

Université de Sherbrooke

Effets de l'hypoxie sur la production des cytokines par le neutrophile humain

Par
Rim Bouchelaghem
Programme d'Études Supérieures en Immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc) en immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Avril, 2013

Membres du jury d'évaluation
Pr Patrick McDonald, Département de médecine, Codirecteur de recherche
Pre Claire Dubois, Département de pédiatrie, Codirectrice de recherche
Pr Marek Rola-Pleszczynski, Département de pédiatrie, Évaluateur
Pr Claude Asselin, Département d'anatomie et biologie cellulaire, Évaluateur

© Rim Bouchelaghem, 2013



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-499-00389-8

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00389-8

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ

Effets de l'hypoxie dans la production des cytokines par le neutrophile humain

Par Rim Bouchelaghem, MD, Département de pédiatrie, Service d'immunologie
Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention
du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en immunologie, Faculté de médecine et des
sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La production de cytokines et chimiokines par les polymorphonucléaires (PMN) est une fonction importante dans la réponse inflammatoire. La phagocytose et la migration, ainsi que d'autres fonctions des PMN changent en milieu hypoxique. Il est bien connu que la régulation par l'hypoxie dépend principalement de l'activation du facteur de transcription HIF, cependant, l'effet de l'hypoxie sur la production des cytokines n'est pas encore établi. Notre hypothèse est que l'hypoxie change le profil de production des cytokines et chimiokines dans les neutrophiles humains en réponse aux agonistes en impliquant HIF.

Dans ce travail, nous avons tout d'abord démontré que les PMN expriment constitutivement HIF-2 α et HIF-3 α . De plus, les agonistes G-CSF, GM-CSF, TNF α ou LPS augmentent l'expression de HIF-1 α en hypoxie. D'autre part, nous avons démontré que l'hypoxie seule induit la sécrétion de TNF α et MIP-3 α et modifie les niveaux des MIP-1 α /1 β , IL-8 et MIP-3 α produites en réponse au GM-CSF, LPS et PGN. Ceci suggère que l'hypoxie oriente la production des cytokines dans les PMN de façon dépendante du stimulus et témoigne d'une mobilisation des voies de signalisation et des facteurs de transcription différente de celle connue en normoxie. Par la suite, nous avons étudié les mécanismes qui pourraient être à l'origine de ces modifications tels que la voie des MAPK p42/p44, STAT3, ERK, JNK et C/EBP- β . D'autre part, nous avons montré que la production inédite d'IL-8 par G-CSF en hypoxie dépend de STAT3 et p38 et que cette production met en jeu l'action autocrine des cytokines endogènes IL-18, IL-1 α et TNF α . De plus, l'utilisation d'une lignée cellulaire PLB-985 différenciée en PMN portant une mutation sur les sites consensus du NF- κ B ou HIF, nous a permis de démontrer que non seulement l'hypoxie seule ou associée au G-CSF, GM-CSF, TNF α ou au LPS régule l'activité de ce promoteur, mais le HIF régule aussi cette activité en normoxie.

Finalement, les travaux présentés dans ce mémoire démontrent que l'hypoxie modifie l'expression et la production des cytokines par les neutrophiles humains de façon différente de la normoxie. Si le rôle crucial des neutrophiles dans l'inflammation physiologique et pathologique basé sur leur production des cytokines a été largement documenté en normoxie, il est primordial de réaliser des études pour approfondir ce rôle en considérant l'effet de l'hypoxie.

Mots clés : Neutrophile humain, hypoxie, facteur de transcription HIF, chimiokine, inflammation.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-------------|
| RÉSUMÉ | iii |
| Table des matières | iv |
| Liste des figures | vi |
| Liste des tableaux | vii |
| Liste des abréviations | viii |
| 1. Introduction | 1 |
| 1.1. Le neutrophile humain | 1 |
| 1.1.1. Origine du neutrophile | 1 |
| 1.1.2. Le neutrophile en circulation | 2 |
| 1.1.3. Activation du neutrophile | 2 |
| 1.1.4. Fonctions du neutrophile | 4 |
| 1.1.4.1. Migration transendothéliale et transtissulaire | 4 |
| 1.1.4.2. Chimiotaxie | 5 |
| 1.1.4.3. Phagocytose | 5 |
| 1.1.4.4. Dégranulation | 7 |
| 1.1.4.5. Formation des espèces réactives oxygénées (ROS) | 8 |
| 1.1.4.6. Formation des NETs (« neutrophil extracellular traps ») | 9 |
| 1.1.4.7. Formation de médiateurs inflammatoires lipidiques | 10 |
| 1.1.4.8. Formation de médiateurs inflammatoires peptidiques | 11 |
| 1.1.5. Neutrophile et pathologies | 14 |
| 1.2. Régulation de la production des cytokines chez le neutrophile humain | 15 |
| 1.2.1. Régulation transcriptionnelle des cytokines | 16 |
| 1.2.1.1. Absence de rôle de AP-1 | 17 |
| 1.2.1.2. Implication de NF- κ B | 17 |
| 1.2.1.3. Implication de C/EBP | 19 |
| 1.2.1.4. Rôle non démontré pour les STATs | 20 |
| 1.2.2. Voies de signalisation intracellulaire | 20 |
| 1.3. Hypoxie | 21 |
| 1.3.1. Réponse cellulaire à l'hypoxie | 22 |
| 1.3.2. Facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF) | 25 |
| 1.3.2.1. Structure et rôle des sous-unités HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , et HIF-1 β | 27 |
| 1.3.2.2. Régulation des facteurs HIF | 29 |
| 1.3.3. Hypoxie et immunité innée | 36 |
| 1.3.3.1. HIF chez les monocytes/macrophages | 36 |
| 1.3.3.2. HIF chez les cellules dendritiques | 37 |
| 1.3.3.3. HIF chez le neutrophile | 38 |
| 1.3.4. HIF comme cible thérapeutique | 39 |
| 2. Objectifs de recherche | 41 |
| 3. Matériel et méthodes | 42 |
| 4. RÉSULTATS | 48 |
| 4.1. Expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains au repos en normoxie | 48 |

| | |
|--|------------|
| 4.2. Modulation par l'hypoxie ou l'inhibition des PHD par le DMOG des protéines HIF chez les neutrophiles humains au repos | 51 |
| 4.3. Effet des agonistes des PMN sur l'expression des HIF en présence ou en absence d'hypoxie | 55 |
| 4.4. Activation des protéines HIF sous hypoxie chez les neutrophiles humains | 61 |
| 4.5. Influence de l'hypoxie/DMOG sur la sécrétion des cytokines par les agonistes chez les neutrophiles humains | 63 |
| 4.6. Induction de l'expression des transcrits d'ARNm des cytokines par le DMOG/GM-CSF | 73 |
| 4.7. Effets de l'hypoxie sur les protéines des voies de signalisation intracellulaire exprimées chez les neutrophiles humains | 76 |
| 4.8. Mécanismes cellulaires mobilisés par le G-CSF sous hypoxie | 79 |
| 4.8.1. Effet de l'hypoxie sur la signalisation dépendante du G-CSF | 79 |
| 4.8.2. Effet de l'inhibition des STAT3 et p38 sur la production d'IL-8..... | 79 |
| 4.8.3. Action autocrine des cytokines endogènes dans la production d'IL-8 par le G-CSF sous hypoxie | 82 |
| 4.8.4. Voies mobilisées par le TNF α sous hypoxie..... | 85 |
| 4.9. Contribution de l'hypoxie dans l'activation du promoteur d'IL-8 chez les neutrophiles humains sous conditions inflammatoires | 87 |
| 4.9.1. Expression de HIF-1 α dans les cellules PLB-985 durant la différenciation en neutrophiles..... | 87 |
| 4.9.2. Activation différentielle du promoteur d'IL-8 chez les cellules PLB-985 différenciées en neutrophiles sous hypoxie en réponse aux stimuli inflammatoires..... | 89 |
| 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS..... | 92 |
| 6. CONCLUSION GÉNÉRALE | 102 |
| 7. REMERCIEMENTS | 103 |
| 7. BIBLIOGRAPHIE..... | 104 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Chimioquinas sécrétées par les neutrophiles et leurs cibles cellulaires. | 13 |
| Figure 2. Exemples des gènes dépendant de HIF et leurs fonctions biologiques. | 23 |
| Figure 3. Représentation schématique des membres de la famille HIF. | 26 |
| Figure 4. Régulation de la protéine HIF- α par les PHD. | 31 |
| Figure 5. Les principaux agents pharmacologiques et les mécanismes moléculaires d'inhibition de HIF-1. | 40 |
| Figure 6. Expression des protéines HIF chez les neutrophiles (PMN). | 50 |
| Figure 7. Effet du DMOG ou de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains. | 52 |
| Figure 8. Effet de l'hypoxie sur la stabilité de la protéine HIF-3 α chez les neutrophiles | 54 |
| Figure 9. Effet de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains en réponse au G-CSF. | 57 |
| Figure 10. Effet de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains en réponse au GM-CSF. | 58 |
| Figure 11. Effet de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains en réponse au LPS. | 59 |
| Figure 12. Effet de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains en réponse au TNF α | 60 |
| Figure 13. Distribution cellulaire des protéines HIF chez les neutrophiles (PMN) exposés ou non à l'hypoxie. | 62 |
| Figure 14. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production des chimioquinas par le G-CSF chez les neutrophiles. | 66 |
| Figure 15. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production des chimioquinas par le GM- CSF chez les neutrophiles. | 67 |
| Figure 16. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production des chimioquinas par le LPS chez les neutrophiles. | 68 |
| Figure 17. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production des chimioquinas par le PGN chez les neutrophiles. | 69 |
| Figure 18. Effet de l'hypoxie sur la production d'IP-10 par les agonistes des neutrophiles humains. | 70 |
| Figure 19. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production de l'IL-6 par les agonistes des neutrophiles. | 71 |
| Figure 20. Effet du DMOG sur l'expression induite par le GM-CSF des gènes de cytokines/chimioquinas chez le neutrophile humain. | 75 |
| Figure 21. Effet de l'hypoxie sur les protéines des voies de signalisation intracellulaire exprimées chez les neutrophiles humains. | 78 |
| Figure 22. Effet de l'hypoxie sur la signalisation mobilisée par G-CSF chez les neutrophiles | 81 |
| Figure 23. Mécanismes impliqués dans la production d'IL-8 par le G-CSF sous hypoxie. | 84 |
| Figure 24. Voies de signalisation mobilisées par le TNF α en présence de G-CSF ou hypoxie. | 86 |
| Figure 25. Réponses des cellules PLB-985 à l'hypoxie et au DMOG. | 88 |
| Figure 26. Effet de l'hypoxie sur l'activité du promoteur d'IL-8 chez les PLB-985 différenciées en neutrophiles en réponse aux agonistes des neutrophiles. | 91 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Localisation des quatre gènes codant les protéines HIF chez l'humain..... | 26 |
| Tableau 2. Séquences des oligonucléotides utilisés dans l'analyse par Q-PCR | 45 |
| Tableau 3. Modulation de la sécrétion des cytokines et chimiokines par l'hypoxie chez les neutrophiles humains. | 72 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-------------------------------|---|
| 4EBP | eucaryotic translation initiator factor 4E-binding protein |
| 5-LO | 5-lipooxygénase |
| ADNc | acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AP-1 | adapter protein complex 1 |
| AR | arthrite rhumatoïde |
| ARNm | acide ribonucléique messenger |
| ARNT | aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator |
| bHLH | basic helix-loop-helix |
| BLys | B lymphocyte stimulator |
| BSA | albumine de sérum bovin |
| C5a | complement component 5a |
| C/EBP | CCAAT/enhancer-binding protein |
| COX-2 | cyclooxygénase-2 |
| CREB | cAMP response element-binding protein |
| DC-SIGN | dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin |
| eIF4E | eucaryotic translation initiation factor 4E |
| ENA-78 | epithelial neutrophil-activating peptide-78 |
| EPAS | endothelial PAS domain protein |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase |
| fMLP | N-formyl-methionyl-leucine-phenylalanine |
| G-CSF | facteur stimulateur des colonies de granulocytes |
| GM-CSF | facteur stimulateur des colonies de granulocytes et de macrophages |
| Gro | growth-regulated oncogene |
| HRE | hypoxia response element |
| IgG | immunoglobuline |
| IκB | inhibitor of kappa B |
| IKK | kinase I κ B |
| IL | interleukine |
| INFγ | interferon gamma |
| IP-10 | interferon gamma-induced protein 10 |
| I-TAC | T-cell alpha chemoattractant |
| IRES | internal ribosome entry site |
| IRP | iron regulatory protein |
| JNK1 | c-Jun N-terminal kinase 1 |
| HAT | histone acetyl transferase |
| LAD-1 | leukocyte adhesion deficiency type 1 |
| LPS | lipopolysaccharide |
| LTB₄ | leucotriène-B ₄ |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MEC | matrice extracellulaire |
| MEK | MAPK/ERK kinase |
| MIG | monokine induced by interferon γ |
| Mip | macrophage inflammatory protein |
| miR | microARN |

| | |
|---------------------------------|--|
| mmHg | millimètre de mercure |
| MNK1 | MAPK-interacting kinase |
| MO | mœlle osseuse |
| MPO | myéloperoxidase |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| NADPH | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NAT | neutrophil associated tumor |
| NET | neutrophil extracellular trap |
| NF-κB | nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells |
| NK | naturel killer cell |
| Nox | NADPH oxydase |
| O₂-• | anion superoxyde |
| OH• | radical hydroxyle |
| PAF | platelet activating factor |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern |
| PAS | Per-Arnt-Sim |
| PERK | endoplasmic reticulum kinase PKR-like ER kinase |
| phox | phagocytic oxydase |
| PI3K | phosphoinositide-3-kinase |
| PMN | polymorphonucléaire neutrophile |
| pO₂ | pression partielle en O ₂ |
| PGN | prostaglandine |
| PHD | prolyl-hydroxylase |
| PRR | pattern recognition receptor |
| PTB | polypyrimidine tract-binding protein |
| PVL | Panton-Valentine leukocidin |
| RBP | RNA-binding-protein |
| RHD | N-terminal Rel homology domain |
| ROS | reactive oxygen species |
| SDF-1α | stromal cell derived factor 1 α |
| SOD | superoxyde dismutase |
| STAT | signal transducer and activator of transcription |
| SUMO | small ubiquitin-related modifier |
| TAK1 | TGF beta activating kinase I |
| TECK | thymus-expressed chemokine |
| TGFβ | transforming growth factor-beta |
| TNFα | tumor necrosis factor-alpha |
| TTP | tristétraproline |
| UPR | unfolded protein response |
| UTR | untranslated region |

1. INTRODUCTION

1.1. Le neutrophile humain

1.1.1. Origine du neutrophile

Les neutrophiles représentent 50% à 70% de l'ensemble des leucocytes. Ils sont dérivés de précurseurs myéloïdes communs qui se différencient dans la moëlle osseuse (MO) sous l'action de facteurs hématopoïétiques (G-CSF et GM-CSF) et de cascades d'activation de facteurs de transcription, dont les principaux sont STAT3, C/EBP et PU.1 (Friedman, 2002; Zhang *et al.*, 2010b). Les précurseurs suivent plusieurs stades de différenciation pour aboutir au bout de 10-14 jours à un neutrophile mature. On définit successivement ces stades en stade de myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, cellule polysegmentaire, cellule non segmentée et enfin le stade de la cellule segmentée mature. À cette dernière étape, le neutrophile mesure 12-15 μm de diamètre. Il se distingue par deux caractéristiques morphologiques, soit la condensation nucléaire, donnant au noyau une forme polylobée (2 à 5 lobes) qui est due à la dissociation de la chromatine par des filaments d'hétérochromatine, et la granulosité, due à la présence de nombreux granules dans le cytoplasme qui apparaissent successivement au cours de la maturation du précurseur granulocytaire à partir du stade myéloblaste. Cette granulosité est également un indicateur de la différenciation des progéniteurs en neutrophile mature dans la MO et sont donc un marqueur de la granulopoïèse. Un aspect particulier aux neutrophiles des personnes de sexe féminin est la présence du chromosome X inactif sous forme d'un appendice filamentaire associé au noyau (Sanchez *et al.*, 1997).

1.1.2. Le neutrophile en circulation

Les neutrophiles matures de la MO peuvent y résider durant 5 jours formant ainsi la réserve médullaire. Seul un petit nombre accède à la circulation sanguine, tandis que leur mobilisation augmente ce nombre jusqu'à 10 fois. Chez la souris, le pourcentage des neutrophiles matures circulants a été estimé à 1-2% du nombre total des cellules matures présentes dans la MO (Day *et al.*, 2011). En effet, le stroma dans lequel se trouvent les neutrophiles à l'intérieur de la MO est riche en "stromal cell derived factor 1 α " (SDF-1 α). Cette chimiokine favorise la rétention de cellules matures par l'intermédiaire du récepteur CXCR4. Dans un contexte inflammatoire, ces neutrophiles constituent des réserves qui seront rapidement relâchées dans la circulation sanguine en réponse à un signal chimiotactique. Une fois dans le compartiment sanguin, une partie des neutrophiles circule au sens propre du terme : ceci représente 49% des neutrophiles, et c'est la seule fraction qui peut être isolée directement lors de prélèvements sanguins (Summers *et al.*, 2010). Le 51% restant se trouve accolé aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, et représente le groupe marginal. Ces PMN traversent les lits capillaires des tissus et sont rapidement mobilisables lors de l'inflammation aiguë (Summers *et al.*, 2010). Le nombre des cellules marginales est influencé par des conditions physiologiques ou pathologiques comme le stress, l'exercice physique et l'inflammation, qui délimitent le temps de passage des neutrophiles à travers les capillaires. Ce temps de passage diffère selon les organes (Summers *et al.*, 2010). L'excès de margination des neutrophiles et le défaut de leur margination induisent respectivement une neutropénie ou une leucocytose. Les neutrophiles sénescents sont éliminés dans trois organes, le foie, la rate et la MO, où ils entament l'apoptose et sont la cible d'une phagocytose par les macrophages stromaux (Furze *et al.*, 2008).

1.1.3. Activation du neutrophile

En réponse à des signaux d'activation, les neutrophiles interagissent avec les cellules endothéliales tapissant la paroi vasculaire enflammée, ce qui constitue un événement

primordial dans la migration et l'extravasation des PMNs (Goldsby et al, 2001). Les cellules endothéliales et les neutrophiles modifient l'expression, la fonction et la distribution de leurs molécules d'adhésion dont les principaux types sont les sélectines, les intégrines et la famille des immunoglobulines. En premier lieu, les PMNs sont capturés par les cellules de l'endothélium et y adhèrent faiblement. Cette adhésion précoce et faible peut être rompue par le flux sanguin et se répète de façon à ce que les neutrophiles roulent le long de l'endothélium (Schmidt *et al.*, 2011). Des molécules d'adhésion de faible affinité réalisent ces interactions réversibles, s'agissant des E- et P-sélectines (exprimées sur les cellules endothéliales) et L-sélectines (exprimées sur les neutrophiles) (Lew, 1998 ; Yuan *et al.*, 2012). Les ligands des sélectines sont les mucines (Rosen et Bertozzi, 1994). CD34 et la « glycosylation-dependent cell adhesion molecule » (GlyCAM)-1 présents sur l'endothélium sont les ligands des L-sélectines. Le « P-selectin glycoprotein ligand » (PSGL)-1 et le CD44 présents sur les neutrophiles sont les ligands des E- et P-sélectines (Tu *et al.*, 1996 ; Katayama *et al.*, 2005). La liaison des sélectines et leurs ligands peut également entraîner la libération de calcium intracellulaire, la production de superoxyde et la production de cytokines chez les neutrophiles (Laudanna *et al.*, 1994). L'adhésion ferme entre les neutrophiles et les cellules endothéliales nécessite la formation d'interactions solides à leurs surfaces par l'expression des molécules d'adhésion de forte affinité. D'une part, l'activation de l'endothélium augmente l'expression des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines, dont ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule ») et PECAM (« platelet-endothelial cell adhesion molecule ») (Schmidt *et al.*, 2011). D'autre part, l'activation des neutrophiles induit l'activation des intégrines. En effet, les intégrines exprimées constitutivement par les PMN sont sous une forme inactive et leur activation favorise un changement de conformation et de localisation potentialisant ainsi la liaison efficace à leurs ligands (Zarbock *et al.*, 2011 ; Pick *et al.*, 2013). Les intégrines $\beta 2$ (telles que « lymphocyte function-associated antigen » (LFA)-1 et CD11d/CD18) reconnaissent les ligands des cellules endothéliales (Lefort *et al.*, 2012) tandis que les intégrines $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 7$ reconnaissent des composantes de la matrice extracellulaire (Lindbom et Werr, 2002). Les intégrines interagissent avec ICAM, VCAM et PECAM (Schmidt *et al.*, 2011). Les PMNs sont activés par les médiateurs pro-inflammatoires sécrétés localement, tels que les protéines du complément, les cytokines (TNF α , IL-1 β), les chimiokines (IL-8, Gro- α), les

médiateurs lipidiques (PAF, LTB₄), les particules (les microcristaux d'urate monosodique, ou de calcium pyrophosphate déshydraté) ou les produits des agents pathogènes (fMLP, LPS), les microbes opsonisés à l'IgG (levures, bactéries, champignons, virus), les enzymes protéolytiques, les composantes allergiques (éotaxine, I-309) (Scapini *et al.*, 2000 ; Amulic *et al.*, 2011a). Les chimiokines sont fixées sur les glycosaminoglycanes (telles que les héparanes sulfates) des surfaces endothéliales où elles s'exposent aux récepteurs des chimiokines des neutrophiles roulant sur l'endothélium aboutissant à leur arrêt (Tanino *et al.*, 2010 ; Gangavarapu *et al.*, 2012).

1.1.4. Fonctions du neutrophile

1.1.4.1. Migration transendothéliale et transtissulaire

Les neutrophiles doivent traverser l'endothélium et par la suite progresser dans le tissu en se dirigeant vers le lieu de l'agression. La migration transendothéliale (ou diapédèse) s'effectue dans la majorité des cas en se faufilant à travers les jonctions de cellules endothéliales. Un autre moyen de cette migration implique la transcytose à travers les cellules endothéliales (Marmon *et al.*, 2009 ; Borregaard, 2010). Cette étape nécessite l'interaction des PMN avec les protéines jonctionnelles, telles que PECAM-1, CD99, les « junctional adhesion molecules » (JAMs), les « vascular-endothelial » (VE)-cadhérines, les β -caténines, les occludines et les claudines (Zahler *et al.*, 2003 ; Zemans, 2009 ; Woodfin *et al.*, 2009). Au delà de l'endothélium, la traversée de la membrane basale implique les enzymes gélatinase et métalloprotéinases-9 (MMP-9). Ces enzymes sont libérées par exocytose à partir des granules à gélatinase et permettent la dégradation du collagène IV de la membrane basale (Reichel *et al.*, 2008). Une fois dans le tissu, les PMN migrent par chimiotaxie en interagissant avec les molécules de la matrice extracellulaire (MEC), telles que le collagène, l'élastine et GAG favorisant leur adhésion au tissu (Couture *et al.*, 2009).

1.1.4.2. Chimiotaxie

Les neutrophiles activés expriment des récepteurs de chimioattractants à leur surface et se déplacent dans le sens du gradient de chimioattractants par chimiotaxie. Les chimioattractants sont des molécules produites *in situ* par les cellules affectées au cours du processus inflammatoire, les leucocytes recrutés ainsi que certains produits bactériens. Il peut s'agir des composants du complément (C5a), peptides bactériens (formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine; fMLP), chimiokines (IL-8) ou de médiateurs lipidiques (LTB₄) (Cicchetti *et al.*, 2002 ; Williams *et al.*, 2011). Cependant, l'action simultanée des différents chimioattractants dans un site inflammatoire et la combinaison des récepteurs présents sur les surfaces cellulaires des PMN conduisent ces derniers à un lieu précis. Les neutrophiles trans migrants se déplacent en mouvements cycliques dans lesquels ils étendent le pseudopode à l'avant et rétractent leur partie arrière (Bodin *et al.*, 2005 ; Gane *et al.*, 2011). Cet événement implique des réorganisations du cytosquelette (Cicchetti *et al.*, 2002 ; Steinmann *et al.*, 2013).

1.1.4.3. Phagocytose

Au niveau du tissu lésé, le neutrophile élimine l'agent pathogène ou les particules étrangères par l'intermédiaire du contenu des granules. Ce contenu peut être mis en contact directement avec l'agent pathogène à l'extérieur de la cellule ou bien dans une structure intracytoplasmique appelée le phagosome réalisant la *phagocytose*. La phagocytose inclut trois étapes. 1) L'*adhésion* de la particule avec la membrane cytoplasmique du neutrophile implique les récepteurs de reconnaissance, les PRR (Pattern recognition receptor) (Thomas et Schroder, 2013). Les PRRs sont présents à la surface des neutrophiles, dans les endosomes et dans le cytosol et se lient à des motifs moléculaires conservés au cours de l'évolution des microorganismes : les PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) (Thomas et Schroder, 2013). Leur liaison avec les PAMPs déclenche plusieurs fonctions chez les neutrophiles, y compris la bactéricidie, la production des cytokines, la migration et l'apoptose (Thomas et Schroder, 2013). Les neutrophiles expriment également des récepteurs impliqués dans l'*opsonisation*. Cette dernière est un phénomène qui facilite et

augmente l'efficacité de l'adhésion par la reconnaissance des opsonines (particulièrement, les immunoglobulines et les protéines du complément dérivées de C3). Les PMN expriment constitutivement des récepteurs Fc de faible affinité, CD32a (FcγRIIa, récepteur d'IgG), CD16b (FcγRIIIb, récepteur d'IgG), CD89 (FcαR, récepteur d'IgA) et CD23 (FcεRI, récepteur d'IgE), tandis que l'expression du récepteur de haute affinité CD64 (FcγRI) est inductible par l'interféron-γ (IFNγ) produit par d'autres cellules immunitaires (Mantovani, 1975 ; Fleit *et al.*, 1989 ; Albrechtsen *et al.*, 1988 ; Gounni *et al.*, 2001). Les protéines dérivées du complément sont également des opsonines qui se lient aux récepteurs CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) ou CR4 (CD11c/CD18) (Rabellino *et al.*, 1978 ; Ross *et al.*, 1978 ; Dana *et al.*, 1984 ; Hickstein *et al.*, 1987 ; Myones *et al.*, 1988).

2) L'ingestion des petites particules ne nécessite pas de réarrangement membranaire. Les plus grosses particules nécessitent la formation d'un ou de plusieurs pseudopodes. Ces derniers sont formés par l'apparition d'une invagination de la membrane cytoplasmique des neutrophiles suivie de son extension selon un mécanisme dépendant de l'actine (Dale *et al.*, 2008). Le pseudopode englobe la bactérie ou la particule entraînant son internalisation qui aboutit à la formation d'un phagosome. Le phagosome en interagissant avec les différents compartiments d'endocytose, soient les endosomes précoces, les endosomes tardifs et enfin les lysosomes, subit une maturation, ce qui aboutit à la diminution de son pH et l'augmentation de son contenu en enzymes lytiques (telles que LIMP2 et Lamp2) ainsi qu'en NADPH oxydase (pour Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate; Nox) (Lee *et al.*, 2003 ; Nordenfelt et Tapper, 2011). La fusion du phagosome avec les lysosomes crée le phagolysosome (Vieira *et al.*, 2002). À ce niveau, la particule internalisée se trouve en contact des protéases lysosomales et finit par être digérée.

3) la digestion des particules ingérées survenant au sein du phagolysosome mature mène généralement à la destruction terminale des agents pathogènes. Elle est achevée par le rétablissement du pH intraluminal et l'élimination des fragments (Lee *et al.*, 2003 ; Nordenfelt et Tapper, 2011).

1.1.4.4. Dégranulation

Le cytoplasme du neutrophile comporte quatre types de granules classés en fonction de leur chronologie d'apparition, leur taille, leur morphologie et leur contenu. On distingue d'abord les granules primaires ou azurophiles, qui sont les premiers à apparaître, à partir de l'étape promyélocytaire. Ils contiennent principalement des molécules bactéricides, dont des enzymes protéolytiques et des peptides. Leur contenu est très riche en myéloperoxydase (MPO) et en protéases comme la cathepsine G, l'élastase ainsi que les défensines et le lysozyme. Les granules spécifiques apparaissent au stade myélocytaire. Ils sont caractérisés par l'absence de peroxydase et par la présence de lactoferrine, qui en séquestrant le fer et le cuivre, devient antimicrobienne. De plus, on y trouve le lysozyme et la gélatinase. Cette dernière enzyme catalyse le clivage du collagène de la MEC, ce qui favorise la migration du neutrophile vers le site de l'infection. On note également la présence de nombreux constituants de récepteurs membranaires inactifs impliqués dans l'adhérence et l'activation du neutrophile (intégrines, récepteur au fMLF, etc.). Les granules tertiaires apparaissent au stade du métamyélocyte. Ils regroupent des enzymes lytiques telles que la gélatinase. Enfin, les vésicules sécrétoires apparaissant en toute fin de maturation sont riches en récepteurs membranaires. Leur contenu est impliqué dans le chimiotactisme et l'adhérence du neutrophile aux intégrines et au récepteur au fMLF. Un point commun aux granules spécifiques et tertiaires ainsi qu'aux vésicules sécrétoires consiste en un contenu extrêmement riche en cytochrome *b558*, la sous-unité catalytique de la Nox. L'activation du neutrophile implique la libération du contenu de certains granules ou dégranulation (Lacy *et Eitzen*, 2008). L'hierarchie de la mobilisation des granules dépend du stimulus activateur des neutrophiles (Fauschou *et Borregaard*, 2003). De plus, le potentiel d'exocytose est plus important pour les vésicules sécrétoires, suivies des granules secondaires, tertiaires et enfin primaires (Fauschou *et Borregaard*, 2003). Par exemple, la migration des neutrophiles *in vivo* mobilise les vésicules sécrétoires lors du contact des PMN avec l'endothélium, suivies des tertiaires, lors de la transmigration, et des secondaires et des primaires au niveau du site inflammatoire (Sengelov *et al.*, 1993 ; Borregaard *et Cowland*, 1997 ; Fauschou *et Borregaard*, 2003). Les granules mobilisés fusionnent avec le phagosome ou la membrane cytoplasmique des neutrophiles. Dans ce dernier cas, le

mécanisme est appelé exocytose (Tapper *et al.*, 2002; Lacy, 2006). D'abord, les granules sont recrutés par les microtubules et le cytosquelette d'actine vers la membrane cible. Par la suite, les membranes (des granules et du phagosome ou la membrane cytoplasmique) entrent en contact et fusionnent au niveau d'un pore qui augmente en taille jusqu'à permettre de libérer le contenu dans l'espace extracellulaire ou le phagosome (Lacy et Eitzen, 2008). L'exocytose de protéases (cathepsines, élastase, ...) permet l'attraction d'autres phagocytes au site enflammé et le clivage des molécules impliquées dans l'inflammation (Borregaard *et al.*, 2001 ; Soehnlein *et al.*, 2009). Notons par exemple le rôle réalisé des enzymes protéinase 3, élastase et cathepsine G, qui clivent des intégrines, chimiokines et cytokines ainsi que plusieurs récepteurs (Meyer-Hoffert *et al.*, 2010). La fusion des granules spécifiques à la membrane cytoplasmique augmente le potentiel phagocytaire des neutrophiles en localisant le récepteur CR3 à ce niveau. La fusion des granules azurophiles et spécifiques avec le phagosome crée un environnement propice pour la bactéricidie (Borregaard et Cowland, 1997).

