutritionnelles

L'équilibre entre la biosynthèse et la recirculation des lipides assure la fluidité des membranes cellulaires. Lorsque peroxydés, les phospholipides doivent être remplacés par de nouveaux lipides afin de conserver l'intégrité membranaire. Bien que la fétuine soit dépourvue d'activité anti-oxydante, elle pourrait cependant favoriser l'homéostasie des lipides par la contribution lipidique des acides gras qui lui sont associés en remplaçant les lipides membranaires oxydés (Fisher et Lam, 1974; Kumbla et al., 1989, 1991; Nie, 1992). Le métabolisme des divers phospholipides est médié par différents organelles dont le réticulum endoplasmique, les lysosomes et les mitochondries (Esposti, 2002). Puisque l'albumine et la fétuine sont responsables du transport de diverses substances dont les lipides, elles contribuent assurément à l'équilibre existant entre le métabolisme et le catabolisme des lipides. D'ailleurs, les patients atteints du syndrome de Barth, une pathologie rare affectant l'équilibre d'un important lipide mitochondrial, les cardiolipins, souffrent d'une neutropénie sévère (Degli Esposti, 2004).

De plus, le fait que l'albumine et la fétuine augmentent la viabilité des PMNs de façon similaire concernant, entre autre, l'externalisation des résidus PS, l'intégrité du CD16b, de la vimentine et de la stabilité du Mcl-1 pointe vers l'existence de divers mécanismes régissant l'apoptose constitutive des PMNs. Un de ces mécanismes est sans doute relié à la présence de protéases puisque la fétuine, un inhibiteur de la trypsine et de l'élastase, inhibent efficacement l'apoptose spontanée des PMNs. Or, bien que le z-VAD-fmk est largement employé à titre d'inhibiteur de caspases, on sait maintenant qu'il inhibe non seulement cette famille de protéases mais également d'autres enzymes, plus particulièrement les calpaïnes de même que les cathepsines (Lockshin et Zakeri, 2002; Schotte et al, 1999). L'action protectrice conférée par le z-VAD-fmk sur les PMNs et leurs cytoplastes est importante (Maianski et al., 2004). Donc, il est plausible de croire que l'inhibition des protéases représente un mécanisme central.

Les dérivés oxygénés de même que la présence d'enzymes protéolytiques influencent certaines conditions physiologiques, dont le vieillissement, les différentes formes d'ischémies et la perfusion associée à ces ischémies. Lors de ces évènements, le métabolisme des lipides et les fonctions mitochondriales sont altérés menant à des dommages tissulaires importants (Kajiyama et al., 1987; Lesnefsky et al., 2001; McMillin et al., 1993; Paradies et al., 1997, 1999; Pepe et al., 1999). D'ailleurs, certaines études démontrent un rôle important de la molécule pro-apoptotique, Bid, dans la recirculation des lipides liant davantage le métabolisme des lipides au phénomène de mort cellulaire (Esposti et al., 2001; McMillin et Dowhan, 2002). De plus, l'influx calcique soutenu contribue également au processus en activant les phospholipases qui compromettent l'intégrité des membranes lysosomales et mitochondriale. Puisque les PMNs sont caractérisés par l'abondance de granules cytoplasmiques, ces vésicules, formées d'une double couche de phospholipides, représentent donc un important substrat pour les ROS. L'activation des

PMNs et la génération de ROS par ces derniers sont d'ailleurs responsables des dommages tissulaires observés dans les diverses formes d'ischémies. Chez les PMNs, la notion de vieillissement est un phénomène *in vitro* inévitable. Ainsi, la peroxydation des lipides pourrait représenter un mécanisme important de ce phénomène pointant vers l'importance du métabolisme des lipides dans la survie des PMNs. De plus, la perméabilisation partielle des lysosomes par les ROS ou par l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire se doit d'être considérée. En effet, ces granulocytes contiennent divers types de granules renfermant plusieurs enzymes. L'intégrité membranaire de ces vésicules est probablement un élément important dans la viabilité des PMNs. La diversité des granules cytoplasmiques ainsi que leur prépondérance chez les PMNs par rapport à leurs précurseurs de même qu'aux macrophages suggère une participation active de l'arsenal enzymatique dans l'induction d'apoptose (Hampton et al., 1998). D'ailleurs, lorsque les PMNs sont stimulés en présence de G-CSF, la diversité enzymatique des granules spécifiques est diminuée alors que leur viabilité s'accroît (Leavay et al., 1998). Ainsi, l'action protectrice conférée par l'albumine et la fétuine envers les PMNs comparativement au GM-CSF pourrait en partie provenir de l'inhibition de la perméabilisation lysosomale. En effet, l'albumine assure l'intégrité membranaire des organelles cytoplasmiques par ses multiples fonctions telles, sa fonction anti-oxydante, son affinité pour le Ca^{2+} , et sa fonction nutritionnelle. L'apport en acides aminés que procure l'albumine détient également une importance capitale dans son pouvoir antioxydant. Similairement à la lactalbumine, l'albumine sérique est caractérisée par la présence de résidu cystéine retrouvé à la position 34 de sa molécule. Cet acide aminé, présent en faible quantité dans notre régime alimentaire, est primordial à la synthèse du glutathion (GSH), d'où l'engouement pour les bienfaits des protéines de petit-lait (Guyomarc'h et al., 2007; Tseng et al., 2008;). De plus, le GSH et l'albumine représentent d'importants tampons d'oxydoréduction constituant les muscles squelettiques ainsi que le plasma (Drögue et Breitzkreutz, 1999; Kent et al., 2003; Tseng et al., 2008). Ainsi, plusieurs propriétés, résumées à la Figure 43, peuvent contribuer à l'action protectrice de l'albumine que nous avons observée. Cependant, leur implication dans l'apoptose spontanée des PMNs

reste à approfondir. Cette schématisation pourrait servir de point de départ en vue de futures investigations. De son côté, la fétuine séquestre le Ca^{2+} et inhibe les protéases qui sont relâchées suivant la perméabilisation partielle des lysosomes (Figure 44). De plus, les d'inhibiteurs de serpines (antichymotrypsin-like), préviennent également la perméabilisation des membranes lysosomales, ce qui contribue à l'effet protecteur conféré par la fétuine envers la mort cellulaire des PMNs. Tout comme la Figure 43, l'implication des propriétés de la fétuine dans l'apoptose des PMNs décrites à la Figure 44 gagneraient à être approfondie.

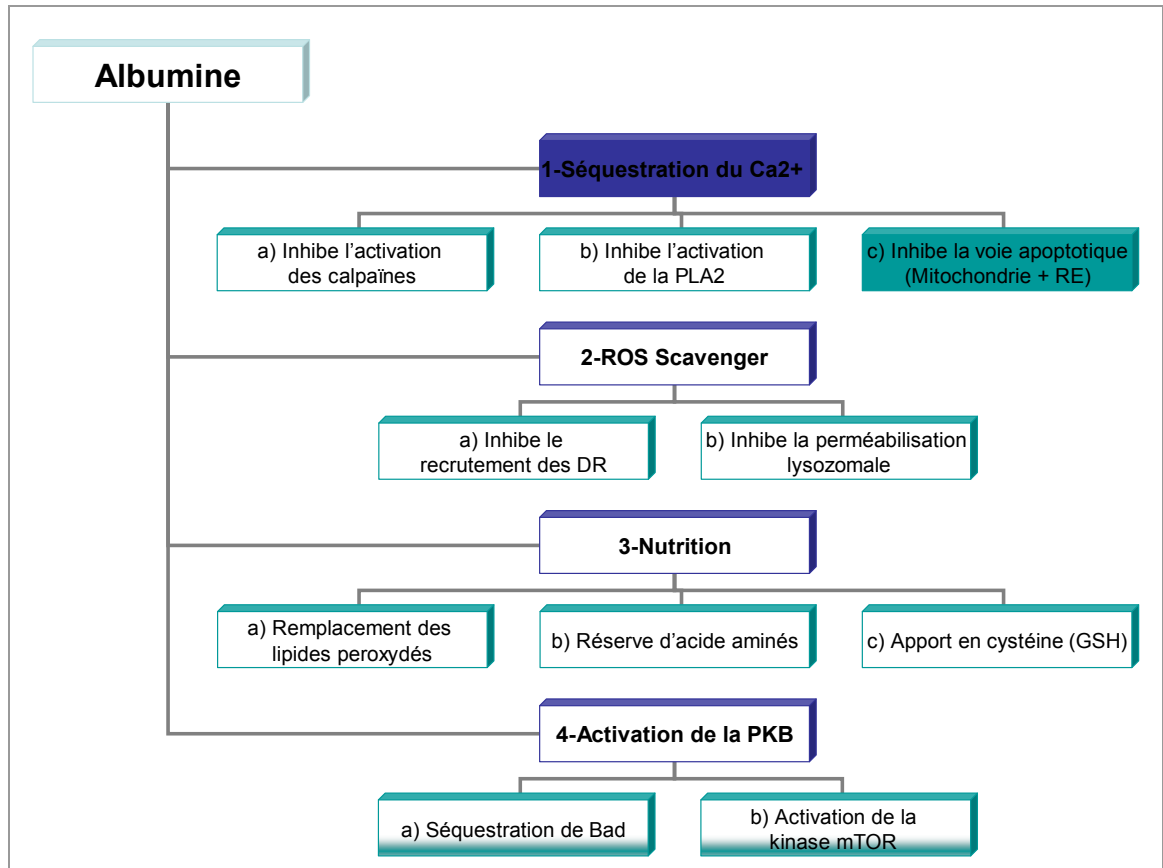


Figure 43: Schématisation hypothétique expliquant les mécanismes de cytoprotection probables de l'albumine sur la viabilité cellulaire.

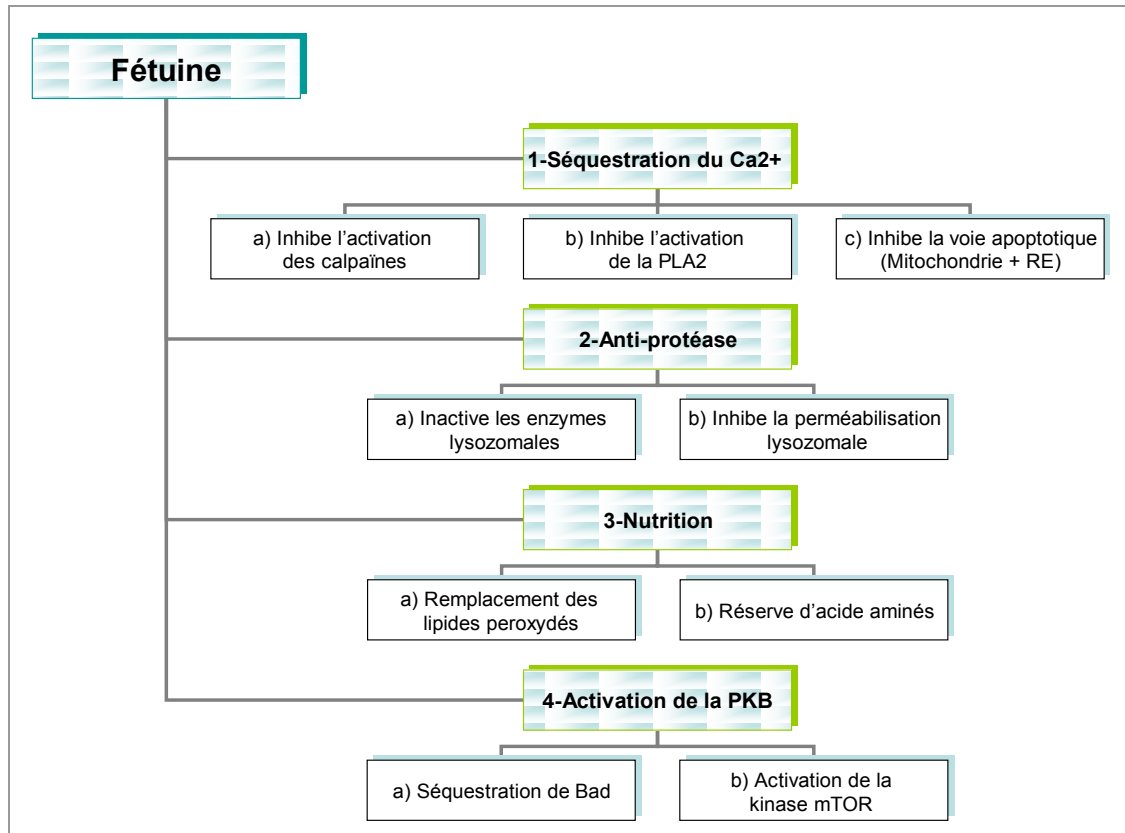


Figure 44: Principaux mécanismes hypothétiques pouvant contribuer à la protection de la viabilité cellulaire conférée par la fétuine.

4.4 Modèle proposé de mort cellulaire chez les PMNs

Bien que la communauté scientifique catégorise les formes de mort cellulaire en deux grands volets soient l'apoptose et la nécrose, d'autres publications suggèrent plutôt l'existence d'un continuum entre le phénomène d'apoptose et celui de la nécrose (Lockshin et Zakeri, 2002; Nicotera et Melino, 2004). Le stress oxydatif contribue à ces deux processus et nuit définitivement à la survie en accélérant le vieillissement. Ainsi, les ROS altèrent les fonctions cognitives et favorisent la neurodégénération (Berr, 2000; Serrano et Klann, 2004; Sugaya et al., 1996). Les dommages oxydatifs engendrés au cerveau relativement au vieillissement se traduisent, entre autre, par la peroxydation des lipides ce qui compromet l'intégrité membranaire (Cini et Moretti, 1995; Gupta, 1991; Murray et Lynch, 1998; O'Donnell et Lynch, 1998; Poon et al., 2004; Richwine, 2005). D'ailleurs, plusieurs antioxydants, dont les N-acétylcystéines et les polyphénols resveratrol préviennent l'oxydation lié au vieillissement et prolonge la durée de vie (Howitz et al., 2003; Miquel et al., 1995). Chez les PMNs, le processus de vieillissement est un phénomène inévitable et particulièrement accéléré.