1.1.4.5. Formation des espèces réactives oxygénées (ROS)

Communément appelée l'explosion respiratoire, cette activité met en jeu l'enzyme Nox. Ce complexe multiprotéique est composé d'une protéine membranaire, le flavocytochrome *b558* (Rotrosen *et al.*, 1992), de protéines cytosoliques $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$ (*phox* pour « phagocyte oxidase ») et de petites protéines G, soient Rac1/2 et Rap1A (Kwong *et al.*, 1993). Dans les neutrophiles au repos, ces éléments sont dissociés (Lapouge *et al.*, 2002), tandis que lors de l'activation, les différentes protéines cytosoliques transloquent à la membrane cytoplasmique où elles s'associent, ce qui enclenche l'activation de Nox (Babior *et al.*, 2002). La Nox activée catalyse le transfert d'électrons depuis une molécule de NADPH vers une molécule d' O_2 , ce qui produit l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Les autres formes des ROS sont obtenues à la suite de la conversion de l'anion $O_2^{\bullet-}$. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provient de la dismutation spontanée de l'anion $O_2^{\bullet-}$ ou d'une catalyse réalisée par la superoxyde dismutase (SOD). De plus, le H_2O_2 est transformé par l'action de la MPO d'origine granulaire, en ion hypochlorite OCl^- , qui est un oxydant très puissant. Il peut aussi être réduit en radical hydroxyl (OH^{\bullet}) dont la réactivité est

extrême. Les chloramines sont des formes dérivées très toxiques de la réaction de l'acide hypochloreux (HOCl) avec des amines. Un dernier composant des ROS est l'oxygène singulet obtenu par l'association de H_2O_2 et OCl⁻. Cette forme déclenche la peroxydation des lipides membranaires. En plus de leur fonction microbicide, les ROS peuvent être impliquées dans plusieurs événements de la réponse immunitaire. En effet, les ROS modulent la fonction d'une variété de molécules cibles impliquées dans la signalisation chez les neutrophiles, comme des récepteurs membranaires, des kinases, des phosphatases et des canaux ioniques (Fialkow *et al.*, 2007). Par exemple, les ROS permettent d'activer certaines molécules présentes sous la forme de précurseurs qui doivent subir une protéolyse afin d'acquérir leurs propriétés inflammatoires. En général, il s'agit de l'oxydation d'acides aminés qui mène au clivage enzymatique (Valko *et al.*, 2007). La production des ROS représente un des signes d'appel de la résolution de l'inflammation qui amorce l'élimination des neutrophiles par les macrophages (Bratton *et al.*, 2011). La majorité des ROS traverse les membranes, ce qui leur permet d'exercer un pouvoir bactéricide sur les microorganismes à tropisme extracellulaire. Toutefois, au-delà de cette propriété bactéricide, les ROS réagissent également avec les cellules de l'hôte. Ceci peut déclencher un processus pathologique, tel que la nécrose microbienne, les collagénoses, les glomérulonéphrites et l'arthrite rhumatoïde (AR) (Chiurchiu *et al.*, 2011). Par conséquent, la production des ROS nécessite une régulation rigoureuse. Un défaut génétique de fonctionnement de Nox résulte en un syndrome d'immunodéficience grave, la granulomatose septique chronique (Chronic Granulomatous Disease, CGD), qui est caractérisée par des infections microbiennes à répétition associées à une inflammation touchant plusieurs organes (Holland, 2010).

1.1.4.6. Formation des NETs (« neutrophil extracellular traps »)

Les NETs résultent de la libération du contenu nucléaire des neutrophiles dans le milieu extracellulaire. Il s'agit de chromatine décondensée associée à des composantes granulaires (des sérine-protéases) et des protéines cytoplasmiques formant un réseau compact et fibreux auquel adhère l'agent pathogène (Kumar *et al.*, 2010). L'ADN provient de la

mitochondrie et du noyau (Amulic *et al.*, 2011b). L'interaction entre les NETs et les microorganismes comme les bactéries, les champignons et les parasites, permet leur emprisonnement pour limiter leur diffusion (Papayannopoulos et Zychlinsky, 2009). De plus, l'incorporation d'enzymes protéolytiques et molécules bactéricides concentrées dans les NETs est favorable pour la bactéricide (Papayannopoulos et Zychlinsky, 2009). Par ailleurs, les NETs constituent un signal de résolution de l'inflammation et constituent une forme particulière de mort cellulaire du neutrophile ne conduisant ni à l'apoptose ni à la nécrose (Bratton et Henson, 2011; Mantovani *et al.*, 2011).

1.1.4.7. Formation de médiateurs inflammatoires lipidiques

Les neutrophiles produisent des médiateurs lipidiques dérivés des phospholipides membranaires, qui comprennent les métabolites de l'acide arachidonique (AA) et le facteur d'activation plaquettaire (Platelet activating factor; PAF). Ces médiateurs sont en majorité des molécules proinflammatoires très efficaces qui agissent rapidement (Serhan *et al.*, 2008). L'AA est produit par l'action de la phospholipase A2 sur les phospholipides membranaires. Par la suite, il est catabolisé en plusieurs métabolites intermédiaires et terminaux. Une caractéristique importante de ces métabolites consiste en des effets variés qui peuvent être antagonistes au cours de l'inflammation. Deux principales voies prennent en charge leur production, soit la voie de la cyclo-oxygénase COX-2, qui génère le thromboxane A2, la prostacycline et les prostaglandines PGD2, PGE2, PGF2 (St-Onge *et al.*, 2007), et la voie de la 5-lipo-oxygénase, qui produit les leucotriènes (LT), des médiateurs à action variable, vasoconstrictrice ou bronchoconstrictrice, et qui augmentent la perméabilité vasculaire (tel que induit par les leucotriènes C4, D4 et E4) (Wenzel, 1997). Le LTB4 agit principalement sur les neutrophiles et n'exerce pas d'effets sur le muscle lisse bronchique. Il stimule la diapédèse des neutrophiles aussi bien qu'il provoque l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'installation de l'œdème (Afonso *et al.*, 2012; Sadik et Luster, 2012). Dans certaines conditions, Le LTB4 induit également une libération de ROS par les neutrophiles (Lärfars *et al.*, 1999). Son action sur les éosinophiles est conditionnée par leur activation dépendante de l'IL-5 (Coëffier *et al.*, 1994). Le PAF est

synthétisé sous l'action de la phospholipase A2 et la lysoPAF acétylCoA transférase et il est responsable de multiples effets proinflammatoires (Snyder *et al.*, 1995). Le PAF active les plaquettes (Prescott *et al.*, 1990), augmente l'adhérence leucocytaire à l'endothélium (Zimmerman *et al.*, 1990), la dégranulation des neutrophiles (O'Flaherty *et al.*, 1984), et la synthèse des prostaglandine et leucotriènes (Lin *et al.*, 1982 ; Kawaguchi *et Yasuda.*, 1986). De plus, le PAF entraîne une vasoconstriction (à forte concentration), ou vasodilatation (à faible concentration) (Juncos *et al.*, 1992). Certains produits issus du catabolisme des PGE2 et PGD2 par la 5-LO et sont impliqués dans la résolution de l'inflammation, entre autres les lipoxines, les résolvines et les statines (Serhan *et al.*, 2008).

1.1.4.8. Formation de médiateurs inflammatoires peptidiques

L'activation des neutrophiles en réponse aux stimuli inflammatoires induit l'expression et la production de médiateurs peptidiques solubles qui confèrent aux neutrophiles un rôle important dans les réponses immunitaires innée et adaptative. En effet, les PMN produisent des cytokines (TNF α , IL-1 α/β , IL-12, TGF β , INF γ , IL-18, IL-1RA, BLys) (Scapini *et al.*, 2005 ; Cassatella *et al.*, 2009 ; Fortin *et al.*, 2009 ; Mantovani *et al.*, 2011), des chimiokines (IL-8, Gro α/β , Mip-1 α/β , Mip-3 α/β , IP-10, MIG, I-TAC, ENA-78, etc.) (Scapini *et al.*, 2003 ; Mantovani *et al.*, 2011) et le facteur angiogénique VEGF (Gaudry *et al.*, 1997). Les neutrophiles, par les cytokines qu'ils produisent et qui agissent de concert avec les médiateurs inflammatoires lipidiques, déclenchent et promeuvent la différenciation, la maturation et le chimiotactisme des cellules immunitaires. Par exemple, l'IL-12 et l'IL-18 induisent la production d'INF γ par les lymphocytes T et les cellules NK (Khaled *et al.*, 2002; Micallef *et al.*, 1997) ce qui contribue à potentialiser leur cytotoxicité. De plus, l'IL-12 favorise la polarisation des lymphocytes T en Th1 (Gately *et al.*, 1992). BLys et l'INF γ modulent plusieurs fonctions des lymphocytes B, telles que la maturation, la prolifération et la production des anticorps (Kiefer *et al.*, 2012; Treml *et al.*, 2009).

Les chimiokines sont divisées selon leur activité en chimiokines constitutives ou homéostatiques (tel que BLC, BRAK, TECK) responsables du développement du système

immunitaire et du trafic des cellules immunes entre les organes lymphoïdes, et en chimiokines inductibles ou inflammatoires sécrétées au niveau du site enflammé et agissant préférentiellement sur les différentes populations leucocytaires (Borish *et al.*, 2003; Esche *et al.*, 2005). Les chimiokines se distinguent selon l'espacement des deux premiers résidus cystéines en quatre sous-groupes, soient CCL, CXCL, XCL, et CX3CL (Zlotnik *et al.*, 2012). Dans le cas des neutrophiles, les chimiokines sécrétées sont de nature inflammatoire (Figure 1). En effet, le neutrophile produit des chimiokines du groupe CXC, dont CXCL-1 (Gro α), CXCL-8 (IL-8) et CXCL-5 (ENA-78) caractérisées par la présence d'un triplet d'acides aminés appelés ELR (acide glutamique, leucine, arginine) et dites ELR CXC. Celles-ci attirent et activent les neutrophiles (Baggiolini *et al.*, 1993; Baggiolini *et al.*, 1995) en plus d'être des facteurs angiogéniques puissants (Yoshie, 2005). Les chimiokines CXCL-10 (IP-10), CXCL-11 (I-TAC) et CXCL-9 (MIG) appartiennent également au groupe CXC, mais sont dites ELR CXC puisqu'elles ne contiennent pas le triplet ELR. Celles-ci induisent le recrutement de lymphocytes et de cellules NK et n'ont aucun effet sur les neutrophiles (Cole *et al.*, 1998; Farber, 1997). Les chimiokines CCL-3 (MIP-1 α), CCL-4 (MIP-1 β), CCL-20 (MIP-3 α) et CCL-19 (MIP-3 β), qui sont des membres du groupe CC, attirent les monocytes/macrophages (Zlotnik *et al.*, 2006), les éosinophiles et les basophiles (Mantovani *et al.*, 2011; Zhang, Y. *et al.*, 2004).

Parmi ces chimiokines, l'IL-8 constitue de loin la mieux caractérisée chez les neutrophiles. Ceux-ci sont la principale cible et source d'IL-8 (Scapini *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2010). La production d'IL-8 par les neutrophiles est une réponse stéréotypée à divers stimuli, entre autres TNF α , IL-18, fMLP, PAF, LTB $_4$, cristaux d'urate et LPS (Strieter *et al.*, 1992; Cassatella, 1999; Fortin *et al.*, 2009). Les neutrophiles expriment deux récepteurs membranaires d'IL-8, soient les récepteurs CXCR1 et CXCR2 (Browning *et al.*, 2000). L'IL-8 favorise la libération des PMN de la MO vers la circulation et induit également l'activation des neutrophiles et le chimiotactisme. De plus, certaines évidences laissent supposer que l'IL-8 peut jouer un rôle dans la dégranulation et l'explosion oxydative chez les neutrophiles (Amulic *et al.*, 2012; Mantovani *et al.*, 2011; Scapini *et al.*, 2000).

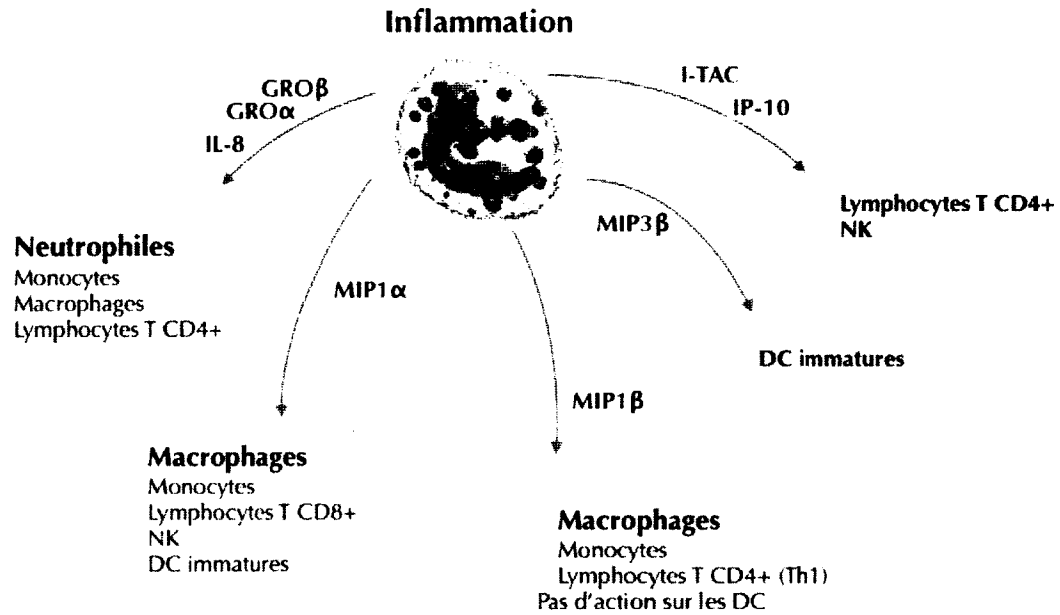


Figure 1. Chimioamines s cr t es par les neutrophiles et leurs cibles cellulaires.

En réponse à des stimuli inflammatoires, les neutrophiles sécrètent des chimioamines qui agissent préférentiellement sur des populations de leucocytes. Les principales cibles cellulaires sont indiqu es en gras. Les actions des chimioamines sur les cellules immunitaires incluent le recrutement, la migration, le chimiotactisme, l'activation, la polarisation et dans le cas des lymphocytes T et NK, la cytotoxicité.

1.1.5. Neutrophile et pathologies

En plus des dysfonctionnements génétiques des neutrophiles à l'origine de désordres immunitaires, ces cellules sont impliquées dans d'autres pathologies, notamment l'ischémie, l'inflammation et le cancer. Dans le cas du cancer, on parle désormais de deux populations de neutrophiles associés aux tumeurs (Tumor-associated neutrophils, TAN), les TAN pro- et antitumoraux (Mantovani, 2009; Murdoch *et al.*, 2008). L'abondance des foyers tumoraux en TAN est un facteur indicateur du pronostic défavorable de la maladie (Murdoch *et al.*, 2008). Les TAN promeuvent la tumorigénèse par leur capacité de produire des facteurs angiogéniques (IL-8, VEGF) (Tazzyman *et al.*, 2009). Ils favorisent les métastases en modulant la MEC par les MMPs (Murdoch *et al.*, 2008) et induisent la prolifération des cellules endothéliales via leurs cytokines (TNF α , PAF, et GM-CSF) (Mantovani *et al.*, 2010). Enfin, l'activation des TAN s'accompagne d'une production des ROS impliquées dans les dommages à l'ADN à l'origine de la tumorigénèse (Sandhu *et al.*, 2000).

Les neutrophiles sont aussi impliqués dans des maladies inflammatoires, tel que l'arthrite rhumatoïde (AR) de l'adulte et de l'enfant (Cascao *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Macaubas *et al.*, 2009), les vascularites (Abdgawad *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2012), la goutte (Martin *et al.*, 2010; Popa-Nita *et al.*, 2010) et le lupus (Kaplan, 2011; Knight *et al.*, 2012). Les granulocytes contribuent à l'installation et au maintien du processus inflammatoire au niveau des organes atteints. Les études réalisées sur des modèles animaux d'inflammation aiguë ou chronique ont servi à comprendre certains mécanismes qui accentuent le rôle des neutrophiles dans la pathologie inflammatoire. D'abord, la prolongation de la survie des neutrophiles au sein du foyer inflammatoire favorise l'exposition tissulaire exagérée et nocive aux agents destructeurs issus directement des neutrophiles (ROS, enzymes). Ces altérations tissulaires sont observées au cours des bronchectasies, les glomérulonéphrites post-streptococciques, les ischémies cardiaques, la fibrose kystique post-pneumonique, les gastrites à *Helicobacter pylori*, la tuberculose et les hépatites C (Phillipson *et al.*, 2011). Ensuite, les neutrophiles qui constituent une source considérable des facteurs chimiotactiques (lipidiques et peptidiques), jouent un rôle dans le recrutement continu des

leucocytes et permettent la persistance des phénomènes inflammatoires. Aussi, les PMN produisent des facteurs angiogéniques tels que les VEGF et l'IL-8. Ces facteurs sont impliqués dans l'angiogenèse qui assure l'apport adéquat en nutriments et en O₂ aux cellules. Cependant, ceci implique le remaniement de l'architecture du foyer inflammatoire et altère l'intégrité des tissus menant à leur destruction. Par exemple, au cours de l'AR, l'infiltration du tissu synovial enflammée par les leucocytes, y compris les neutrophiles, est associée à une destruction progressive de cartilage articulaire et plus tardivement les os, entraînant des invalidités fonctionnelles (Pitsillides *et al.*, 2011). Spécifiquement, dans le liquide synovial des patients arthritiques, les niveaux de plusieurs cytokines proinflammatoires, produits en particuliers par les neutrophiles, sont augmentés, notamment VEGF, IL-1, TNF α , IL-8, IL-12, MIP-3 α , SDF-1 et IL-6 (Bosco *et al.*, 2008a; Bosco *et al.*, 2011; Konisti *et al.*, 2012; Muz *et al.*, 2009). Par conséquent, l'étude des mécanismes de la production des cytokines et des chimiokines par les neutrophiles représente une étape primordiale dans la détermination du rôle de ces cellules dans la pathologie inflammatoire.

1.2. Régulation de la production des cytokines chez le neutrophile humain

La production des cytokines et chimiokines par les neutrophiles suit une régulation conjointement génique et post-transcriptionnelle (Hamilton *et al.*, 2010). L'activation de la transcription constitue une étape initiale : elle est déclenchée suite à la liaison d'un ligand à son récepteur membranaire. Ensuite, une cascade de signalisation intracellulaire conduit à l'activation de certains facteurs de transcription, et leur liaison à l'ADN au niveau de séquences spécifiques présentes dans la région promotrice des gènes cibles (Hamilton *et al.*, 2012). Les produits de la transcription représentés par les transcrits sont également modulés à l'étape de la traduction (Brühl *et al.*, 2003 ; Hamilton *et al.*, 2012). Dans les neutrophiles, certaines cytokines produites peuvent initialement être emmagasinées à l'intérieur de la cellule plutôt que d'être sécrétées : tel est le cas des cytokines Blys, TRAIL, IL-8, MIP-1 α et IL-RA (Scapini *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1998). La sécrétion

rapide de cette forme stockée survient après l'activation des neutrophiles, mais les mécanismes de cette synthèse protéique ainsi que la sécrétion sont encore inconnus (Mantovani *et al.*, 2011).

Dans notre laboratoire, nos recherches ciblent le contrôle de l'expression des cytokines et chimiokines chez les granulocytes, et la signalisation en amont de cette réponse. Les évidences qui en découlent ont permis de décrire plusieurs mécanismes régulateurs tel que nous discuterons plus bas. Par ailleurs, il faut noter que la condition hypoxique que le neutrophile ne manque pas de rencontrer au sein des loci inflammatoires n'a pas été considérée dans ces études. Ainsi, il existe une possibilité que la production des cytokines et des chimiokines par les neutrophiles soit affectée par l'hypoxie.

1.2.1. Régulation transcriptionnelle des cytokines

Chez les neutrophiles humains, il a été démontré que les facteurs de transcription suivants sont exprimés, STAT (pour signal transducers and activators of transcription) (Bovolenta *et al.*, 1996 ; Brizzi *et al.*, 1996), NF- κ B (nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells) (McDonald *et al.*, 1997), C/EBP (CCAAT/Enhancer-binding protein) (Borregaard *et al.*, 2003 ; Cloutier *et al.*, 2009), AP-1 (Activator protein 1) (Cloutier *et al.*, 2003b) et PU.1 (Chen *et al.*, 1995). Par ailleurs, seuls C/EBP et NF- κ B jouent un rôle direct dans l'induction des gènes des cytokines chez les granulocytes humains (Cloutier *et al.*, 2007; Ear *et al.*, 2008; Cloutier *et al.*, 2009) tandis que AP-1 ne joue pas un rôle dans cette induction (Cloutier *et al.*, 2003 ; Ear *et al.*, 2008). Particulièrement, les travaux effectués dans notre laboratoire, sur le modèle cellulaire PLB-985 différencié en neutrophile ont permis d'étudier la régulation des promoteurs de certains gènes de cytokines par les facteurs de transcription C/EBP et NF- κ B (Ear *et al.*, 2008; Cloutier *et al.*, 2009). Ce modèle a appuyé les résultats obtenus sur des neutrophiles humains primaires. En effet, devant la limite des essais de surexpression des gènes chez les neutrophiles primaires à cause de leur résistance à la transfection, ce modèle a permis de reproduire plusieurs phénotypes des cellules primaires, à savoir, l'expression des marqueurs de surfaces,

l'acquisition d'une réponse aux stimuli des neutrophiles fMLP et LPS, les profil d'expression, de production des cytokines et d'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B, C/EBP, AP-1 et STAT ainsi que de vérifier les rôles de ces derniers dans la régulation des gènes de cytokines.

1.2.1.1. Absence de rôle de AP-1

Le complexe AP-1 est un facteur transcriptionnel dimérique composé de combinaisons entre des membres des familles Fos et Jun. Les protéines Jun (c-Jun, JunB, JunD) homodimérisent ou bien hétérodimérisent entre elles ou avec les protéines Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, et Fra-2), tandis que ces dernières ne peuvent former des complexes AP-1 qu'en se liant aux protéines Jun (Karin *et al.*, 1997). Le complexe AP-1 régule la transcription des gènes des cytokines TNF α , IL-1 β , IL-1RA et IL-8 en réponse à des stimuli inflammatoires chez plusieurs types cellulaires (Smolinska *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2008). Chez les neutrophiles humains, seules les protéines c-Fos, JunD et de façon minime c-Jun sont exprimées (Cloutier *et al.*, 2003a). Les niveaux de ces protéines sont généralement augmentés par différents agonistes dans plusieurs types cellulaires et l'activité d'AP-1 est régulée par l'activation de c-Jun N-Terminal kinase (JNK). Ces deux événements ne sont pas produits en réponse aux stimuli inflammatoires (TNF α , LPS ou GM-CSF) chez les neutrophiles humains. Parallèlement, l'inhibition de la kinase JNK1 n'affecte pas la sécrétion des cytokines en réponse à ces stimuli (Cloutier *et al.*, 2003a). Ce qui laisse supposer que la voie JNK1/AP-1 ne semble pas jouer un rôle dans la production des cytokines chez les granulocytes (Cloutier *et al.*, 2003a).

1.2.1.2. Implication de NF- κ B

NF- κ B est un facteur clé dans le contrôle de l'immunité innée et adaptative. Il régule la transcription d'un grand nombre de gènes cibles, parmi lesquels les gènes des cytokines et des chimiokines (Brown *et al.*, 2008). La famille NF- κ B englobe les membres c-Rel, RelA

(p65), RelB, NF- κ B1 (p50/p105) et NF- κ B2 (p52/p100) (Oeckinghaus et Ghosh, 2009). Ces protéines peuvent dimériser grâce à leur domaine N-terminal, le RHD ou « Rel homology domain » (Ghosh, 1999). Le RHD permet également au complexe NF- κ B de se lier à l'ADN (Ghosh *et al.*, 1998). Au repos, chez la plupart des types cellulaires, le complexe inactif NF- κ B dont l'hétérodimère p50/p65 constitue la forme la plus abondante est séquestré dans le cytoplasme sous l'action des protéines inhibitrices I κ B (I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ) (Oeckinghaus et Ghosh, 2009). L'activation de la voie NF- κ B met en jeu le complexe I κ B kinase (IKK). Ce complexe est formé le plus souvent de deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β), et d'une sous-unité régulatrice (IKK γ). Le complexe IKK activé entraîne la phosphorylation d'I κ B α et sa dégradation par le protéasome 26S, ce qui libère le dimère p50/p65. Ensuite, le complexe NF- κ B est transloqué du cytoplasme au noyau ce qui va lui permettre d'activer la transcription des gènes cibles (Ghosh et Karin, 2002). Au repos, chez les neutrophiles humains primaires ainsi que les PLB-985 "neutrophil-like", les membres de la famille NF- κ B exprimés sont NF- κ B1 p50/p105, p65/RelA et c-Rel (Ear et McDonald, 2008; McDonald *et al.*, 1997a). Contrairement à d'autres types cellulaires, ces protéines sont distribuées entre le cytoplasme et le noyau des neutrophiles ainsi que dans la lignée PLB-985 différenciée en neutrophiles par le DMSO (McDonald *et al.*, 1997a; Cloutier *et al.*, 2005). Aussi, des complexes NF- κ B liés à l'ADN ont été détectés au repos dans les neutrophiles primaires et les PLB-985 "neutrophil-like" (McDonald *et al.*, 1997; Ear *et al.*, 2005). Plusieurs stimuli inflammatoires sont à l'origine de l'activation de NF- κ B chez les granulocytes, soient des dérivés viraux et bactériens (LPS, fMLP), le LTB₄, des cytokines (IL-15, IL-18, TNF α , IL-1 β) et des particules de phagocytose (cristaux d'urate) (Fortin *et al.*, 2009; McDonald *et al.*, 1997a; McDonald *et al.*, 1998a; McDonald *et al.*, 1997b; McDonald *et al.*, 1998b; Tamassia *et al.*, 2007). L'activation d'IKK en réponse au LPS et TNF α ainsi que la dégradation subséquente d'I κ B α se produisent simultanément dans le cytoplasme et le noyau chez les neutrophiles humains et constitue une particularité de ces cellules à la différence de la majorité des types cellulaires (Ear *et al.*, 2005). Chez les neutrophiles humains primaires, il est bien documenté que les gènes des chimiokines IL-8, MIP1 α/β , et de la cytokine TNF α sont régulés par le facteur NF- κ B qui est activé en réponse au TNF α ou au LPS (Cloutier *et al.*, 2007; Ear et McDonald, 2008).

1.2.1.3. Implication de C/EBP

Le facteur de transcription C/EBP appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP (Leucine Zipper) (Wedel *et* Ziegler-Heitbrock, 1995). C/EBP est formé d'homo- ou d'hétérodimères reliés entre eux par leurs domaines C- terminaux (Leucine Zipper) qui se lient à l'ADN par l'intermédiaire de leurs régions basiques. On distingue 6 isoformes C/EBP (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) (Nerlov, 2007). Chez les neutrophiles humains, Cloutier et ses collègues ont permis de caractériser le facteur C/EBP et de déterminer son importance comme régulateur de l'expression des gènes des cytokines, en plus de NF- κ B (Cloutier *et al.*, 2009). En effet, les granulocytes expriment toutes les isoformes C/EBP (α , β , δ , ϵ , ζ) à l'exception de C/EBP- γ . C/EBP est lié constitutivement à l'ADN des neutrophiles humains (Cloutier *et al.*, 2009). La stimulation des neutrophiles au LPS ou TNF α ne modifie pas les niveaux d'expression des protéines C/EBP. Par contre, elle induit une phosphorylation transitoire de C/EBP- β sur la thréonine 235 (à 15 minutes) (Cloutier *et al.*, 2009). De plus, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre C/EBP- β phosphorylée sur un gel de retardement a démontré que cette forme, absente dans les complexes liés constitutivement à l'ADN au repos, se trouve liée à l'ADN en réponse au LPS (Cloutier *et al.*, 2009). Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) réalisées dans les neutrophiles primaires ont démontré que C/EBP- β et C/EBP- ϵ sont constitutivement liée au promoteur d'IL-8 dans les neutrophiles au repos ou activé par LPS, et qu'en réponse au LPS, l'association de C/EBP- β phosphorylée a été augmentée 4 à 5 fois (Cloutier *et al.*, 2009). La surexpression d'une variante mutée de C/EBP- β (T235A) (substitution de la thréonine 235 par une alanine) dans les PLB-985 « neutrophil-like » a démontré que cette phosphorylation de C/EBP- β est déterminante dans la production des cytokines. En effet, tandis que la surexpression de la variante C/EBP β sauvage augmente la production d'IL-8, Mip-1 α et d'une façon moindre Mip-1 β , cette production a été abolie avec le mutant C/EBP- β (T235A). Ceci laisse supposer que le complexe C/EBP contrôle l'expression d'IL-8, MIP-1 α et MIP-1 β . Ce travail a démontré également que ce facteur ne joue pas un rôle dans l'expression du gène du TNF α (Cloutier *et al.*, 2009).

1.2.1.4. Rôle non démontré pour les STATs

La famille des facteurs de transcription STAT comporte 7 membres, soient les protéines STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT6 et les membres apparentés STAT5A et STAT5B (Ihle *et al.*, 1997 ; O'Shea *et al.*, 2002). Ces protéines se trouvent au repos sous forme de monomères (Santos et Costa-Pereira, 2011). Leur activation en réponse aux stimuli adéquats nécessite une phosphorylation par la tyrosine kinase Janus kinase (JAK) suivi de leur dimérisation (Santos et Costa-Pereira, 2011). Chez les neutrophiles humains, il a été démontré que les facteurs de croissance G-CSF et GM-CSF activent les dimères STAT1/STAT3 et STAT3/STAT5 (Bovolenta *et al.*, 1996; McDonald 1998). L'IL-4 induit la phosphorylation de STAT1 et STAT6 (Rathé *et al.*, 2007) et l'INF- γ induit la formation d'un dimère STAT1 chez les neutrophiles activés (McDonald *et al.*, 1998). L'implication des STATs dans la transcription des gènes de cytokines chez les neutrophiles humains n'a pas été largement étudiée. Récemment, il a été démontré que l'activation de STAT3 par G-CSF chez les PMN inhibe la production induite par le LPS d'IL-8 et TNF α , ce qui laisse suggérer que STAT3 peut être impliqué dans la régulation de la production des cytokines chez les neutrophiles (Fukuzono *et al.*, 2010). Néanmoins, le mécanisme d'une telle régulation reste à démontrer.

1.2.2. Voies de signalisation intracellulaire

Les voies de signalisation intracellulaire mobilisées chez les PMN et impliquées dans la production des cytokines ne sont pas complètement établies. Les travaux effectués dans notre laboratoire ont étudié certaines de ces voies en réponse au LPS, IL-18 et TNF α et le rôle de certaines kinases, soit dans l'expression des cytokines, soit dans la synthèse protéique de leur ARNm, a été vérifié, notamment, les kinases MAP3K TGF beta activating kinase 1 (TAK1), p38 MAPK, p42/44 MAPK (ERK), MAPK-interacting kinase-1 (MNK1) et phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Cloutier *et al.*, 2007 ; Ear *et al.*, 2010 ; Fortin *et al.*, 2011 ; Fortin *et al.*, 2013). TAK1 est essentielle dans l'expression et la synthèse de l'IL-8, Mip-1 α et Mip-1 β en réponse au LPS et TNF α et elle contrôle les voies d'activation d'IKK/NF- κ B, p38 MAPK et PI3K (Ear *et al.*, 2010 ; Fortin *et al.*, 2011). En

effet, l'inhibition spécifique de TAK1 par le 5 α -7-oxozeaenol réduit la phosphorylation d'IKK et I κ B α ainsi que la liaison à l'ADN de NF- κ B, ce qui se traduit par la diminution drastique de la production d'IL-8, Mip-1 α et Mip-1 β (Ear et McDonald, 2008 ; Ear *et al.*, 2010). En aval de TAK1, les kinases activées peuvent avoir des effets variables sur l'activation de la transcription ou la synthèse des chimiokines. Par exemple, l'activation de la voie PI3K/AKT en réponse au LPS et TNF α ne conduit pas à l'activation de NF- κ B et C/EBP (Fortin *et al.*, 2011). Par contre, l'inhibition de PI3K abolit la transcription et la production consécutive de Mip-1 α et Mip-1 β tandis que seule la transcription d'IL-8 se trouve affectée (Fortin *et al.*, 2011). La kinase MNK1 (*MAPK-interacting kinase-1*) activée de façon séquentielle par TAK1 et p38 MAPK en réponse au LPS et TNF α joue un rôle dans la traduction des ARNm des chimiokines (Fortin *et al.*, 2013). L'inhibition de MNK1 par CGP57380 abolit uniquement la synthèse protéique d'IL-8, Mip-1 α et Mip-1 β en réponse aux LPS et TNF α et n'a pas d'effet sur la transcription de leur gènes (Fortin *et al.*, 2013). MNK1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'étape initiale de la traduction des ARNm en modifiant l'état de phosphorylation des protéines clés S6K, S6, et 4E-BP1 (eucaryotic translation initiator factor 4E-binding protein) (Fortin *et al.*, 2013).