Les PMNs sont caractérisés par l'abondance des granules cytoplasmiques ce qui leur confère un potentiel lytique et oxydatif impressionnant. C'est la compartimentation qui régit la distribution des différentes enzymes parmi les organelles, ce qui soutient l'implication de l'intégrité membranaire dans le phénomène de mort cellulaire des PMNs. Ainsi les granules cytoplasmiques représentent un substrat de choix pour les ROS. L'importance des phospholipides dans les diverses structures membranaires des PMNs vient appuyer l'hypothèse de Scheel-Toellner et al. (2004). Nos résultats pointent vers l'importance des enzymes lysosomales chez les PMNs et nous poussent donc à redéfinir le processus de mort cellulaire programmé des PMNs. Nous suggérons un processus de mort

cellulaire où, dans un premier temps, les ROS, produits au sein des granules cytoplasmiques, perturberaient l'intégrité de ces dernières en provoquant la peroxydation des lipides. En absence du remplacement des lipides peroxydés, la déstabilisation membranaire engendrée conduirait graduellement à leur perméabilisation. Cependant, en présence d'antioxydants, telle l'albumine, l'action des ROS est interrompue. L'apport nutritionnel de l'albumine et de la fétuine pourraient également contribuer au mécanisme de protection en remplaçant les lipides peroxydés. La fuite massive d'enzymes contenus dans les granules serait ensuite responsable de la dégradation des protéines du cytosquelette de même que du clivage ou de la translocation des molécules pro-apoptotiques, telle Bid et Bax (Figure 45). Ces molécules initieraient la deuxième phase du processus en impliquant la voie mitochondriale, gouvernée par l'activation des caspases. Donc, la fétuine agirait en inhibant les protéases lysosomales prévenant ainsi la dégradation des substrats cellulaires et l'activation de la voie mitochondriale. Parallèlement aux ROS, la présence de Ca^{2+} influencerait le processus en activant les phospholipases et les calpaïnes. L'affinité de l'albumine et de la fétuine envers le Ca^{2+} protègerait également cet aspect du processus.

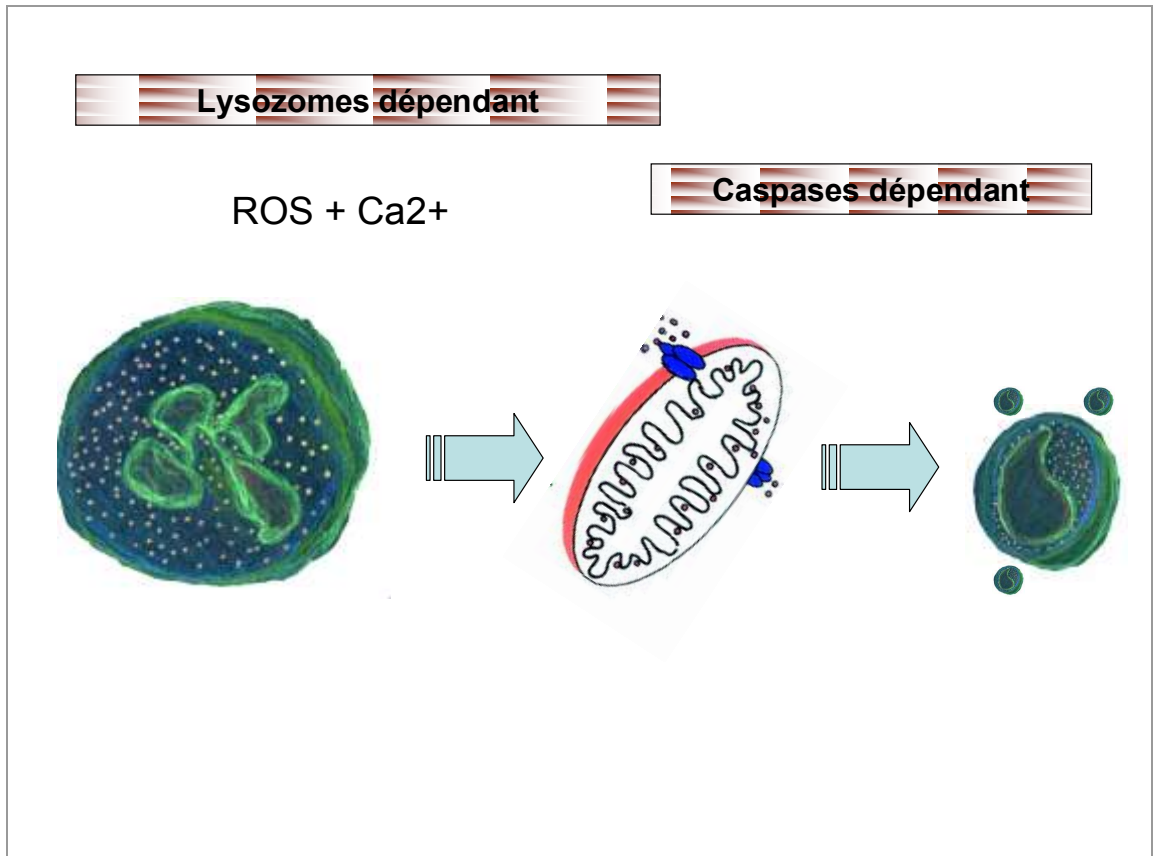


Figure 45: Modèle proposé de mort cellulaire programmé chez les PMN

4.5 Voies cellulaires dépendantes de l'action de l'albumine et de la fétuine

La complexité enzymatique jumelée à la capacité oxydative des PMNs viennent appuyer l'importance de l'apoptose dans la résolution de l'inflammation. Contrairement aux autres leucocytes, les PMNs sont des cellules entièrement différenciées possédant une demi-vie d'environ 7 heures en circulation. Les mécanismes par lesquels certains stimuli produisent leurs effets sur les PMNs font l'objet de nombreuses études.

4.5.1 Les kinases

La survie des PMNs *in vitro* est également orientée par l'activation de certaines cascades de signalisation cellulaire faisant appel à la kinase 3-phosphoinositol (PI-3K), l'extracellular regulated kinase (ERK) et la phosphorylation de la p38. (Akgul et al., 2001; Epling-burnette et al. 2001; Klein et al., 2000; Ward et al, 2004). Nous nous sommes donc penchés sur l'implication de ces trois voies de signalisation afin d'explorer davantage les mécanismes contribuant à l'action protectrice de l'albumine et de la fétuine comparativement au GM-CSF. L'activation des kinases représente un phénomène rapide à l'intérieur des cascades de signalisation cellulaire. Ainsi, afin d'évaluer la contribution de ces voies de signalisation, nous avons eu recours à trois inhibiteurs de kinases dont la wortmannin, le PD 98059 ainsi que le SB 202190. Ces inhibiteurs perméables possèdent une action inhibitrice rapide et sont généralement employés sur un court laps de temps. Afin d'apprécier plus rapidement le phénotype apoptotique des PMNs, nous avons donc utilisé la CHX dans nos études au détriment des méthodes d'induction d'apoptose utilisant le TNF- α ou le système Fas/FasL. Bien que l'apoptose des PMNs puisse être induite très rapidement en présence de TNF- α ou par l'interaction de la molécule Fas avec son

récepteur (FasL) à la surface des PMNs, ces méthodes d'induction conduisent probablement à l'activation de mécanisme autre que ceux rencontrés lors de l'apoptose spontanée (Villunger et al., 2000).

Tout d'abord, nos résultats révèlent qu'en présence de CHX, le GM-CSF est incapable d'augmenter la viabilité des PMNs. Dans notre système, le GM-CSF perd son activité contrairement aux études réalisées par Derouet et al. (2004). Il devient donc impossible de comparer les groupes traités à CHX+GM-CSF par rapport aux groupes ayant également reçu un inhibiteur de kinase. Les travaux, Derouet et al. (2004) utilisent une concentration de GM-CSF (50ng/ml) plus importante que celle que nous utilisons (10ng/ml). Notre concentration a été choisie selon la courbe dose-réponse préétablie au début de nos travaux. La concentration de 10ng/ml correspond également à celle utilisée par plusieurs auteurs (Cowburn et al., 2002; Iwai et al., 1994; Khwaja et Tatton, 1999; Ottonello et al., 2002; Yamashita et al., 1999). Bien que d'autres études ont démontré l'importance des kinases dans l'action du GM-CSF sur les PMNs, d'autres auteurs n'ont pu mettre en évidence l'implication de ERK dans la survie des PMNs en présence du GM-CSF par l'entremise de l'inhibiteur spécifique PD 98059 (Cowburn et al., 2002; Derouet et al., 2004; Epling-burnette et al. 2001; Klein et al., 2000).

Contrairement au GM-CSF, en présence d'albumine ou de la fétuine, il est possible d'observer des différences significatives sur la survie des PMNs lorsque les voies de la PI-3K et ERK sont inhibées. Cependant, seul l'inhibiteur wortmannin empêche l'action protectrice conférée par la fétuine, contrairement à l'albumine, dont l'efficacité dépend également de l'activation de la kinase ERK. Lorsque nous inhibons l'activation de la p38 avec le SB 202190, l'effet protecteur de l'albumine et de la fétuine persiste nous indiquant que leur mode d'action ne dépend pas de cette voie de signalisation cellulaire. Cependant, il est à noter que l'inhibiteur SB 202190 utilisé dans nos essais est seulement spécifique pour l'isoforme α de la p38, ce qui laisse la possibilité aux autres isoformes (β , γ , δ) d'être activées (Davies et al., 2000). Malheureusement, aucun inhibiteur spécifique n'existe pour

les isoformes γ et δ . Au meilleur de nos connaissances, très peu d'études ont abordées les voies de signalisation cellulaire impliquées en présence de ces protéines. Deux études se sont penchées sur l'activation de la PI-3K en présence d'albumine (Jones et al., 2003; Bolitho et al., 2007). Dans la première, les résultats témoignent de l'action anti-apoptotique du plasma envers les cellules B-CCL *in vitro*. Ils identifient l'albumine, en tant que constituant majeur du plasma, responsable de l'action anti-apoptotique observée (Jones et al., 2003; Wickremasinghe et al., 2001). La protection engendrée par l'albumine dans leur système est dépendante de l'activation de la PI-3K. Dans la seconde étude (Bolitho et al., 2007), l'effet protecteur de l'albumine sur l'endothélium vasculaire est analysé. Tout comme Jones et al. (2003), les auteurs constatent que la cytoprotection conférée par l'albumine est dépendante de la PI-3K. Ils proposent que l'effet anti-apoptotique de l'albumine dans leur système soit en partie médié par un récepteur inconnu mais spécifique pour l'albumine (Bolitho et al., 2007).

4.6 Chimioprotection et hématopoïèse

4.6.1 Études *In vitro*

Les facteurs de croissance hématopoïétiques tels le GM-CSF et le G-CSF sont des composés thérapeutiques cliniquement utilisés afin de favoriser l'hématopoïèse dans certaines conditions pathologiques ou encore lors de certains traitements (ASCO, 1994; Cairo et al., 1990; Sparano et al., 1999). On les utilise, entre autre, chez les patients qui reçoivent de fortes ou répétitives doses de chimiothérapie (Ballestrero et al., 1999; Bennett et al., 1996; Elias et al., 2002; Sparano et al., 2000). Ces derniers présentent souvent un déficit leucocytaire important qui les rendent vulnérables à diverses infections opportunistes (Demetri et Griffin, 1991; Gabrilove, 1992). L'utilisation de facteurs de survie des PMNs et des monocytes, le GM-CSF, constitue donc une approche complémentaire afin de contrer l'effet néfaste des thérapies qui doivent être promulguées.

Nous avons alors établis diverses conditions expérimentales nous permettant d'étudier l'effet du GM-CSF, de l'albumine et de la fétuine en présence d'un composé chimiothérapeutique. Nos études ont, tout d'abord, été élaborées dans un modèle *in vitro* utilisant la doxorubicine de formulation thérapeutique en tant qu'agent chimiothérapeutique (Ellis et al., 1987; Friesen et al., 2000; Kraus-Berthier et al., 2000). De couleur rouge intense, ce cytotoxique fut rapidement remplacé, car il émettait une fluorescence très importante qui biaisait l'analyse cytométrique. On a donc choisi un second composé cytotoxique, la mutamycine (Ueda et Komano, 1984; Yang et Wang, 1999), également de formulation thérapeutique, et n'influençant pas la fluorescence. Nos résultats, obtenus lors des études comparatives entre le GM-CSF et les protéines, décrivent l'efficacité de l'albumine et de la fétuine relativement à l'action toxique de la mutamycine. La protection générée est comparable à celle conférée par le GM-CSF.

Afin d'écarter l'implication de la biodisponibilité relativement à l'action de l'albumine et de la fétuine sur les PMNs, nous avons donc élaboré deux modèles expérimentaux. Dans le premier modèle, les PMNs sont mis en présence des protéines (albumine ou fétuine) ou du GM-CSF pendant seulement 4 heures. Suivant le lavage des cellules, la mutamycine est ajoutée. Ainsi, en effectuant un lavage, on élimine la présence de l'albumine et de la fétuine dans le milieu de culture afin de ne pas réduire la biodisponibilité de l'agent cytotoxique. Nos résultats montrent que l'action de l'albumine et de la fétuine sur les PMNs en présence de mutamycine n'est pas due à une réduction de sa biodisponibilité. En effet, même si les PMNs sont exposés pendant 4 heures seulement, l'albumine, la fétuine et le GM-CSF exercent une protection importante contre l'effet cytotoxique de la mutamycine. Dans le second modèle, le composé cytotoxique est ajouté aux cellules et incubés pendant 4 heures précédant l'addition de l'albumine, la fétuine ou du GM-CSF. Ainsi, on limite le phénomène de liaison préférentielle de l'agent cytotoxique aux protéines sériques avant même l'action de la mutamycine. Dans ce second modèle, l'albumine et la fétuine protègent significativement les PMNs contre l'apoptose induite par l'entremise d'un composé chimiothérapeutique contrairement au GM-CSF. Cette différence

pourrait provenir de la dépendance de la synthèse protéique nécessaire à l'activité du GM-CSF contrairement à l'albumine et à la fétuine. De plus, l'apport nutritionnel que représentent l'albumine et la fétuine pourrait également expliquer l'efficacité de ces deux protéines comparativement au GM-CSF.