1.3. Hypoxie

L'oxygène est un élément crucial pour la cellule. L'utilisation de l'oxygène est contrôlée par un système homéostatique complexe, afin de maintenir la valeur de la pression partielle d'O $_2$ (pO_2) entre 2,9 et 9% pour ne pas compromettre la fonction de la mitochondrie. Dans l'air ambiant, la pO_2 équivaut à 160 mmHg (soit 21%). Dans les poumons, elle varie entre 104 et 150 mmHg, puis elle passe à 104 mmHg dans le sang artériel et à 40 mmHg dans les veines (5%). Dans les tissus sains, la pO_2 est incluse entre 20 et 70 mmHg, et diminue à 8-10 mmHg dans certains tissus où le métabolisme aérobie est intense, comme dans la médullaire rénale, l'épiderme et le cartilage articulaire (Jiang *et al.*, 1996). Dans un milieu de culture cellulaire, l'atmosphère est dite normoxique lorsque la pO_2 est à 20.9%, soit 159 mmHg (Nizet et Johnson, 2009; Galc et Maxwell, 2010). Quant à l'hypoxie, celle-ci est définie par une inadéquation de l'apport cellulaire en O $_2$ requis pour le métabolisme qui compromet la fonction des cellules, des tissus et des organes (Hockel *et al.*, 2001).

L'hypoxie n'est pas obligatoirement nocive pour la cellule. Elle peut être physiologique, comme à la haute altitude, durant l'exercice physique et l'embryogenèse (au premier trimestre). L'hypoxie est également une caractéristique du liquide lymphatique (Hangai-Hoger *et al.*, 2007). L'hypoxie est dite pathologique lorsqu'elle se développe au cours d'une maladie telle que le cancer, l'ischémie des organes, l'athérosclérose et l'inflammation. Selon le temps de d'exposition cellulaire à l'hypoxie, on parle d'hypoxie aiguë (pendant quelques minutes à quelques heures), ou chronique, quand elle est observée à des temps d'exposition beaucoup plus longs.

1.3.1. Réponse cellulaire à l'hypoxie

Les réponses cellulaires à l'hypoxie sont gérées par la mobilisation du système Hypoxia Inducible Factor (HIF). En effet, des centaines de promoteurs de gènes contiennent des séquences de liaison au facteur HIF, nommées les Hypoxia Response Element (HRE) avec la séquence suivante 5'-RCGTG-3' (où R est généralement une base adénine) (Wenger *et al.*, 2005). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans plusieurs fonctions adaptatives à l'hypoxie (Figure 2).

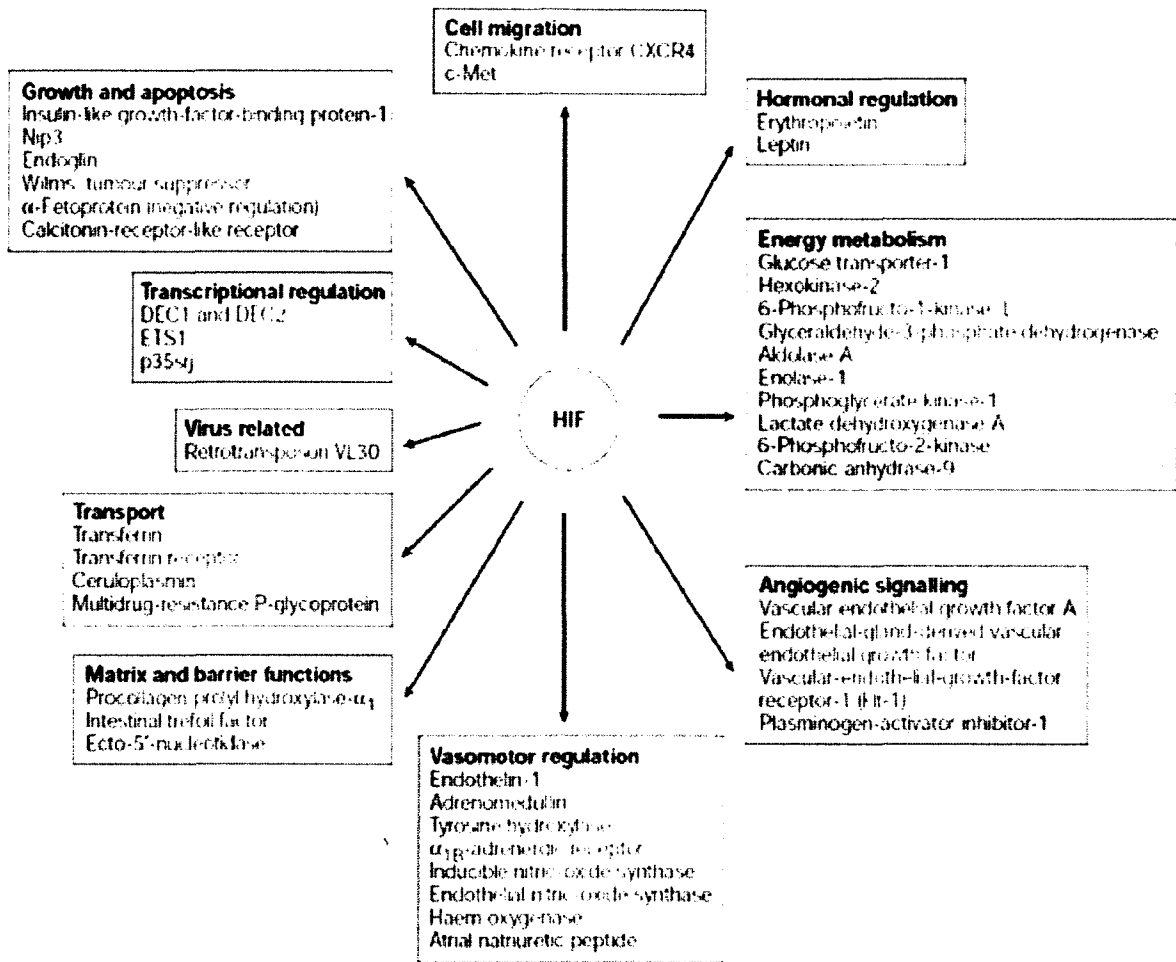


Figure 2. Exemples des gènes dépendant de HIF et leurs fonctions biologiques.

Le facteur HIF régule directement la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans la réponse cellulaire à l'hypoxie, parmi lesquels les protéines correspondantes sont indiquées sur cette figure. (Schofield *et al.*, 2004).

D'autres mécanismes en plus de l'activation du HIF peuvent être mis en jeu par la cellule et participent à la réponse à l'hypoxie. Par exemple, la transcription dépend d'autres facteurs de transcription en plus du HIF : l'activation hypoxique de la protéine liant l'élément de réponse à l'AMP cyclique (CREB) est observée au niveau du cerveau, mais aussi au niveau des poumons, du foie, du cœur, chez la lignée cellulaire PC12 provenant d'un phéochromocytome de rat, la lignée du cancer cervicale HeLa et les cellules HP-75 d'adénome pituitaire (Baugh *et al.*, 2006; Beitner-Johnson *et al.*, 2000; Dimova *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Leonard *et al.*, 2008; Morimoto *et al.*, 2006). AP-1 et le facteur NF- κ B sont deux autres facteurs qui peuvent être induits par l'hypoxie (Culver *et al.*, 2010; Fitzpatrick *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2003; Maxwell *et al.*, 2007; Yeramian *et al.*, 2011).

En plus de la transcription, le contrôle post-transcriptionnel des transcrits ARNm est également une étape régulée par l'hypoxie qui ne dépend pas seulement de HIF (Van Den Beucken *et al.*, 2011). Bien que les études dans ce domaine soient moins documentées que celles concernant la transcription, plusieurs évidences indiquent que les transcrits ARNm sont sensibles à l'hypoxie. En effet, l'hypoxie induit l'interruption rapide et globale de la traduction des protéines afin de réduire la consommation en énergie. Les effets de l'hypoxie modérée (1-5% O₂) sur la traduction entraînent les mêmes effets que ceux observés lors de l'hypoxie sévère (0-0.5% O₂), mais avec une cinétique retardée (Kenneth *et al.*, 2008). L'hypoxie altère les trois étapes de la traduction : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Pour l'étape d'initiation, l'hypoxie active deux principales voies d'inhibition. La première de ces voies, dite *unfolded protein response* (UPR), est activée rapidement à des taux d'oxygène inférieurs à 1% et stimule la kinase PERK (*endoplasmic reticulum kinase PKR-like ER kinase*) qui phosphoryle eIF2 α , un composant essentiel de l'initiation de la traduction (Koumenis *et al.*, 2002). La deuxième voie est sous la dépendance de mTOR et est activée par l'hypoxie prolongée et inhibe la traduction en perturbant le complexe eIF4F (Eukaryotic translation initiation factor 4 F), formé à partir des protéines eIF4G, eIF4E, eIF4A (Koritzinsky *et al.*, 2006). Cela induit la dissociation du complexe eIF4F par hypophosphorylation de 4EBP1, ce qui engendre une séquestration de eIF4E par le 4EBP1 et l'inhibition de la traduction (Koumenis *et al.*, 2006). De façon spécifique, l'ARNm codant pour HIF-1 α continue à être traduit en hypoxie, bien que le

mécanisme du maintien de la traduction de HIF-1 α n'est pas clairement établi. Il semblerait néanmoins que dans le cas de HIF1 α , la présence d'un IRES (*Internal ribosome entry site*) dans sa partie 5'-UTR puisse jouer ce rôle (Schepens *et al.*, 2005). L'inhibition de l'élongation et de la terminaison dépend de deux classes de protéines activées sous hypoxie, soient les RBPs (RNA-binding-proteins) telles que la PTB (pour polypyrimidine tract-binding protein), la TTP (pour tristétraproline) et la IRP (Iron regulatory protein) (Gorospe *et al.*, 2011) et les microARNs (miR) dont miR210, miR373 et miR21 sont les plus connues (Crosby *et al.*, 2009; Wouters *et al.*, 2005). Enfin, des modifications épigénétiques des histones ou d'autres facteurs sont aussi des éléments de régulation hypoxique, bien que leurs mécanismes restent mal élucidés. Par exemple, p300 qui s'associe à HIF-1 et possède une activité HAT (histone acetyl transférase) et HDAC7, une désacétylase contrôlent l'action des HIFs (Melvin *et al.*, 2012).

1.3.2. Facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF)

Le HIF est un système présent chez toutes les cellules de mammifères étudiées à ce jour. Il a été identifié pour la première fois en 1993, lors de l'étude de l'expression du gène de l'érythropoïétine. Ces composantes protéiques ont été caractérisées en 1995 par Semenza et ses collègues (Wang *et al.*, 1995a; Wang *et al.*, 1993). HIF est responsable du contrôle d'un nombre important de gènes impliqués conjointement dans des processus cellulaires physiologiques et physiopathologiques (Kenneth *et al.*, 2008; Schofield *et al.*, 2004). Il s'agit d'un facteur de transcription hétérodimérique formé par deux sous-unités α et β . Il existe trois sous-unités α , HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α , qui constituent les partenaires de la protéine HIF-1 β (Li *et al.*, 2006; Loboda *et al.*, 2012; Semenza, 2012). Ces quatre protéines appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH/PAS qui englobe des protéines contenant un domaine bHLH (pour *basic helix-loop-helix*) et un domaine PAS (pour *Per-Arnt-Sim*) (Erbel *et al.*, 2003). Les protéines HIF possèdent plusieurs domaines fonctionnels qui permettent la dimérisation et l'activation du complexe HIF (Figure 3). Les protéines HIFs sont obtenues suite à la transcription de quatre gènes différents (tableau 1).

| Gène | Locus | Nombre d'exons |
|-------|-----------|----------------|
| HIF1A | 14q21-q24 | 15 exons |
| HIF2A | 2p21-p16 | 16 exons |
| HIF3A | 19q13.32 | 19 exons |
| HIF1B | 1q21 | 22 exons |

Tableau 1. Localisation des quatre gènes codant les protéines HIF chez l'humain

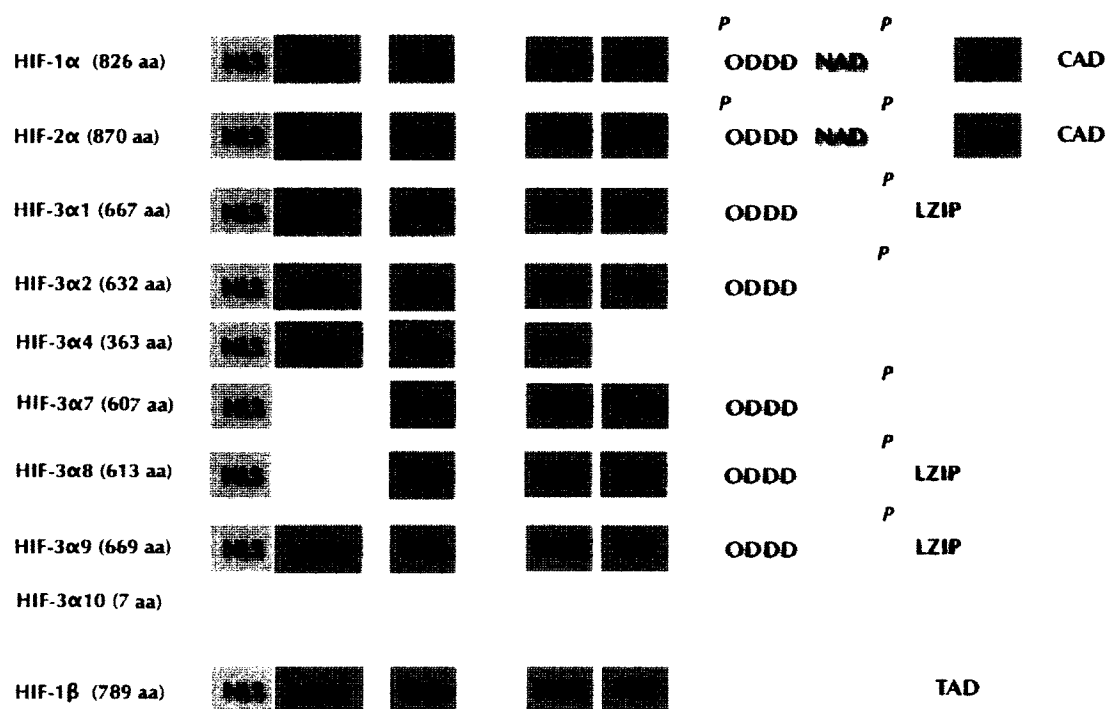


Figure 3. Représentation schématique des membres de la famille HIF.

Le domaine basique bHLH est impliqué dans la dimérisation de HIF- α avec HIF-1 β et dans la liaison du complexe HIF avec l'ADN. Le domaine ODDD (pour Oxygen dependent degradation domain) permet de réguler la stabilité de la protéine HIF- α sous hypoxie. P représente les sites d'hydroxylation. Le domaine PAS contient des régions hydrophobes nommées PAS A et PAS B qui représentent des motifs accessoires de dimérisation entre HIF-1 α et HIF-1 β , en plus du domaine bHLH. Le domaine de transactivation (Transactivation domain; TAD) est séparé en deux domaines, soient le domaine N-terminal (N-TAD) et le domaine C-terminal (C-TAD). Ces deux domaines activent la transcription via l'interaction avec des coactivateurs tel que p300/CBP (CREB binding protein). HIF-1 α contient deux séquences de localisation nucléaire (*Nuclear localization signal*; NLS) en N-terminal (N-NLS) et C-terminal (C-NLS). Seule la C-NLS est essentielle à l'importation nucléaire de HIF-1 α par les importines de type alpha (Depping *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 1996; Peet *et al.*, 2006; Ruas *et al.*, 2005; Ruas *et al.*, 2010). (Schéma adapté de Heikkila *et al.*, 2011; Maynard *et al.*, 2003).

1.3.2.1. Structure et rôle des sous-unités HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , et HIF-1 β

La protéine HIF-1 α constituée de 826 acides aminés possède un poids moléculaire de 115 kDa et est exprimée de façon quasi ubiquitaire (Lee *et al.*, 2001; Talks *et al.*, 2000). La protéine HIF-2 α , également appelée EPAS (endothelial PAS domain protein) partage 48% d'identité de séquence en acides aminés avec HIF-1 α et possède des similarités biochimiques et structurales avec HIF-1 α , notamment dans les domaines fonctionnels. Cependant, l'expression cellulaire est différente (Lofstedt *et al.*, 2007). À la différence de HIF-1 α ubiquitaire, l'expression de HIF-2 α est restreinte à certains types cellulaires chez l'humain. HIF-2 α se trouve majoritaire par rapport à HIF-1 α dans les cellules endothéliales des vaisseaux rénaux, des poumons, du coeur et de l'intestin grêle, dans les cellules gliales, les pneumocytes de type II, les cardiomyocytes, les fibroblastes rénaux, les cellules interstitielles du pancréas et du duodénum, les hépatocytes et les macrophages (Compernelle *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2009; Rankin *et al.*, 2007; Scortegagna *et al.*, 2005; Talks *et al.*, 2000; Wiesener *et al.*, 2003).

Les gènes encodant HIF-1 α et HIF-2 α ne sont pas redondants, ce qui se traduit par la différence de leurs fonctions biologiques. En effet, l'inactivation du gène encodant HIF-1 α chez la souris entraîne la létalité chez les embryons après 8 à 9 semaines de développement due à une atteinte profonde du système circulatoire, des malformations cardiovasculaires et nerveuses ainsi qu'une augmentation de l'hypoxie tissulaire (Ryan *et al.*, 1998). L'inactivation du gène EPAS1 codant pour HIF-2 α chez la souris, conduit à son tour à une létalité avec un phénotype complètement différent de celui obtenu par l'inactivation de HIF-1 α . En dépit de l'absence des anomalies vasculaires, plusieurs dysfonctionnements graves sont observés comme des rétinopathies, une stéatose hépatique, des myopathies, une azoospermie, une pancytopenie ainsi que des perturbations du métabolisme du glucose (Scortegagna *et al.*, 2003a; Scortegagna *et al.*, 2003b). Ce manque de redondance s'observe également à l'échelle cellulaire, où les deux facteurs HIF-1 et HIF-2 régulent différemment les gènes. En effet, l'inactivation conditionnelle de HIF-2 α ou HIF-1 α entraîne des conséquences sur le profil d'expression génique non similaires pour un même type cellulaire. Par exemple, au niveau de l'épithélium intestinal, seule l'absence de HIF-2 α ,

altère le métabolisme du fer en réponse à l'hypoxie, par la diminution de la transcription du gène codant pour le transporteur clé du fer, le DMT1 (pour divalent metal transporter 1) (Mastrogiannaki *et al.*, 2009). Un autre exemple est le gène de l'érythropoïétine au niveau des hépatocytes dont la transcription est sous la dépendance de HIF-2 α uniquement (Rankin *et al.*, 2009; Ratcliffe, 2007). L'utilisation de différents mutants de délétion de HIF-1 α ou HIF-2 α avait permis d'identifier un des mécanismes de la régulation différentielle entre les deux facteurs HIF-1 et HIF-2 impliquant le N-TAD comme le domaine qui confère la spécificité des gènes transcrits pour chaque facteur, tandis que le C-TAD contrôle la transcription de gènes communs entre HIF-1 et HIF-2 (Loboda *et al.*, 2010; Florczyk *et al.*, 2011).

Comparativement à HIF-1 α et HIF-2 α , HIF-3 α est moins étudiée : sa fonction et sa régulation sont peu documentées. Chez l'humain, la protéine HIF-3 α possède plusieurs isoformes obtenues par épissage alternatif. À ce jour, 7 variants d'épissage de HIF-3 α ont été identifiés, soient HIF-3 α 1, HIF-3 α 2, HIF-3 α 4 et HIF-3 α 7 à HIF-3 α 10. L'expression de ces protéines a été détectée dans les tissus adultes, dont l'endothélium vasculaire, le cœur, le cerveau, le foie, le muscle, les reins et le pancréas, ainsi qu'un grand nombre de lignées cellulaires (Augstein *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011). Les isoformes HIF-3 α 1 et 2 sont les variantes longues, tandis que les autres HIF-3 α plûtôt courts manquent le domaine ODDD et N-TAD (Maynard *et al.*, 2003). Dans les lignées cellulaires de carcinome hépatique HepB2, des expériences de surexpression des différentes isoformes HIF-3 α en condition hypoxique ont permis de démontrer que toutes ces protéines peuvent dimériser avec HIF-1 α , HIF-2 α ou HIF-1 β , à l'exception de HIF-3 α 2 pour laquelle aucun complexe avec HIF-2 α n'a été détecté (Heikkila *et al.*, 2011). Les complexes HIF-3 α /HIF-1 β formés à partir des isoformes 1, 2, 7, 8 ou 9 se fixent sur la séquence HRE de l'ADN. Ces dimères sont actifs dans plusieurs types cellulaires et régulent plusieurs gènes, entre autres celui de l'érythropoïétine (Heikkila *et al.*, 2011). En dépit d'une forte homologie de séquence avec HIF-1 α et HIF-2 α , l'isoforme HIF-3 α 1 est caractérisée par l'absence du C-TAD (Gu *et al.*, 1998). De plus, elle possède un seul résidu d'hydroxylation au niveau de l'ODDD qui correspond au résidu proline 564 (Hara *et al.*, 2001). HIF-3 α 1 entre en compétition avec HIF-1 α et HIF-2 α en présence de quantité limitée de HIF-1 β , ce qui supprime l'activité de

HIF-1 et HIF-2 (Gu *et al.*, 1998). La variante courte HIF-3 α 4 interagit avec la région N-terminale de HIF-1 β et forme un dimère inactif HIF-3 qui peut se fixer sur les sites HRE de l'ADN. Par ailleurs, HIF-3 α 4 ne possède pas de domaine transactivateur en C-terminal et joue donc un rôle de dominant négatif, entraînant la formation d'un complexe HIF-3 sans activité transcriptionnelle (Maynard *et al.*, 2005; Maynard *et al.*, 2007). De plus, l'isoforme HIF-3 α 4 régule l'activité transcriptionnelle de HIF-2 α en interagissant avec cette dernière et en bloquant sa liaison à l'ADN au niveau de la séquence HRE (Maynard *et al.*, 2005; Maynard *et al.*, 2007). Chez la souris, l'homologue de l'isoforme HIF-3 α 4 s'appelle IPAS (pour inhibitor of PAS domain protein) et est régulé positivement par l'hypoxie (Heikkila *et al.*, 2011). IPAS forme un dimère uniquement avec HIF-1 α , sans former de complexes avec HIF-2 α ou HIF-1 β . Le dimère IPAS/HIF-1 α est incapable de se fixer aux séquences HRE de l'ADN, ce qui lui confère un rôle de dominant négatif (Makino *et al.*, 2001; Makino *et al.*, 2002).

La sous-unité HIF-1 β , aussi appelée aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ou ARNT, est exprimée de façon constitutive et localisée principalement au noyau (Jiang *et al.*, 1996; Kallio *et al.*, 1997). Alors que les sous-unités HIF-1 α , HIF-2 α ou HIF-3 α sont spécifiques au facteur HIF-1, HIF-2 ou HIF-3 respectivement, HIF-1 β n'est pas spécifique à ces trois facteurs et n'est pas sensible à l'O₂. D'ailleurs, ARNT a d'abord été reconnu pour son rôle dans la fonction du récepteur aux xénobiotiques AhR (pour Aryl Hydrocarbon Receptor), en permettant sa translocation nucléaire (Reyes *et al.*, 1992). Dans le cas de HIF-1 α , ARNT n'est pas nécessaire à sa translocation vers le noyau (Chilov *et al.*, 1999).

1.3.2.2. Régulation des facteurs HIF

1.3.2.2.1. Régulation de la protéine HIF- α

HIF est d'abord régulé par la disponibilité de la protéine HIF- α . En effet, HIF- α est une protéine transcrite et traduite de manière constitutive (Heikkila *et al.*, 2011; Kong *et al.*,

2007; Wang *et al.*, 1995a). Toutefois, en normoxie, la protéine subit une dégradation dépendante de l'oxygène dès qu'elle est synthétisée, ce qui rend sa demi-vie courte. Dans le cas de HIF-1 α , elle est estimée à 5 minutes (Maxwell *et al.*, 2001). Ceci est relié à la présence du domaine ODDD. À ce niveau, HIF- α subit des modifications post-transcriptionnelles affectant les prolines 402 et 564 pour HIF-1 α (Hirota *et al.*, 2005), les prolines 405 et 531 pour HIF-2 α (Bracken *et al.*, 2006) et la proline 564 pour HIF-3 α (Heikkila *et al.*, 2011). Ces résidus sont hydroxylés en présence d'O₂ par des dioxygénases nommées PHD qui catalysent le transfert de 2 atomes d'oxygène sur leurs substrats et sont dépendantes de l'O₂, du Fe(II+) et du 2-oxoglutarate (Hewitson *et al.*, 2003). On distingue trois isoformes de PHD (1, 2 et 3) qui hydroxylent HIF selon des affinités variables. PHD2 et PHD3 sont les principales enzymes contrôlant la stabilité de HIF-1 α et HIF-2 α (Appelhoff *et al.*, 2004; Epstein *et al.*, 2001; Pasanen *et al.*, 2010). La double hydroxylation des résidus prolines favorise la fixation d'un complexe d'ubiquitylation composé de la E3-ubiquitine ligase von Hippel-Lindau (VHL), de la cullin 2 et des elongin B et C (Jaakkola *et al.*, 2001; Maxwell *et al.*, 1999). Par conséquent, HIF- α sous sa forme ubiquitylée est dégradée par le protéasome 26S (Kallio *et al.*, 1999). La constante d'affinité des PHDs pour l'O₂ est légèrement supérieure à la PO₂ atmosphérique. Ainsi, ces enzymes constituent des senseurs de la PO₂, et la diminution de cette valeur les inhibe (Hirsila *et al.*, 2003). En effet, l'hypoxie entraîne l'inactivation des PHD, ce qui stabilise HIF- α , et l'accumulation subséquente dans le cytoplasme. HIF- α transloque au noyau et dimérise avec HIF-1 β . La formation du complexe HIF conduit à la transcription des gènes cibles (Semenza *et al.*, 2006). Le niveau d'expression des PHDs est varié selon le type de stimulus, tel que l'exposition hormonale (pour PHD1) ou l'hypoxie prolongée (PHD2 et PHD3) (Sato *et al.*, 2010 ; Högel *et al.*, 2011 ; Andersen *et al.*, 2011).

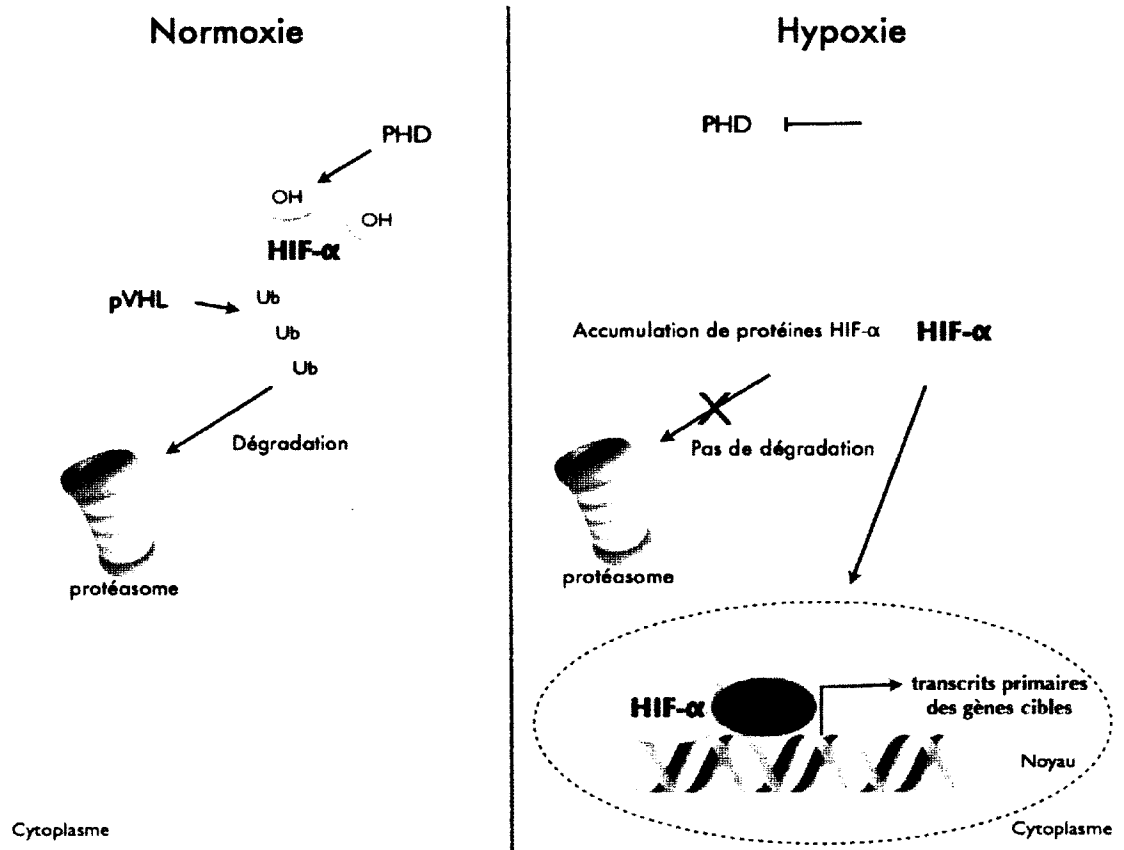


Figure 4. Régulation de la protéine HIF- α par les PHD.

En présence d'oxygène (normoxie, à gauche), les PHD hydroxylent la protéine HIF- α , ce qui l'expose à la polyubiquitinylation par le complexe pVHL et la dégradation par le protéasome. Le manque d'oxygène (hypoxie, à droite) inhibe les PHD. Par conséquent, HIF- α échappe à la dégradation par le protéasome et dimérise avec HIF-1 β . Le complexe HIF transloque au noyau et se fixe sur les séquences spécifiques HRE, pour augmenter la transcription des gènes cibles.

Par ailleurs, la dégradation par le protéasome de HIF- α peut être régulée de façon indépendante de l'O₂. Par exemple, l'interaction de HIF- α avec les protéines chaperon Hsp90 et Hsp70 (heat shock protein-70 et 90) joue un rôle dans la maturation et l'activation de HIF- α . Hsp90 interagit avec le domaine PAS de HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α (Katschinski *et al.*, 2004) et Hsp70 se fixe sur le domaine ODDD (Zhou *et al.*, 2004 ; Katschinski *et al.*, 2004) ce qui renforce la stabilité de HIF-1 α . L'utilisation d'inhibiteur pharmacologique de Hsp90, tel que la geldanamycine ou le 17-AAG (17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin), diminue le taux intracellulaire de HIF-1 α et favorise sa dégradation de façon indépendante de la concentration en oxygène (Koga *et al.*, 2009; Mo *et al.*, 2012). La protéine d'échafaudage RACK1 (receptor of activated protein kinase C-1) entre en compétition avec la protéine Hsp90 pour la liaison de HIF-1 α . Cette interaction permet le recrutement du complexe ubiquitine ligase qui provoque l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de HIF-1 α , ce qui l'expose à la dégradation de façon indépendante de la voie des PHD et de la disponibilité en O₂ (Liu *et al.*, 2007). Il a été démontré que la voie PI3K/Akt contribuait à la stabilisation de HIF-1 α en induisant l'expression de Hsp90 et Hsp70 (Zhou *et al.*, 2004). La régulation de HIF-1 α dépendant des protéines Hsp90 est contrôlée également par la kinase JNK1 dont l'activation permet la stabilisation de HIF-1 α . Cet effet est induit par l'augmentation de l'expression de l'histone déacétylase HDAC6 dont l'activité favorise la fonction de Hsp90 (Zhang *et al.*, 2010a). Par ailleurs, la phosphorylation de HIF-1 α par la kinase GSK3 β (glycogen synthase kinase 3) sur les trois résidus serine 551, thréonine 555 et serine 589 favorise la dégradation par le protéasome indépendamment de l'état d'hydroxylation (Flugel *et al.*, 2007).

La protéine HIF- α constitutivement présente peut échapper à la dégradation par le protéasome en normoxie, lors de l'activation cellulaire par des facteurs de croissance (Lim *et al.*, 2008; Tacchini *et al.*, 2001), cytokines (Chae *et al.*, 2011; Haddad, 2002; Haddad *et al.*, 2001), hormones (Heidbreder *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2006) et de protéines virales et bactériennes (Feldser *et al.*, 1999; Heidbreder *et al.*, 2007). En général, ces stimuli déclenchent des cascades de signalisation intracellulaire augmentant la transcription des gènes HIF1A, HIF2A ou HIF3A couplée à la stabilisation de quantités substantielles de la protéine HIF- α qui dépassent la capacité de dégradation par

le protéasome. L'activation des récepteurs à tyrosine kinase, tel que l'IGFR (Insulin growth factor receptor), induit l'expression et la synthèse de HIF-1 α de manière indépendante de l'oxygène en faisant intervenir les voies mTOR (mammalian target of rapamycin) et MAPK (Land *et al.*, 2007; Laughner *et al.*, 2001). Des modifications post-traductionnelles autres que l'hydroxylation modulent les niveaux de HIF- α . Par exemple, l'acétylation au niveau du résidu lysine 532 dans le domaine ODDD par la N-acétyltransférase ARD1 (Arrest defective 1) favorise l'interaction entre HIF-1 α et VHL en normoxie (Jeong *et al.*, 2002). Par contre, cet effet est controversé puisqu'il a été démontré que ARD1 n'a pas d'influence sur la stabilité de HIF-1 α et HIF-2 α (Bilton *et al.*, 2006). L'activation de la voie de la MAPK p38 induit la phosphorylation directe de HIF-1 α ce qui inhibe son interaction avec pVHL et favorise son accumulation (Sang *et al.*, 2003). Enfin, des modifications épigénétiques affectent les niveaux de la protéine HIF en contrôlant l'expression de PHD3 et VHL (Huang *et al.*, 2010; Vanharanta *et al.*, 2013).

1.3.2.2.2. Régulation de l'ARNm de HIF- α

Les mécanismes de contrôle de la synthèse et de la traduction des ARN messagers de HIF sont peu connus comparativement à ceux responsables de la dégradation. En revanche, il a été démontré que la transcription du gène *HIF1A* dépend de facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation, notamment, NF- κ B (Rius *et al.*, 2008; Taylor, 2008; Van Uden *et al.*, 2008), HSF (Heat Shock sequence) (Iton *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2011 ; Huali *et al.*, 2012). De plus, les facteurs Sp1 et Sp3 contrôlent l'induction de l'expression du gène *EPAS1* lors de l'adipogenèse (Wada *et al.*, 2006). La traduction des ARNm de HIF- α est dépendante de la voie de PI3K. En effet, l'activation de la voie PI3K/p70S6K recrute la protéine ribosomale S6, ce qui augmente la traduction et la quantité de la protéine HIF- α (Belaiba *et al.*, 2007). L'ARNm de HIF-1 α peut également être régulé par plusieurs microARNs (miR) (Dalmay *et al.*, 2006; Kulshreshtha *et al.*, 2007). Les miR sont des acides ribonucléiques simple-brin formé en moyenne de 22 nucléotides (Kim, 2005 ; Chen et Rajewsk, 2007). Ils constituent des régulateurs post-transcriptionnels négatifs des gènes cibles en s'appariant à une séquence complémentaire d'ARNm, ce qui conduit à la répression ou la dégradation de cet ARNm (Kim, 2005 ; Chen et Rajewsk, 2007). Par

exemple, miR-20b induit la suppression de l'ARNm de HIF-1 α chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 (Cascio *et al.*, 2010). Par ailleurs, la diminution des niveaux de miR-199a chez les myocytes cardiaques favorise l'augmentation de l'ARNm de HIF-1 α (Song *et al.*, 2010). Le groupe des miR17-92 régule de façon négative l'expression de HIF-1 α (Taguchi *et al.*, 2008).

1.3.2.2.3. Régulation de l'activité du HIF

Des modifications de la protéine HIF- α sont nécessaires pour induire la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle. Il s'agit principalement de modifications post-traductionnelles permettant le recrutement des coactivateurs p300/CBP, SRC-1 et TIF2 (Kallio *et al.*, 1997 ; Kallio *et al.*, 1998 ; Wenger, 2002). La protéine p300/CBP est une histone acétyltransférase qui joue son rôle en acétylant des histones et plusieurs facteurs de transcription, ce qui permet l'accessibilité à la chromatine et la régulation transcriptionnelle. L'hydroxylase FIH est une dioxygénase qui régule l'activité de HIF- α de façon dépendante de l'O₂ et des cofacteurs comme le 2-oxoglutarate, le fer et l'acide ascorbique (Lando *et al.*, 2002). Cette enzyme hydroxyle le résidu asparagine 803 de HIF-1 α dans le domaine C-TAD, ce qui interfère avec la liaison aux coactivateurs p300/CBP (Linke *et al.*, 2004; Peet et Linke, 2006). Sous hypoxie, cette situation est inversée quand FIH est dépourvu de ses cofacteurs et devient inactif, ce qui déclenche l'interaction entre HIF- α et p300/CBP et le recrutement séquentiel des deux autres coactivateurs Ref-1 et SRC-1 (Gray *et al.*, 2005; Ruas *et al.*, 2005). Par conséquent, le facteur HIF est disponible pour son activité de transcription. Le domaine C-TAD de HIF-2 α serait moins sensible à l'action de FIH que celui de HIF-1 α (Bracken *et al.*, 2006). Certains stimuli modulent l'action du FIH comme les MAPKs. La phosphorylation de HIF-1 α sur la thréonine 796 abolit la fixation de FIH ainsi que l'hydroxylation subséquente de HIF (Lancaster *et al.*, 2004). La phosphorylation de la thréonine 796 par la caséine kinase 2 augmente l'activité transcriptionnelle de HIF1 α en favorisant l'interaction avec CBP/p300 (Gradin *et al.*, 2002 ; Mottet *et al.*, 2005). La modification de ce résidu empêcherait l'hydroxylation du résidu asparagine 803 voisin par le FIH, ce qui contribuerait également à stimuler l'activité transcriptionnelle de HIF1 α .

(Lancaster *et al.*, 2004). La phosphorylation de HIF-1 α sur les sérines 641 et 643 par la p42/p44 MAPK est essentielle à l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α (Hur *et al.*, 2001) en permettant la rétention nucléaire de HIF-1 α (Mylonis *et al.*, 2006).

La sumoylation consiste en l'ajout de résidu SUMO (Small ubiquitin-related modifier) par une SUMO E3-ligase. Le rôle de la sumoylation de HIF reste controversé, certains auteurs avaient proposé qu'elle réduit l'activité transcriptionnelle de HIF (Berta *et al.*, 2007), alors que d'autres avaient démontré l'inverse (Huang *et al.*, 2009). HIF-1 α est sumoylée sur les lysines 391 et 477, conduisant à la diminution de l'activité de transcription (Berta *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2010). Il a été démontré que HIF-1 β peut également être sumoylée sur la lysine 245 située dans son domaine PAS, ce qui influence négativement l'activité transcriptionnelle du dimère HIF-1 (Tojo *et al.*, 2002). HIF-2 α est aussi régulée par sumoylation et cela influe sur sa dégradation par VHL (Van Hagen *et al.*, 2010).

La S-nitrosylation permet conjointement de moduler l'expression et l'activité de HIF- α . Elle consiste en l'ajout d'un groupement NO sur la cystéine 520 et inhibe la liaison de HIF-1 α à pVHL, ce qui empêche sa dégradation (Yasinska *et al.*, 2003). De plus, la cystéine 800 de HIF-1 α est également nitrosée, ce qui active la liaison avec le co-activateur p300/CBP (Li *et al.*, 2007). Là encore, le rôle de cette modification n'est pas clairement établi puisque des travaux contradictoires font état d'une inhibition de la liaison avec CBP/p300 par la nitrosylation (Cho *et al.*, 2007). Une régulation négative est contrôlée par les membres de la famille CITED, par exemple, CITED-2 qui entre en compétition avec HIF-1 α pour la fixation de CBP/p300 et empêche la formation d'un complexe HIF actif (Freedman *et al.*, 2003).

D'autres modifications épigénétiques peuvent influencer la liaison et l'activation du HIF au site HRE, principalement en ciblant l'ADN et les histones (Watson *et al.*, 2010). Par exemple, la méthylation du CpG au site 3' HRE du gène de l'érythropoïétine abolit l'activité de HIF (Wenger *et al.*, 1998). Les HDAC régulent l'activité de HIF-1. Sous hypoxie, HDAC7 transloque au noyau en liant le C-TAD de HIF-1 α (Watson *et al.*, 2010).

1.3.3. Hypoxie et immunité innée

L'hypoxie est une caractéristique de l'inflammation retrouvée dans les sites infectieux, les blessures tissulaires, les tumeurs solides et les sites des réactions d'auto-immunité (Shiao *et al.*, 2011; Souto *et al.*, 2011; Imtiyaz *et al.*, 2010; Karhausen *et al.*, 2005). Ces foyers d'inflammation sont le lieu d'une prolifération cellulaire importante et d'une consommation accrue d'O₂ à l'origine de l'hypoxie. De plus, d'autres facteurs exacerbent l'hypoxie comme la diminution de la perfusion due à l'atteinte des lits microvasculaires et les thromboses, l'augmentation de la pression interstitielle, l'hypoglycémie, l'acidose, l'augmentation des déchets métaboliques provenant des agents infectieux ainsi que l'afflux considérable des cellules inflammatoires, comprenant les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles (Liaskou *et al.*, 2012; Nizet et Johnson, 2009; Falgarone *et al.*, 2005). Plusieurs travaux ont démontré que les fonctions des cellules infiltrant les foyers inflammatoires sont modulées par l'hypoxie, dont certaines sont sous le contrôle du facteur HIF (Dong *et al.*, 2010; Flamant *et al.*, 2009; Nizet *et al.*, 2009; Karhausen *et al.*, 2005).

1.3.3.1. HIF chez les monocytes/macrophages

Les macrophages, qui ont des rôles dans l'immunité tumorale, sont nommés macrophages associés aux tumeurs (Tumor associated macrophages, TAM). Chez l'homme, les niveaux d'expression augmentés de HIF-1 et HIF-2 chez les TAM sont associés à un mauvais pronostic dans les cancers (Beasley *et al.*, 2002; Eubank *et al.*, 2011). Sous hypoxie, les protéines HIF-1 α et HIF-2 α sont exprimées chez les monocytes et les macrophages primaires humains (Elbarghati *et al.*, 2008). L'exposition au LPS en normoxie augmente les transcrits d'ARNm et le niveau de HIF-1 α , induit une activité de transcription dépendante de HIF-1 (Blouin *et al.*, 2004; Nishi *et al.*, 2008). De plus, plusieurs fonctions des macrophages dépendent de HIF. En effet, la stabilisation de HIF-1 α induite par l'hypoxie est responsable de l'augmentation de la bactéricidie des macrophages primaires cultivés au contact de *Staphylococcus aureus* comparativement aux macrophages normoxiques (Zinkernagel *et al.*, 2008). Chez les macrophages, l'utilisation des ARN interférents dirigés

contre HIF-1 α abolit la phagocytose (Anand *et al.*, 2007). Aussi, plusieurs gènes inflammatoires exprimés chez les macrophages en hypoxie sont régulés par HIF, dont ceux encodant les récepteurs TLR2 et TLR6 (Kim *et al.*, 2010) et l'IL-8 (Hirani *et al.*, 2001). La délétion conditionnelle de HIF-1 α dans les cellules myéloïdes de souris altère les fonctions d'agrégation, de motilité, d'invasion et de bactéricidie des macrophages (Cramer *et al.*, 2003). Également, les macrophages dérivés de la MO et qui sont cultivées sous hypoxie chronique acquièrent un phénotype angiogénique différent de celui des macrophages cultivés en normoxie : les niveaux des transcrits de HIF-1 α et des gènes cibles VEGF et MMP9 sont augmentés (Staples *et al.*, 2011). Ces données montrent que l'activation de HIF chez les macrophages est impliquée dans la pathologie inflammatoire. Par exemple, au cours de l'athérosclérose qui est une maladie vasculaire inflammatoire, les macrophages imprègnent les plaques d'athérome et contribuent à leur formation (Antohe, 2006). Le facteur HIF-1 est impliqué dans ce processus. En effet, des niveaux élevés de HIF-1 α détectés chez ces macrophages s'accompagnent d'une activation de HIF-1 à l'origine d'une grande production de VEGF. Ce facteur angiogénique favorise le développement de l'athérome et l'installation de la maladie (Vink *et al.*, 2007). De plus, les macrophages isolés à partir de liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde expriment fortement HIF-1 α comparativement aux macrophages isolés des articulations des sujets sains. Cette expression est dépendante de la voie PI3K et CaMKII (Fang *et al.*, 2009). L'inhibition pharmacologique de la voie activatrice de HIF-1 dépendante de la PI3K entraîne une baisse de HIF-1 α qui mène à une diminution des transcrits de VEGF et MMP9 (Fang *et al.*, 2009; Westra *et al.*, 2010).

1.3.3.2. HIF chez les cellules dendritiques

HIF-1 α est exprimé chez les cellules dendritiques (CDs) immatures et activé sous hypoxie (Jantsch *et al.*, 2008). De plus, une étude de micropuces des CDs cultivées sous hypoxie a permis de détecter une augmentation d'expression de gènes, en particulier ceux encodant des cytokines (Blengio *et al.*, 2013). Parmi ceux-ci, les gènes codant pour IL-1 β , MIF, IL-23 et VEGF contiennent une séquence HRE dans leurs régions promotrices (Blengio *et al.*, 2013). Mais la régulation directe de ces gènes par le facteur HIF n'a pas été vérifiée. Par

ailleurs, chez les CD₈, l'hypoxie augmente l'expression des gènes codant pour MIP-1 α , MIP-2 α , MIP-3 α , RANTES, Gro- γ , ENA-78, IL-8 et le récepteur CCR2, et diminue celle des gènes qui codent pour les chimiokines PARC et BLC, et le récepteur CCR6 (Blengio *et al.*, 2012; Bosco *et al.*, 2011; Bosco *et al.*, 2008b).

1.3.3.3. HIF chez le neutrophile

Les neutrophiles fonctionnent en présence d'une faible pO_2 grâce à certaines caractéristiques, notamment la présence d'un faible nombre de mitochondries. Leur métabolisme est basé sur l'anaérobiose même en normoxie puisqu'ils catabolisent 85 % de leur glucose en lactate (Borregaard *et al.*, 1982). Malgré cela, les effets de l'hypoxie sur la biologie des neutrophiles demeurent peu connus.

Les travaux de Cramer *et al.* (2003) avaient prédit que l'hypoxie module certaines fonctions des neutrophiles par l'intermédiaire du facteur HIF. En effet, l'inactivation conditionnelle du gène encodant HIF-1 α dans la lignée myéloïde chez la souris entraîne une diminution des niveaux d'adénosine triphosphate (ATP) de 15 à 40% chez les neutrophiles mutés comparativement aux neutrophiles normaux, ce qui indique que HIF-1 régule le métabolisme énergétique chez ces cellules. De plus, la migration et le chimiotactisme des PMN déficients en HIF-1 α sont inhibés. Ceci s'accompagne d'une diminution importante de l'intensité des phénomènes inflammatoires au cours de l'arthrite induite par le collagène chez ces souris (Cramer *et al.*, 2003). De plus, l'activation hypoxique de HIF-1 joue un rôle anti-apoptotique dépendant de NF- κ B chez les neutrophiles humains et murins (Elks *et al.*, 2011; Walmsley *et al.*, 2005). D'ailleurs, l'inactivation conditionnelle de HIF-1 α chez des cellules myéloïdes de souris diminue la survie de neutrophiles dérivés et cultivés sous hypoxie (Mecklenburgh *et al.*, 2002; Walmsley *et al.*, 2005). De façon spécifique, la stimulation sous normoxie des neutrophiles de souris par le LPS permet l'accumulation de HIF-1 α et l'activation de HIF-1 menant à la transcription du gène du transporteur du glucose GLUT1 (Schuster *et al.*, 2007). Dans ce travail, cette activation est dépendante de la kinase p38 MAPK. Une étude réalisée par Walmsley *et al.* (2006) a caractérisé le

phénotype des neutrophiles des patients atteints du syndrome de von Hippel Lindau (pVHL) caractérisé par une anomalie du gène pVHL à l'origine d'une suractivation du facteur HIF. Dans ce cas, les neutrophiles invalidés pour pVHL et cultivés *in vitro* ont une survie prolongée, une bactéricidie augmentée et une production accrue des protéases. Cependant, le chimiotactisme et la production des ROS ne sont pas affectés (Walmsley *et al.*, 2006). Dans une autre étude, les neutrophiles de souris déficientes en acide ascorbique, qui est un cofacteur indispensable pour la fonction des PHD, présentent une élévation des niveaux du HIF-1 α et une survie prolongée (Vissers *et al.*, 2007). Récemment, une étude réalisée dans un modèle de cicatrisation post-résection chez les poissons-zèbres a permis de montrer le rôle crucial de HIF dans l'inflammation par les neutrophiles. En effet, le dominant actif de HIF obtenu en mutant les sites d'hydroxylation par le PHD et FIH favorise la survie et le recrutement continu des neutrophiles en réponse au DMOG, en rapport avec la diminution de la cicatrisation (Elks *et al.*, 2011).

Le nombre d'études sur le facteur HIF chez les neutrophiles est limité. Aucune évidence ne permet à ce jour de confirmer son implication dans l'expression des cytokines chez les neutrophiles. De plus, la caractérisation des protéines HIF n'est que partiellement établie chez les PMN. Par conséquent, il est important d'approfondir l'étude du facteur HIF dans la régulation des fonctions des neutrophiles, notamment au niveau de l'expression des cytokines, et de considérer l'influence de la régulation hypoxique chez les neutrophiles.

1.3.4. HIF comme cible thérapeutique

La découverte des mécanismes divers de la régulation de HIF a permis la mise au point d'un arsenal thérapeutique important qui vise différentes voies de régulation de HIF. Il s'agit d'agents pharmacologiques dont certains sont décrits plus loin (Figure 6). Par ailleurs, ces molécules ne sont pas toutes des inhibiteurs sélectifs de HIF et peuvent interférer avec d'autres voies de signalisation importantes dans plusieurs processus biologiques. D'autres approches basées sur la transgénèse chez des modèles animaux visant particulièrement le HIF-1 sont utilisées. Par exemple, la surexpression d'une forme active

de HIF-1 α dans l'épiderme améliore les signes de la maladie inflammatoire ischémique (Vincent *et al.*, 2000; Shyu *et al.*, 2002). Au cours de l'inflammation chronique, une thérapie qui cible HIF aurait pour objectif de freiner le processus inflammatoire, en plus que HIF contribue à augmenter l'agressivité des cellules phagocytaires, en augmentant la production des ROS qui peuvent induire des lésions tissulaires (Gale *et al.*, 2010). Dans le cas des déficits immunitaires issus d'une déficience des leucocytes, l'activation de la voie de HIF peut être bénéfique : il serait primordial de favoriser des traitements qui stimulent la réponse immunitaire. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des PHD comme le FG-4497 ou l'inhibition indirecte de ces enzymes par la chélation du 2-oxyglutarate améliore les colites inflammatoires dans un modèle de souris (Tambuwala *et al.*, 2010). Donc, la compréhension approfondie du rôle du facteur HIF dans la biologie des leucocytes, notamment les neutrophiles, est une étape indispensable dans l'utilisation de thérapies dirigées contre HIF.

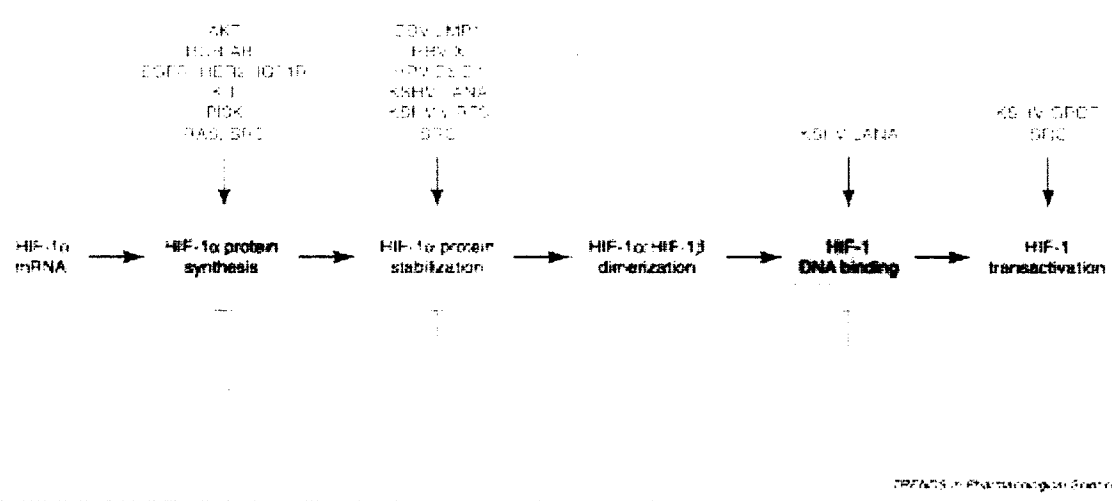


Figure 5. Les principaux agents pharmacologiques et les mécanismes moléculaires d'inhibition de HIF-1.

Les étapes de la régulation de HIF sont indiquées dans les parties colorées, tandis que les inhibiteurs sont cités en bas. L'inhibition de la liaison aux séquences HRE dépend d'agents intercalants. La transactivation est inhibée par l'abolition du recrutement des coactivateurs de transcription. Abréviations : AF, aminoflavine; MSC, Se-méthylselenocysteine (Semenza, 2012).

2. OBJECTIFS DE RECHERCHE

- 2.1. Déterminer le profil d'expression des protéines HIFs chez les neutrophiles humains en normoxie et en hypoxie, avec ou sans stimuli.
- 2.2. Déterminer l'influence de l'hypoxie sur la production des cytokines chez les neutrophiles humains.
- 2.3. Étudier l'activation des facteurs HIFs chez les neutrophiles humains.
- 2.4. Étudier les voies de signalisation mobilisées en hypoxie chez les neutrophiles humains.
- 2.5. Étudier le rôle de l'hypoxie dépendant ou non de HIF dans la production des cytokines chez les neutrophiles humains.

3. MATERIEL ET METHODES

Anticorps et réactifs

Les anticorps dirigés contre les protéines phospho-AKT (Ser473) (#9271), phospho-C/EBP- β (Thr235) (#3084), phospho-ERK p44/42 (T202/Y204) (#4376), DYKDDDDK TAG(#2044), HIF-1 β (#3718), phospho-STAT1 (Tyr701) (#7649), phospho-STAT3 (Tyr705) (#9131), phospho-STAT5 (Tyr694) (#9351), ont été achetés de Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Les anticorps dirigés contre les protéines β -Actine (sc-1616), HIF-1 α (sc-10790 X), HIF-2 α (sc-46691 X), HIF-3 α (sc-28707 X), I κ B- α (sc-371), phospho-JNK (Thr183) (sc-135642), phospho-p38 α (sc-535) ont été achetés de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorps neutralisant le TNF α (500-M26) a été acheté de PeproTech (Québec, QC, Canada). Les anticorps neutralisant IL-18 et IL-1Ra proviennent de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Le Ficoll-Paque provient de GE Biosciences (Baie d'Urfé, Qc, Canada). Le RPMI 1640 et le sérum de veau fœtal (FCS) sans endotoxines (<2 pg/ml) ont été achetés de chez Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Les cytokines recombinantes humaines (G-CSF, GM-CSF et TNF α) ont été achetées de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Le LPS UltraPure (issu d'*Escherichia coli* 0111:B4) a été acheté de InvivoGen (San Diego, CA, USA). La cycloheximide, le diméthyl sulfoxyde (DMSO), l'acétyl-BSA, le phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) et le fMLP ont été achetés de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le diisopropyl fluorophosphate (DFP) a été acheté de Bioshop Inc. (Burlington, ON, Canada). Les inhibiteurs des protéases, l'aprotinine, le 4-(2-aminométhyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), la leupeptine, et la pepstatine A ont été achetés de Roche (Laval, Qc, Canada). L'inhibiteur de STAT3 (S31-201) et l'inhibiteur de p38 (SB 203580) ont été achetés de Calbiochem (San Diego, CA). La T4 polynucléotide kinase et le poly(dI-dC) ont été achetés chez GE Healthcare Biosciences Inc. (Baie d'Urfé, QC, Canada); les radionucléotides [γ -³²P] ATP et [α -³²P] UTP ont été achetés chez NEN (Boston, MA, USA). Un oligonucléotide contenant un site consensus HRE a été synthétisé. Un oligonucléotide contenant des sites NF- κ B répétés en tandem identiques à ceux du promoteur du HIV a été synthétisé (5'-gatcaGGGACTTTCCgctgGGGACTTTCC-3'). Toutes les solutions et les tampons ont été

préparés à partir d'eau stérile de grade clinique.

Vecteurs

Le plasmide (pIL8-Luc) contenant un gène rapporteur luciférase sous le contrôle de la région promotrice (-1481 à +40) de l'IL-8, ainsi que les plasmides (pIL8-Luc- κ Bmut) et (pIL8-Luc-HREmut) contenant les constructions mutées dans les séquences consensus du NF- κ B (cgtgAaCtttctct) ou HRE (cAtg), proviennent du Dr. Vijay K. Kalra (University of Southern California, Los Angeles, CA, USA). Les bases mutées sont indiquées en majuscule.

Isolement des neutrophiles et culture cellulaire

Les neutrophiles ont été isolés à partir du sang périphérique de donneurs sains. Le protocole d'isolement a été approuvé par le comité d'éthique institutionnel. Toute la procédure d'isolement a été réalisée à température de la pièce (TP) et dans des conditions exemptes d'endotoxines, tel que décrit auparavant (Cloutier *et al.*, 2003). La suspension finale des neutrophiles contient <0.5% de monocytes et de lymphocytes; et <3% d'éosinophile, selon une coloration de Wright des cellules. La viabilité des neutrophiles était supérieure à 98% après 4 heures de culture, tel que déterminé par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Les neutrophiles purifiés ont été resuspendus dans du RPMI 1640, supplémenté avec 10% de sérum autologue inactivé à la chaleur, à une concentration finale de 5×10^6 cellules/ml. La lignée promyélocytaire humaine PLB-985 a été obtenue de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany). La procédure de différenciation granulocytaire de ces cellules en présence de DMSO était réalisée ainsi : les cellules PLB-985 ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère humide avec 95% air et 5% de CO₂ dans du RPMI 1640 additionné de 10% FCS, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et du DMSO à 1.25% v/v (de grade de culture cellulaire) pendant 5 jours. Le milieu a été renouvelé chaque deux jours. Les cellules différenciées seront référées en tant que «*neutrophil-like*». Les neutrophiles humains et les cellules «*neutrophil-like*» ont été

cultivés à 37°C, à une densité cellulaire de 5×10^6 neutrophiles/ml, sous une atmosphère humide. Les pourcentages des gaz atmosphériques ont été contrôlés pour maintenir la culture sous normoxie (21% d'O₂ et 5% de CO₂) ou sous hypoxie (5% de CO₂, 1% d'O₂ et balancée par le N₂).

Analyse des protéines par immunobuvardage

Après avoir cultivé les cellules en présence ou en absence des stimuli et en présence ou en absence d'hypoxie, les incubations étaient arrêtées avec un volume équivalent de PBS froid. Les cellules ont été centrifugées à 300 x g pendant 5 min, et les culots cellulaires ont été resuspendus dans un tampon de relaxation froid (10 mM PIPES pH 7.3, 10 mM NaCl, 3.5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA et 1 mM DTT) contenant des inhibiteurs de phosphatases (10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM Na₄P₂O₇) ainsi que des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinine, 10 µg/ml pepstatine A, 10 µg/ml leupeptine, 0.5 M AEBSF, 1 mM DFP). Un petit volume de chaque échantillon a été dosé pour le contenu protéique. Les cellules ont été centrifugées 5 min à 300 x g. Lorsque des échantillons cellulaires totaux ont été réalisés, un tampon d'échantillon 2X bouillant est ajouté aux culots cellulaires. Il s'agit d'une suspension finale dans 25 mM Tris-base pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoéthanol et 10% glycérol. Les lysats ont été brièvement agités, chauffés à 95°C pendant 5 min et soniqués, afin de défaire les complexes de chromatine. Les échantillons étaient conservés à -20°C jusqu'à leur analyse. Pour préparer les fractions cytoplasmiques et nucléaires, les neutrophiles étaient lysés par cavitation à l'azote selon la procédure décrite auparavant (Ear *et al.*, 2005). Pour analyser le contenu en protéines, les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide de 7 à 10% selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Par la suite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les sites non spécifiques sur la membrane ont été bloqués par une solution de Tris-Base avec 5% de lait non écrémé ou contenant 5% de BSA dépendamment de la protéine étudiée. Les membranes ont été incubées avec des anticorps dirigés contre les protéines recherchées. L'acquisition de la chimiluminescence a été réalisée par le VersaDoc et les images ont été révélées et analysées par le programme QuantityOne (Bio-Rad Laboratoires, Mississauga, ON, Canada).

Extractions d'ARN et analyses par PCR en temps réel

Les neutrophiles ont été incubés en présence ou en absence de GM-CSF, avec ou sans DMOG. L'ARN total a été extrait à partir de 10^7 cellules, en utilisant le TRIzol selon la procédure définie par le manufacturier (Invitrogen). Un μg d'ARN isolé par échantillon a été soumis à la transcription inverse en utilisant l'enzyme SuperScript II (Invitrogen). Les oligonucléotides utilisés comme amorce (Ambion) sont décrits au tableau 2. Le niveau d'expression des transcrits d'ARNm des gènes inscrits dans le tableau a été évalué par une analyse semi-quantitative par PCR en temps réel (Real-time PCR; RT-PCR) selon une procédure déjà décrite (Cloutier *et al.*, 2009).

| Transcrit ARNm | Oligonucléotide forward | Oligonucléotide reverse |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| IL-8 | AGGAAGCTCACTGGTGGCTG | TAGGCACAATCCAGGTGGC |
| Mip-1 α | AGCTGACTACTTTGAGACGAG CA | CGGCTTCGCTTGGTTAGGA |
| Mip-1 β | CTGCTCTCCAGCGCTCTCA | GTAAGAAAAGCAGCAGGCGG |
| MIP-3 α | TCCTGGCTGCTTTGATGTCA | TCAAAGTTGCTTGCTGCTTCTG |
| TNF α | TCTTCTCGAACCCCGAGTGA | CCTCTGATGGCACCACCAG |
| IL-6 | ACACCCCTCCCTCACAC | GGTTGTTTTCTGCCAGTGC |
| IP-10 | TGAAATTATTCCTGCAAGCCAA | CAGACATCTCTTCTCACCCTTC TTT |
| TGF- β | CAGCAACAATTCCTGGCGA | AAGGCGAAAGCCCTCAATTT |
| VEGF | CCAGGCCCTCGTCATTG | AAGGAGGAGGGCAGAATCAT |
| MTG | GCATTCCTGGGTCGTTAGAG | CAGCCACTGATTCCACCACCAC |
| MCL-1 | TTCCAAGGCATGCTTCGG | TCTGCTAATGGTTCGATGCAG |
| 18S | CGAGATCCCTCCAAATC | TTCACACCCA TGACGAAC |

Tableau 2. Séquences des oligonucléotides utilisés dans l'analyse par Q-PCR

Analyse des cytokines par ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay)

Les neutrophiles (3×10^6 cellules/600 μ l) ont été cultivés dans des plaques de 12 puits à 37°C. Les surnageants cellulaires ont été prélevés, puis rapidement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leurs analyses. Les concentrations des cytokines et chimiokines dans les surnageants ont été déterminées par ELISA en sandwich, en utilisant les anticorps de capture et de détection fournis par R&D Systems. La procédure de détection, capture et mesures a été réalisée suivant les instructions du manufacturier. L'acquisition des données et leur analyse ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Vmax de Molecular Devices (California, USA) et du logiciel SoftMax® Pro.

Transfections transitoires par nucléofection

Les cellules «*neutrophil-like*» différenciées selon la procédure décrite ci-dessus ont été lavées deux fois avec du PBS. 5×10^6 cellules ont été resuspendues dans 400 μ l de solution de nucléofection (trousse pour les cellules dendritiques de Amaxa Biosystems, Köln, Germany). Le plasmide destiné à être transfecté (5 μ g d'ADNc/ 5×10^6) a été mélangé avec les cellules et incubé pendant 5 min à température ambiante. La suspension de cellules a été placée dans une cuvette de nucléofection dont les électrodes étaient séparées de 4 mm. Les cellules ont été nucléofectées suivant les paramètres du programme Q-01 (Amata Biosystems). Les cellules nucléofectées ont été lavées une fois avec le milieu RPMI 1640 contenant 10% FCS et ensuite mises en culture à 37°C dans une atmosphère normoxique pendant 2 heures avant leur stimulation sous normoxie ou hypoxie.