Le GM-CSF constitue non seulement un facteur de croissance, mais également un facteur de différenciation important dans la maturation des cellules myéloïdes. (Antman et al., 1988; Elias et al., 1992). En effet, ce dernier stimule la formation de colonies à partir des précurseurs hématopoïétiques pluripotents (Socinski et al., 1988). Il supporte également la survie et la prolifération des précurseurs hématopoïétiques durant tout le processus de maturation (Metcalf, 1980). Afin de comparer davantage le mécanisme d'action du GM-CSF à celui de l'albumine et de la fétuine, nous avons entrepris une étude mettant en évidence la capacité de différenciation des précurseurs hématopoïétiques humains. Puisque nos résultats démontrent que l'albumine et la fétuine augmentent la prolifération des cellules progénitrices issues de la moelle osseuse humaine, nous avons donc étudié l'effet de l'albumine et de la fétuine sur la formation de colonies en milieu semi-solide, le méthylcellulose. Parallèlement, les effets générés en présence de l'érythropoïétine (EPO) et du GM-CSF sont étudiés pour des fins de comparaison et de validation de la méthode expérimentale (Mayani et al., 1993). Dans un premier temps, nous constatons que l'action du GM-CSF sur les précurseurs macrophagiques et granulocytaires est faible, bien que le GM-CSF représente notre contrôle positif. Les résultats obtenus concernant l'albumine et la fétuine sont également similaires. Ainsi, l'absence d'activité obtenue en présence de GM-CSF ne nous permet pas de comparer nos résultats avec ceux du contrôle positif. Contrairement au GM-CSF, la présence de l'EPO influence la différenciation des cellules progénitrices de la moelle osseuse humaine. En effet, les précurseurs hématopoïétiques préalablement incubés en présence de l'EPO s'engagent clairement dans la lignée érythrocytaire. La présence de l'EPO stimule la formation de colonies CFU-E et BFU-E de façon importante. Non seulement l'EPO permet la formation de colonies érythrocytaires

mais également l'albumine et la fétuine induisent une différenciation de ces précurseurs. En effet, lorsque les précurseurs hématopoïétiques sont préalablement incubés en présence d'albumine ou de fétuine, on favorise la formation de colonies de type BFU-E. D'ailleurs, l'action générée par l'albumine et la fétuine sur la maturation des lignées érythrocytaires se rapproche de celle conférée par l'EPO. Les milieux de culture méthylcellulose optimisés commercialement sont entre autre formés de ces protéines (Petzer et al., 1996). Le MethocultTM, utilisé dans nos essais renferme une combinaison de facteurs de croissance et cytokines impliqués dans l'expansion des précurseurs hématopoïétiques (Brugger et al., 1993; Gribaldo et al., 1999; Hogge et al., 1996). De plus, ce milieu commercial contient également du sérum de veau fœtal ainsi que de l'albumine (Petzer et al., 1996; Tanno et Denburg, 1986). La présence d'albumine dans ce milieu de culture est d'ailleurs très importante. En effet, lorsque l'albumine est omise du milieu de culture semi-solide, l'expansion *ex vivo* des précurseurs hématopoïétiques humains et la formation de colonies en est significativement affectée (Möböst et al., 1998). L'albumine supporte également la formation de colonies chez les rongeurs (Rothmann et al., 1983). De plus, son apport est essentiel afin de supporter la formation de colonies érythrocytaires (Stewart et al., 1984). L'albumine est d'ailleurs largement utilisée dans la confection de milieux supportant la différenciation des précurseurs érythrocytaires (Aye et al., 1979; Casadevall et al., 1982). Les études réalisées afin d'évaluer l'impact du sérum ou de l'albumine sur les précurseurs hématopoïétiques portent principalement sur leur présence dans le milieu semi-solide. Nos travaux, quant à eux, décrivent l'effet de l'albumine et de la fétuine sur la stimulation des précurseurs hématopoïétiques précédant leur ensemencement dans le Methocult. Ils sont évalués par rapport aux facteurs hématopoïétiques connus et utilisés soit l'EPO et le GM-CSF (Brugger et al., 1993; Elias et al., 1992; Mayani et al., 1993). Selon nos connaissances, aucune publication concernant l'activité érythropoïétique de la fétuine n'existe, contrairement à l'albumine dont quelques auteurs s'y sont attardés (Stewart et al., 1984; Mobbest et al., 1998).

4.6.2 Étude *In vivo*

Nous avons, jusqu'ici démontré différentes propriétés que possèdent l'albumine et la fétuine. Entre autre, ces protéines protègent les PMNs contre l'apoptose spontanée tout en contrecarrant l'effet toxique conféré *in vitro* par des agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie. De plus, l'albumine et la fétuine stimulent la différenciation des précurseurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse humaine vers la lignée érythrocytaire. À la lumière de ces diverses fonctions, il s'avère pertinent d'évaluer la contribution de l'albumine et de la fétuine dans un modèle *in vivo* de chimioprotection. Bien que l'albumine et la fétuine augmentent significativement la prolifération des cellules issues de la moelle osseuse humaine, leur puissance dans le modèle murin de chimioprotection est discutable lorsqu'on analyse leur impacte sur la densité cellulaire des organes lymphoïdes et du sang. En effet, la fétuine n'a pas permis d'augmenter la prolifération des précurseurs hématopoïétiques murins, autant *in vivo* que *in vitro*. Quant à l'albumine, elle supporte la prolifération des cellules issues de la moelle osseuse *in vitro* seulement. L'albumine ne protègent pas les cellules issues de la moelle osseuse contre l'effet toxique du cytoxan lorsqu'étudiée *in vivo*. Cependant, elle protège les leucocytes circulants (sang) contre l'immunosuppression induite par le cytoxan. On remarque également que l'albumine engendre une légère augmentation de la densité cellulaire des globules blancs présents dans la rate des souris immunosupprimées et traitées comparé au groupe immunosupprimé seulement. Le manque de consistance quant à l'effet des protéines peut-être lié aux doses inadéquates utilisées *in vivo*. Chez les PMNs humains, une concentration de 200 μ M, (soit 14mg/ml pour l'albumine) est nécessaire afin de protéger 2x10⁶ cellules contre l'apoptose spontanée et celle induite en présence d'agent cytotoxique. Lors de nos études *in vivo*, nous avons utilisé des concentrations conservatrices de 7 et 14mg/kg (albumine) pour fin de précaution. Ces doses sont définitivement inférieures à celle de l'albumine sérique (35-50mg/ml) (Peters et Feldhoff, 1975). Contrairement aux concentrations utilisées *in vivo*, la dose utilisée *in vitro* se rapproche de la concentration

sérique. Dans une série d'études mettant en évidence la fonction neuroprotectrice de l'albumine *in vivo*, Belayev et collaborateurs (2001, 2002, 2005) utilisent une dose d'albumine supérieure à celle que nous utilisons, soit 1.25g/kg. Comparativement à ces auteurs, nos concentrations utilisées sont sous-optimales pour permettre d'obtenir un impacte dans un modèle *in vivo*, malgré une tendance favorable chez les souris traitées en présence d'albumine. Cependant, nous n'avons pas évalué des concentrations supérieures dû à une contrainte d'injection à des doses dépassants 14mg/kg. Nous n'avons pas non plus tenté d'optimiser la méthode d'injection et/ou le modèle *in vivo* puisque ce dernier ne reflète pas entièrement la situation cliniquement rencontrée. Nous savons que l'albumine protège non seulement les PMNs, mais elle inhibe également l'apoptose induite par l'entremise de la CAM chez les cellules de type HL-60. De plus, elle protège également les cellules Hep3B et B-CLL (Hsu et al., 1998; Jones et al., 2003; Wan et al., 2000; Wickremasinghe et al., 2001). Ainsi, un modèle tenant compte à la fois de la présence de tumeurs et d'agent chimiothérapeutique serait plus approprié pour évaluer l'impacte de l'albumine et de la fétuine. Malgré les propriétés prometteuses conférées par l'albumine, son utilisation chez les patients atteints d'un cancer en tant qu'agent chimioprotecteur est peu probable étant donné son manque de spécificité.

Conclusion

Somme toute, cette étude nous a permis de constater le pouvoir de prolifération et de différenciation de l'albumine et de la fétuine sur les précurseurs hématopoïétiques. Ainsi leurs effets ne se limitent pas seulement aux PMNs, car la présence de ces protéines augmente significativement la prolifération des cellules issues de la moelle osseuse humaine. De plus, ces protéines supportent l'érythropoïèse. Bien que l'albumine et la fétuine soient actives en présence de composés cytotoxiques utilisés en clinique pour contrer divers types de cancer, leur utilisation en tant qu'agent chimioprotecteur est peu probable. En effet, leur manque de spécificité ou encore leur large spectre d'action implique également un effet bénéfique potentiel envers les cellules transformées. L'activation des synoviocytes fibroblastiques de la cavité synoviale dans la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde est similaire aux cellules transformées (Firestein, 1996). Dans le même sens, des études se sont également penchées sur l'implication des cellules hématopoïétiques dans la pathogénèse de l'arthrite rhumatoïde (Hirohata et al., 2004). Il est possible que la prolifération des synoviocytes de type fibroblastiques, responsables de l'hyperplasie de la membrane synoviale, proviennent davantage d'une repopulation de la cavité à partir de précurseurs hématopoïétiques et peut-être même à partir de cellules dendritiques (Ferrero et al., 1998; Hendler et al., 1985; Hirohata et al., 2001). En effet, la multitude de cytokines et facteurs de croissances présents dans le fluide synovial chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde induirait une différenciation de ces cellules au sein de la cavité (Ceponis et al., 1998 a, b; ; Feldmann et al., 1996; Kiener et al., 2000; Thomas et al., 1994). Non seulement les synoviocytes en sont affectés, mais les PMNs y sont également exposés et subissent une trans-différenciation en cellules dendritiques (Iking-Konert et al., 2005). Les différentes propriétés de l'albumine et de la fétuine en font donc de faibles candidats pour une future thérapie en tant qu'adjuvant de chimiothérapie dans un modèle établi de cancer. D'un autre côté, leur multifonctionnalité se prête admirablement aux cibles visées dans le traitement des ischémies et des maladies neurodégénératives. Nos résultats coïncident avec l'effet protecteur de l'albumine décrite dans la littérature et son impacte. D'ailleurs, l'albumine fait présentement l'objet d'une étude clinique dirigée par le

NIH (National Institute of Health) pour une éventuelle thérapie ciblant les accidents vasculaires cérébraux aigus (Ginsberg et al., 2006; Palesch, 2006; NS 40406). Il serait également intéressant d'évaluer l'impacte de l'albumine et de la fétuine relativement à la neutropénie congénitale. En effet, l'administration de G- et GM-GSF cliniquement utilisé chez ces patients augmente le nombre de PMNs pour les protéger. Cependant, ce traitement est également associé à la survenue de leucémie myéloïde vu la puissance de ces facteurs hématopoïétiques. Il est plausible de croire que, dans ce contexte (en absence de tumeurs), l'albumine et la fétuine permettent d'augmenter la viabilité des PMNs et préserver leur fonctionnalité sans induire le développement de leucémie myéloïde vu leur large spectre d'action comparativement au GM-CSF. Certains ligands propres aux bénéfices de l'albumine et de la fétuine pourraient se développer et représenter d'intéressantes cibles thérapeutiques.

Bibliographie

Abel, G. A., J. T. Hays, et al. (2005). "Effects of biochemically confirmed smoking cessation on white blood cell count." *Mayo Clin Proc* 80(8): 1022-1028.

Acehan, D., X. Jiang, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* 9(2): 423-432.

ASCO (1994). "American Society of Clinical Oncology. Recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines." *J Clin Oncol* 12(11): 2471-2508.

Adams, J. M. (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." *Genes Dev* 17(20): 2481-2495.

Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* 281(5381): 1322-1326.

Adams, J. M. and S. Cory (2007). "Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential." *Curr Opin Immunol* 19(5): 488-496.

Adrain, C. and S. J. Martin (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas." *Trends Biochem Sci* 26(6): 390-397.

Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." *Nature* 404(6774): 193-197.

Akgul, C., D. A. Moulding, et al. (2001). "Molecular control of neutrophil apoptosis." *FEBS Lett* 487(3): 318-322.

Akhtari, M., B. Curtis, et al. (2009). "Autoimmune neutropenia in adults." *Autoimmun Rev* 9(1): 62-66.

Algeciras-Schimmich, A., E. M. Pietras, et al. (2003). "Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20): 11445-11450.

Aliprantis, A. O., R. B. Yang, et al. (2000). "The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2." *EMBO J* 19(13): 3325-3336.

Altnauer, F., S. Conus, et al. (2004). "Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis." *J Biol Chem* 279(7): 5947-5957.

Aman, M. J. and K. S. Ravichandran (2000). "A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux." *Curr Biol* 10(7): 393-396.

Amstad, P. A., G. Yu, et al. (2001). "Detection of caspase activation in situ by fluorochrome-labeled caspase inhibitors." *Biotechniques* 31(3): 608-610, 612, 614, passim.

Anglade, P., S. Vyas, et al. (1997). "Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease." *Histol Histopathol* 12(1): 25-31.

Ankarcrona, M., J. M. Dypbukt, et al. (1994). "Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells." *Exp Cell Res* 213(1): 172-177.

Antman, K. S., J. D. Griffin, et al. (1988). "Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression." *N Engl J Med* 319(10): 593-598.

Antonsson, B., S. Montessuit, et al. (2000). "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria." *Biochem J* 345 Pt 2: 271-278.

Antunes, F., E. Cadenas, et al. (2001). "Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture." *Biochem J* 356(Pt 2): 549-555.

Aoshiba, K., S. Yasui, et al. (1999). "Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils." *J Immunol* 162(3): 1692-1700.

Attar, E. C. and D. T. Scadden (2004). "Regulation of hematopoietic stem cell growth." *Leukemia* 18(11): 1760-1768.

Auer, J., M. Blass, et al. (2007). "Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 9(5): R94.

Ausubel, F. M. (1990). *Current protocols in molecular biology*. New York ; Toronto, Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley.

Aye, M. T., J. A. Seguin, et al. (1979). "Erythroid and granulocytic colony growth in cultures supplemented with human serum lipoproteins." *J Cell Physiol* 99(2): 233-238.

- Babior, B. M. (2000).** "Phagocytes and oxidative stress." *Am J Med* 109(1): 33-44.
- Babior, B. M. (2004).** "NADPH oxidase." *Curr Opin Immunol* 16(1): 42-47.
- Babior, B. M., J. D. Lambeth, et al. (2002).** "The neutrophil NADPH oxidase." *Arch Biochem Biophys* 397(2): 342-344.
- Bahr, B. A. and J. Bendiske (2002).** "The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction." *J Neurochem* 83(3): 481-489.
- Bailey JM, Menter J. (1967).** Lipid metabolism in cultured cells VII. Linoleic acid content of cells grown on lipid-free synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med.* 125:101-105.
- Ballestrero, A., F. Ferrando, et al. (1999).** "Comparative effects of three cytokine regimens after high-dose cyclophosphamide: granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and sequential interleukin-3 and GM-CSF." *J Clin Oncol* 17(4): 1296.
- Barabe, F., E. Rollet-Labelle, et al. (2002).** "Early events in the activation of Fc gamma RIIA in human neutrophils: stimulated insolubilization, translocation to detergent-resistant domains, and degradation of Fc gamma RIIA." *J Immunol* 168(8): 4042-4049.
- Bar-Or, D., G. Curtis, et al. (2001).** "Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia." *Eur J Biochem* 268(1): 42-47.

Bar-Or, D., L. T. Rael, et al. (2001). "An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species." *Biochem Biophys Res Commun* 284(3): 856-862.

Bar-Or, D., G. W. Thomas, et al. (2001). "Asp-Ala-His-Lys (DAHK) inhibits copper-induced oxidative DNA double strand breaks and telomere shortening." *Biochem Biophys Res Commun* 282(1): 356-360.

Barry, M., J. A. Heibein, et al. (2000). "Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid." *Mol Cell Biol* 20(11): 3781-3794.

Bartok, B. and G. S. Firestein (2010). "Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis." *Immunol Rev* 233(1): 233-255.

Barton, G. M., et R. Medzhitov. (2002). "Toll-like receptors and their ligands." *Curr Top Microbiol Immunol* 270:81-92.

Bass, D. A., J. W. Parce, et al. (1983). "Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation." *J Immunol* 130(4): 1910-1917.

Becker, J. W., J. Rotonda, et al. (2004). "Reducing the peptidyl features of caspase-3 inhibitors: a structural analysis." *J Med Chem* 47(10): 2466-2474.

Bedner, E., P. Smolewski, et al. (2000). "Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation." *Exp Cell Res* 259(1): 308-313.