Essais luciférase

Les cellules «*neutrophil-like*» nucléofectées en présence des plasmides décrits plus haut, ont été cultivées sous normoxie ou hypoxie durant 6 heures, en présence ou en absence des stimuli. L'arrêt des stimulations a été fait par un double lavage au PBS 1X froid. Puis, les

cellules ont été lysées pendant 15 min dans 100 µl de tampon de lyse (Reporter Lysis Buffer, Promega Corp, Madison, WI, USA). Cette étape a été suivie d'une étape de congélation-décongélation dans l'azote liquide. Les lysats ont été centrifugés pendant 10 min à 12000 x g. 20 µl de surnageant ont été utilisés pour la lecture de l'activité luciférase selon les instructions du fabricant (Promega), dans un luminomètre Sirius (Berthold Détection Systems, Pforzheim, Germany). Les données sont normalisées selon l'activité de la β -galactosidase et exprimées en unité relative de luciférase (URL).

4. RÉSULTATS

4.1. Expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains au repos en normoxie

La détection des protéines HIF chez les neutrophiles (PMN) a fait l'objet d'un nombre restreint d'études, chez le poisson-zèbre (Elks *et al.*, 2011), la souris (Schuster *et al.*, 2007; Vissers *et al.*, 2007) et chez l'homme (Mecklenburgh *et al.*, 2002; Walmsley *et al.*, 2005). Cependant, seule la protéine HIF-1 α a été examinée, tandis que l'expression des autres protéines HIF n'a pas encore été établie. Par conséquent, nous avons déterminé le profil d'expression des protéines HIF chez les PMN. Pour ce faire, des contenus en protéines de lysats totaux des neutrophiles ont été analysés par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques pour chacune des quatre sous-unités HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α et HIF-1 β . Un lysat de la lignée cellulaire Jurkat nous a servi de contrôle positif.

Tel qu'illustré à la figure 6, nous n'avons pas détecté une immunoréactivité spécifique pour HIF-1 α (normalement à 120 kDa) comparativement aux lysats des lignées cellulaires contrôles. Ce résultat a été validé par l'analyse avec deux anticorps différents. Le premier anticorps était acheté de Santa Cruz Biotechnology (sc-10790 X), le deuxième de Novus Biologicals (CAT NB100-134). Toutefois, le premier anticorps (de Santa Cruz Biotechnology) a détecté une bande immunoréactive légèrement plus haute que 120 kDa et qui peut être interprétée à tort comme étant une bande correspondante à la protéine HIF-1 α (Figure 6). Cette observation était identique lors des analyses par immunobuvardage qui ont été réalisées sur les échantillons de 43 donneurs participants. Nous avons procédé à l'analyse du poids apparent de cette bande à l'aide du programme Quantity One (Quantity One 1-D Analysis Software, Biorad) : ceci a révélé un poids moléculaire de 136 kDa, qui ne constitue pas le poids de migration prévu pour HIF-1 α .

Ces résultats suggèrent fortement que HIF-1 α est absente chez les neutrophiles humains, en normoxie et au repos.

Pour les autres protéines de la famille HIF, nous avons détecté des bandes immunoréactives

qui correspondent aux poids moléculaires théoriques pour HIF-2 α et HIF-1 β , soient 120-122 kDa et 56 kDa respectivement (Figure 6). Dans le cas de HIF-2 α , il s'agit de deux bandes spécifiques superposées, relativement faibles. Dans le cas de HIF-3 α , nous avons obtenu des résultats variables selon les différents donneurs. Dans une partie des échantillons (8 donneurs sur 28), HIF-3 α était absente. Pour le reste des échantillons (20), nous avons détecté deux bandes de migration de poids moléculaire moyens, pour lesquels l'analyse effectuée par le logiciel Quantity One révèle des poids de 60 kDa et 54 kDa (Figure 6). Selon les données du fournisseur de l'anticorps que nous avons utilisé pour détecter HIF-3 α (Santa Cruz Biotechnology, sc-28707 X), cet anticorps permet la détection d'une forme de 73 kDa par immunobuvardage dans les lysats tissulaires du foie du rat et de la souris. Nous signalons que la majorité des anticorps dirigés contre cette protéine et disponibles commercialement détectent des bandes multiples de poids variables, qui correspondent aux isoformes obtenues par épissage alternatif de l'ARNm de HIF-3 α . Dans ce cas, l'isoforme de HIF-3 α de poids moléculaire de 73 kDa ne semble pas être exprimée sous normoxie chez les neutrophiles humains au repos. En conclusion, les neutrophiles humains expriment constitutivement les protéines HIF-2 α , HIF-1 β et deux isoformes courtes de HIF-3 α tandis qu'ils n'expriment pas HIF-1 α .

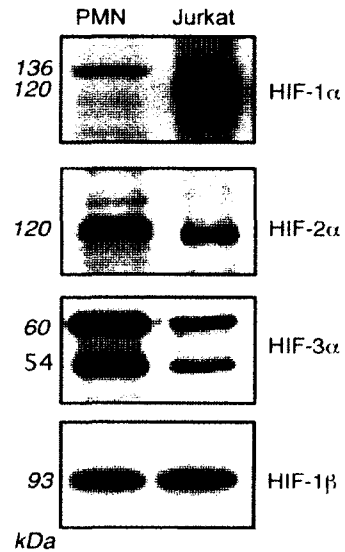


Figure 6. Expression des protéines HIF chez les neutrophiles (PMN).

Les neutrophiles fraîchement isolés ont été lysés et le contenu total en protéines HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α et HIF-1 β a été analysé par immunobuvardage, comparativement aux lysats totaux de Jurkat. 1×10^6 PMN/piste, 0.2×10^6 de HcLa ou HepG2/piste. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

4.2. Modulation par l'hypoxie ou l'inhibition des PHD par le DMOG des protéines HIF chez les neutrophiles humains au repos

Les protéines HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α sont affectées par l'hydroxylation dépendante des PHDs menant à la dégradation par le protéasome. Les PHDs sont inhibées par l'hypoxie et le DMOG. Ainsi, la culture cellulaire sous ces conditions permet d'augmenter les niveaux d'expression de ces trois protéines. Dans notre projet, nous voulions explorer l'effet suivant un traitement au DMOG, ou sous hypoxie sur l'expression des HIFs chez les neutrophiles humains. Dans le cas du DMOG, nous avons d'abord établi une dose réponse entraînant l'apparition de HIF-1 α . Ainsi, des concentrations croissantes de DMOG ont été utilisées lors de la mise en culture des PMN pendant 2 heures. Les lysats totaux des cellules ont servi pour la détection de HIF-1 α par immunobuvardage (Figure 7A). Les résultats indiquent que le DMOG induit fortement HIF-1 α , et ce, à partir d'une concentration finale de 1 mM. Par conséquent, nous avons choisi cette concentration pour réaliser toutes les expériences ultérieures.

Ensuite, les neutrophiles ont été traités avec 1 mM de DMOG, ou cultivés en hypoxie (0.7 % d'O₂). Les cultures ont été maintenues pendant 10, 30, 60, 120 et 240 minutes. Le contenu cellulaire a été analysé par immunobuvardage afin de vérifier les niveaux d'expression des protéines HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . L'analyse de HIF-1 β n'a pas été réalisée étant donné que cette protéine n'est pas modulée par l'inhibiteur des PHD, le DMOG (Zhou *et al.*, 2007). Les résultats de la cinétique au DMOG indiquent qu'il agit de façon précoce entraînant l'accumulation de quantités détectables de HIF-1 α à partir de 30 minutes. Cet effet se prolonge jusqu'à 4 heures. Aucun changement notable dans les cas de HIF-2 α et HIF-3 α n'a été perçu (Figure 7B).

L'hypoxie favorise l'apparition de HIF-1 α après deux heures de culture cellulaire (Figure 7C) et davantage après 4 heures. Par ailleurs, nous avons constaté que l'hypoxie ne modifie pas l'expression de HIF-2 α .

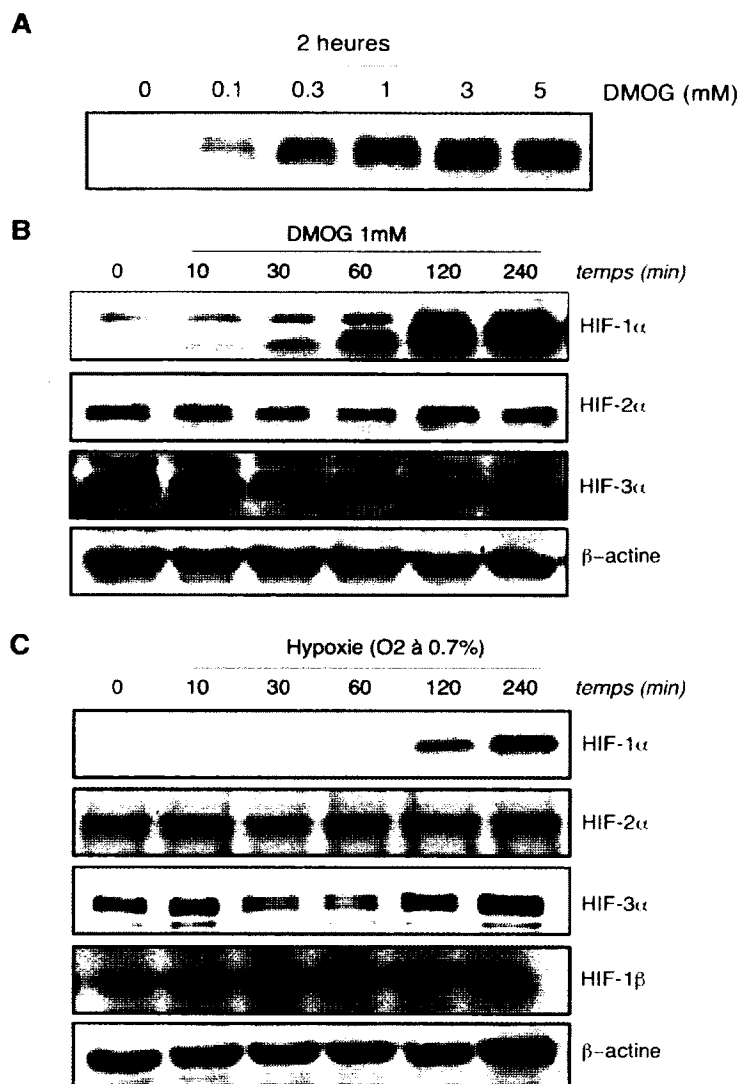


Figure 7. Effet du DMOG ou de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains

A) Les neutrophiles (PMN) ont été traités en absence (0) ou en présence de concentrations croissantes de DMOG (mM), pendant 2 heures en normoxie. Les lysats totaux ont été analysés par immunobuvardage pour leur contenu en HIF-1 α . 1×10^6 PMN/piste. Le résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes. B) Les PMN ont été traités en absence (0) ou en présence de 1 mM de DMOG pour les temps indiqués. Les lysats totaux ont été analysés pour immunobuvardage pour vérifier leur contenu en HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α et β -actine comme contrôle de chargement. 1×10^6 PMN/piste. Chaque résultat est représentatif de 1 à 2 expériences indépendantes. C) Les PMN cultivés en normoxie (0) ou en hypoxie (0.7 % d'O₂) pour les temps indiqués. Les lysats totaux ont été analysés par immunobuvardage pour vérifier leur contenu en HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-1 β et β -actine comme contrôle de chargement. 1×10^6 PMN/piste. Le résultat est représentatif de 2 à 5 expériences indépendantes.

Dans le cas de HIF-3 α , nous avons obtenu des résultats variables selon trois groupes distincts de donneurs (Figure 8). D'abord, le groupe des donneurs qui exprimait constitutivement les deux formes de 60 et 54 kDa (5 donneurs) n'a pas présenté de modifications des niveaux de HIF-3 α en hypoxie (exemple du donneur 2, figure 8). Par contre, un autre groupe de donneurs exprimant constitutivement HIF-3 α a exprimé une bande supplémentaire plus lourde, en hypoxie à 2 heures (3 donneurs). Nous appelons cette forme HIF-3 α -80 kDa : elle correspond à l'isoforme longue de cette protéine (exemple du donneur 1, figure 8). Le dernier groupe (2 donneurs) n'exprime pas HIF-3 α en normoxie, tandis qu'il l'exprime à partir de 1 heure sous hypoxie (exemple du donneur 2, figure 8).

Ainsi, bien que la stabilisation de HIF-1 α en hypoxie et au traitement au DMOG semble être prolongée, elle est obtenue plus tardivement en hypoxie qu'avec le traitement au DMOG. De plus, l'hypoxie et le DMOG ne semblent pas avoir d'effets sur l'expression de HIF-2 α et les isoformes courtes de HIF-3 α . Cependant, l'expression de HIF-3 α en hypoxie semble être variable d'un donneur à un autre.

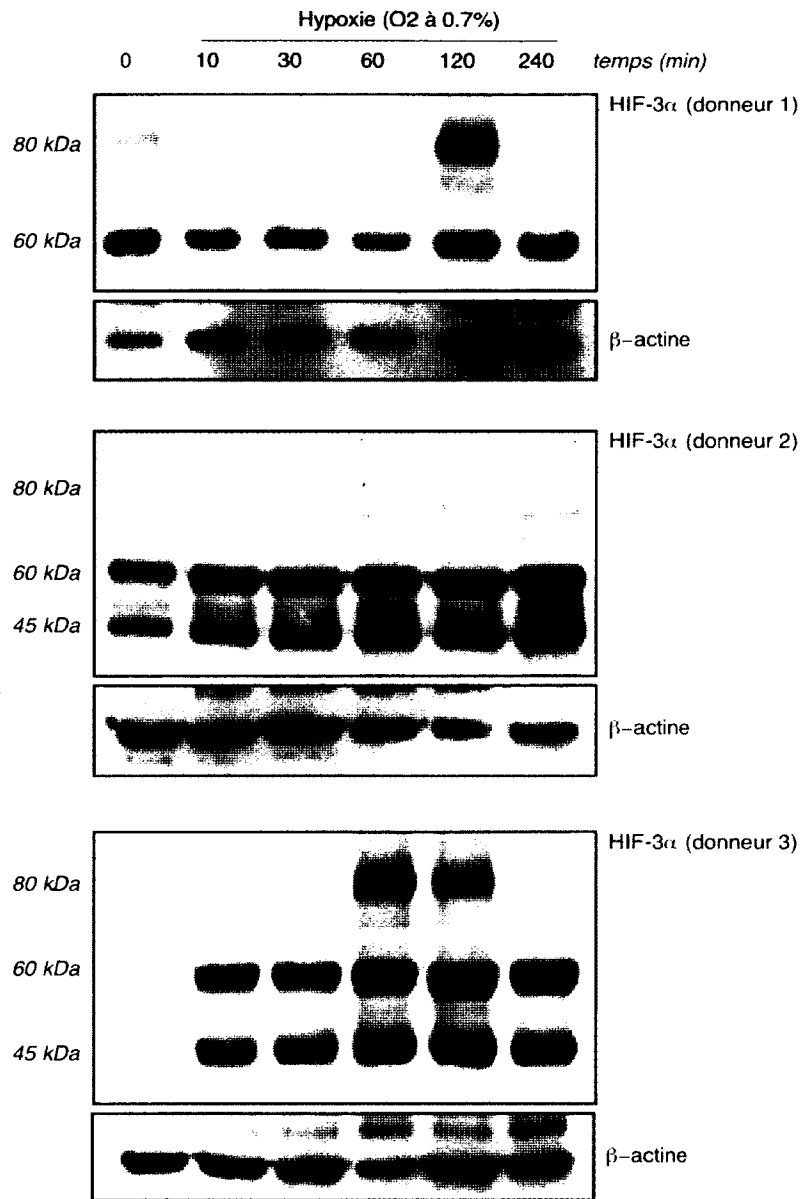


Figure 8. Effet de l'hypoxie sur la stabilité de la protéine HIF-3α chez les neutrophiles

Les neutrophiles (PMN) de donneurs différents ont été cultivés en normoxie (0) ou en hypoxie (0.7 % d'O₂) aux temps indiqués. Les lysats totaux ont été analysés par immunobuvardage pour vérifier leur contenu en HIF-3α et β-actine (contrôle de chargement). 1x10⁶ PMN/piste. Le résultat pour chaque donneur est représentatif de 3 expériences (donneur 1), 5 expériences (donneur 2) et 2 expériences (donneur 3) indépendantes.

4.3. Effet des agonistes des PMN sur l'expression des HIF en présence ou en absence d'hypoxie

Les neutrophiles humains cultivés en réponse à plusieurs agonistes modifient le contenu cellulaire en protéines. Ces changements s'observent aussi bien pour les protéines constitutivement exprimées, telles que les kinases (Aomatsu *et al.*, 2008; Fuxman *et al.*, 2008), les facteurs de transcription et les protéines synthétisées *de novo* (Aomatsu *et al.*, 2008). Nous nous sommes intéressés à l'effet des stimulations des PMN par certains stimuli inflammatoires, sur les quantités des protéines HIF. Ces stimuli activent les PMN, et modulent les niveaux des protéines HIF, comme le LPS, TNF α , GM-CSF et G-CSF chez les macrophages. Nous avons donc cultivé des neutrophiles en normoxie en présence de 100 U/ml de TNF α , 1 μ g/ml de LPS, 10 nM de G-CSF ou 1nM de GM-CSF. Un autre groupe a été mis en culture sous hypoxie pendant 10, 30, 60, 120 et 240 minutes. Le contenu cellulaire a été analysé par immunobuvardage pour les protéines HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α et HIF-1 β . Aucun des stimuli n'a induit une stabilisation de HIF-1 α ou un changement des niveaux constitutifs de HIF-2 α et HIF-1 β sous normoxie, même à des durées prolongées (Figure 9 à 12). Par contre, nous avons détecté une quantité importante de la HIF-3 α de 80 kDa après 4 heures de stimulation avec G-CSF (Figure 9), GM-CSF (Figure 10) et TNF α (Figure 12), sauf en présence de LPS (Figure 11). De façon intéressante, nous avons noté une bande de migration plus tardive pour HIF-1 β à 4 heures pour les trois agonistes G-CSF, GM-CSF et TNF α (Figure 9, 10 et 12). Cette bande était absente en présence de LPS (Figure 11).

Nous avons vérifié si la présence simultanée de l'hypoxie et des stimuli comme G-CSF, GM-CSF, LPS ou TNF α , module les niveaux des protéines HIF. Nous avons remarqué une augmentation des niveaux de la protéine HIF-1 α dans les cellules cultivées en hypoxie, en présence de ces agonistes (Figures 9 à 12), comparativement aux cellules cultivées sous normoxie en présence de ces agonistes. Par contre l'association de l'hypoxie et l'un des trois agonistes G-CSF, GM-CSF ou TNF α n'a pas permis l'apparition de HIF-3 α de 70 kDa ou la bande de migration tardive de HIF-1 β augmentée par les agonistes seuls. De plus, les niveaux d'expression de HIF-2 α ne sont pas modifiés. Nous concluons que sous normoxie,

les agonistes LPS, TNF α , GM-CSF, G-CSF ne stabilisent pas HIF-1 α et ne modifient pas les niveaux de HIF-2 α et des deux formes courtes (54 et 60 kDa) de HIF-3 α . Par contre, TNF α , GM-CSF et G-CSF semblent induire l'apparition d'une forme longue de HIF-3 α (80 kDa). En hypoxie, LPS, TNF α , G-CSF et GM-CSF agissent en synergie pour stabiliser davantage HIF-1 α .

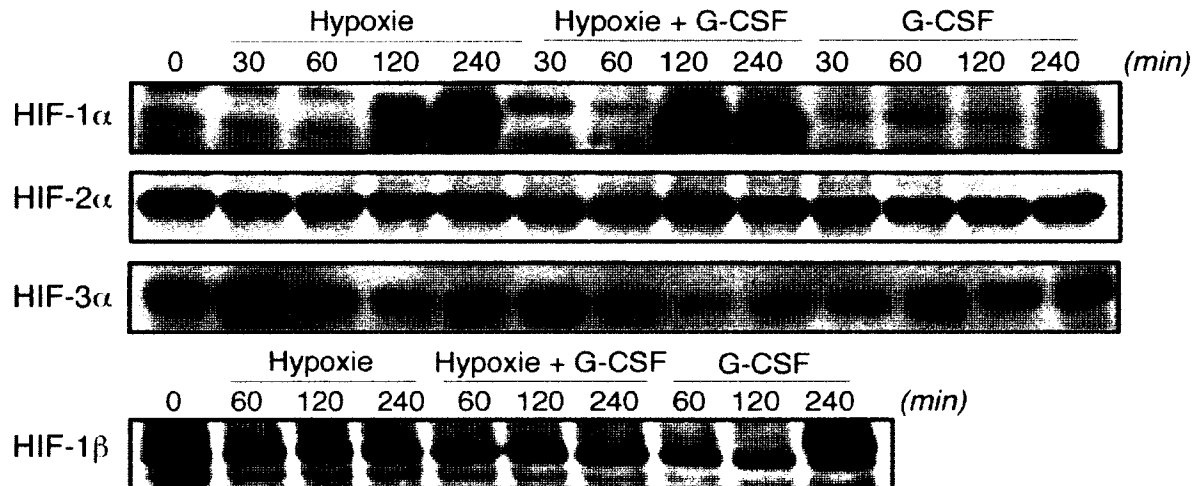


Figure 9. Effet de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains en réponse au G-CSF.

Les neutrophiles (PMN) ont été cultivés aux temps indiqués en normoxie ou en hypoxie en absence (0) ou en présence de 10 nM de G-CSF. Les lysats totaux ont été analysés par immunobuvardage pour vérifier leur contenu en HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , HIF-1 β . 1×10^6 PMN/piste. Chaque résultat est représentatif de 1 à 2 expériences indépendantes.

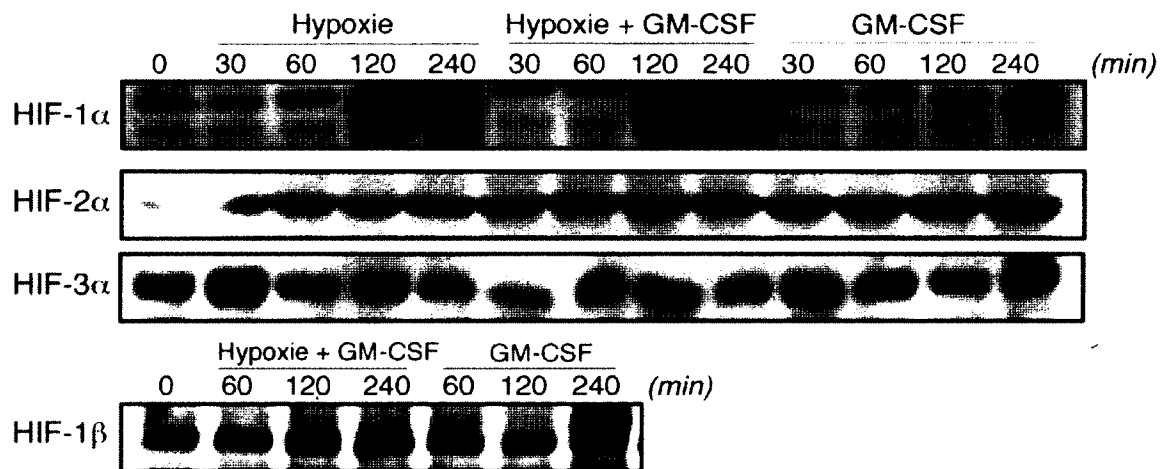


Figure 10. Effet de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains en réponse au GM-CSF.

Les neutrophiles (PMN) ont été cultivés aux temps indiqués en normoxie ou en hypoxie en absence (0) ou en présence de 1 nM de GM-CSF. Les lysats totaux ont été analysés par immunobuvardage pour vérifier leur contenu en HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , HIF-1 β . 1×10^6 PMN/piste. Chaque résultat est représentatif de 1 à 2 expériences indépendantes.

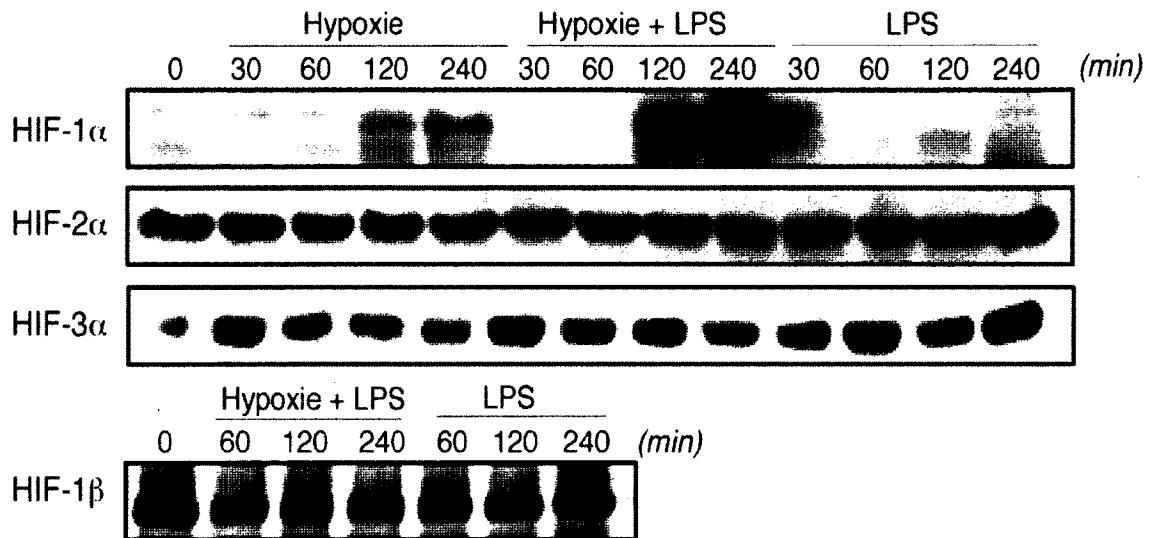


Figure 11. Effet de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains en réponse au LPS.

Les neutrophiles (PMN) ont été cultivés aux temps indiqués en normoxie ou en hypoxie en absence (0) ou en présence de 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. Les lysats totaux ont été analysés par immunobuvardage pour vérifier leur contenu en HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , HIF-1 β . 1 $\times 10^6$ PMN/piste. Ce résultat est représentatif de 1 à 3 expériences indépendantes.

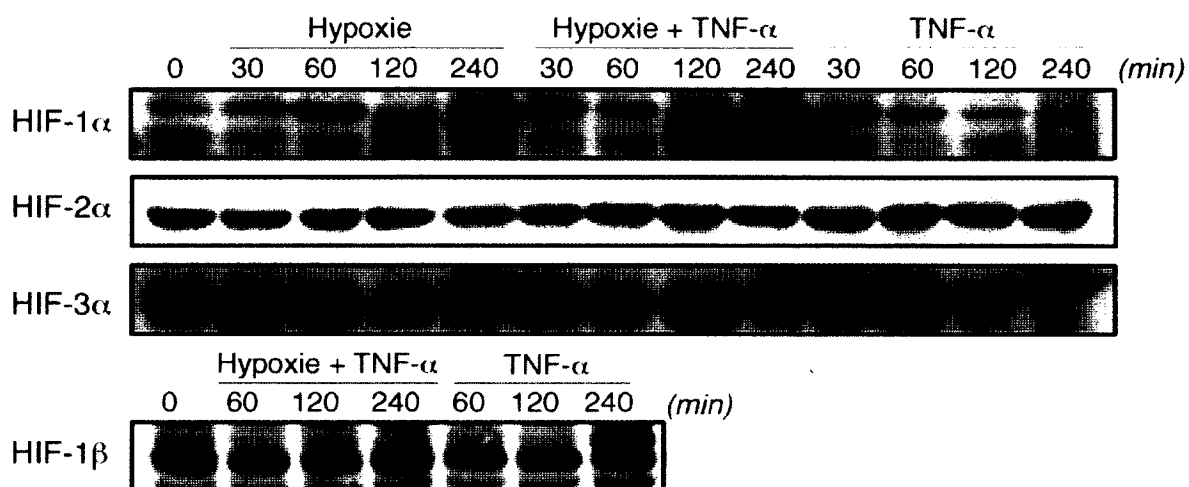


Figure 12. Effet de l'hypoxie sur l'expression des protéines HIF chez les neutrophiles humains en réponse au TNF α .

Les neutrophiles (PMN) ont été cultivés aux temps indiqués en normoxie ou en hypoxie en absence (0) ou en présence de 100 U/ml de TNF α . Les lysats totaux ont été analysés par immunobuvardage pour vérifier leur contenu en HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , HIF-1 β . 1×10^6 PMN/piste. Chaque résultat est représentatif de 1 à 3 expériences indépendantes.

4.4. Activation des protéines HIF sous hypoxie chez les neutrophiles humains

L'activation du facteur HIF passe par deux étapes, qui sont la stabilisation de la sous-unité HIF- α dans le cytoplasme et la translocation au noyau, suivies de sa dimérisation avec HIF- 1β (Gorlach, 2009). Le complexe se lie à l'ADN sur la séquence HRE. Dans notre étude, nous avons vérifié la distribution cellulaire des protéines HIF, ainsi que l'activité de liaison à l'ADN.

Pour étudier la distribution cellulaire des protéines HIF chez les neutrophiles, nous avons réalisé des fractions cytoplasmiques et nucléaires, et des lysats totaux de PMN. En premier lieu, la méthode de fractionnement utilisée dans notre laboratoire, la cavitation à l'azote (McDonald *et al.*, 1997) s'est avérée inefficace pour détecter les protéines HIF, de même qu'avec le fractionnement des cellules basé sur la lyse au détergent Nonidet P-40 (NP-40) (Figure 13). Conformément aux résultats des sections 4.1 et 4.2, nous avons observé que HIF- 1α est absente des lysats des cultures témoins en normoxie (Figure 13), et HIF- 2α est constitutivement exprimée (Figure 13). Après 4 heures de culture en hypoxie, nous avons détecté une bande correspondant à HIF- 1α (Figure 13). Cependant, HIF- 1α n'est pas détectée dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des échantillons hypoxiques obtenus aussi bien par la cavitation à l'azote que par la lyse au NP40. Cette observation s'applique également dans le cas de HIF- 2α . Cependant, les isoformes de poids moléculaires faibles de HIF- 3α semblent être cytoplasmiques au repos et en hypoxie. Ceci laisse supposer que les deux méthodes de fractionnement exposent les protéines HIF- 1α , HIF- 2α à la dégradation, et seule HIF- 3α semble être protégée de cet effet. Nous n'avons pas procédé à des analyses ultérieures pour trouver une solution à ce problème de détection. Ces résultats peuvent expliquer la raison pour laquelle il nous a été impossible de détecter une liaison significative et spécifique du complexe HIF à un site HRE par gel de rétention (non montré).

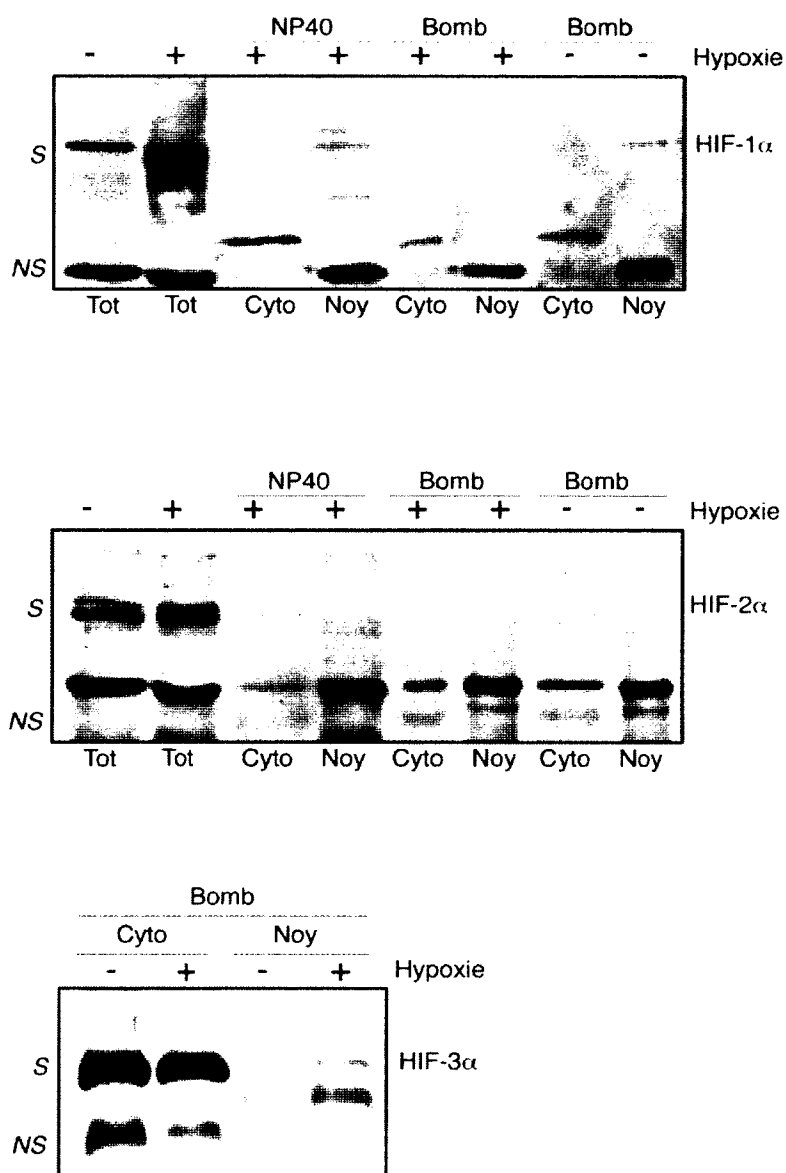


Figure 13. Distribution cellulaire des protéines HIF chez les neutrophiles (PMN) exposés ou non à l'hypoxie.