Beekman, R. and I. P. Touw (2010). "G-CSF and its receptor in myeloid malignancy." *Blood* 115(25): 5131-5136.

Belayev, L., Y. Liu, et al. (2001). "Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window." *Stroke* 32(2): 553-560.

Belayev, L., E. Pinard, et al. (2002). "Albumin therapy of transient focal cerebral ischemia: in vivo analysis of dynamic microvascular responses." *Stroke* 33(4): 1077-1084.

Belayev, L., I. Saul, et al. (2005). "Albumin treatment reduces neurological deficit and protects blood-brain barrier integrity after acute intracortical hematoma in the rat." *Stroke* 36(2): 326-331.

Belizario, J. E. and C. A. Dinarello (1991). "Interleukin 1, interleukin 6, tumor necrosis factor, and transforming growth factor beta increase cell resistance to tumor necrosis factor cytotoxicity by growth arrest in the G1 phase of the cell cycle." *Cancer Res* 51(9): 2379-2385.

Benito, A., D. Grillot, et al. (1995). "Regulation and function of Bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promyelocytic cells." *Am J Pathol* 146(2): 481-490.

Bennett, C. L., T. J. Smith, et al. (1996). "Use of hematopoietic colony-stimulating factors: the American Society of Clinical Oncology survey. The Health Services Research Committee of the American Society of Clinical Oncology." *J Clin Oncol* 14(9): 2511-2520.

Berr, C., B. Balansard, et al. (2000). "Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Arteriel." *J Am Geriatr Soc* 48(10): 1285-1291.

Bhana, N. (2007). "Granulocyte colony-stimulating factors in the management of chemotherapy-induced neutropenia: evidence based review." *Curr Opin Oncol* 19(4): 328-335.

Bialik, S., V. L. Cryns, et al. (1999). "The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes." *Circ Res* 85(5): 403-414.

Bidere, N., H. K. Lorenzo, et al. (2003). "Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis." *J Biol Chem* 278(33): 31401-31411.

Biffl, W. L., E. E. Moore, et al. (1995). "Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent." *J Leukoc Biol* 58(5): 582-584.

Birch JR, Pirt SJ. (1969). "The choline and serum protein requirements of mouse fibroblast cells (strain LS) in culture." *J Cell Sci.* 5:135-142.

Blagosklonny, M. V. (2000). "Cell death beyond apoptosis." *Leukemia* 14(8): 1502-1508.

Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." *Curr Opin Cell Biol* 15(6): 725-731.

Bokoch, G. M. (2005). "Regulation of innate immunity by Rho GTPases." *Trends Cell Biol* 15(3): 163-171.

Bolitho, C., P. Bayl, et al. (2007). "The anti-apoptotic activity of albumin for endothelium is mediated by a partially cryptic protein domain and reduced by inhibitors of G-coupled protein and PI-3 kinase, but is independent of radical scavenging or bound lipid." *J Vasc Res* 44(4): 313-324.

Borregaard, N. (2010). "Neutrophils, from marrow to microbes." *Immunity* 33(5): 657-670.

Borregaard, N., L. Kjeldsen, et al. (1992). "Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils." *J Clin Invest* 90(1): 86-96.

Borregaard, N. and K. Kragballe (1980). "Role of oxygen in antibody-dependent cytotoxicity mediated by monocytes and neutrophils." *J Clin Invest* 66(4): 676-683.

Borregaard, N., O. E. Sorensen, et al. (2007). "Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins." *Trends Immunol* 28(8): 340-345.

Botelho, R. J., C. C. Scott, et S. Grinstein. (2004). "Phosphoinositide involvement in phagocytosis and phagosome maturation." *Curr Top Microbiol Immunol* 282:1-30.

Bouchard, A., C. Rathe, et al. (2004). "Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8." *J Leukoc Biol* 75(5): 893-900.

Bouillet, P., D. Metcalf, et al. (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." *Science* 286(5445): 1735-1738.

Boutros, T., E. Chevet, et al. (2008). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer." *Pharmacol Rev* 60(3): 261-310.

Boya, P., K. Andreau, et al. (2003). "Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion." *J Exp Med* 197(10): 1323-1334.

Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, et al. (2003). "Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine." *Oncogene* 22(25): 3927-3936.

Boyum, A. (1968). "A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:51-76.

Brach, M. A., S. deVos, et al. (1992). "Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death." *Blood* 80(11): 2920-2924.

Breckenridge, D. G., M. Nguyen, et al. (2002). "The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4331-4336.

Brenner, D. and T. W. Mak (2009). "Mitochondrial cell death effectors." *Curr Opin Cell Biol* 21(6): 871-877.

Brinkmann, V., U. Reichard, et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." *Science* 303(5663): 1532-1535.

Brinkmann, V. and A. Zychlinsky (2007). "Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs." *Nat Rev Microbiol* 5(8): 577-582.

Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." *J Biol Chem* 275(23): 17221-17224.

Brown, W. M. and K. M. Dziegielewska (1997). "Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution." *Protein Sci* 6(1): 5-12.

Brugger, W., W. Mocklin, et al. (1993). "Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin." *Blood* 81(10): 2579-2584.

Buckle, A. M. and N. Hogg (1989). "The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors." *J Immunol* 143(7): 2295-2301.

Buckle, A. M., Y. Jayaram, et al. (1990). "Colony-stimulating factors and interferon-gamma differentially affect cell surface molecules shared by monocytes and neutrophils." *Clin Exp Immunol* 81(2): 339-345.

Bulow, E., N. Bengtsson, et al. (2002). "Sorting of neutrophil-specific granule protein human cathelicidin, hCAP-18, when constitutively expressed in myeloid cells." *J Leukoc Biol* 72(1): 147-153.

Bursch, W. (2001). "The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death." *Cell Death Differ* 8(6): 569-581.

Caccavo, D., G. D. Sebastiani, et al. (1999). "Increased levels of lactoferrin in synovial fluid but not in serum from patients with rheumatoid arthritis." *International journal of clinical & laboratory research* 29(1): 30-35.

Cain, K., S. B. Bratton, et al. (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." *Biochimie* 84(2-3): 203-214.

Cairo, M. S., J. M. Plunkett, et al. (1990). "Seven-day administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor to newborn rats: modulation of neonatal neutrophilia, myelopoiesis, and group B Streptococcus sepsis." *Blood* 76(9): 1788-1794.

Calafat, J., H. Janssen, et al. (1997). "Human monocytes and neutrophils store transforming growth factor-alpha in a subpopulation of cytoplasmic granules." *Blood* 90(3): 1255-1266.

Callewaert, L. and C. W. Michiels (2010). "Lysozymes in the animal kingdom." *J Biosci* 35(1): 127-160.

Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* 296(5573): 1655-1657.

Carafoli, E. and M. Molinari (1998). "Calpain: a protease in search of a function?" *Biochem Biophys Res Commun* 247(2): 193-203.

Carp, H. and A. Janoff (1979). "In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by reactive oxygen species generated by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes." *J Clin Invest* 63(4): 793-797.

Carrington, P. E., C. Sandu, et al. (2006). "The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8." *Mol Cell* 22(5): 599-610.

Casadevall, N., W. Vainchenker, et al. (1982). "Erythroid progenitors in polycythemia vera: demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum free cultures." *Blood* 59(2): 447-451.

Cataldo, A. M., D. J. Hamilton, et al. (1994). "Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease." *Brain Res* 640(1-2): 68-80.

Ceponis, A., Y. T. Konttinen, et al. (1998). "Synovial lining, endothelial and inflammatory mononuclear cell proliferation in synovial membranes in psoriatic and reactive arthritis: a comparative quantitative morphometric study." *Br J Rheumatol* 37(2): 170-178.

Ceponis, A., Y. T. Konttinen, et al. (1998). "Expression of stem cell factor (SCF) and SCF receptor (c-kit) in synovial membrane in arthritis: correlation with synovial mast cell hyperplasia and inflammation." *J Rheumatol* 25(12): 2304-2314.

Cerretti, D. P., C. J. Kozlosky, et al. (1992). "Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme." *Science* 256(5053): 97-100.

Certo, M., V. Del Gaizo Moore, et al. (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." *Cancer Cell* 9(5): 351-365.

Chakraborty, K., S. Ghosh, et al. (2008). "Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells." *Cell Microbiol* 10(12): 2520-2537.

Chang, D. W., Z. Xing, et al. (2003). "Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation." *EMBO J* 22(16): 4132-4142.

Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* 410(6824): 37-40.

Chang, S. K., Z. Gu, et al. (2010). "Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11." *Immunol Rev* 233(1): 256-266.

Chen, G., J. Cizeau, et al. (1999). "Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins." *J Biol Chem* 274(1): 7-10.

Cheng, E. H., M. C. Wei, et al. (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." *Mol Cell* 8(3): 705-711.

Cheng, P. C., M. L. Dykstra, et al. (1999). "A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting." *J Exp Med* 190(11): 1549-1560.

Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, et al. (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario." *Cell Death Differ* 13(8): 1396-1402.

Chipuk, J. E. and D. R. Green (2008). "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" *Trends Cell Biol* 18(4): 157-164.

Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, et al. (2010). "The BCL-2 family reunion." *Mol Cell* 37(3): 299-310.

Chowdhury, I., B. Tharakan, et al. (2008). "Caspases - an update." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151(1): 10-27.

Chuang, F. Y., M. Sassaroli, et al. (2000). "Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils." *J Immunol* 164(1): 350-360.

Cini, M. and A. Moretti (1995). "Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain." *Neurobiol Aging* 16(1): 53-57.

Cirman, T., K. Oresic, et al. (2004). "Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins." *J Biol Chem* 279(5): 3578-3587.

Clark, J. M., D. W. Vaughan, et al. (1980). "Elastase-like enzymes in human neutrophils localized by ultrastructural cytochemistry." *J Cell Biol* 84(1): 102-119.

Coffer, P. J., R. C. Schweizer, et al. (1998). "Analysis of signal transduction pathways in human eosinophils activated by chemoattractants and the T-helper 2-derived cytokines interleukin-4 and interleukin-5." *Blood* 91(7): 2547-2557.

Coligan, J. E. and R. Coico (1994). *Current protocols in immunology*. New York, Wiley.

Colotta, F., F. Re, et al. (1992). "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products." *Blood* 80(8): 2012-2020.

Cooney, D. S., H. Phee, et al. (2001). "Signal transduction by human-restricted Fc gamma RIIa involves three distinct cytoplasmic kinase families leading to phagocytosis." *J Immunol* 167(2): 844-854.

Cornish, A. L., I. K. Campbell, et al. (2009). "G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis." *Nat Rev Rheumatol* 5(10): 554-559.

Cowburn, A. S., K. A. Cadwallader, et al. (2002). "Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival." *Blood* 100(7): 2607-2616.

Cowland, J. B. and N. Borregaard (1999). "The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules." *J Leukoc Biol* 66(6): 989-995.

Craig, R. W. (2002). "MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis." *Leukemia* 16(4): 444-454.

Creagh, E. M., H. Conroy, et al. (2003). "Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity." *Immunol Rev* 193: 10-21.

Croall, D. E. and G. N. DeMartino (1991). "Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation." *Physiol Rev* 71(3): 813-847.

Cross, A., D. Bakstad, et al. (2005). "Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis." *Pathophysiology* 12(3): 191-202.

Dale, D. C. and D. C. Link (2009). "The many causes of severe congenital neutropenia." *N Engl J Med* 360(1): 3-5.

Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* 116(2): 205-219.

Dare, E., W. Li, et al. (2001). "Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis." *Free Radic Biol Med* 30(12): 1347-1356.

Darzynkiewicz, Z., X. Huang, et al. (2004). "Cytometric methods to detect apoptosis." *Methods Cell Biol* 75: 307-341.

Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev* 13(22): 2905-2927.

Davies, S. P., H. Reddy, et al. (2000). "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors." *Biochem J* 351(Pt 1): 95-105.

Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." *Cell* 103(2): 239-252.

Dawson, S. P., J. E. Arnold, et al. (1995). "Developmental changes of the 26 S proteasome in abdominal intersegmental muscles of *Manduca sexta* during programmed cell death." *J Biol Chem* 270(4): 1850-1858.

De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." *Arthritis Rheum* 44(8): 1928-1942.

Degli Esposti, M. (2004). "Mitochondria in apoptosis: past, present and future." *Biochem Soc Trans* 32(Pt3): 493-495.

Demetri, G. D. and J. D. Griffin (1991). "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor." *Blood* 78(11): 2791-2808.

Demetriou, M., C. Binkert, et al. (1996). "Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist." *The Journal of biological chemistry* 271(22): 12755-12761.

Dempke, W., A. Von Poblozki, et al. (2000). "Human hematopoietic growth factors: old lessons and new perspectives." *Anticancer Res* 20(6D): 5155-5164.

Derouet, M., L. Thomas, et al. (2004). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1." *J Biol Chem* 279(26): 26915-26921.

Desagher, S. and J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." *Trends Cell Biol* 10(9): 369-377.

Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* 13(3): 239-252.

Dewitt, S. and M. B. Hallett (2002). "Cytosolic free Ca(2+) changes and calpain activation are required for beta integrin-accelerated phagocytosis by human neutrophils." *J Cell Biol* 159(1): 181-189.

Dibbert, B., M. Weber, et al. (1999). "Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13330-13335.

Dransfield, I., A. M. Buckle, et al. (1994). "Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression." *J Immunol* 153(3): 1254-1263.

Dunn, P. A. and H. W. Tyrer (1981). "Quantitation of neutrophil phagocytosis, using fluorescent latex beads. Correlation of microscopy and flow cytometry." *J Lab Clin Med* 98(3): 374-381.

Durand, V., Y. Renaudineau, et al. (2001). "Cross-linking of human Fc gamma RIIIb induces the production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils." *J Immunol* 167(7): 3996-4007.

Dziegielewska, K. M., W. M. Brown, et al. (1990). "The complete cDNA and amino acid sequence of bovine fetuin. Its homology with alpha 2HS glycoprotein and relation to other members of the cystatin superfamily." *J Biol Chem* 265(8): 4354-4357.

Dziegielewska, K. M., Y. Daikuhara, et al. (2000). "Fetuin in the developing neocortex of the rat: distribution and origin." *J Comp Neurol* 423(3): 373-388.

Eagle, H., Oyama, V.I., Piez, K.A. (1960). "The reversible binding of half-cystine residues to serum protein, and its bearing on the cystine requirement of cultured mammalian cells." *J Biol Chem.* 235:1719-1726.

Edwards, J. C. (2000). "Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis." *Arthritis Res* 2(5): 344-347.

Edwards, S. W., M. Derouet, et al. (2004). "Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1." *Biochem Soc Trans* 32(Pt3): 489-492.

Elghetany, M. T. (2002). "Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review." *Blood Cells Mol Dis* 28(2): 260-274.

Elghetany, M. T. and B. H. Davis (2005). "Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: a review." *Cytometry B Clin Cytom* 65(1): 1-5.