Les PMN ont été cultivés en normoxie ou en hypoxie pendant 4 heures. Les lysats totaux (Tot) ont été obtenus par la lyse à la chaleur dans du *Laemmli 1X*. Les fractions cytoplasmiques (Cyto) et nucléaires (Noy) ont été obtenues par la lyse au NP40 (NP40) ou la cavitation à l'azote (Bomb). Les lysats et fractions ont été analysés pour leur contenu en protéines HIF-1 α (A), HIF-2 α (B) et HIF-3 α (C) par immunobuvardage. 1×10^6 PMN/piste (Tot), 1×10^6 PMN/piste (Cyto) et 1×10^6 PMN/piste (Noy). Ces résultats sont représentatifs de 1 à 3 expériences indépendantes.

4.5. Influence de l'hypoxie/DMOG sur la sécrétion des cytokines par les agonistes chez les neutrophiles humains

L'activation de HIF-1 au cours de l'inflammation mène à l'expression et à la sécrétion de cytokines proinflammatoires, telles que IL-6, IL-8 et TGF- β chez plusieurs types cellulaires (Hellwig-Burgel *et al.*, 2005). Pour les neutrophiles (PMN) qui représentent une source importante de cytokines et chimiokines, on ignore si l'hypoxie régule la production de ces médiateurs ou si le HIF gère l'expression de leurs gènes. Nous avons donc vérifié la régulation de la sécrétion des cytokines dans les neutrophiles humains sous hypoxie comparativement aux neutrophiles sous normoxie. Nous avons choisi d'étudier sept cytokines proinflammatoires, dont la production par les neutrophiles a été confirmée par plusieurs travaux, à savoir IL-8 (Bazzoni *et al.*, 1991), MIP-1 α /1 β (Kasama *et al.*, 1993 ; Kasama *et al.*, 1994), MIP-3 α (Scapini *et al.*, 2001), IP-10 (Cassatella *et al.*, 1997) et IL-6 (Palma *et al.*, 1992). Parallèlement, nous avons examiné le profil sécrétoire des neutrophiles cultivés sous hypoxie en présence d'agonistes stimulant la production des cytokines et chimiokines chez les neutrophiles, à savoir LPS, PGN, GM-CSF et G-CSF. Notons également que ces stimuli peuvent se retrouver dans plusieurs sites inflammatoires hypoxiques. De plus, ils entraînent l'accumulation des protéines HIF et leur activation chez certains types cellulaires (Eubank *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Roda *et al.*, 2012; Sumbayev *et al.*, 2012; Westra *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2008).

Ainsi, nous avons cultivé les neutrophiles en présence ou en absence d'agonistes selon trois groupes expérimentaux : le groupe témoin en normoxie, le groupe étudié sous hypoxie, avec stimulation et exposition en hypoxie concomitantes, et le groupe traité avec 1 mM de DMOG. Ce dernier groupe sert à comparer les effets à ceux induits par l'hypoxie. Notons que le DMOG est considéré comme une condition chimique qui mime l'hypoxie (Cartee *et al.*, 2012; El Guerrab *et al.*, 2011; Elvidge *et al.*, 2006; Groenman *et al.*, 2007). Par la suite, nous avons analysé les surnageants des cultures cellulaires par ELISA.

Tel que démontré aux figures 14 à 19, les neutrophiles normoxiques au repos ne sécrètent pas de chimiokines sauf des quantités détectables d'IL-8. Une stimulation par le G-CSF

favorise uniquement la libération de MIP-3 α (Figure 14). Les agonistes GM-CSF, LPS et PGN induisent la sécrétion de IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β et MIP-3 α selon des cinétiques caractéristiques pour chaque stimulus (Figures 15, 16 et 17 respectivement). L'IP-10 est sécrétée chez les PMN en réponse aux costimulations à l'INF γ et le GM-CSF, LPS ou TNF α , mais pas en réponse au G-CSF (Figure 18). Dans le cas d'IL-6, les données de la littérature sont encore controversées, vis-à-vis la capacité du neutrophile humain à exprimer son gène. Dans notre cas, les niveaux induits en réponse aux GM-CSF ou G-CSF sont faibles comparativement à l'induction par LPS, PGN ou TNF α (Figure 19). Nous avons remarqué qu'en présence d'hypoxie seule, les PMN produisent des quantités détectables de MIP-3 α de façon soutenue dans le temps (Figure 14 à 17). Par ailleurs, nous n'avons pas détecté IL-8, MIP-1 α /1 β , MIP-3 β , IL-6 et IP-10 (Figure 14 à 17). Notons que les cellules traitées au DMOG ne produisent aucune des chimiokines étudiées, y compris le MIP-3 α (Figure 14 à 17, et 19).

En associant les agonistes à l'hypoxie, nous constatons que les profils de sécrétion des chimiokines, pour chacun des agonistes en normoxie (figures 14 à 19 et tableau 3), sont modulés au moins pour une des cytokines étudiées. Par exemple, alors que la production d'IL-8 par GM-CSF n'est pas modifiée (figure 15), nous observons que le G-CSF permet sa libération (figure 14). L'hypoxie abolit les niveaux induits d'IL-8 par les LPS et PGN (figures 16 et 17). Inversement, nous avons trouvé que l'hypoxie renforce la sécrétion de MIP-1 α par LPS, PGN et GM-CSF (figures 15 à 17), alors que la capacité du GM-CSF à induire la production de MIP-1 β est fortement amoindrie par l'hypoxie (figure 15), et l'induction par LPS et PGN est augmentée (figures 16 et 17). De plus, MIP-3 α qui est détectée en présence d'hypoxie seule voit sa production diminuée par le G-CSF, et augmentée par LPS, PGN et GM-CSF (Figure 14 à 17). Dans ces cas, nous remarquons une sécrétion élevée et précoce suivie d'une diminution progressive jusqu'à un retour à la valeur initiale après 24 heures. Dans le cas d'IL-6, l'hypoxie semble augmenter la production de cette cytokine dépendante de la stimulation par G-CSF et PGN (Figure 19). Sinon, elle est diminuée en présence de LPS, TNF α et GM-CSF. Enfin, pour vérifier l'effet de l'hypoxie sur la production d'IP-10, nous avons costimulé les neutrophiles avec l'INF γ et l'un des agonistes G-CSF, GM-CSF, LPS ou TNF α . La présence d'INF γ est

indispensable à la production d'IP-10 en réponse au LPS et TNF α (Cassatella *et al.*, 1997). La nécessité de la costimulation à l'INF γ et G-CSF ou GM-CSF pour produire l'IP-10 chez les neutrophiles n'est pas encore vérifiée. Selon nos résultats, l'hypoxie favorise la production d'IP-10 en réponse à LPS ou TNF α seules, mais pas en réponse au GM-CSF (Figure 18). Cependant, l'hypoxie ne semble pas modifier les niveaux de production d'IP-10 comparativement à ceux obtenus sous normoxie, en costimulation par l'INF γ et les quatre agonistes (Figure 18). Concernant la sécrétion des cytokines en réponse aux quatre agonistes associés au traitement par le DMOG (Figures 14 à 17, et 19), encore une fois, nous signalons la non-ressemblance des effets induits par cette molécule et ceux réalisés par l'hypoxie. Ces résultats montrent que l'hypoxie module les mécanismes de production des cytokines IL-8, MIP-1 α /1 β , MIP-3 α , IL-6 et IP-10, en favorisant la sécrétion de certaines d'entre elles et en diminuant d'autres de façon spécifique pour chaque stimulus (tableau 3).

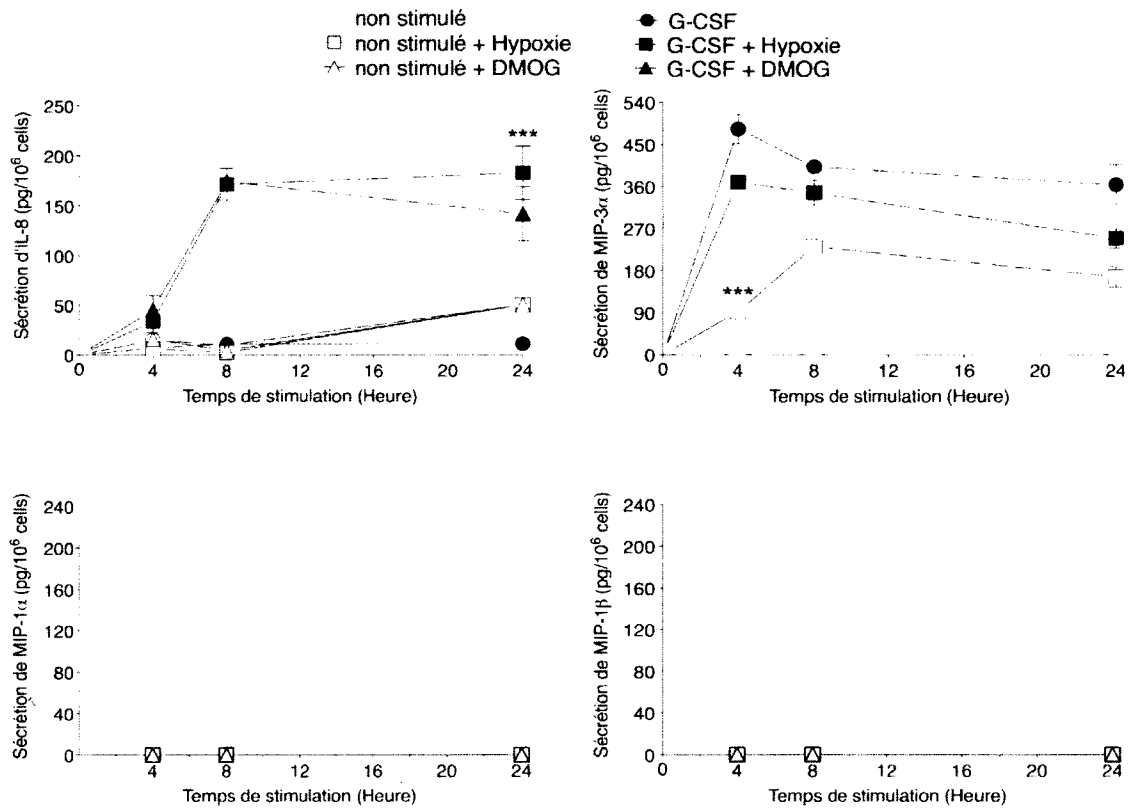


Figure 14. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production des chimiokines par le G-CSF chez les neutrophiles.

Les neutrophiles ont été stimulés par 10 nM de G-CSF, en normoxie ou en hypoxie, ou avec 1 mM de DMOG, pour les temps indiqués. Les cytokines IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β et MIP-3 α ont été mesurées dans les surnageants par ELISA. Le résultat de la mesure de MIP-3 α représente une seule expérience. Les résultats des mesures de IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β représentent la moyenne \pm SEM de 2 à 5 expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un ANOVA double (***) = $p < 0.001$ par rapport au stimulus en normoxie).

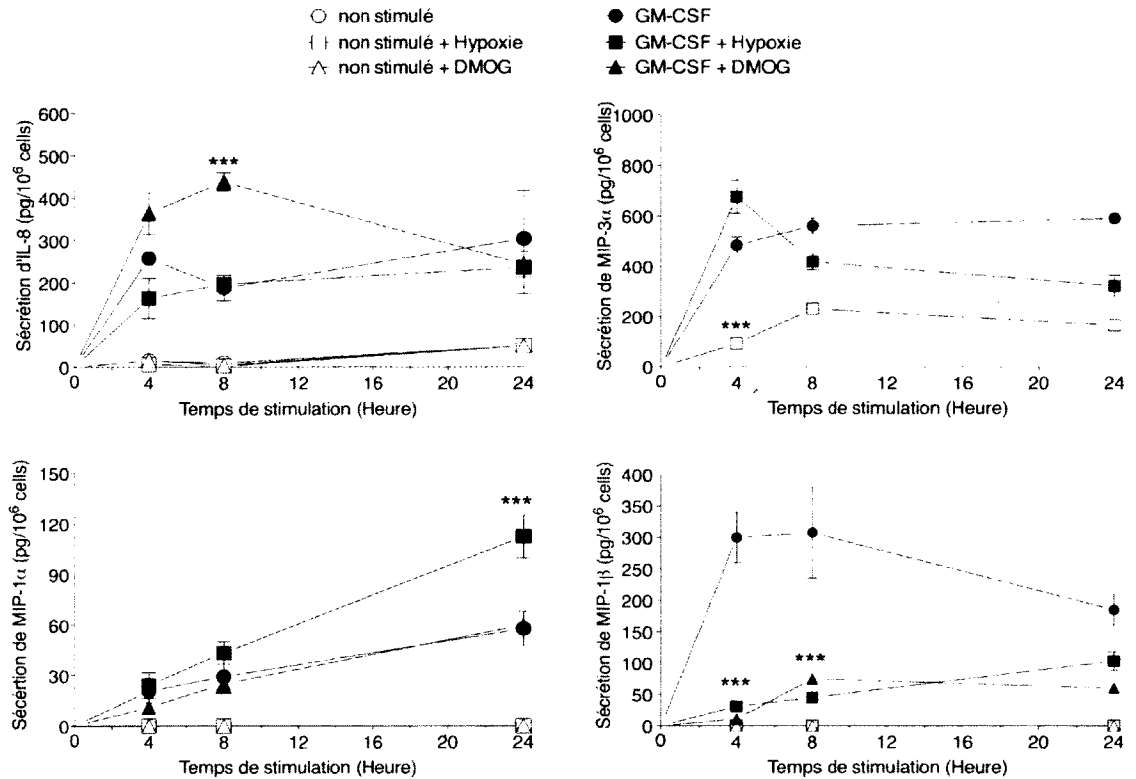


Figure 15. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production des chimiokines par le GM-CSF chez les neutrophiles.

Les neutrophiles ont été stimulés par 1 nM de GM-CSF en normoxie ou en hypoxie, ou avec 1 mM de DMOG, pour les temps indiqués. Les cytokines IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β et MIP-3 α ont été mesurées dans les surnageants par ELISA. Le résultat de la mesure de MIP-3 α représente une seule expérience. Les résultats des mesures de IL-8, MIP-1 α et MIP-1 β représentent la moyenne + SEM de 2 à 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un ANOVA double (** – $p < 0.01$ par rapport au stimulus en normoxie; *** – $p < 0.001$ par rapport au stimulus en normoxie).

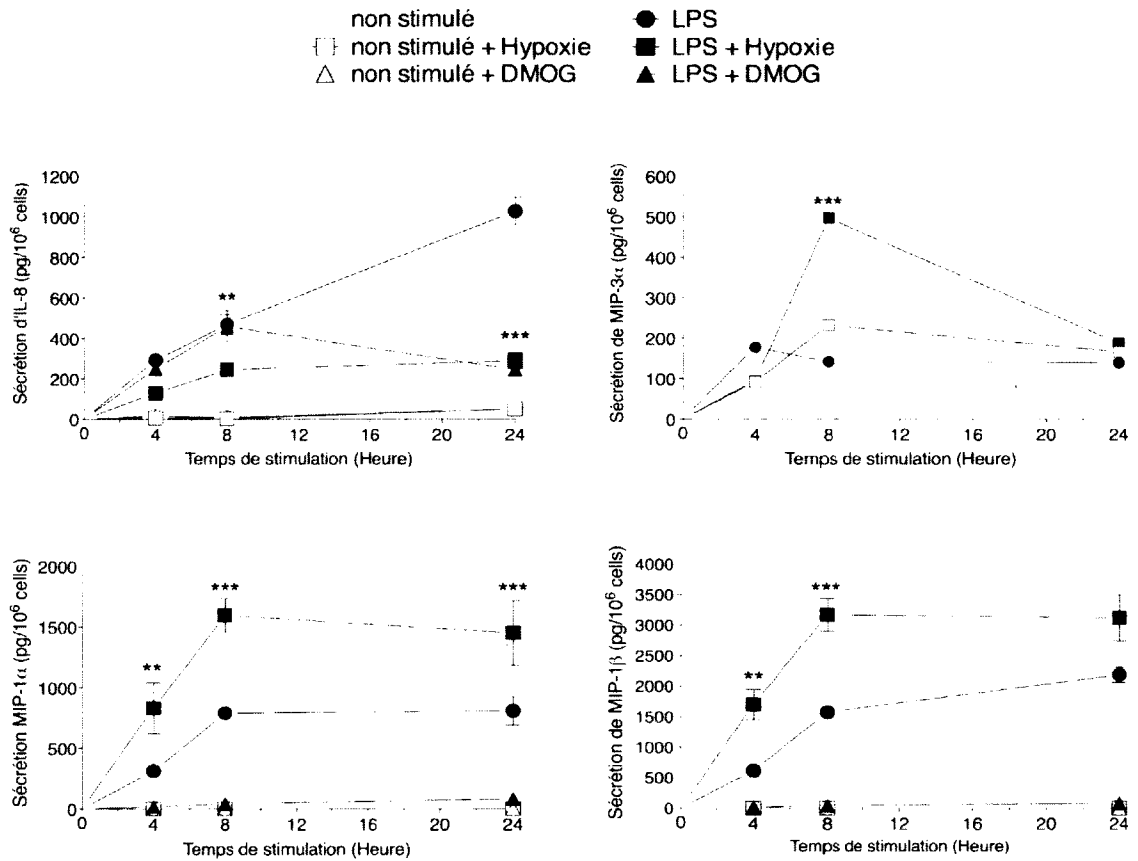


Figure 16. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production des chimiokines par le LPS chez les neutrophiles.

Les neutrophiles ont été stimulés par 1 µg/ml de LPS en normoxie ou en hypoxie, ou avec 1 mM de DMOG, pour les temps indiqués. Les cytokines IL-8, MIP-1α, MIP-1β et MIP-3α ont été mesurées dans les surnageants par ELISA. Le résultat de la mesure de MIP-3α représente une seule expérience. Les résultats des mesures de IL-8, MIP-1α et MIP-1β représentent la moyenne + SEM de 2 à 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un ANOVA double (** = p < 0.01 par rapport au stimulus en normoxie; *** = p < 0.001 par rapport au stimulus en normoxie).

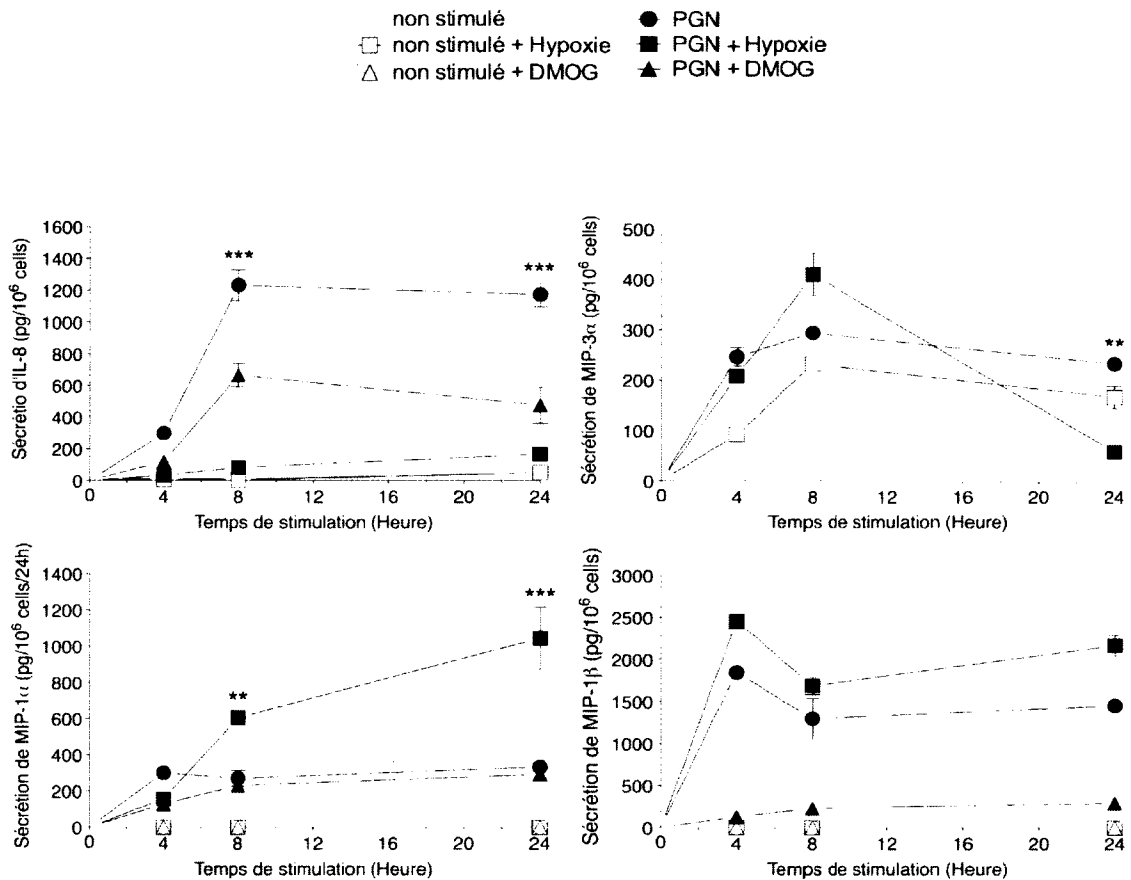


Figure 17. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production des chimiokines par le PGN chez les neutrophiles.

Les neutrophiles ont été stimulés par 1 $\mu\text{g/ml}$ de PGN en présence ou en absence d'hypoxie, ou avec 1 mM de DMOG, pour les temps indiqués. Les cytokines IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β et MIP-3 α ont été mesurées dans les surnageants par ELISA. Le résultat de la mesure de MIP-3 α représente une seule expérience. Les résultats des mesures IL-8, MIP-1 α et MIP-1 β représentent la moyenne \pm SEM de 2 à 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test ANOVA double (** = $p < 0.01$ par rapport au stimulus en normoxie; *** = $p < 0.001$ par rapport au stimulus en normoxie).

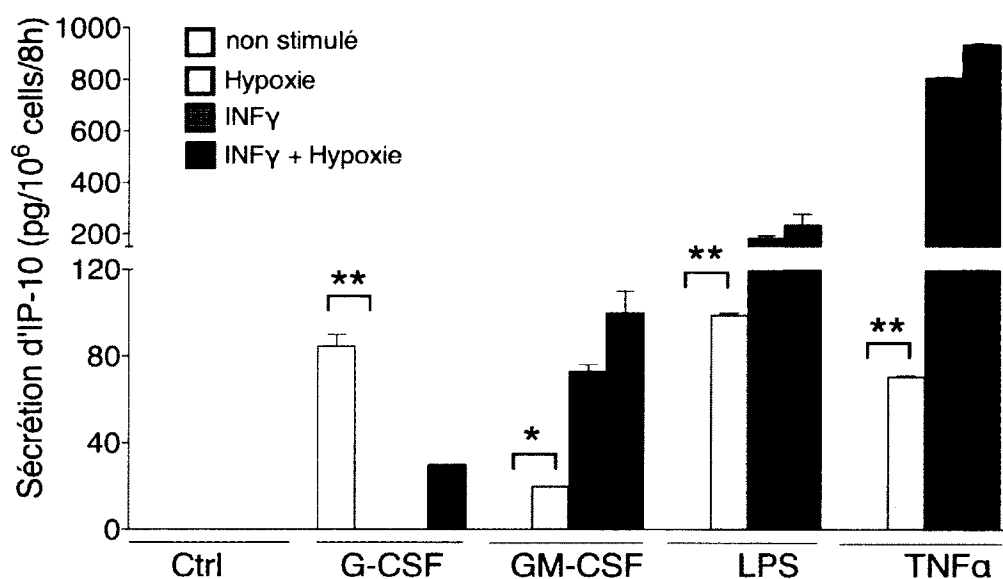


Figure 18. Effet de l'hypoxie sur la production d'IP-10 par les agonistes des neutrophiles humains.

Les neutrophiles ont été costimulés avec 100 U/ml d'INF γ et 10 nM de G-CSF, 1 nM de GM-CSF, 1 μ g/ml de LPS ou 100 U/ml de TNF α , en normoxie ou en hypoxie pendant 8 heures. La chimiokine IP-10 a été mesurée dans les surnageants par ELISA. Ce résultat est représentatif de 2 expériences réalisées séparément. Les résultats des mesures représentent la moyenne + SEM de 2 expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test ANOVA double (* = $p < 0.05$ par rapport au stimulus en normoxie; ** = $p < 0.01$ par rapport au stimulus en normoxie).

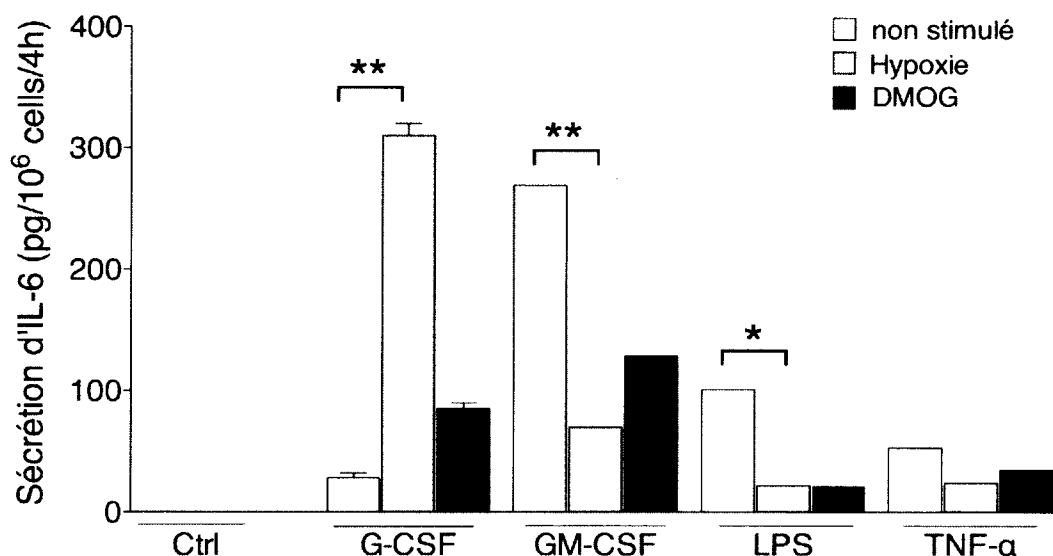


Figure 19. Effet de l'hypoxie ou du DMOG sur la production de l'IL-6 par les agonistes des neutrophiles.

Les neutrophiles ont été stimulés avec 10 nM de G-CSF, 1 nM de GM-CSF, 1 µg/ml de LPS ou 100 U/ml de TNFα, en normoxie ou en hypoxie, ou avec 1 mM de DMOG, pendant 4 heures. La cytokine IL-6 a été mesurée dans les surnageants par ELISA. Ce résultat correspond à une seule expérience. Les résultats représentent la moyenne + SEM du duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test ANOVA double (* = $p < 0.05$ par rapport au stimulus en normoxie; ** = $p < 0.01$ par rapport au stimulus en normoxie).

| Cytokine | G-CSF | GM-CSF | LPS | PGN |
|-----------------|--------------|---------------|-------------|-------------|
| IL-8 | Augmentée | Non modulée | Diminuée | Diminuée |
| MIP-1 α | Non modulée | Augmentée | Augmentée | Augmentée |
| MIP-1 β | Non modulée | Diminuée | Augmentée | Augmentée |
| MIP-3 α | Augmentée | Diminuée | biphasique* | biphasique* |
| IL-6 | Augmentée | Diminuée | Diminuée | Augmentée |
| IP-10 | Diminuée | Diminuée | Non modulée | Non modulée |

Tableau 3. Modulation de la sécrétion des cytokines et chimiokines par l'hypoxie chez les neutrophiles humains.

* Nous désignons par la modulation biphasique un profil de sécrétion caractérisé par la présence d'une phase sécrétoire courte et ample suivie d'une diminution drastique plus soutenue dans le temps.

4.6. Induction de l'expression des transcrits d'ARNm des cytokines par le DMOG/GM-CSF

Cette partie des résultats a été réalisée avant que les résultats de la section 4.5 soient finalisés. En conséquence, les effets différents du DMOG et de l'hypoxie sur la production des cytokines n'était pas connus. Nous avons vérifié si le DMOG affecte l'expression de gènes, et nous avons examiné son influence sur les niveaux des transcrits d'ARNm des cytokines étudiées. Nous avons vérifié les transcrits d'ARNm de gènes qui contiennent dans leurs régions promotrices des séquences HRE et peuvent ainsi potentiellement répondre au HIF. Ces gènes comprennent les cytokines IL-6, TNF α , IL-1 β , et TGF β (Kim *et al.*, 2007; Nishi *et al.*, 2004; Pfafflin *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2011), ainsi que les chimiokines IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 β et IP-10 (Hatfield *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2006). Nous avons également mesuré un gène cible de HIF-1, le VEGF (Ahluwalia *et al.*, 2012). Tous ces gènes sont exprimés par les neutrophiles humains, en conditions inflammatoires. Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur la stimulation au GM-CSF qui peut être impliqué dans la stabilisation de l'ARNm chez les neutrophiles, par un mécanisme dépendant de mTOR (Lehman *et al.*, 2003). Le GM-CSF entraîne la phosphorylation de deux résidus tyrosines et une sérine aux positions 421, 389 et 424 respectivement, ce qui augmente l'activité de la protéine p70S6K et ainsi la traduction (Gomez-Cambronero *et al.*, 2003). De plus, le GM-CSF module les gènes analysés chez les neutrophiles humains ou murins. Les gènes affectés par le GM-CSF sont TNF α (Choi *et al.*, 2008; Quayle *et al.*, 1994), IL-1 β (Choi *et al.*, 2008; Oudijk *et al.*, 2005), IL-8 (Oudijk *et al.*, 2005), MIP-1 α (Oudijk *et al.*, 2005), MIP-1 β (Oudijk *et al.*, 2005), MIP-3 β (Melani *et al.*, 1993; Quayle *et al.*, 1994), IP-10 (Melani *et al.*, 1993; Quayle *et al.*, 1994) et IL-6 (Melani *et al.*, 1993; Quayle *et al.*, 1994). Nous avons également analysé le gène codant pour la protéine Myeloid translocation gene (MTG) comme contrôle négatif car il est non modulable par le GM-CSF, et le gène MCL-1, qui est induit par le GM-CSF, comme contrôle positif (Derouet *et al.*, 2004).

Les cellules ont été traitées avec le DMOG en présence ou en absence de GM-CSF. Tel qu'indiqué à la figure 20, la stimulation au GM-CSF augmente les transcrits de tous les gènes sauf MIP-3 β et MTG. Le DMOG induit fortement l'expression des transcrits VEGF,

MTG, MCL-1, TGF- β et IL-6, et de façon moindre les transcrits IL-1 β , IP-10, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β et TNF α . Par ailleurs, la co-stimulation avec le DMOG et GM-CSF mène à trois groupes d'expression des niveaux des transcrits. Un premier groupe englobe les transcrits VEGF, IL-6, MCL-1 et MTG. Il s'agit de transcrits ARNm qui sont augmentés par le DMOG, tandis que l'association au GM-CSF entraîne une diminution. Le deuxième groupe est composé des transcrits IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α et TGF- β : dans ce cas, on assiste à une synergie entre le DMOG et GM-CSF. Enfin, les transcrits IP-10 et IL-1 β sont induits par le GM-CSF tandis que le DMOG exerce un effet inhibiteur partiel sur leur induction. Par contre, le transcrit MIP-3 β n'est pas induit par cette molécule. Dans le cas d'IL-8 et IL-6, l'induction suit l'augmentation des niveaux des deux protéines détectées par ELISA. Globalement, ces résultats démontrent que le traitement au DMOG, qui stabilise HIF-1 α , s'accompagne d'une modulation des transcrits d'ARNm de plusieurs gènes régulés par HIF-1.