Elias, A. D., J. Ibrahim, et al. (2002). "The impact of induction duration and the number of high-dose cycles on the long-term survival of women with metastatic breast cancer treated with high-dose chemotherapy with stem cell rescue: an analysis of sequential phase I/II trials from the Dana-Farber/Beth Israel STAMP program." *Biol Blood Marrow Transplant* 8(4): 198-205.

Ellis, C. N., M. B. Ellis, et al. (1987). "Effect of adriamycin on heart mitochondrial DNA." *Biochem J* 245(1): 309-312.

Emerson, T. E., Jr. (1989). "Unique features of albumin: a brief review." *Crit Care Med* 17(7): 690-694.

Epling-Burnette, P. K., B. Zhong, et al. (2001). "Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils." *J Immunol* 166(12): 7486-7495.

Esposti, M. D. (2002). "Lipids, cardiolipin and apoptosis: a greasy licence to kill." *Cell Death Differ* 9(3): 234-236.

Esposti, M. D., J. T. Erler, et al. (2001). "Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity." *Mol Cell Biol* 21(21): 7268-7276.

Etzioni, A., C. M. Doerschuk, et al. (1999). "Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies." *Blood* 94(10): 3281-3288.

Eyles, J. L., A. W. Roberts, et al. (2006). "Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease." *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(9): 500-510.

Fadeel, B., A. Ahlin, et al. (1998). "Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species." *Blood* 92(12): 4808-4818.

Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." *Microbes Infect* 5(14): 1317-1327.

Feldmann, M., F. M. Brennan, et al. (1996). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis." *Annu Rev Immunol* 14: 397-440.

Ferrante, A. and Y. H. Thong (1980). "Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method." *J Immunol Methods* 36(2): 109-117.

Ferrero, E., A. Bondanza, et al. (1998). "CD14⁺ CD34⁺ peripheral blood mononuclear cells migrate across endothelium and give rise to immunostimulatory dendritic cells." *J Immunol* 160(6): 2675-2683.

Feuk-Lagerstedt, E., M. Samuelsson, et al. (2002). "The presence of stomatin in detergent-insoluble domains of neutrophil granule membranes." *J Leukoc Biol* 72(5): 970-977.

Firestein, G. S. (1996). "Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors?" *Arthritis Rheum* 39(11): 1781-1790.

Firestein, G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." *Nature* 423(6937): 356-361.

Firestein, G. S., A. E. Berger, et al. (1992). "IL-1 receptor antagonist protein production and gene expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium." *J Immunol* 149(3): 1054-1062.

Fisher, D. A., et R. W. Lam. 1974. Thyroid hormone binding by bovine and ovine fetuin. *Endocrinology* 94:49-54.

Fischer, D., Y. Li, et al. (2003). "In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis." *Biomaterials* 24(7): 1121-1131.

Fischer, U., R. U. Janicke, et al. (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." *Cell Death Differ* 10(1): 76-100.

Fleit, H. B., S. D. Wright, et al. (1982). "Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(10): 3275-3279.

Foghsgaard, L., D. Wissing, et al. (2001). "Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor." *J Cell Biol* 153(5): 999-1010.

Fossati, G., R. C. Bucknall, et al. (2002). "Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional responses induced by priming with cytokines." *Annals of the rheumatic diseases* 61(1): 13-19.

Fossati, G., D. A. Moulding, et al. (2003). "The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis." *J Immunol* 170(4): 1964-1972.

Franke, T. F., D. R. Kaplan, et al. (1997). "PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis." *Cell* 88(4): 435-437.

Fratelli, M., V. Gagliardini, et al. (1995). "Autocrine interleukin-1 beta regulates both proliferation and apoptosis in EL4-6.1 thymoma cells." *Blood* 85(12): 3532-3537.

Freire-de-Lima, C. G., D. O. Nascimento, et al. (2000). "Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages." *Nature* 403(6766): 199-203.

Friedlander, R. M., V. Gagliardini, et al. (1996). "Functional role of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis." *J Exp Med* 184(2): 717-724.

Friesen, C., S. Fulda, et al. (1999). "Induction of CD95 ligand and apoptosis by doxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive- and drug-resistant tumor cells." *Cell Death Differ* 6(5): 471-480.

Gabrilove, J. (1992). "The development of granulocyte colony-stimulating factor in its various clinical applications." *Blood* 80(6): 1382-1385.

Galembeck, F. and J. R. Cann (1974). "Fetuin as a trypsin inhibitor." *Arch Biochem Biophys* 164(1): 326-331.

Gallego-Sandin, S., J. Novalbos, et al. (2005). "Albumin prevents mitochondrial depolarization and apoptosis elicited by endoplasmic reticulum calcium depletion of neuroblastoma cells." *Eur J Pharmacol* 520(1-3): 1-11.

Ganz, T. (2003). "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity." *Nat Rev Immunol* 3(9): 710-720.

Garcia-Garcia, E. and C. Rosales (2002). "Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis." *J Leukoc Biol* 72(6): 1092-1108.

Gasmi, L., A. G. McLennan, et al. (1996). "The diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil: platelet interactions during inflammation." *Blood* 87(8): 3442-3449.

Ge, Y. and M. T. Elghetany (2005). "CD36: a multiligand molecule." *Lab Hematol* 11(1): 31-37.

Gervais, F. G., D. Xu, et al. (1999). "Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation." *Cell* 97(3): 395-406.

Gesbert, F., W. R. Sellers, et al. (2000). "BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway." *J Biol Chem* 275(50): 39223-39230.

Ginsberg, M. D., M. D. Hill, et al. (2006). "The ALIAS Pilot Trial: a dose-escalation and safety study of albumin therapy for acute ischemic stroke--I: Physiological responses and safety results." *Stroke* 37(8): 2100-2106.

Girard, D., M. E. Paquet, et al. (1996). "Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15." *Blood* 88(8): 3176-3184.

Goetz, D. H., M. A. Holmes, et al. (2002). "The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition." *Mol Cell* 10(5): 1033-1043.

Goto, K., K. Yoshida, et al. (1997). "Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding plasma countertrypanin, a member of mammalian fetuin family, from the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*." *J Biochem (Tokyo)* 121(3): 619-625.

- Green, D. R. (1998).** "Apoptotic pathways: the roads to ruin." *Cell* 94(6): 695-698.
- Green, D. R. and G. I. Evan (2002).** "A matter of life and death." *Cancer Cell* 1(1): 19-30.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2005).** "Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight?" *J Clin Invest* 115(10): 2610-2617.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998).** "Mitochondria and apoptosis." *Science* 281(5381): 1309-1312.
- Gregory, C. D. and A. Devitt (2004).** "The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically?" *Immunology* 113(1): 1-14.
- Gribaldo, L., S. Casati, et al. (1999).** "Comparison of in vitro drug-sensitivity of human granulocyte-macrophage progenitors from two different origins: umbilical cord blood and bone marrow." *Exp Hematol* 27(11): 1593-1598.
- Griffin, J. D., O. Spertini, et al. (1990).** "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors." *J Immunol* 145(2): 576-584.
- Guicciardi, M. E., J. Deussing, et al. (2000).** "Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c." *J Clin Invest* 106(9): 1127-1137.

Guicciardi, M. E., M. Leist, et al. (2004). "Lysosomes in cell death." *Oncogene* 23(16): 2881-2890.

Gum, E. T., R. A. Swanson, et al. (2004). "Human serum albumin and its N-terminal tetrapeptide (DAHK) block oxidant-induced neuronal death." *Stroke* 35(2): 590-595.

Guo, B., R. M. Kato, et al. (2000). "Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex." *Immunity* 13(2): 243-253.

Gupta, A., M. Hasan, et al. (1991). "Age-related elevation of lipid peroxidation products: diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous system of rats." *Gerontology* 37(6): 305-309.

Guyomarc'h, F., M. Renan, M. Chatriot, V. Gamberre, et M. H. Famelart. (2007). "Acid gelation properties of heated skim milk as a result of enzymatically induced changes in the micelle/serum distribution of the whey protein/kappa-casein aggregates." *J Agric Food Chem* 55:10986-10993.

Haerdi-Landerer, M. C., A. Steiner, et al. (2011). "Primary bovine synoviocyte cultures: A useful tool for in vitro drug testing?" *Vet J* 188(1): 58-63.

Hager, M., J. B. Cowland, et al. (2010). "Neutrophil granules in health and disease." *J Intern Med* 268(1): 25-34.

Hakem, R., A. Hakem, et al. (1998). "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo." *Cell* 94(3): 339-352.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." *Arch Biochem Biophys* 280(1): 1-8.

Hamasaki, A., F. Sendo, et al. (1998). "Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene." *J Exp Med* 188(11): 1985-1992.

Hamilton, J. A. (2008). "Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity." *Nat Rev Immunol* 8(7): 533-544.

Hampton, M. B., B. Fadeel, et al. (1998). "Redox regulation of the caspases during apoptosis." *Ann N Y Acad Sci* 854: 328-335.

Hannah, S., K. Mecklenburgh, et al. (1995). "Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro." *FEBS Lett* 372(2-3): 233-237.

Hanyuda, M., T. Kasama, et al. (2003). "Activated leucocytes express and secrete macrophage inflammatory protein-1alpha upon interaction with synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis via a beta2-integrin/ICAM-1 mechanism." *Rheumatology (Oxford)* 42(11): 1390-1397.

Hardwick, J. M., et B. M. Polster. (2002). "Bax, along with lipid conspirators, allows cytochrome c to escape mitochondria." *Mol Cell* 10:963-965.

Harris, V. K. and S. A. Sadiq (2009). "Disease biomarkers in multiple sclerosis: potential for use in therapeutic decision making." *Molecular diagnosis & therapy* 13(4): 225-244.

Hayashi, F., T. K. Means, et al. (2003). "Toll-like receptors stimulate human neutrophil function." *Blood* 102(7): 2660-2669.

Hayes, J. D., et L. I. McLellan. (1999). "Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress." *Free Radic Res* 31:273-300.

Hedrick, S. M., I. L. Chen, et al. (2010). "Intertwined pathways of programmed cell death in immunity." *Immunol Rev* 236: 41-53.

Heibein, J. A., I. S. Goping, et al. (2000). "Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax." *J Exp Med* 192(10): 1391-1402.

Hendler, P. L., P. E. Lavoie, et al. (1985). "Human synovial dendritic cells. Direct observation of transition to fibroblasts." *J Rheumatol* 12(4): 660-664.

Henry-Mowatt, J., C. Dive, J. C. Martinou, et D. James. (2004). "Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer." *Oncogene* 23:2850-2860.

Heuberger, M. P., M. R. Widmer, et al. (2005). "Protein-mediated boundary lubrication in arthroplasty." *Biomaterials* 26(10): 1165-1173.

Hinds, M. G. and C. L. Day (2005). "Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants." *Curr Opin Struct Biol* 15(6): 690-699.

Hirohata, S., T. Yanagida, et al. (2001). "Induction of fibroblast-like cells from CD34(+) progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis." *J Leukoc Biol* 70(3): 413-421.

Hirohata, S., T. Yanagida, et al. (2004). "Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization." *Arthritis Rheum* 50(12): 3888-3896.

Hogge, D. E., P. M. Lansdorp, et al. (1996). "Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human stem cell factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor." *Blood* 88(10): 3765-3773.

Holland, S. M. (2010). "Chronic granulomatous disease." *Clin Rev Allergy Immunol* 38(1): 3-10.

Homburg, C. H., M. de Haas, et al. (1995). "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro." *Blood* 85(2): 532-540.

Howitz, K. T., K. J. Bitterman, et al. (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." *Nature* 425(6954): 191-196.

Huang, H. L., L. W. Fang, et al. (2003). "DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation." *Oncogene* 22(50): 8168-8177.

Huang, Y. and K. K. Wang (2001). "The calpain family and human disease." *Trends Mol Med* 7(8): 355-362.

Huh, P. W., L. Belayev, et al. (1998). "The effect of high-dose albumin therapy on local cerebral perfusion after transient focal cerebral ischemia in rats." *Brain Res* 804(1): 105-113.

Huizinga, T. W., M. de Haas, et al. (1990). "Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils." *J Clin Invest* 86(2): 416-423.

Iglesias, J., V. E. Abernethy, et al. (1999). "Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS." *Am J Physiol* 277(5 Pt 2): F711-722.

Iking-Konert, C., B. Ostendorf, et al. (2005). "Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells." *Ann Rheum Dis* 64(10): 1436-1442.

Inoki, K., Y. Li, et al. (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." *Nat Cell Biol* 4(9): 648-657.

Ishida, K., N. Sawada, et al. (2004). "Expression of albumin in bone tissues and osteoblastic cells: involvement of hormonal regulation." *Int J Mol Med* 14(5): 891-895.

Ishidoh, K. and E. Kominami (2002). "Processing and activation of lysosomal proteinases." *Biol Chem* 383(12): 1827-1831.

Iwai, K., T. Miyawaki, et al. (1994). "Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils." *Blood* 84(4): 1201-1208.

Ix, J. H., C. L. Wassel, et al. (2008). "Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons." *JAMA* 300(2): 182-188.

Jaattela, M. and J. Tschopp (2003). "Caspase-independent cell death in T lymphocytes." *Nat Immunol* 4(5): 416-423.

Johansson, A. C., H. Appelqvist, et al. (2010). "Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization." *Apoptosis* 15(5): 527-540.

Johnson, E. E., C. V. Srikanth, et al. (2010). "Siderocalin inhibits the intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages." *FEMS Immunol Med Microbiol* 58(1): 138-145.

Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* 298(5600): 1911-1912.

Jones, D. T., K. Ganeshaguru, et al. (2003). "Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis." *Blood* 101(8): 3174-3180.

Kadhim, S., C. Penney, et al. (2000). "Synergistic anti-tumor activity of a novel immunomodulator, BCH-1393, in combination with cyclophosphamide." *Int J Immunopharmacol* 22(9): 659-671.

Kagedal, K., M. Zhao, et al. (2001). "Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases." *Biochem J* 359(Pt 2): 335-343.

Kajiyama, K., D. F. Pauly, et al. (1987). "Protection by verapamil of mitochondrial glutathione equilibrium and phospholipid changes during reperfusion of ischemic canine myocardium." *Circ Res* 61(2): 301-310.

Kakkar, A. K. and D. J. Lefer (2004). "Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice." *Curr Opin Pharmacol* 4(2): 154-158.

Kane, D. J., T. A. Sarafian, et al. (1993). "Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species." *Science* 262(5137): 1274-1277.

Kang, T., J. Yi, et al. (2001). "Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils." *J Biol Chem* 276(24): 21960-21968.

Karlsen, J. R., N. Borregaard, et al. (2010). "Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression by co-stimulation with interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is controlled by IkappaB-zeta but neither by C/EBP-beta nor C/EBP-delta." *J Biol Chem* 285(19): 14088-14100.

Kasahara, Y., K. Iwai, et al. (1997). "Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils." *Blood* 89(5): 1748-1753.

Katsuma, S., N. Hatae, et al. (2005). "Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1." *J Biol Chem* 280(20): 19507-19515.