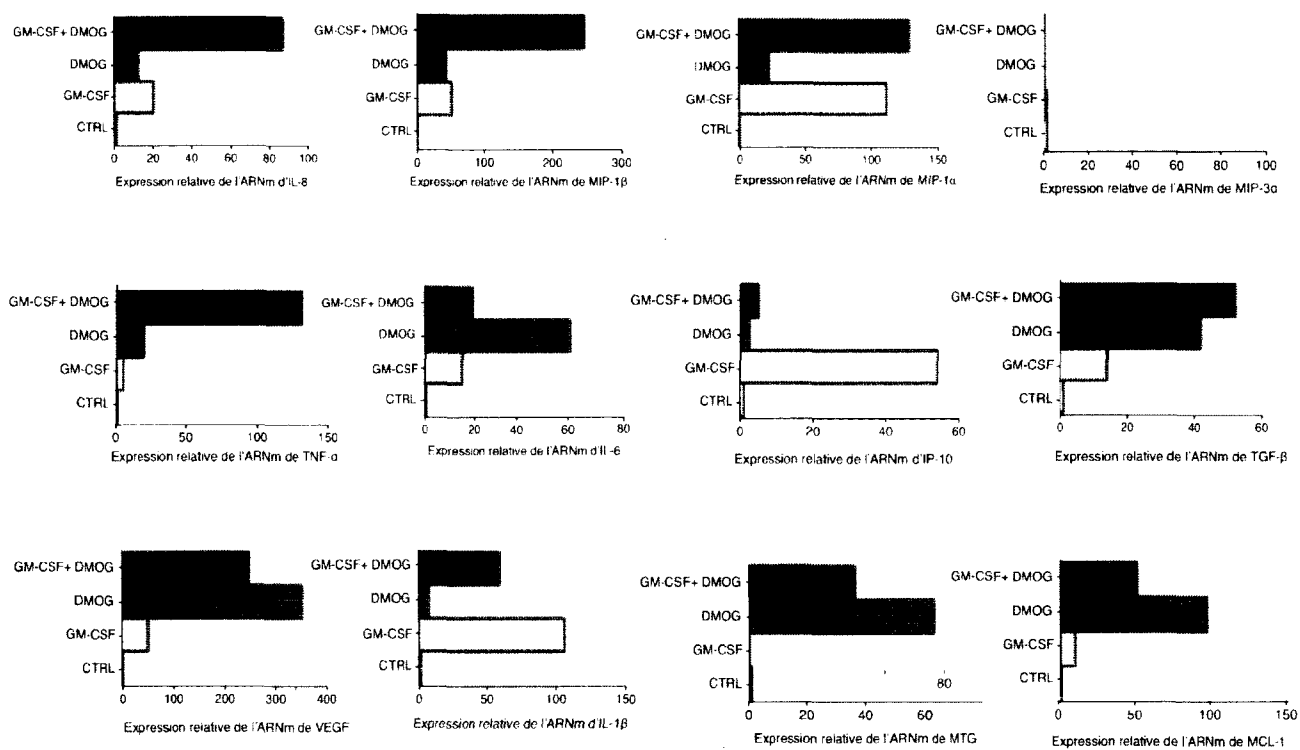


Figure 20. Effet du DMOG sur l'expression induite par le GM-CSF des gènes de cytokines/chimiokines chez le neutrophile humain.

Les neutrophiles ont été cultivés en absence (ctrl) ou en présence de 1 mM de DMOG, avec ou sans 1 nM de GM-CSF, pendant 3 heures. L'ARN total a été isolé, et après transcription inverse les transcrits ont été analysés par PCR en temps réel. Les valeurs ont été normalisées à l'ARN ribosomal 18S et sont présentées sous forme d'une expression relative aux cellules non stimulées. Le résultat représente une seule expérience.

4.7. Effets de l'hypoxie sur les protéines des voies de signalisation intracellulaire exprimées chez les neutrophiles humains

Les mécanismes moléculaires de l'expression génique et de la production des cytokines sont spécifiques à chaque type cellulaire. Ils dépendent, entre autres, de facteurs de transcription et/ou de voies de signalisation intracellulaires impliquant des kinases (Cassatella, 1995; Lang, 2005). Considérant l'effet modulateur de l'hypoxie, il est possible que ces protéines soient différemment mobilisées chez les neutrophiles humains, ce qui engendrerait le changement du profil sécrétoire des chimiokines étudiées. Chez les PMN, il reste à confirmer le rôle régulateur de certaines voies de signalisation en hypoxie. Par exemple, parmi les protéines que les PMN expriment, on note que celles de la cascade JNK qui active AP-1 dans d'autres types cellulaires n'ont pas de rôle confirmé dans la production des cytokines (Cloutier *et al.*, 2003), tandis que les MAPK MEK (Cloutier 2007; Aomatsu *et al.*, 2008), MAPK p38 (Cloutier 2007; Fukuzono *et al.*, 2010), PI3K/AKT (Fortin *et al.*, 2011a; Montecucco *et al.*, 2008), ainsi que les protéines activant le facteur de transcription NF- κ B (Ear *et al.*, 2010) et les facteurs de transcription STAT (Fukuzono *et al.*, 2010) et C/EBP (Cloutier *et al.*, 2009) régulent plusieurs cytokines et chimiokines. Plusieurs travaux ont démontré que ces voies de signalisation et facteurs de transcription sont mobilisés en hypoxie dans d'autres types cellulaires et constituent des régulateurs cruciaux de la production des cytokines IL-6, IL-8, VEGF et MIP-1 α /1 β au cours de la réponse cellulaire à l'hypoxie, notamment C/EBP (Min *et al.*, 2011), NF- κ B (Kim *et al.*, 2006; Maxwell *et al.*, 2007), JNK/AP-1 (Pfafflin *et al.*, 2006; Yoshino *et al.*, 2006), STAT (Demaria *et al.*, 2012; Yamaji-Kegan *et al.*, 2009), MAPK ERK (Maroni *et al.*, 2007), MAPK p38 (Thobe *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004) et PI3K/AKT (Gonsalves *et al.*, 2010; Stegeman *et al.*, 2012; Joung *et al.*, 2003; Khandrika *et al.*, 2009; Laderoute *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010). Nous avons donc vérifié l'effet de l'hypoxie sur la phosphorylation de ERK, AKT, JNK, MAPK p38, STAT1/3 et C/EBP- β et la dégradation d'I κ B- α , un événement indispensable à l'activation du facteur NF- κ B. Nous avons également vérifié la stabilisation de HIF-1 α qui constitue la seule protéine HIF à être contrôlée de façon récurrente par l'hypoxie dans notre étude. De plus, HIF est un facteur de transcription qui est aussi impliqué dans l'expression des gènes IL-8, VEGF et MIP-1 α /1 β dans les monocytes et les cellules endothéliales (Gonsalves et Kalra, 2010; Kim *et al.*,

2006). Nous avons cultivé les neutrophiles en hypoxie pour différents temps et vérifié les quantités des protéines P-ERK, P-AKT, P-JNK, P-p38, P-STAT1, P-STAT-3, P-C/EBP- β ainsi que I κ B- α et HIF-1 α par immunobuvardage (Figure 21). En plus de la stabilisation de HIF-1 α après 2 heures, l'hypoxie modifie l'état de phosphorylation des protéines ERK, AKT, JNK et p38 à des temps variables, tandis que celle-ci ne modifie pas la quantité totale d'I κ B- α et n'induit pas la phosphorylation des STAT1/3. Dans le cas du C/EBP- β , le résultat représente une seule expérience, et nécessite une étude ultérieure. Les phosphorylations de ERK, JNK et p38 surviennent rapidement à partir de 30 à 60 minutes d'hypoxie par rapport à la stabilisation de HIF-1 α , et sont prolongées jusqu'à 4 heures. Par ailleurs, la phosphorylation d'AKT est concomitante à l'apparition de HIF-1 α . Notons que la forme phosphorylée de JNK apparaît de façon transitoire entre 30 et 60 minutes et disparaît par la suite. Ces résultats montrent une activation de différentes voies de signalisation intracellulaire chez les neutrophiles humains par l'hypoxie, soient précoce (ERK, JNK et p38) ou tardive (AKT). Aussi, l'absence de dégradation d'I κ B- α suggère une activation du facteur NF- κ B indépendante de cette voie, ou une absence totale de l'activation de celui-ci. Ces observations supportent la complexité des mécanismes cellulaires modulés par l'hypoxie chez les PMN.

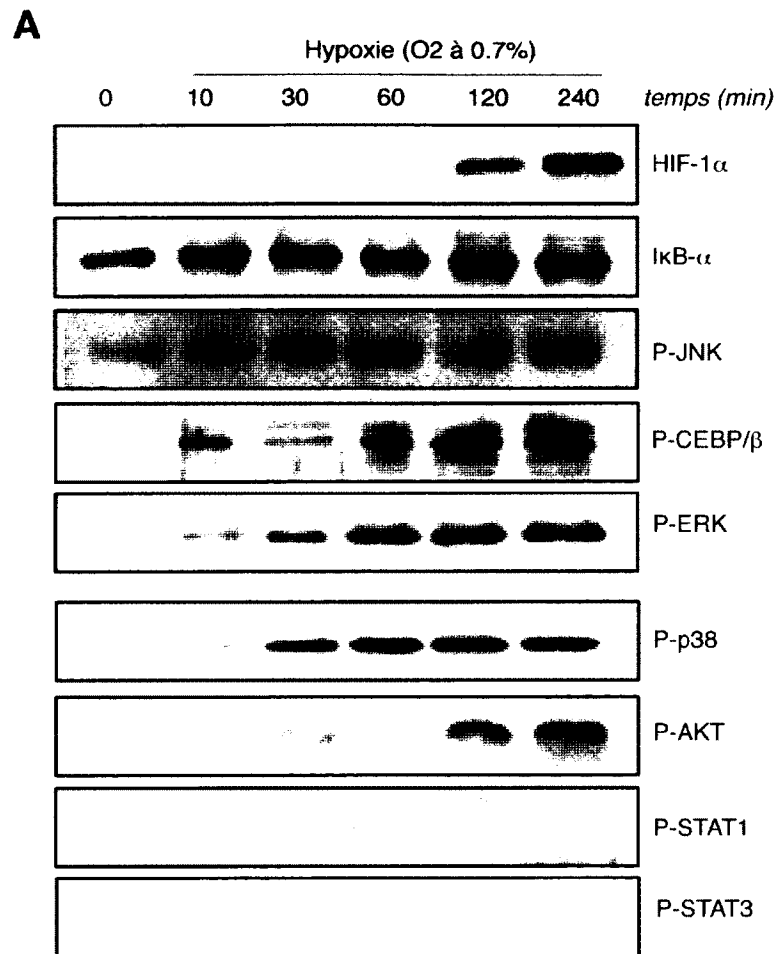


Figure 21. Effet de l'hypoxie sur les protéines des voies de signalisation intracellulaire exprimées chez les neutrophiles humains

Les neutrophiles ont été cultivés sous hypoxie (0.7 % d'O₂) pendant 0, 10, 30, 60, 120 et 240 min. Le contenu des lysats totaux a été analysé pour vérifier l'état de phosphorylation des protéines AKT, ERK, JNK, p38, STAT1, STAT3 et C/EBP- β ainsi que la stabilisation de I κ B- α et HIF-1 α . Ces résultats sont représentatifs de 1 à 4 expériences indépendantes.

4.8. Mécanismes cellulaires mobilisés par le G-CSF sous hypoxie

4.8.1. Effet de l'hypoxie sur la signalisation dépendante du G-CSF

Selon nos résultats, l'hypoxie favorise la production d'IL-8 par le G-CSF (Figure 14). Les mécanismes contrôlant la production d'IL-8 en présence de G-CSF sont intéressants à approfondir étant donné l'implication des deux molécules dans plusieurs pathologies inflammatoires. Nous avons donc vérifié les voies de signalisation mobilisées par le G-CSF seul ou en présence d'hypoxie. Les principales voies auxquelles nous nous sommes intéressées sont les voies de STAT1 et STAT3, ERK, p38 et NF- κ B. En effet, le G-CSF via les STAT1 et STAT3 régule la migration (Nguyen-Jackson *et al.*, 2010), le chimiotactisme (Panopoulos *et al.*, 2006) et la transcription du gène Fc γ RI du CD64 (Bovolenta *et al.*, 1996) chez les neutrophiles. En plus, le G-CSF phosphoryle ERK chez les neutrophiles humains (Fukuzono *et al.*, 2010). Il est connu que le facteur NF- κ B est un élément clé dans la transcription du gène de l'IL-8 (Cloutier *et al.*, 2007).

Pour ce faire, les cellules ont été stimulées à des temps variables avec 1 nM de G-CSF, en normoxie ou en hypoxie. Nous avons démontré que le G-CSF en normoxie et en hypoxie induit la phosphorylation rapide de STAT3 ainsi que celle des kinases ERK et p38 (Figure 22A). De plus, alors que la phosphorylation de ERK et p38 est soutenue, STAT3 est phosphorylée de façon transitoire et semble être plus forte en hypoxie. Par ailleurs, nous n'avons détecté ni la phosphorylation de STAT1, ni la dégradation d'I κ B- α .

4.8.2. Effet de l'inhibition des STAT3 et p38 sur la production d'IL-8

Étant donné que le G-CSF conjointement à l'hypoxie induit la phosphorylation de STAT3 et p38, nous avons exploré l'effet de l'inhibition de ces deux cascades de signalisation sur la production d'IL-8 chez les PMN incubés en condition hypoxique et stimulés au G-CSF. Ainsi, nous avons prétraité les neutrophiles avec les inhibiteurs SB203580 et le S31-201 qui ciblent les deux voies de signalisation p38 et STAT3 respectivement, avant de les stimuler au G-CSF, en normoxie ou en hypoxie, pendant 8 heures. Tel que l'illustre la

figure 22B, le prétraitement aux inhibiteurs pharmacologiques diminue la production d'IL-8 en hypoxie et en normoxie. Le G-CSF semble impliquer l'activation de p38 et STAT3 simultanément afin d'induire la production d'IL-8.

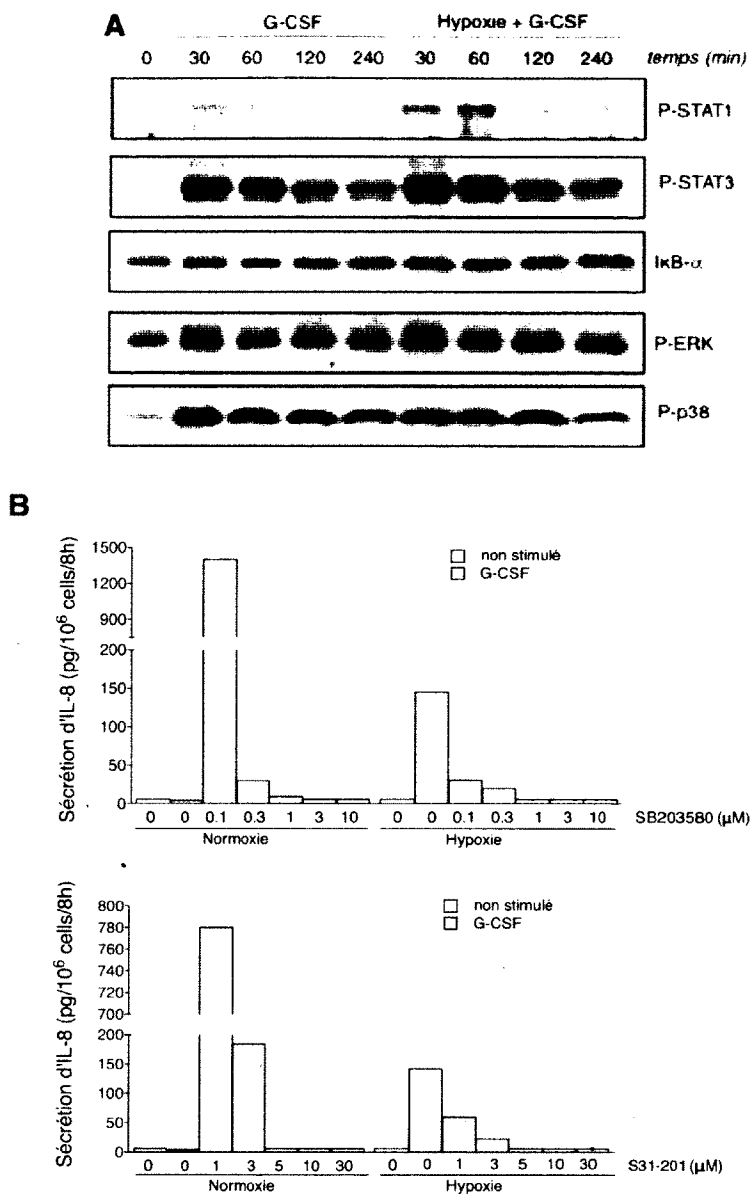


Figure 22. Effet de l'hypoxie sur la signalisation mobilisée par G-CSF chez les neutrophiles

A) Les neutrophiles ont été cultivés avec ou sans stimulation au G-CSF à 10 nM, sous normoxie ou hypoxie (0.7 % d'O₂) aux temps indiqués. Les lysats totaux ont été analysés pour vérifier la stabilisation ou la phosphorylation des protéines correspondantes. Ces résultats sont représentatifs de 1-3 expériences séparées. B) Les neutrophiles ont été préincubés avec des doses croissantes de SB203580 (haut) ou S31-201 (bas) pendant 15 min avant d'être stimulés par 1 nM de G-CSF en normoxie ou en hypoxie. L'IL-8 des surnageants cellulaires a été dosée par ELISA. Les résultats représentent une seule expérience réalisée en duplicata.

4.8.3. Action autocrine des cytokines endogènes dans la production d'IL-8 par le G-CSF sous hypoxie

Le G-CSF mène à l'activation de p38 et STAT3 aussi bien en hypoxie qu'en normoxie. Toutefois, dans la dernière condition, cette activation n'est pas accompagnée d'une production d'IL-8. Il est donc clair que l'hypoxie favorise la présence d'un troisième facteur cellulaire dont l'effet associatif à ceux de p38 et STAT3 permet d'induire l'IL-8. Ce facteur peut être déjà présent chez les neutrophiles stimulés au G-CSF sous forme inactive, et l'hypoxie associée au G-CSF entraîne son activation, ou alors son apparition et son activation sont consécutives aux traitements combinés.

Nous remarquons que la production d'IL-8 par G-CSF dans les cellules incubées en hypoxie est divisée en deux phases (Figure 14). La première, précoce, s'étale sur 4 heures. La deuxième plus tardive conduit à une libération soutenue de la chimiokine. Ce profil a été rapporté dans certaines études. Par exemple, en réponse au LPS ou à l'acide lipotéicoïque (Lipoteicoïque acid ; LTA), les neutrophiles humains produisent l'IL-8 en deux phases (Cassatella *et al.*, 1993; Hattar *et al.*, 2006). La première est obtenue par un effet direct du LPS ou LTA sur la production d'IL-8. La deuxième plus soutenue conduit à la libération des quantités supplémentaires d'IL-8, dépendant de l'action autocrine jouée par le TNF α endogène (Cassatella *et al.*, 1993; Hattar *et al.*, 2006). Le TNF α dans ce cas est sécrété en réponse à la stimulation au LPS ou LTA. Les expériences de neutralisation par des anticorps dirigés contre TNF α abolissent la deuxième phase de sécrétion (Cassatella *et al.*, 1993; Hattar *et al.*, 2006). À ce jour, il a été démontré que l'action autocrine à l'origine de la libération d'IL-8 chez les neutrophiles peut être exercée par TNF α , IL-18 et IL-1 endogènes (Cassatella *et al.*, 1993; Hattar *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2009). Nous avons donc utilisé des anticorps neutralisants dirigés contre ces trois cytokines. Comme le démontre la figure 23A, la neutralisation de TNF α réduit la production d'IL-8, tandis que la neutralisation d'IL-18 ou IL-1 l'abolit. La viabilité des cellules en présence des anticorps n'était pas modifiée telle que vérifiée par le test d'exclusion au bleu de Trypan (résultats non montrés).

Nous avons ensuite voulu vérifier la présence de cytokines endogènes dans les surnageants des cultures cellulaires stimulées au G-CSF sous hypoxie. Nous avons commencé par l'étude de la production de TNF α . Tel qu'indiqué à la figure 23B, le TNF α n'est pas produit en normoxie en absence de stimulation et l'hypoxie induit sa production. G-CSF n'induit pas la production de TNF α en normoxie. Par contre G-CSF diminue l'effet positif de l'hypoxie sur la production de TNF α mais n'entraîne pas son abolition.

Les neutrophiles cultivés sous hypoxie, en dépit de la présence de TNF α endogène, n'induisent pas l'IL-8. Nous avons examiné si les neutrophiles en hypoxie répondent différemment au TNF α exogène. Ainsi, nous avons stimulé les neutrophiles avec le TNF α et cultivé sous hypoxie (Figure 23C). Nos résultats indiquent que les neutrophiles répondent au TNF α exogène en normoxie, en produisant des quantités importantes d'IL-8, tel qu'il a été déjà vérifié (Scapini *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Cloutier *et al.*, 2005 ; Kumar *et al.*, 2010). En présence d'hypoxie, la production d'IL-8 semble être amplifiée précocement (à 4 heures) puis maintenue de façon similaire à la normoxie sur 24 heures. Dans ce cas, les neutrophiles cultivés sous hypoxie, en réponse au TNF α , conservent leur propriété de sécréter l'IL-8 en dépit d'une augmentation précoce des niveaux de production.

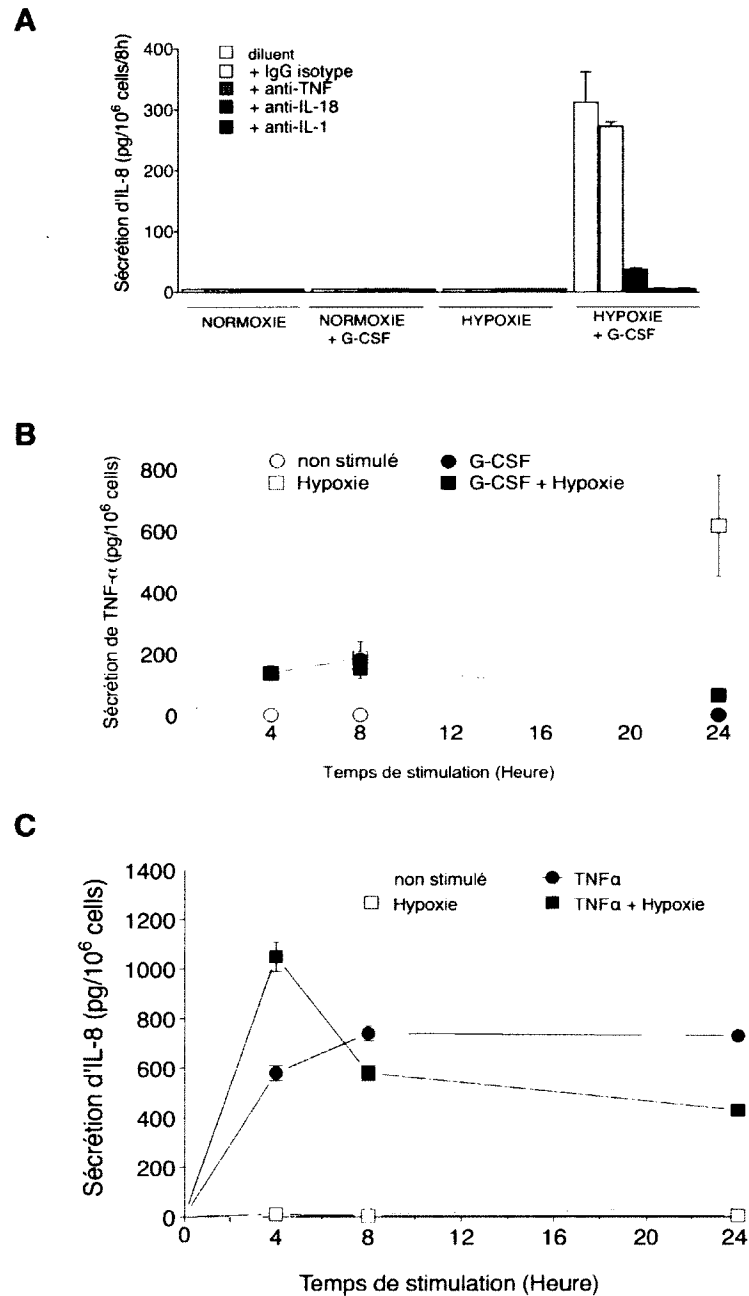


Figure 23. Mécanismes impliqués dans la production d'IL-8 par le G-CSF sous hypoxie

A) Les neutrophiles ont été stimulés avec 10 nM de G-CSF en normoxie ou en hypoxie, en présence ou en absence des anticorps neutralisants dirigés contre TNF α , IL-18 ou IL-1 pendant 8 heures. L'IL-8 des surnageants a été dosé par ELISA. Ces résultats sont représentatifs de 1 à 3 expériences séparées. B) Les neutrophiles ont été cultivés aux temps indiqués en présence ou en absence d'hypoxie, avec 10 nM de G-CSF ou avec 100 U/ml de TNF α (en bas). La sécrétion de TNF α (en haut) et d'IL-8 (en bas) a été estimée par ELISA. Les résultats sont la moyenne \pm SE de 2-3 expériences séparées.

4.8.4. Voies mobilisées par le TNF α sous hypoxie

Les neutrophiles en hypoxie répondent par la production d'IL-8 aux stimuli exogènes TNF α ou G-CSF. Cependant, le TNF α endogène, bien que sa production soit augmentée en hypoxie seule, n'induit pas la production d'IL-8. De plus, le G-CSF n'induit pas cette production en normoxie. Les deux situations, soit G-CSF et hypoxie, ou bien TNF α exogène et hypoxie, permettent de corriger ce manque en induisant la production d'IL-8. Nous avons postulé que l'hypoxie et TNF α exogène mobilisent les mêmes voies de signalisation que celles produites par G-CSF en hypoxie. Pour vérifier cette possibilité, nous avons stimulé les neutrophiles sous hypoxie avec le TNF α . Nous avons analysé l'état d'activation des principales protéines affectées par TNF α chez les neutrophiles humains et qui peuvent induire la production d'IL-8, soient p38, ERK, I κ B- α et C/EBP- β (Ear *et al.*, 2007 ; Cloutier *et al.*, 2009). Nous avons également vérifié la phosphorylation de STAT1 et STAT3 dans un but de comparer cette réponse avec celle produite par le G-CSF sous hypoxie (Figure 22A). Nous avons observé que l'hypoxie ne modifie pas l'état de phosphorylation de p38, ERK, C/EBP- β , STAT1 et STAT3 (Figure 24). L'exception touchait I κ B- α , dont la dégradation semble être plus soutenue sous hypoxie. Ceci suggère que ces voies de signalisation ne sont pas affectées par l'hypoxie en réponse au TNF α et que les voies activées par G-CSF en hypoxie, en dépit de la présence de TNF α endogène, ne sont pas semblables à celles mobilisées par le TNF α exogène. Par ailleurs, en hypoxie, il est possible que l'effet du TNF α endogène soit induit en présence de G-CSF.

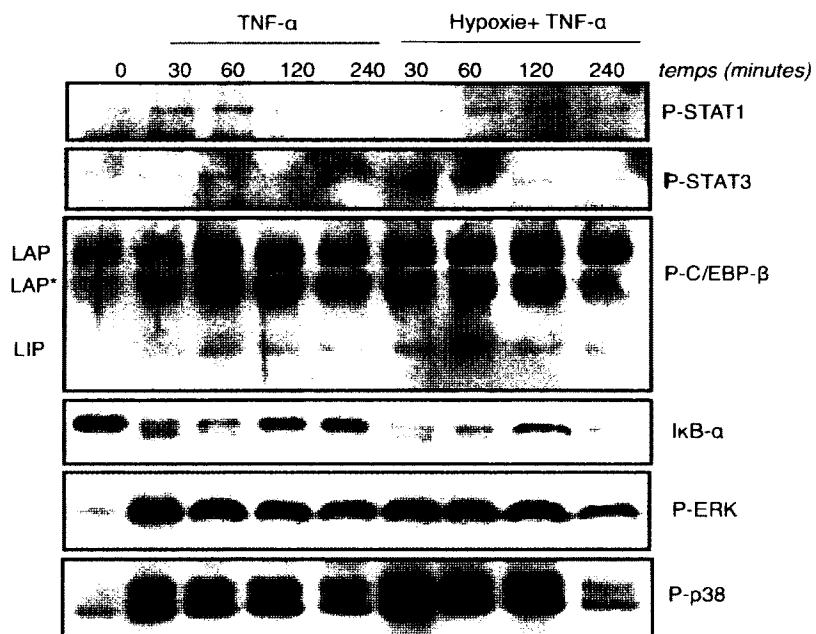


Figure 24. Voies de signalisation mobilisées par le TNF α en présence de G-CSF ou hypoxie

Les neutrophiles ont été stimulés par 100 U/ml de TNF α en normoxie ou en hypoxie aux temps indiqués. Les lysats totaux ont été analysés pour vérifier l'expression des protéines correspondantes. Ces résultats sont représentatifs de 1 expérience.

4.9. Contribution de l'hypoxie dans l'activation du promoteur d'IL-8 chez les neutrophiles humains sous conditions inflammatoires

Selon les résultats précédents, l'hypoxie semble moduler la production d'IL-8 en réponse aux G-CSF, LPS et TNF α , tandis qu'elle n'a pas d'influence sur la réponse au GM-CSF. Étant donné que HIF-1 α est stabilisée en hypoxie, et que son apparition précède les modifications observées au profil de production d'IL-8, nous voulions déterminer si ce facteur régule l'expression du gène d'IL-8. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire PLB-985, qui se différencie en cellules «neutrophile-like» en présence du DMSO. Ces dernières acquièrent plusieurs aspects morphologiques et fonctionnels similaires aux neutrophiles (Ear *et al.*, 2008).

4.9.1. Expression de HIF-1 α dans les cellules PLB-985 durant la différenciation en neutrophiles

Ainsi, nous avons traité les cellules PLB-985 non différenciées ou différenciées au DMSO sous hypoxie pendant 4 heures, ou suivant une cinétique de traitement au DMOG. Par la suite, nous avons comparé ces deux groupes de cellules aux cellules normoxiques. La lignée cellulaire HepG2 nous a servi de contrôle positif pour l'expression de HIF-1 α . Comme nous pouvons le constater à la figure 25, les cellules PLB-985 non différenciées et cultivées sous hypoxie pendant 4 heures n'expriment pas HIF-1 α (Figure 25A). Par contre, les cellules différenciées expriment des quantités détectables de cette protéine en hypoxie (Figure 25A) ou en réponse au DMOG (Figure 25B), comme observé chez les neutrophiles primaires.

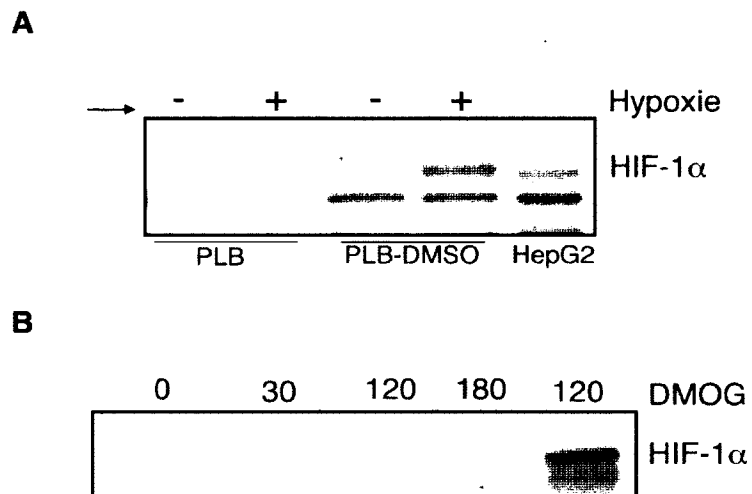


Figure 25. Réponses des cellules PLB-985 à l'hypoxie et au DMOG.