Katunuma, N., A. Matsui, et al. (2001). "Novel procaspase-3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis." *Adv Enzyme Regul* 41: 237-250.

Kent, K. D., W. J. Harper, et J. A. Bomser. 2003. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 17:27-33.

Khwaja, A. and L. Tatton (1999). "Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase Cdelta plays a central role in neutrophil apoptosis." *Blood* 94(1): 291-301.

Kiener, H. P., R. Hofbauer, et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha promotes the expression of stem cell factor in synovial fibroblasts and their capacity to induce mast cell chemotaxis." *Arthritis Rheum* 43(1): 164-174.

Kiener, H. P., G. F. Watts, et al. (2010). "Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture." *Arthritis Rheum* 62(3): 742-752.

Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, et al. (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." *Nat Cell Biol* 8(12): 1348-1358.

Kim, J. S., J. M. Kim, et al. (2001). "Caspase-3 activity and expression of Bcl-2 family in human neutrophils by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins." *Helicobacter* 6(3): 207-215.

Kindzelskii, A. L., M. J. Zhou, et al. (1998). "Oscillatory pericellular proteolysis and oxidant deposition during neutrophil locomotion." *Biophys J* 74(1): 90-97.

Klebanoff, S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." *J Leukoc Biol* 77(5): 598-625.

Klein, J. B., A. Buridi, et al. (2001). "Role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in chemoattractant and LPS delay of constitutive neutrophil apoptosis." *Cell Signal* 13(5): 335-343.

Klein, J. B., M. J. Rane, et al. (2000). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways." *J Immunol* 164(8): 4286-4291.

Knepper-Nicolai, B., J. Savill, et al. (1998). "Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases." *J Biol Chem* 273(46): 30530-30536.

Kobayashi, S., K. Yamashita, et al. (2002). "Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia." *J Biol Chem* 277(37): 33968-33977.

Kobayashi, S. D., J. M. Voyich, et al. (2003). "Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection." *Microbes Infect* 5(14): 1337-1344.

Koh, J. S., W. Lieberthal, et al. (1998). "Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway." *J Clin Invest* 102(4): 716-727.

Korade-Mirnic, Z. and S. J. Corey (2000). "Src kinase-mediated signaling in leukocytes." *J Leukoc Biol* 68(5): 603-613.

Kouoh, F., B. Gressier, et al. (1999). "Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes." *Farmaco* 54(10): 695-699.

Krajewski, S., M. Krajewska, et al. (1999). "Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5752-5757.

Kraus-Berthier, L., M. Jan, et al. (2000). "Histology and sensitivity to anticancer drugs of two human non-small cell lung carcinomas implanted in the pleural cavity of nude mice." *Clin Cancer Res* 6(1): 297-304.

Kuida, K., T. F. Haydar, et al. (1998). "Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9." *Cell* 94(3): 325-337.

Kuida, K., J. A. Lippke, et al. (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme." *Science* 267(5206): 2000-2003.

Kuida, K., T. S. Zheng, et al. (1996). "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice." *Nature* 384(6607): 368-372.

Kuijpers, T. W. (2002). "Clinical symptoms and neutropenia: the balance of neutrophil development, functional activity, and cell death." *Eur J Pediatr* 161 Suppl 1: S75-82.

Kumbla, L., S. Bhadra, et al. (1991). "Multifunctional role for fetuin (fetal protein) in lipid transport." *Faseb J* 5(14): 2971-2975.

Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, et al. (2005). "BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly." *Mol Cell* 17(4): 525-535.

Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." *Cell* 111(3): 331-342.

Kwak, J. Y., T. Z. Ma, et al. (2004). "The comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for acute myeloid leukemia." *Exp Hematol* 32(9): 836-842.

Kwiatkowska, K. and A. Sobota (1999). "Signaling pathways in phagocytosis." *Bioessays* 21(5): 422-431.

Kwiatkowska, K. and A. Sobota (2001). "The clustered Fcgamma receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol-dependent manner." *Eur J Immunol* 31(4): 989-998.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.

Lafyatis, R., N. L. Thompson, E. F. Remmers, K. C. Flanders, N. S. Roche, S. J. Kim, J. P. Case, M. B. Sporn, A. B. Roberts, et R. L. Wilder. (1989). "Transforming growth factor-beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization." *J Immunol* 143:1142-1148.

Lagasse, E. and I. L. Weissman (1994). "bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages." *J Exp Med* 179(3): 1047-1052.

Lagraoui M et Gagnon L. (1995). "Modulation of neutrophil survival by synoviocytes and macropages RAW 264.7 co-culture." *9th International Congress of Immunology*: San Francisco, California, USA. pp796

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

Lagraoui, M. (1999). Étude des interactions cellulaires lors de co-cultures

neutrophiles/synoviocytes et neutrophiles/macrophages (RAW264.7). Implication des facteurs de croissance dans la survie et les fonctions cellulaires du neutrophile. Montréal, Université de Montréal.

Lambert, E., C. Boudot, et al. (2003). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival." *Biochem J* 372(Pt 3): 767-774.

Laudanna, C. and R. Alon (2006). "Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes." *Thromb Haemost* 95(1): 5-11.

Lavastre, V., M. Pelletier, et al. (2002). "Mechanisms involved in spontaneous and Viscum album agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: Viscum album agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases." *J Immunol* 168(3): 1419-1427.

Lavastre, V., C. J. Roberge, et al. (2002). "Toxaphene, but not beryllium, induces human neutrophil chemotaxis and apoptosis via reactive oxygen species (ROS): involvement of caspases and ROS in the degradation of cytoskeletal proteins." *Clin Immunol* 104(1): 40-48.

Lawrence, Y. R., D. Raveh, et al. (2007). "Extreme leukocytosis in the emergency department." *QJM* 100(4): 217-223.

Leavey, P. J., K. S. Sellins, et al. (1998). "In vivo treatment with granulocyte colony-stimulating factor results in divergent effects on neutrophil functions measured in vitro." *Blood* 92(11): 4366-4374.

Lee, A., M. K. Whyte, et al. (1993). "Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators." *J Leukoc Biol* 54(4): 283-288.

Lee, D. M., H. P. Kiener, et al. (2007). "Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis." *Science* 315(5814): 1006-1010.

Lee, W. L. and S. Grinstein (2004). "Immunology. The tangled webs that neutrophils weave." *Science* 303(5663): 1477-1478.

Lee, W. L., R. E. Harrison, et al. (2003). "Phagocytosis by neutrophils." *Microbes Infect* 5(14): 1299-1306.

Leist, M. and M. Jaattela (2001b). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8): 589-598.

Leist, M. and M. Jaattela (2001a). "Triggering of apoptosis by cathepsins." *Cell Death Differ* 8(4): 324-326.

Lenoir, M., B. Djerdjouri, et al. (2004). "Stroma cell-derived factor 1alpha mediates desensitization of human neutrophil respiratory burst in synovial fluid from rheumatoid arthritic patients." *J Immunol* 172(11): 7136-7143.

Lesnefsky, E. J., T. J. Slabe, et al. (2001). "Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(6): H2770-2778.

Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." *Cancer Cell* 2(3): 183-192.

Li, P., H. Allen, et al. (1995). "Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock." *Cell* 80(3): 401-411.

Li, P. A., W. Howlett, et al. (1998). "Postischemic treatment with calpain inhibitor MDL 28170 ameliorates brain damage in a gerbil model of global ischemia." *Neurosci Lett* 247(1): 17-20.

Li, W. and D. W. Hoffman (2001). "Structure and dynamics of translation initiation factor aIF-1A from the archaeon *Methanococcus jannaschii* determined by NMR spectroscopy." *Protein Sci* 10(12): 2426-2438.

Li, W., X. Yuan, et al. (2000). "Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH." *FEBS Lett* 470(1): 35-39.

Lima, C. S., E. V. Paula, et al. (2006). "Causes of incidental neutropenia in adulthood." *Ann Hematol* 85(10): 705-709.

Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell* 6(6): 1389-1399.

Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(7): 545-550.

Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2002). "Caspase-independent cell deaths." *Curr Opin Cell Biol* 14(6): 727-733.

Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2004). "Caspase-independent cell death?" *Oncogene* 23(16): 2766-2773.

Lokuta, M. A., P. A. Nuzzi, et al. (2003). "Calpain regulates neutrophil chemotaxis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 4006-4011.

Lundy, F. T., J. Nelson, et al. (2008). "Antimicrobial activity of truncated alpha-defensin (human neutrophil peptide (HNP)-1) analogues without disulphide bridges." *Mol Immunol* 45(1): 190-193.

Luo, H. R. and F. Loison (2008). "Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation." *Am J Hematol* 83(4): 288-295.

Luthi, A. U. and S. J. Martin (2007). "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates." *Cell Death Differ* 14(4): 641-650.

Magnarin, M., P. Spessotto, et al. (2000). "Human neutrophils specifically interact with human monocyte-derived macrophage monolayers." *Inflammation* 24(1): 89-98.

Maianski, N. A., J. Geissler, et al. (2004). "Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis." *Cell Death Differ* 11(2): 143-153.

Maianski, N. A., F. P. Mul, et al. (2002). "Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils." *Blood* 99(2): 672-679.

Maianski, N. A., D. Roos, et al. (2003). "Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils." *Blood* 101(5): 1987-1995.

Majai, G., P. Gogolak, et al. (2010). "PPARgamma modulated inflammatory response of human dendritic cell subsets to engulfed apoptotic neutrophils." *J Leukoc Biol* 88(5): 981-991.

Makowski, G. S. and M. L. Ramsby (2003). "Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection." *Clin Chim Acta* 329(1-2): 77-81.

Manfredi, A. A., P. Rovere-Querini, et al. (2010). "Dangerous connections: neutrophils and the phagocytic clearance of activated platelets." *Curr Opin Hematol* 17(1): 3-8.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." *Cell* 129(7): 1261-1274.

Manning, B. D., A. R. Tee, et al. (2002). "Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway." *Mol Cell* 10(1): 151-162.

Markgraf, C. G., N. L. Velayo, et al. (1998). "Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats." *Stroke* 29(1): 152-158.

Marshall, J. G., J. W. Booth, et al. (2001). "Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis." *J Cell Biol* 153(7): 1369-1380.

Marshall, T. and K. M. Williams (2000). "Protein determination in cerebrospinal fluid by protein dye-binding assay." *Br J Biomed Sci* 57(4): 281-286.

Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, et al. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." *J Exp Med* 182(5): 1545-1556.

Martinou, J. C. and D. R. Green (2001). "Breaking the mitochondrial barrier." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 63-67.

Mathur, S. P. (2000). "Autoimmunity in endometriosis: relevance to infertility." *American journal of reproductive immunology* 44(2): 89-95.

Maugeri, N., P. Rovere-Querini, et al. (2009). "Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, P-selectin, and β 2 integrin-dependent cell clearance program." *Blood* 113(21): 5254-5265.

Mayani, H., W. Dragowska, et al. (1993). "Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells." *Blood* 81(12): 3252-3258.

Mbuyi, J. M., J. Dequeker, et al. (1982). "Plasma proteins in human cortical bone: enrichment of alpha 2 HS-glycoprotein, alpha 1 acid-glycoprotein, and IgE." *Calcif Tissue Int* 34(3): 229-231.

McDonald, P. P., C. Bovolenta, et al. (1998). "Activation of distinct transcription factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon-gamma, and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases." *Biochemistry* 37(38): 13165-13173.

McMillin, J. B. and W. Dowhan (2002). "Cardiolipin and apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1585(2-3): 97-107.

Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." *Nat Rev Immunol* 1(2): 135-145.

Metcalf, D. (1986). "The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors." *Blood* 67(2): 257-267.

Metcalf, D. (2010). "The colony-stimulating factors and cancer." *Nat Rev Cancer* 10(6): 425-434.

Middelhoven, P. J., A. Ager, et al. (1997). "Involvement of a metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gammaRIIIB." *FEBS Lett* 414(1): 14-18.

Miquel, J., M. L. Ferrandiz, et al. (1995). "N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria." *Eur J Pharmacol* 292(3-4): 333-335.

Mirinics, Z. K., J. Calafat, et al. (2002). "Identification of the presenilins in hematopoietic cells with localization of presenilin 1 to neutrophil and platelet granules." *Blood Cells Mol Dis* 28(1): 28-38.

Mobest, D., R. Mertelsmann, et al. (1998). "Serum-free ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic progenitor cells." *Biotechnol Bioeng* 60(3): 341-347.

Mor, A., S. B. Abramson, et al. (2005). "The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction." *Clin Immunol* 115(2): 118-128.

Moran, E. C., A. S. Kamiguti, et al. (2002). "Cytoprotective antioxidant activity of serum albumin and autocrine catalase in chronic lymphocytic leukaemia." *Br J Haematol* 116(2): 316-328.

Morgan, M. D., L. Harper, et al. (2005). "Can neutrophils be manipulated in vivo?" *Rheumatology (Oxford)* 44(5): 597-601.

Morishima, N., K. Nakanishi, et al. (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." *J Biol Chem* 277(37): 34287-34294.

Moulding, D., J. A. Quayle, et al. (1996). "Regulation of neutrophil apoptosis by sodium butyrate." *Biologicals* 24(4): 301-306.

Moulding, D. A., J. A. Quayle, et al. (1998). "Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival." *Blood* 92(7): 2495-2502.

Moulding, D. A., C. Akgul, et al. (2001). "BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis." *J Leukoc Biol* 70(5): 783-792.

Muller, I., M. Munder, et al. (2009). "Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms?" *Trends Immunol* 30(11): 522-530.

Murray, C. A. and M. A. Lynch (1998). "Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation." *J Neurosci* 18(8): 2974-2981.

Nagarajan, S., N. H. Ffadara, et al. (2005). "Signal-specific activation and regulation of human neutrophil Fc gamma receptors." *J Immunol* 174(9): 5423-5432.

Nagel, J. E., K. Han, et al. (1986). "Age differences in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes measured by flow cytometry." *J Leukoc Biol* 39(4): 399-407.

Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* 403(6765): 98-103.

Nakamura, H., Y. Ueki, et al. (2000). "High serum and synovial fluid granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) concentrations in patients with rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 18(6): 713-718.

Namura, S., J. Zhu, et al. (1998). "Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia." *J Neurosci* 18(10): 3659-3668.

Nicotera, P. and G. Melino (2004). "Regulation of the apoptosis-necrosis switch." *Oncogene* 23(16): 2757-2765.

Nio, J., A. Yokoyama, et al. (2002). "Three-dimensional ultrastructure of synoviocytes in the knee joint of rabbits and morphological changes in osteoarthritis model." *Arch Histol Cytol* 65(2): 189-200.

Nopp, A., J. Lundahl, et al. (2002). "Caspase activation in the absence of mitochondrial changes in granulocyte apoptosis." *Clin Exp Immunol* 128(2): 267-274.

Noss, E. H. and M. B. Brenner (2008). "The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis." *Immunol Rev* 223: 252-270.

O'Donnell, E. and M. A. Lynch (1998). "Dietary antioxidant supplementation reverses age-related neuronal changes." *Neurobiol Aging* 19(5): 461-467.

Ogle, J. D., J. G. Noel, et al. (1988). "Phagocytosis of opsonized fluorescent microspheres by human neutrophils. A two-color flow cytometric method for the determination of attachment and ingestion." *J Immunol Methods* 115(1): 17-29.

Oh, K. J., S. Barbuto, et al. (2006). "A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro." *J Biol Chem* 281(48): 36999-37008.

Onozaki, K., K. Matsushima, et al. (1985). "Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines." *J Immunol* 135(6): 3962-3968.

Ottonello, L., M. Cutolo, et al. (2002). "Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines." *Rheumatology* 41(11): 1249-1260.

Ottonello, L., G. Frumento, et al. (2002b). "Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3." *J Leukoc Biol* 72(1): 125-132.

Owen, C. A. and E. J. Campbell (1999). "The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis." *J Leukoc Biol* 65(2): 137-150.

Palesch, Y. Y., M. D. Hill, et al. (2006). "The ALIAS Pilot Trial: a dose-escalation and safety study of albumin therapy for acute ischemic stroke--II: neurologic outcome and efficacy analysis." *Stroke* 37(8): 2107-2114.

Paradies, G., G. Petrosillo, et al. (1999). "Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion." *Free Radic Biol Med* 27(1-2): 42-50.

Parker, L. C., M. K. Whyte, et al. (2005). "The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil." *J Leukoc Biol* 77(6): 886-892.

Parsons, M. J. and D. R. Green (2009). "Mitochondria and apoptosis: a quick take on a long view." *F1000 Biol Rep* 1.

Pedersen, K.O. (1944). "Fetuin, a new globulin isolated from serum." *Nature* 154: 575

Pei, D. (1999). "Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage." *Cell Res* 9(4): 291-303.

Pelletier, M., A. Micheletti, et al. (2010). "Modulation of human neutrophil survival and antigen expression by activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells." *J Leukoc Biol* 88(6): 1163-1170.

Pelletier, M., C. Ratthe, et al. (2002). "Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2." *FEBS Lett* 532(1-2): 164-170.

Pepe, S., N. Tsuchiya, et al. (1999). "PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH." *Am J Physiol* 276(1 Pt 2): H149-158.

Pericle, F., J. H. Liu, et al. (1994). "Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils." *Eur J Immunol* 24(2): 440-444.

Persson, H. L., Z. Yu, et al. (2003). "Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators." *Free Radic Biol Med* 34(10): 1295-1305.

Perussia, B. and G. Trinchieri (1984). "Antibody 3G8, specific for the human neutrophil Fc receptor, reacts with natural killer cells." *J Immunol* 132(3): 1410-1415.

Perussia, B., G. Trinchieri, et al. (1984). "The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies." *J Immunol* 133(1): 180-189.

Peters, C., C. L. Budde, et al. (1995). "Ovine bone marrow extracellular matrix and soluble protein extraction: fetuin amino terminus microheterogeneity." *Am J Med Sci* 309(5): 285-294.

Peters, T., Jr., et R. C. Feldhoff. (1975). "Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Isolation and characterization of tryptic fragments." *Biochemistry* 14:3384-3391.

Petrie, R. J., P. P. Schnetkamp, et al. (2000). "Transient translocation of the B cell receptor and Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase to lipid rafts: evidence toward a role in calcium regulation." *J Immunol* 165(3): 1220-1227.

Petzer, A. L., D. E. Hogge, et al. (1996). "Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4): 1470-1474.

Pezzella, F., A. G. Tse, et al. (1990). "Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation." *Am J Pathol* 137(2): 225-232.

Pinkoski, M. J., N. J. Waterhouse, et al. (2001). "Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway." *J Biol Chem* 276(15): 12060-12067.

Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, et J. W. Smith. (2000). "Ligand binding to integrins". *J Biol Chem* 275:21785-21788.

Pongracz, J., P. Webb, et al. (1999). "Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta." *J Biol Chem* 274(52): 37329-37334.

Poon, H. F., V. Calabrese, et al. (2004). "Free radicals and brain aging." *Clin Geriatr Med* 20(2): 329-359.

Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." *J Biol Chem* 284(33): 21777-21781.

Portt, L., G. Norman, et al. (2011). "Anti-apoptosis and cell survival: a review." *Biochim Biophys Acta* 1813(1): 238-259.

Pryde, J. G., A. Walker, et al. (2000). "Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c." *J Biol Chem* 275(43): 33574-33584.

Putnam, F. W. (1975). *The plasma proteins : structure, function, and genetic control*. New York, Academic Press.

Raha, S. and B. H. Robinson (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing." *Trends Biochem Sci* 25(10): 502-508.

Rao, R. V., S. Castro-Obregon, et al. (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway." *J Biol Chem* 277(24): 21836-21842.

Ravetch, J. V. and J. P. Kinet (1991). "Fc receptors." *Annu Rev Immunol* 9: 457-492.

Rawlings, N. D. and A. J. Barrett (1990). "Evolution of proteins of the cystatin superfamily." *J Mol Evol* 30(1): 60-71.

Reddy, R. C. and T. J. Standiford (2010). "Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis." *Curr Opin Hematol* 17(1): 18-24.

Reed, J. C. (2006). "Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities." *Cell Death Differ* 13:1378-1386.

Reggiori, F. and D. J. Klionsky (2002). "Autophagy in the eukaryotic cell." *Eukaryot Cell* 1(1): 11-21.

Reis, R. C., M. H. Sorgine, et al. (1998). "A novel methodology for the investigation of intracellular proteolytic processing in intact cells." *Eur J Cell Biol* 75(2): 192-197.

Reynolds, J. L., J. N. Skepper, et al. (2005). "Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification." *J Am Soc Nephrol* 16(10): 2920-2930.

Rezaei, N., K. Moazzami, et al. (2009). "Neutropenia and primary immunodeficiency diseases." *Int Rev Immunol* 28(5): 335-366.

Richwine, A. F., J. P. Godbout, et al. (2005). "Improved psychomotor performance in aged mice fed diet high in antioxidants is associated with reduced ex vivo brain interleukin-6 production." *Brain Behav Immun* 19(6): 512-520.

Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 405-413.

Ritchlin, C. (2000). "Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis." *Arthritis Res* 2(5): 356-360.

Roberg, K., K. Kagedal, et al. (2002). "Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts." *Am J Pathol* 161(1): 89-96.

Roberts, A. W. (2005). "G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!" *Growth Factors* 23(1): 33-41.

Rodriguez de Turco, E. B., L. Belayev, et al. (2002). "Systemic fatty acid responses to transient focal cerebral ischemia: influence of neuroprotectant therapy with human albumin." *J Neurochem* 83(3): 515-524.

Rohrlich, S. T. and D. B. Rifkin (1981). "Isolation of the major serine protease inhibitor from the 5-day serum-free conditioned medium of human embryonic lung cells and demonstration that it is fetuin." *J Cell Physiol* 109(1): 1-15.

Roos, D., A. A. Voetman, et al. (1983). "Functional activity of enucleated human polymorphonuclear leukocytes." *J Cell Biol* 97(2): 368-377.

Rosengren, S., D. L. Boyle, et al. (2007). "Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts." *Methods Mol Med* 135: 365-375.

Rothmann, J., C. F. Hertogs, et al. (1983). "Hemin stimulating effect on colony formation of leukemic and bone marrow cells." *Exp Hematol* 11(2): 147-153.

Rozin, A. P., Y. Braun-Moscovici, et al. (2006). "Serum-synovial gradient data of normouricemic patients with history of gout and acute knee effusion." *Clin Rheumatol* 25(6): 886-888.

Rumpold, H., D. Kraft, et al. (1982). "A monoclonal antibody against a surface antigen shared by human large granular lymphocytes and granulocytes." *J Immunol* 129(4): 1458-1464.

Ryan, T. C., G. J. Weil, et al. (1990). "Measurement of superoxide release in the phagovacuoles of immune complex-stimulated human neutrophils." *J Immunol Methods* 130(2): 223-233.

Saido, T. C., H. Sorimachi, et al. (1994). "Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement." *Faseb J* 8(11): 814-822.

Saikko, V. and T. Ahlroos (2000). "Wear simulation of UHMWPE for total hip replacement with a multidirectional motion pin-on-disk device: effects of counterface material, contact area, and lubricant." *Journal of biomedical materials research* 49(2): 147-154.

Saito, K., J. S. Elce, et al. (1993). "Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7): 2628-2632.

Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1997). "Caspases: intracellular signaling by proteolysis." *Cell* 91(4): 443-446.

Salvesen, G. S. and S. J. Riedl (2008). "Caspase mechanisms." *Adv Exp Med Biol* 615: 13-23.

Sanchez, I., C. J. Xu, et al. (1999). "Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats." *Neuron* 22(3): 623-633.

Sander, B., J. Andersson, et al. (1991). "Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure." *Immunol Rev* 119: 65-93.

Sandilands, G. P., Z. Ahmed, et al. (2005). "Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation." *Immunology* 114(3): 354-368.

Sanghavi, D. M., M. Thelen, et al. (1998). "Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils." *FEBS Lett* 422(2): 179-184.

Sawa, A., G. W. Wiegand, et al. (1999). "Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization." *Nat Med* 5(10): 1194-1198.

Scheel-Toellner, D., A. N. Akbar, et al. (2000). "Type I interferons inhibit the resolution of chronic inflammation." *Symposia of the Society for Experimental Biology* 52: 277-288.

Scheel-Toellner, D., K. Q. Wang, et al. (2004). "Early events in spontaneous neutrophil apoptosis." *Biochem Soc Trans* 32(Pt3): 461-464.

Schotte, P., W. Declercq, et al. (1999). "Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases." *FEBS Lett* 442(1): 117-121.

Schutt, C. (1999). "Fighting infection: the role of lipopolysaccharide binding proteins CD14 and LBP." *Pathobiology* 67(5-6): 227-229.

Seetoo, K. F., J. E. Schonhorn, et al. (1997). "A cytosolic calcium transient is not necessary for degranulation or oxidative burst in immune complex-stimulated neutrophils." *J Leukoc Biol* 62(3): 329-340.

Seita, J. and I. L. Weissman (2010). "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2(6): 640-653.

Serrano, F. and E. Klann (2004). "Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus." *Ageing Res Rev* 3(4): 431-443.

Shi, Y. (2002). "Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9." *Structure* 10(3): 285-288.

Shi, Y. (2004). "Caspase activation: revisiting the induced proximity model." *Cell* 117(7): 855-858.

Shi, Y. (2006). "Mechanical aspects of apoptosome assembly." *Curr Opin Cell Biol* 18(6): 677-684.

Shields, D. C., W. R. Tyor, et al. (1998). "Increased calpain expression in activated glial and inflammatory cells in experimental allergic encephalomyelitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10): 5768-5772.

Shimizu, S., T. Kanaseki, et al. (2004). "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes." *Nat Cell Biol* 6(12): 1221-1228.

Shizuru, J. A., R. S. Negrin, et al. (2005). "Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system." *Annu Rev Med* 56: 509-538.

Siiman, O., A. Burshteyn, et al. (2001). "Competitive antibody binding to soluble CD16B antigen and CD16B antigen on neutrophils in whole blood by flow cytometry." *Cytometry* 44(1): 30-37.

Simon, S. I. and C. E. Green (2005). "Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation." *Annu Rev Biomed Eng* 7: 151-185.

Simon, S. I., M. R. Sarantos, et al. (2009). "Leucocyte recruitment under fluid shear: mechanical and molecular regulation within the inflammatory synapse." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(2): 217-224.

Singer, J.M., Plotz, C.M., Goldberg, R. (1965). "The detection of anti-globulin factors utilizing pre-coated latex particules." *Arthritis Rheum.* 8:194-202.

Sluis, K., C. G. Magnusson, et al. (1985). "Inhibition of idiotype-anti-idiotype reaction in particle counting immunoassay as a tentative assay of IgE." *J Immunol Methods* 76(2): 255-261.

Smolewski, P., E. Bedner, et al. (2001). "Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry." *Cytometry* 44(1): 73-82.

Socinski, M. A., S. A. Cannistra, et al. (1988). "Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man." *Lancet* 1(8596): 1194-1198.

Soehnlein, O. and L. Lindbom (2009). "Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system." *J Leukoc Biol* 85(3): 344-351.

Soriani, M., D. Pietraforte, et al. (1994). "Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals." *Arch Biochem Biophys* 312(1): 180-188.

Sorimachi, H., S. Ishiura, et al. (1997). "Structure and physiological function of calpains." *Biochem J* 328 (Pt 3): 721-732.

Sorimachi, H. and K. Suzuki (2001). "The structure of calpain." *J Biochem (Tokyo)* 129(5): 653-664.

Sparano, J. A., A. O'Neill, et al. (2000). "Phase II trial of doxorubicin and docetaxel plus granulocyte colony-stimulating factor in metastatic breast cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1196." *J Clin Oncol* 18(12): 2369-2377.

Sparano, J. A., J. Speyer, et al. (1999). "Phase I trial of escalating doses of paclitaxel plus doxorubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer." *J Clin Oncol* 17(3): 880-886.

Squier, M. K., A. J. Schnert, et al. (1999). "Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis." *J Cell Physiol* 178(3): 311-319.

Steiner, P., M. Otth, et al. (2009). "Autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in children with acute pneumonia." *FEMS Immunol Med Microbiol* 57(2): 125-128.

Steinkamp, J. A., J. S. Wilson, et al. (1982). "Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres." *Science* 215(4528): 64-66.

Stem Cells, 2001. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001.
<http://stemcells.nih.gov/info/scireport>

Stennicke, H. R., Q. L. Deveraux, et al. (1999). "Caspase-9 can be activated without proteolytic processing." *J Biol Chem* 274(13): 8359-8362.

Stennicke, H. R., J. M. Jurgensmeier, et al. (1998). "Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8." *J Biol Chem* 273(42): 27084-27090.

Stewart, S., B. Zhu, et al. (1984). "A "serum-free" medium for the production of erythropoietic bursts by murine bone marrow cells." *Exp Hematol* 12(5): 309-318.

Stoka, V., B. Turk, et al. (2001). "Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route." *J Biol Chem* 276(5): 3149-3157.

Strijbos, P. J. and N. J. Rothwell (1995). "Interleukin-1 beta attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor." *J Neurosci* 15(5 Pt 1): 3468-3474.

Sugaya, K., M. Chouinard, et al. (1996). "Molecular indices of neuronal and glial plasticity in the hippocampal formation in a rodent model of age-induced spatial learning impairment." *J Neurosci* 16(10): 3427-3443.

Sutherland, F. J., D. Bar-Or, et al. (2002). "Attenuation of trace element-mediated injury during ischemia and reperfusion by an N-terminus analogue of human albumin (H4DUS60131)." *J Cardiovasc Pharmacol* 39(5): 722-728.

Sutton, V. R., J. E. Davis, et al. (2000). "Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation." *J Exp Med* 192(10): 1403-1414.

Suzuki, M., R. J. Youle, et al. (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." *Cell* 103(4): 645-654.

Tabernero, A., B. Granda, et al. (2002). "Albumin promotes neuronal survival by increasing the synthesis and release of glutamate." *J Neurochem* 81(4): 881-891.

Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9): 621-632.

Takeda, K. and S. Akira (2004). "Microbial recognition by Toll-like receptors." *J Dermatol Sci* 34(2): 73-82.

Tanno, Y. and J. A. Denburg (1986). "Long term growth of factor-producing lymphoid and myeloid cells in serum-free medium." *Cell Struct Funct* 11(3): 209-217.

Thomas, L. W., C. Lam, et al. (2010). "Mcl-1; the molecular regulation of protein function." *FEBS Lett* 584(14): 2981-2989.

Thomas, R., L. S. Davis, et al. (1994). "Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting dendritic cells." *J Immunol* 152(5): 2613-2623.

Thornberry, N. A., H. G. Bull, et al. (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." *Nature* 356(6372): 768-774.

Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* 281(5381): 1312-1316.

Toda, G., S. Matsushita, et al. (1989). "Calcium-activated neutral protease inhibitor (E-64c) and reperfusion for experimental myocardial infarction." *Jpn Heart J* 30(3): 375-386.

Tortorella, C., O. Simone, et al. (2007). "Age-related impairment of GM-CSF-induced signalling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins." *Ageing Res Rev* 6(2): 81-93.

Tosi, M. F. and H. Zakem (1992). "Surface expression of Fc gamma receptor III (CD16) on chemoattractant-stimulated neutrophils is determined by both surface shedding and translocation from intracellular storage compartments." *J Clin Invest* 90(2): 462-470.

Travis, J. and G. S. Salvesen (1983). "Human plasma proteinase inhibitors." *Annu Rev Biochem* 52: 655-709.

Trevani, A. S., G. Andonegui, et al. (1996). "Neutrophil apoptosis induced by proteolytic enzymes." *Lab Invest* 74(3): 711-721.

Tseng, Y. M., S. Y. Chen, C. H. Chen, Y. R. Jin, S. M. Tsai, I. J. Chen, J. H. Lee, C. C. Chiu, et L. Y. Tsai. 2008. Effects of alcohol-induced human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) pretreated whey protein concentrate (WPC) on oxidative damage. *J Agric Food Chem* 56:8141-8147.

Tsuji, T., S. Shimohama, et al. (1998). "m-Calpain (calcium-activated neutral proteinase) in Alzheimer's disease brains." *Neurosci Lett* 248(2): 109-112.

Turk, B., V. Stoka, et al. (2002). "Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases." *Biol Chem* 383(7-8): 1035-1044.

Turner, M., E. Schweighoffer, et al. (2000). "Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling." *Immunol Today* 21(3): 148-154.

Ueda, K. and T. Komano (1984). "Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxyphenyl)mitomycin C." *Nucleic Acids Res* 12(17): 6673-6683.

Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Toll-like receptors: key mediators of microbe detection." *Curr Opin Immunol* 14(1): 103-110.

van der Velden, W. J., N. M. Blijlevens, et al. (2008). "The potential role of lactoferrin and derivatives in the management of infectious and inflammatory complications of hematology patients receiving a hematopoietic stem cell transplantation." *Transpl Infect Dis* 10(2): 80-89.

van Snick, J. L. and P. L. Masson (1978). "The effect of complement on the ingestion of soluble antigen-antibody complexes and IgM aggregates by mouse peritoneal macrophages." *J Exp Med* 148(4): 903-914.

Vandenabeele, P., L. Galluzzi, et al. (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10): 700-714.

Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, et al. (1998). "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally." *Immunity* 9(2): 267-276.

Velde, L. F., I. Vermes, et al. (1996). "Apoptotic cell death, detected ex vivo in peripheral blood lymphocytes of HIV-1 infected persons." *Mediators Inflamm* 5(5): 379-381.

Vieira, O. V., R. J. Botelho, et al. (2002). "Phagosome maturation: aging gracefully." *Biochem J* 366(Pt 3): 689-704.

Villunger, A., L. A. O'Reilly, et al. (2000). "Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes." *J Exp Med* 192(5): 647-658.

Villunger, A., C. Scott, et al. (2003). "Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival." *Blood* 101(6): 2393-2400.

von Gunten, S., S. Yousefi, et al. (2005). "Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment." *Blood* 106(4): 1423-1431.

von Gunten, S. and H. U. Simon (2007). "Autophagic-like cell death in neutrophils induced by autoantibodies." *Autophagy* 3(1): 67-68.

Voros, K., L. Graf, Jr., et al. (2011). "Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction." *European journal of clinical investigation*. (doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02456.x).

Wada, T. and J. M. Penninger (2004). "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation." *Oncogene* 23(16): 2838-2849.

Wagatsuma, A., Y. Yamazaki, et al. (2001). "Molecular properties and gene expression of albumin in the skeletal muscle following hindlimb immobilization in a shortened position." *Acta Neuropathol* 101(6): 540-546.

Walensky, L. D., K. Pitter, et al. (2006). "A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX." *Mol Cell* 24(2): 199-210.

Wan, Y. J., Y. Cai, C. Cowan, et T. R. Magee. (2000). "Fatty acyl-CoAs inhibit retinoic acid-induced apoptosis in Hep3B cells." *Cancer Lett* 154:19-27.

Wang, C. and R. J. Youle (2009). "The role of mitochondria in apoptosis*." *Annu Rev Genet* 43: 95-118.

Wang, K. K. (2000). "Calpain and caspase: can you tell the difference?" *Trends Neurosci* 23(1): 20-26.

Wang, S., M. Miura, et al. (1998). "Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE." *Cell* 92(4): 501-509.

Wang, Y., M. Sakuma, et al. (2005). "Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury." *Circulation* 112(19): 2993-3000.

Ward, C., A. Walker, et al. (2004). "Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB." *Biochem Soc Trans* 32(Pt3): 465-467.

Ward, P. P., M. Mendoza-Meneses, et al. (2008). "Stimulus-dependent impairment of the neutrophil oxidative burst response in lactoferrin-deficient mice." *Am J Pathol* 172(4): 1019-1029.

Wasil, M., B. Halliwell, et al. (1987). "The antioxidant action of human extracellular fluids. Effect of human serum and its protein components on the inactivation of alpha 1-antiproteinase by hypochlorous acid and by hydrogen peroxide." *Biochem J* 243(1): 219-223.

Watson, R. W., O. D. Rotstein, et al. (1998). "The IL-1 beta-converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1 beta." *J Immunol* 161(2): 957-962.

Weber, C. (2003). "Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules." *J Mol Med* 81(1): 4-19.

Wei, J., G. Wayman, et al. (1996). "Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo." *J Biol Chem* 271(39): 24231-24235.

Weinmann, P., P. Gaehdgens, et al. (1999). "Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3." *Blood* 93(9): 3106-3115.

Weisbart, R. H., D. W. Golde, et al. (1985). "Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator." *Nature* 314(6009): 361-363.

Weisbart, R. H., D. W. Golde, et al. (1986). "Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors." *J Immunol* 137(11): 3584-3587.

Weissman, I. L. (2000). "Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities." *Science* 287(5457): 1442-1446.

Weissman, I. L., D. J. Anderson, et al. (2001). "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 387-403.

Werlen, G., B. Hausmann, et al. (2003). "Signaling life and death in the thymus: timing is everything." *Science* 299(5614): 1859-1863.

Wickremasinghe, R. G., K. Ganeshaguru, et al. (2001). "Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells." *Br J Haematol* 114(3): 608-615.

Williams, K. M. and T. Marshall (2001). "Protein concentration of cerebrospinal fluid by precipitation with Pyrogallol Red prior to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biochem Biophys Methods* 47(3): 197-207.

Wolf, B. B., J. C. Goldstein, et al. (1999). "Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation." *Blood* 94(5): 1683-1692.

Wolf, B. B. and D. R. Green (1999). "Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases." *J Biol Chem* 274(29): 20049-20052.

Wong, S. H., N. Francis, et al. (2009). "Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid." *Rheumatology (Oxford)* 48(1): 39-44.

Woo, M., R. Hakem, et al. (1998). "Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes." *Genes Dev* 12(6): 806-819.

Wright, H. L., R. J. Moots, et al. (2010). "Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases." *Rheumatology (Oxford)* 49(9): 1618-1631.

Xu, Y., F. Loison, et al. (2010). "Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3Kgamma, ROS, and actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7): 2950-2955.

Yamagiwa, H., G. Sarkar, et al. (2003). "Two-dimensional gel electrophoresis of synovial fluid: method for detecting candidate protein markers for osteoarthritis." *J Orthop Sci* 8(4): 482-490.

Yamaguchi, M., A. Igarashi, et al. (2003). "Enhancement of albumin expression in bone tissues with healing rat fractures." *J Cell Biochem* 89(2): 356-363.

Yamamoto, K. and H. Sinohara (1993). "Isolation and characterization of mouse countertrypsin, a new trypsin inhibitor belonging to the mammalian fetuin family." *J Biol Chem* 268(24): 17750-17753.

Yamashita, K., A. Takahashi, et al. (1999). "Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production." *Blood* 93(2): 674-685.

Yan, S. R., K. Sapru, et al. (2004). "The CD11/CD18 (beta2) integrins modulate neutrophil caspase activation and survival following TNF-alpha or endotoxin induced transendothelial migration." *Immunol Cell Biol* 82(4): 435-446.

Yang, F., Z. Schwartz, et al. (1991). "Alpha 2-HS-glycoprotein: expression in chondrocytes and augmentation of alkaline phosphatase and phospholipase A2 activity." *Bone* 12(1): 7-15.

Yang, T., K. M. Kozopas, et al. (1995). "The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2." *J Cell Biol* 128(6): 1173-1184.

Yang, X. L. and A. H. Wang (1999). "Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA." *Pharmacol Ther* 83(3): 181-215.

Yilmaz, G. and D. N. Granger (2010). "Leukocyte recruitment and ischemic brain injury." *Neuromolecular Med* 12(2): 193-204.

Yokota, M., E. Tani, et al. (1999). "Calpain inhibitor entrapped in liposome rescues ischemic neuronal damage." *Brain Res* 819(1-2): 8-14.

Yoshida, K., Y. Suzuki, et al. (1996). "Cystatin-like domain of mouse countertrypsin, a member of mammalian fetuin family, is responsible for the inhibition of trypsin. Evidence from site-directed mutagenesis." *Biochem Mol Biol Int* 39(5): 1023-1028.

Youinou, P., V. Durand, et al. (2002). "Pathogenic effects of anti-Fc gamma receptor IIIb (CD16) on polymorphonuclear neutrophils in non-organ-specific autoimmune diseases." *Autoimmun Rev* 1(1-2): 13-19.

Yousefi, S., C. Mihalache, et al. (2009). "Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps." *Cell Death Differ* 16(11): 1438-1444.

Yuan, J., S. Shaham, et al. (1993). "The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." *Cell* 75(4): 641-652.

Yusuf-Makagiansar, H., M. E. Anderson, et al. (2002). "Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases." *Med Res Rev* 22(2): 146-167.

Zamzami, N., C. Brenner, et al. (1998). "Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins." *Oncogene* 16(17): 2265-2282.

Zhao, M., F. Antunes, et al. (2003). "Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis." *Eur J Biochem* 270(18): 3778-3786.

Zhao, M., U. T. Brunk, et al. (2001). "Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2." *FEBS Lett* 509(3): 399-404.

Zhivotovsky, B., A. Gahm, et al. (1997). "Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* 233(1): 96-101.

Zhou, B. P., Y. Liao, et al. (2001). "Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells." *Nat Cell Biol* 3(3): 245-252.

Zhu, X., K. J. Hamann, et al. (1998). "Intracellular expression of Fc gamma RIII (CD16) and its mobilization by chemoattractants in human eosinophils." *J Immunol* 161(5): 2574-2579.

Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." *Pharmacol Ther* 92(1): 57-70.

Zoellner, H., M. Hofler, et al. (1996). "Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells." *J Cell Sci* 109 (Pt 10): 2571-2580.

Zoellner, H., J. Y. Hou, et al. (1999). "Inhibition of microvascular endothelial apoptosis in tissue explants by serum albumin." *Microvasc Res* 57(2): 162-173.

Zornig, M., A. Hueber, et al. (2001). "Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis." *Biochim Biophys Acta* 1551(2): F1-37.

<http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DES/A1.html>
www.Calbiochem.com/akt

Marqueurs de surface

Marqueur de surface	Nom	Ligands	Expression
CD9	cell-surface glycoprotein (p24) ou platelet p24	CD63, CD81, CD82	Plaquettes, pré-B, eosino, baso, endoth, épith, T activées
CD11b	Mac-1 α integrin, récepteur C3bi	CD54, iC3b, CD50, CD102	Gran,mono, NK T,B, DC
CD11c	P150/95 integrin α X, CR4	Fibrinogène, CD54, iC3b	Mono/Mac, Gran, NK, DC, T/B subset
CD14	LPS-R	LPS	Mono/Mac, Lang, Gran,
CD15	Lewis X, granulocytes associated antigen	CD62	Gran, mono,
CD16b	FcR γ IIIB	IgG	Gran
CD18	Leucocyte function associated-1 antigen beta chaine, β 2 integrin	Association CD 11a,b,c	Leucocytes
CD29	Integrin β 1,	VCAM-1	T,B, mono, Gran, fibro,endoth, NK, mast, plaquettes
CD32	FcR γ II	IgG	B, mono, Gran, plaquettes, endo,
CD35	Récepteur C3b-C4b, CR1 (complement receptor-1)	C3b, C4b,	Eryth, Gran, mono, B
CD36	gpIIb (glycoprotein IIIb)	Thrombospondine, collagène,LDL oxydés,	Mono,plaquettes, endoth,
CD43	Sialophorine, leukosialine	CD54	T, NK. Gran,
CD45	Leucocyte common antigen	Galectine-1	Lympho,mono, Gran, baso, eosino,
CD49d CD49e	VLA-4 (α 4 integrin) VLA-5 (α 5 integrin)	Association CD29, VCAM-1, fibronectine,	Lympho, mono,thymo, NK, B,T, baso, endoth, épith,plaquettes
CD54	ICAM-1	CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD43	Endoth, épith, mono,
CD55	Decay accelerating factor (DAF)	C3b, C4b, CD97	Hémato,
CD62 P CD62L-CD62E	Sélectine-P, -L, -E	CD162, CD24, CD34, CD15	Plaquettes, B,T, Mono, Gran, NK, thymo, endoth
CD63	LIMP, LAMP-3	VLA-3, VLA-4, CD9, CD81	Plaquettes, mono/mac, neutron, fibro, ostéo
CD64	FcR γ I	IgG	Mono/mac, DC, act Gran
CD66b	Non-specific cross-reacting antigen (NCA)	CD66c	Neutro
CD68	Macrosialin	LDL	Intracell mono/mac, Gran, DC, myélo,
CD95	FAS/APO-1	Fas ligand (CD95L)	T,B, NK, mono, neutro, fibro
CD162	PSGL-1 (p-selectin glycoprotein ligand-1)	CD62P, CD62L	Mono, neutro, lympho, moëlle osseuse