A) Les cellules PLB-985 non différenciées (PLB) ou différenciées au DMSO (PLB-DMSO) ont été cultivées en présence ou en absence d'hypoxie pendant 4h. Les lysats totaux ont été analysés pour vérifier l'expression de HIF-1 α . Ce résultat représente 2 expériences séparées. B) Les cellules PLB-985 différenciées au DMSO ont été traitées avec 1mM de DMOG aux temps indiqués. Les lysats totaux ont été analysés pour vérifier l'expression de HIF-1 α . Ce résultat représente une expérience.

4.9.2. Activation différentielle du promoteur d'IL-8 chez les cellules PLB-985 différenciées en neutrophiles sous hypoxie en réponse aux stimuli inflammatoires

Pour déterminer si l'hypoxie régule la transcription du gène d'IL-8, nous avons nucléofecté les cellules avec le vecteur pGL3-IL-8-Luc. Ce vecteur contient une construction de la luciférase dont l'activité dépend de la région promotrice (-1481 à +40) du gène d'IL-8. Par la suite, les cellules «neutrophiles-like» ont été cultivées sous normoxie ou soumises à l'hypoxie, en présence ou en absence des quatre agonistes G-CSF, GM-CSF, TNF α et LPS. Les résultats sont présentés à la figure 26. En normoxie, l'activité de la luciférase correspondante au pGL3-IL-8 est stable, en présence de G-CSF, tandis qu'elle est augmentée en réponse au GM-CSF, LPS ou TNF α . L'hypoxie seule augmente l'activité basale du promoteur d'IL-8, G-CSF et LPS l'augmente davantage. La stimulation par GM-CSF est maintenue en présence d'hypoxie tandis qu'elle est abolie en réponse au TNF α . Nous avons utilisé le plasmide pGL3-IL-8-IIREmut avec un promoteur dont le site IIRE est muté (Kim *et al.*, 2006). En premier lieu, en normoxie, nous avons remarqué que la mutation du site HRE entraîne une diminution des niveaux induits par LPS et TNF α . En hypoxie, il est surprenant de constater que la mutation du site IIRE maintient l'expression du promoteur induite par G-CSF, tandis qu'elle diminue celle en réponse au LPS. La mutation rend le promoteur insensible à l'action au TNF α en normoxie mais pas en hypoxie (Figure 26). Finalement, en réponse au GM-CSF, la mutation HRE augmente les niveaux induits en normoxie et en hypoxie comparativement au promoteur non muté.

Enfin, étant donné que le facteur de transcription NF- κ B module l'activité du promoteur d'IL-8 en réponse au LPS et TNF α , nous avons également testé son rôle sous hypoxie. Ainsi, nous avons utilisé le plasmide pGL3-IL-8- κ Bmut qui contient une mutation des éléments de liaison du NF- κ B, et empêche sa régulation par NF- κ B. La figure 26 indique que la mutation du site NF- κ B inhibe drastiquement l'activité induite du promoteur d'IL-8 dans toutes les conditions étudiées. Dans le cas du LPS et TNF α , nos résultats concordent avec nos résultats précédents montrant que NF- κ B est un facteur indispensable à l'activation du promoteur d'IL-8 (Cloutier *et al.*, 2009; Ear et McDonald, 2008). Autrement, cette réponse est inconnue dans le cas du G-CSF et GM-CSF.

En résumé, nous concluons que l'activation du promoteur de l'IL-8 est différente en normoxie et en hypoxie, et qu'elle est induite de façon spécifique pour chaque stimulus. En normoxie, HIF semble être un activateur de la transcription dépendante du LPS et TNF α , alors qu'il semble inhiber celle du GM-CSF. Sous hypoxie, il existe une activité de base qui dépend conjointement des deux facteurs NF- κ B et HIF. De plus, alors que HIF n'est pas indispensable à l'activité du promoteur en condition G-CSF, il est un activateur dans le cas du LPS et il inhibe les effets du GM-CSF et TNF α .

Ces résultats suggèrent plusieurs conclusions. Premièrement, l'activité du promoteur d'IL-8 en normoxie et en hypoxie est dépendante de NF- κ B en présence de GM-CSF, LPS ou TNF α et du G-CSF uniquement en hypoxie. Deuxièmement, le facteur HIF semble être un nouveau régulateur du promoteur d'IL-8, et la liaison de HIF à la séquence HRE exerce une action variable selon le stimulus, activatrice dans le cas du LPS et TNF α et inhibitrice dans le cas de GM-CSF. Troisièmement, la régulation du promoteur d'IL-8 semble être partiellement dépendante de HIF en normoxie et en hypoxie en réponse au LPS et GM-CSF, tandis qu'elle est complètement dépendante du HIF dans le cas du TNF α . Pour le G-CSF, en l'absence d'une activité du promoteur d'IL-8 et sa modulation en présence de mutation HRE, il est clair que HIF ne semble pas jouer un rôle en normoxie et en hypoxie.

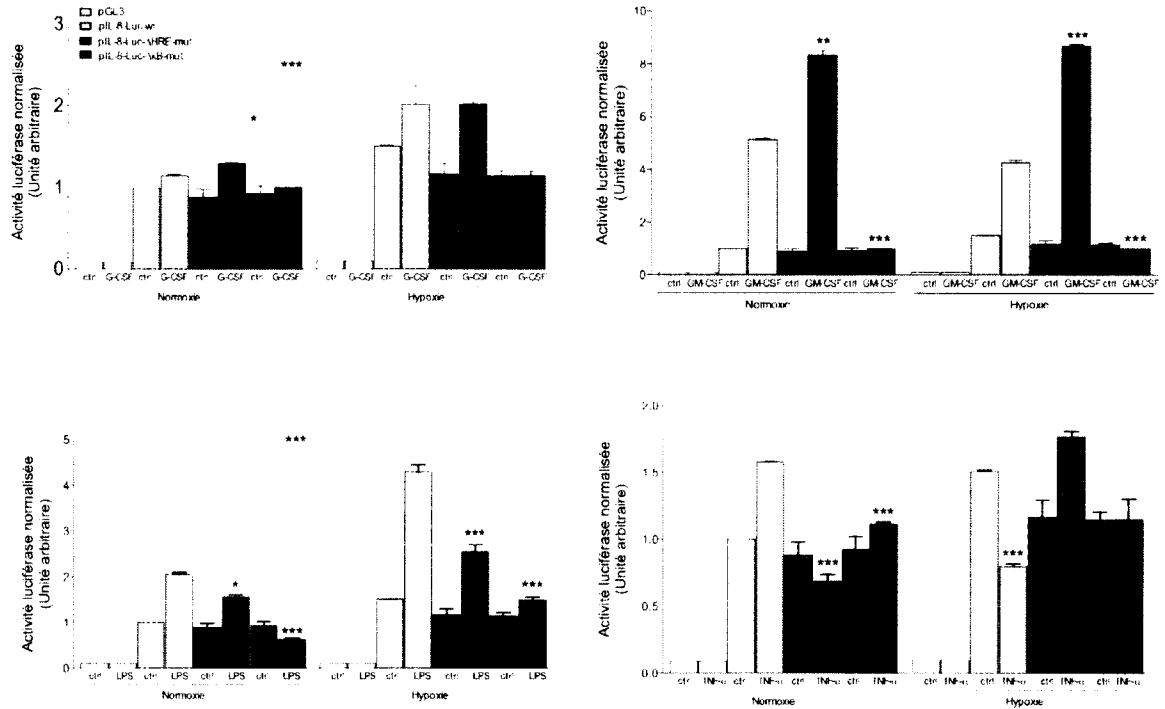


Figure 26. Effet de l'hypoxie sur l'activité du promoteur d'IL-8 chez les PLB-985 différenciées en neutrophiles en réponse aux agonistes des neutrophiles.

Les PLB-985 neutrophile-like ont été nucléofectées avec un plasmide pGL3 porteur de construction du gène de la luciférase, sous la dépendance du promoteur de l'IL-8, sauvage (wt), mutant au site HRE (Δ HRE) ou le site NF- κ B (Δ κ B). Après 2 heures de culture sous normoxie, les cellules ont été stimulées pendant 3 heures avec 10 nM G-CSF, 1 nM GM-CSF, 1 μ g/mL LPS ou 100 U/mL TNF α , en présence ou en absence d'hypoxie. Par la suite les cellules ont été lysées et l'activité de luciférase a été mesurée. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test ANOVA double (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le facteur de transcription HIF joue plusieurs rôles dans la biologie des macrophages (Takeda *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2010 ; Roda *et al.*, 2011), CD8 (Bosco et Varesio, 2012; Köhler *et al.*, 2012), lymphocytes (Palazón *et al.*, 2012; Ikejiri *et al.*, 2012) et neutrophiles (Walmsley *et al.*, 2011). HIF régule la migration, la chimiotaxie, la survie et le métabolisme énergétique des neutrophiles (Cramer *et al.*, 2003; Walmsley *et al.*, 2011). La majorité des études sur HIF chez les neutrophiles ont été réalisées en utilisant des stabilisateurs pharmacologiques de HIF-1 α , comme le DFO et CoCl₂ (Mecklenburgh *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006 ; Walmsley *et al.*, 2011) Par ailleurs, l'effet du stabilisateur naturel de HIF, soit l'hypoxie, n'est pas bien connu. De plus, la régulation des autres protéines HIF et l'activation du complexe HIF par les facteurs de croissance et les cytokines en normoxie et en hypoxie n'ont pas été étudiées. Les résultats présentés dans ce mémoire contribuent à caractériser le facteur HIF dans les neutrophiles humains.

Expression des protéines HIF et leur modulation par l'hypoxie et l'inflammation

Il a été démontré que HIF-1 α n'est pas détectée en normoxie dans le neutrophile humain (Mecklenburgh *et al.*, 2002; Walmsley *et al.*, 2005). Toutefois, nous avons détecté chez 40 % des donneurs, une bande immunoréactive constitutive qui migre légèrement plus haut que le poids moléculaire normal de HIF-1 α , soit de 130 kDa. Il serait intéressant de vérifier si cette bande correspond à une forme plus longue de HIF-1 α car cette forme est abondante chez plusieurs donneurs. Cette forme ne semble pas être régulée par l'activation des voies de stress MAPK p38 et ERK en réponse au TNF α , fMLP, LPS ou GM-CSF (résultats non montrés). Il a été démontré que des formes longues de HIF-1 α peuvent être induites suite à son ubiquitinylation, entraînant ainsi la migration plus lente de HIF-1 α sur gels SDS-PAGE (Li *et al.*, 2005). Des isoformes plus longues de HIF-1 α qui comportent 24 à 27 acides aminés supplémentaires ont aussi été détectées, soient HIF-1 α L.2 chez les macrophages murins (Ramanathan *et al.*, 2009) et HIF-1 α L.3 chez les lymphocytes humains, (Lukashev *et al.*, 2001).

Nous avons détecté HIF-2 α en normoxie dans les neutrophiles humains au repos contrairement aux résultats de Mecklenburgh *et al.* (2002). HIF-2 α n'est pas détectée en normoxie dans la majorité des cellules primaires. Toutefois, elle est constitutivement exprimée dans plusieurs lignées cellulaires et dans les macrophages primaires dérivés de la MO de souris (Rius *et al.*, 2008). HIF-1 α et HIF-2 α ont une homologie faible de 48 % (Bracken *et al.*, 2006), ce qui est à l'origine d'une régulation variable des deux protéines. Par exemple, il a été démontré que l'enzyme FII hydroxyle le domaine C-TAD de HIF-1 α et HIF-2 α en normoxie avec une affinité plus grande pour HIF-1 α , dans les lignées cellulaires HeLa, 293T, COS-1, PC12, CACO2 et HepG2 (Bracken *et al.*, 2006). En effet, la séquence en acides aminés du C-TAD de HIF-1 α permet la formation d'une liaison hydrogène entre les deux valines 802 et 804 stabilisant l'interaction avec FII. Une telle liaison est absente sur le C-TAD de HIF-2 α (Bracken *et al.*, 2006). De plus, l'effet stabilisateur de l'hypoxie sur HIF-1 α et HIF-2 α n'est pas similaire. Dans des cellules de neuroblastomes, les niveaux de HIF-2 α augmentent de façon prolongée tandis que ceux de HIF-1 α augmentent de façon transitoire, mais les mécanismes expliquant cette différence sont encore inconnus (Holmquist *et al.*, 2005). Il est donc possible que la régulation des HIF-1 α et HIF-2 α soit également différente dans les neutrophiles humains.

Nous avons détecté des isoformes de HIF-3 α en normoxie. Dans la littérature, la stabilisation de HIF-3 α en normoxie a été associée à l'insuffisance de la dégradation protéasomale. Par exemple, l'isoforme HIF-3 α 4 qui migre à 45 kDa ne contient pas un ODDD et elle n'est pas sensible à l'O₂. Les isoformes longues de HIF-3 α possèdent un ODDD hydroxylé sur un seul résidu proline (en position 564) en normoxie et peuvent être aussi bien sensibles que résistantes à l'action des PHD. De plus, HIF-3 α peut résister à la dégradation protéasomale suite à des modifications post-transcriptionnelles (comme la phosphorylation et la glycosylation) ou au clivage post-traductionnel (Maynard *et al.*, 2005). Par conséquent, nous pensons que nos résultats doivent être interprétés avec prudence, surtout devant le manque de données sur HIF-3 α .

En conclusion, l'expression de protéines HIF- α chez les neutrophiles au repos laisse supposer que des mécanismes spécifiques sont mis en jeu à l'origine de la stabilisation

constitutive de ces protéines. L'élucidation de ces mécanismes nécessite des études plus détaillées.

L'hypoxie stabilise HIF-1 α chez les neutrophiles humains (Walmsley *et al.*, 2005) et selon nos résultats (Figure 7C), elle ne change pas l'expression constitutive de HIF-2 α et HIF-1 β . Dans plusieurs types cellulaires, HIF-1 α et HIF-2 α sont stabilisées en normoxie par TNF α (Déry *et al.*, 2005), LPS (Takeda *et al.*, 2010 ; Kuschel *et al.*, 2012) et GM-CSF (Liu *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2011 ; Roda *et al.*, 2012) et seule HIF-1 α serait rapporté pour être stabilisée par G-CSF (Li *et al.*, 2011). Néanmoins, dans notre étude, ces agonistes n'ont permis ni la stabilisation de HIF-1 α ni la modification de l'expression de HIF-2 α en normoxie. Avec TNF α , G-CSF ou GM-CSF en normoxie, nous avons observé l'apparition tardive (à 4 heures) d'une bande supérieure à la bande constitutive de HIF-1 β . Il est possible que cette forme soit une forme plus lourde de HIF-1 β . Par exemple, Alt ARNT est une variante obtenue par épissage alternatif d'HIF-1 β (de 15 aa plus longue) (Kewley et Whitelaw, 2005). Des modifications post-traductionnelles de HIF-1 β peuvent augmenter son poids moléculaire telle que sa phosphorylation par les kinases CKII, PKC et PKA dans les COS-1 (Long *et al.*, 1999 ; Levine et Perdew, 2001) et sa sumoylation par SUMO-1 (Tojo *et al.*, 2002 ; Oshima *et al.*, 2009). La stimulation des neutrophiles par les agonistes en hypoxie semble induire une synergie de stabilisation de HIF-1 α . Une telle synergie a été démontrée dans la littérature en réponse au TNF α (Larsen *et al.*, 2012), LPS (Jantsch *et al.*, 2008 ; Brooks *et al.*, 2010) et GM-CSF (Nissim Ben Efraim *et al.*, 2010) tandis qu'elle n'est pas encore vérifiée avec G-CSF. Pour HIF-3 α , l'effet de l'hypoxie varie selon les donneurs, mais les données de la littérature sur cette protéine sont insuffisantes et l'interprétation de ces résultats nécessite des investigations plus approfondies.

Localisation cellulaire et activation des protéines HIF

Il a été démontré que l'hypoxie implique la translocation au noyau de HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α (Forristal *et al.*, 2010; Jokilehto *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2003). Selon nos résultats, HIF-3 α semble être cytoplasmique et l'hypoxie ne modifie pas sa localisation (Figure 13). Chez les cellules souches d'embryons humains, HIF-3 α est largement exprimée au

cytoplasme sous normoxie et hypoxie aiguë, et seul l'hypoxie chronique entraîne sa translocation au noyau (Forristal *et al.*, 2010). Nous n'avons pas pu étudier la localisation cellulaire et la liaison à l'ADN de HIF car HIF-1 α et HIF-2 α n'étaient pas détectables après la lyse par cavitation à l'azote. Il est connue que cette méthode est privilégiée pour lyser les neutrophiles et étudier leurs facteurs de transcription. En effet, cette méthode permet de conserver l'intégrité des granules cytoplasmiques et protéger les protéines de la protéolyse. Une autre méthode de lyse au détergent Nonidet P-40 (NP-40) a abouti à un résultat identique. Contrairement à la lyse de cellules entières, ces deux méthodes nécessitent plus de temps. Nous pouvons penser que HIF-1 α stabilisée en hypoxie a subi une dégradation protéasomale à cause de la réoxygénation des échantillons pendant la lyse. Plusieurs auteurs étudiant HIF-1 α ajoutent l'inhibiteur pharmacologique du protéasome, le MG-132, aux échantillons hypoxiques à l'étape d'arrêt des stimulations et durant la lyse, afin de préserver les quantités de HIF-1 α stabilisées en hypoxie (Ungureanu *et al.*, 2002). Or, le MG-132 stabilise HIF-1 α rapidement (Zhang *et al.*, 2006 ; Kong *et al.*, 2007), ce qui peut modifier le rôle du protéasome dans la stabilisation de HIF-1 α et peut fausser les résultats. Pour ces raisons, nous n'avons pas utilisé ce traitement. L'absence de HIF-1 α peut aussi être expliquée par les effets de certains réactifs contenus dans la solution de lyse. Par exemple, l'ajout du NaF (un inhibiteur des phosphatases) dans les extraits nucléaires ou le traitement des cellules par le DTT diminue les niveaux de HIF-1 α (Wang *et al.*, 1995b, Carver *et al.*, 2007). De plus, les niveaux de la protéine HIF-1 α ainsi que la liaison de HIF à l'ADN peuvent être abolis par l'utilisation de DTT (agent oxydant) (Palmer *et al.*, 2000). Il est donc possible que ces deux molécules utilisées dans notre procédure de lyse (voir *matériel et méthodes*) déstabilisent HIF-1 α dans les lysats des cellules et affectent la liaison à l'ADN du HIF dans les extraits nucléaires. Bien que nous utilisions ces produits dans la lyse totale des cellules, nous n'avons pas vérifié si les quantités de HIF-1 α détectées correspondent réellement aux quantités stabilisées par l'hypoxie avant la lyse. Il serait primordial d'optimiser le protocole de fractionnement cellulaire et l'extraction nucléaire afin de comprendre la cause de l'absence de détection de HIF-1 α et HIF-2 α .

Effets variables de l'hypoxie sur la production des cytokines

Selon nos résultats, l'hypoxie modifie la production des cytokines chez les neutrophiles humains comparativement à la normoxie et ce, de façon dépendante du stimulus. LPS et PGN sont des produits bactériens qui peuvent être présents dans des sites inflammatoires infectieux et hypoxiques, et ils activent leurs récepteurs TLR4 et TLR2 respectivement, induisant la production des cytokines (Kawai *et al.*, 2005 ; Hamilton *et al.*, 2010; Tamassia *et al.*, 2007). Selon nos résultats, les neutrophiles stimulés au LPS ou PGN en hypoxie produisent précocement et de façon plus intense MIP-1 α , MIP-1 β et MIP-3 α . Cependant, la production d'IL-8, conservée avant 4 heures, est suivie de sa diminution tardive et drastique. L'hypoxie semble induire une production particulière de chimiokines *in vitro* qui peut correspondre au recrutement séquentiel des cellules inflammatoires au loci infectieux hypoxique *in vivo*, représenté par un afflux de neutrophiles (réalisé entre autres par l'IL-8) suivi du recrutement des autres populations cellulaires, telles que les monocytes/macrophages (réalisé par MIP-1 α , MIP-1 β et MIP-3 α).

Les neutrophiles produisent des cytokines en réponse au GM-CSF en normoxie (Cloutier *et al.*, 2007; Ear *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 1998a). Selon nos résultats, en réponse au GM-CSF, l'hypoxie semble favoriser la production de MIP-1 α et diminuer celles de MIP-3 α et MIP-1 β . Cette réponse est intéressante à explorer. En effet, MIP-1 α et MIP-1 β ciblent de façon différente les lymphocytes. MIP-1 α est sélective pour les lymphocytes CD8 $^+$ et les lymphocytes B, alors que MIP-1 β cible les lymphocytes T CD4 $^+$ (Esche *et al.*, 2005; Lillard *et al.*, 2003). Ainsi, nous pouvons supposer que l'hypoxie semble diminuer le ratio MIP-1 β /MIP-1 α et orienter la réponse inflammatoire vers un profil Th1 en faveur du recrutement des lymphocytes B. *In vivo*, il est connu que l'effet de l'hypoxie sur la capacité des neutrophiles à produire davantage MIP-1 α est potentiellement important. En fait, il a été démontré qu'en réponse au GM-CSF, les neutrophiles matures résidants des niches hématopoïétiques hypoxiques inhibent la croissance des cellules hématopoïétiques (Olive *et al.*, 2002). MIP-1 α est également connu par son effet inhibiteur sur les cellules souches hématopoïétiques, à la différence de MIP-1 β ayant l'effet antagoniste (Broxmeyer *et al.*,

1989 ; Graham *et al.*, 1990). Il est possible que l'hypoxie en régulant la production de MIP-1 α et MIP-1 β par les neutrophiles régule la croissance des cellules souches.

Les neutrophiles en présence du G-CSF en hypoxie produisent de l'IL-8 (chimiotactique pour les neutrophiles et macrophages) et sécrètent moins d'IP-10 (la seule chimiokine active sur les monocytes et les lymphocytes T et n'ayant pas d'action sur les neutrophiles). Ceci laisse supposer que l'hypoxie et G-CSF diminuent le recrutement des lymphocytes T. Les données sur la capacité des G-CSF, GM-CSF et PGN à produire MIP-3 α sont peu nombreuses. Scapini *et al.* (2001) ont démontré que LPS et TNF α induisent la production de MIP-3 α par les neutrophiles en normoxie. Cette production lente et tardive n'atteint son maximum qu'à 21 heures et fait suite à une augmentation rapide et précoce des ARNm de MIP-3 α à 1 heure (Scapini *et al.*, 2001). Selon nos résultats, MIP-3 α est produite en réponse au LPS en normoxie de façon précoce et ample suivie d'une diminution progressive. Il est possible que cette différence soit due au LPS plus concentré que nous avons utilisé dans nos expériences de stimulation des neutrophiles pour étudier la production des cytokines par ELISA (10 fois plus concentré). Sinon, la capacité des neutrophiles à produire TNF α et MIP-3 α en hypoxie sans stimulation nécessite une exploration plus approfondie. À ce sujet, il est connu que l'hypoxie induit la production de TNF α et MIP-3 α par les macrophages par l'induction de la transcription des gènes des deux cytokines de façon dépendante du facteur NF- κ B (Chandel *et al.*, 2000; Degrossoli et Giorgio, 2007; Battaglia *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2012).

La divergence entre les effets de l'hypoxie ou le DMOG sur la production des cytokines suggère que les mécanismes de la réponse cellulaire en hypoxie ne sont pas reproductibles par le stabilisateur pharmacologique du HIF-1 α , le DMOG. Il s'agit donc d'une erreur de considérer que les traitements au DMOG ou par les stabilisateurs pharmacologiques du HIF sont capables de mimer de façon fidèle l'hypoxie.

Voies de signalisation intracellulaire mobilisées en hypoxie dans les PMN

Nous rapportons que les protéines de signalisation p38, JNK, Akt et ERK sont phosphorylées en hypoxie dans les neutrophiles. Dans la littérature, la phosphorylation de ces protéines en hypoxie a été démontrée dans différentes populations cellulaires, telles que les monocytes/macrophages (Hirani *et al.*, 2001 ; Fong *et al.*, 2007 ; Gonsalves *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2008) ; les cardiomyocytes (Teng *et al.*, 2012), les trophoblastes (Ji *et al.*, 2011) la lignée épithéliale prostatique, LNCaP (Khandrika *et al.*, 2009), les hépatocytes (Kim *et al.*, 2007; Mollen *et al.*, 2007). C/EBP- β est phosphorylée en hypoxie dans les chondrocytes (Hirata *et al.*, 2012) et les lignées cellulaires de leucémies NB4 et U937 (Zhang *et al.*, 2008). La phosphorylation précoce de STAT1 et STAT3 a été rapportée en hypoxie dans les cellules musculaires lisses (Wang *et al.*, 2005) et les lignées cellulaires de cancer du sein (Lee *et al.*, 2006), mais nous n'avons pas pu détecter un tel événement chez les neutrophiles en hypoxie. En normoxie, les protéines p38, JNK, C/EBP- β , Akt et ERK représentent des acteurs potentiels dans la production des cytokines dans les neutrophiles. Il est important de vérifier si ces protéines sont impliquées dans la production des cytokines TNF α et MIP-3 α en hypoxie seule dans les neutrophiles humains (selon nos résultats). Par exemple, la phosphorylation de p38 MAPK par l'hypoxie dans les monocytes/macrophages et impliquée dans la production de TNF α et IL-8 (Liu *et al.*, 2008). Nous avons aussi démontrée que la kinase I κ B- α n'est pas dégradée en hypoxie. Ce fait a été également rapporté par l'équipe de Walmsley (Walmsley *et al.*, 2005). Ceci laisse supposer que la voie classique de l'activation de NF- κ B n'est pas mobilisée chez les neutrophiles en hypoxie. Il reste à confirmer si la voie alternative de l'activation de NF- κ B pourrait être mobilisée en hypoxie puisque ce facteur semble être impliqué dans l'activation du promoteur d'IL-8 en hypoxie (selon nos résultats). Par ailleurs, il a démontré que l'activation du NF- κ B sous hypoxie est indépendante de la dégradation d'I κ B α (Culver *et al.*, 2010). En effet, l'hypoxie induisait une sumoylation d'I κ B- α sur la lysine 21, ce qui empêchait sa dégradation par le protéasome et diminuait son association avec RelA. Celui-ci se trouvant libre, formerait un complexe actif (Culver *et al.*, 2010). La régulation de l'activité protéique par sumoylation n'a pas encore été vérifiée chez les neutrophiles

humains. Selon ces données, nous supposons que sous hypoxie, NF- κ B est activée de façon indépendante de la dégradation d'I κ B- α dans les neutrophiles.

Nouveaux mécanismes de production d'IL-8 dépendant du G-CSF en hypoxie

Le G-CSF n'induit pas la production d'IL-8 par les neutrophiles humains en normoxie (Takahashi *et al.*, 1993). Notre résultat est le premier à attribuer au G-CSF une capacité à induire l'IL-8 qui nécessite la présence d'hypoxie. Bien que les quantités produites d'IL-8 soient de l'ordre du sous-nanogramme par un million de neutrophiles, des concentrations similaires ont été démontrées suffisantes pour induire le chimiotactisme des neutrophiles dans des sites inflammatoires (Browning *et al.*, 2000). L'association du G-CSF et IL-8 caractérise des sites inflammatoires riches en neutrophiles (Fukushima *et al.*, 1995 ; Shimoda *et al.*, 1991, Moser *et al.*, 2005, He *et al.*, 2008). Le rôle chimiotactique et activateur des neutrophiles exercé par l'IL-8 a été bien démontré dans l'inflammation (Bickel *et al.*, 1993; Wright, 2010; Carpagnano *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2013). Par contre, l'implication du G-CSF dans la pathologie inflammatoire n'est pas claire. Le G-CSF peut augmenter l'adhésion et la migration transendothéliale des PMN vers le site inflammatoire (Eyles *et al.*, 2008). Il est possible que G-CSF induit indirectement le recrutement des PMN en favorisant la production d'IL-8 par les neutrophiles résidant dans le site hypoxique. Des essais de chimiotactisme en présence de G-CSF, en normoxie et en hypoxie permettraient d'étudier cette possibilité.

Nous avons également démontré que la sécrétion de TNF α , IL-18 ou IL-1 contribue à la production d'IL-8 par G-CSF en hypoxie. Les neutrophiles sécrètent du TNF α qui reste un facteur important dans la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde (Lawlor *et al.*, 2004). Chez les patients arthritiques, des niveaux élevés de TNF α sécrétés par les neutrophiles ou fixés sur leurs membranes cytoplasmiques ont été détectés (Wright *et al.*, 2011). Nous supposons que TNF α par action autocrine est à l'origine de la production d'IL-8 et du recrutement accru des neutrophiles. Par ailleurs, la production de TNF α endogène en hypoxie ne permet pas à elle seule d'induire l'IL-8 : le G-CSF constitue un prérequis pour cette production. Il

est possible que G-CSF en hypoxie régule l'activité de la forme soluble de TNF α . Enfin, nous avons démontré qu'en hypoxie G-CSF augmente la phosphorylation de STAT3 et conserve la phosphorylation de p38. p38 et STAT3 semblent être essentielles pour la production d'IL-8 en hypoxie. Par ailleurs, il a été démontré que l'activation par G-CSF de STAT3 et p38 MAPK dans les neutrophiles humains inhibe la production d'IL-8 et TNF- α en réponse au LPS (Fukuzono *et al.*, 2010). Dans ce cas, il est possible que l'hypoxie favorise la mobilisation de voies de signalisation supplémentaires par G-CSF à l'origine de son action variable sur la production d'IL-8.

Nouveaux régulateurs du promoteur d'IL-8 en normoxie et en hypoxie

Nos résultats sur la régulation du promoteur d'IL-8 dans les cellules « neutrophil-like » par NF- κ B et HIF, en normoxie et en hypoxie, en réponse au G-CSF, GM-CSF, LPS ou TNF α suggèrent certaines hypothèses. Pour NF- κ B, nos résultats concordent avec nos travaux antérieurs qui démontrent que NF- κ B active le promoteur d'IL-8 en réponse au LPS et TNF α en normoxie. Nos résultats actuels suggèrent que l'activation du promoteur d'IL-8 par NF- κ B est inductible également par GM-CSF en normoxie et que NF- κ B constitue un régulateur central en hypoxie seul ou associée à des stimuli inflammatoires. Le facteur NF- κ B régule la transcription des gènes inflammatoires, la cyclooxygénase, IL-8, TNF α , IL-6 et MIP-2 en hypoxie dans les cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2008).

Nous démontrons également que HIF est indispensable à l'activité du promoteur d'IL-8 en réponse au TNF α tandis qu'il partiellement impliqué dans l'activité du promoteur d'IL-8 en réponse au GM-CSF et LPS en normoxie et en hypoxie. Ceci suggère qu'en réponse au LPS et GM-CSF l'association de HIF et d'autres facteurs de transcriptions, qui restent à identifier, contribue à la régulation du promoteur d'IL-8. Dans la littérature, une telle association a été vérifiée. Par exemple, l'activation du promoteur d'IL-8 en hypoxie est sous la triple dépendance de HIF, NF- κ B et AP-1, dans les cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2006). De plus, l'expression d'IL-8 est régulée par CREB et HIF en hypoxie dans les TAN (Dumitru *et al.*, 2012 ; Nam *et al.*, 2011, Leonard *et al.*, 2008 ; O'Reilly *et al.*, 2006). Chez les macrophages humains, l'IL-8 est induit par C/EBP et HIF en hypoxie (Ilirani *et*

al., 2001 ; Hirani *et al.*, 2001). Il est pertinent de noter que les protéines AP-1, CREB et C/EBP sont exprimées dans les neutrophiles (Cloutier *et al.*, 2003 ; Cloutier *et al.*, 2009) et il serait important de vérifier si elles participent avec HIF dans la transcription du gène d'IL-8.

Un autre aspect de la régulation du gène d'IL-8 par HIF que nous avons démontré est en rapport avec une dualité de régulation. HIF semble avoir des effets suppresseurs ou activateurs qui dépendent de l'agoniste. Nous pouvons supposer que cette régulation est associée à la nature des membres HIF exprimés et activés en réponse à un agoniste donné en normoxie ou en hypoxie. Par exemple, dans les cellules endothéliales humaines, l'expression du gène d'IL-8 est induite par HIF-2, tandis qu'elle est diminuée par HIF-1 (Florczyk *et al.*, 2011). Dans ce cas, ces résultats nécessitent des études approfondies, telles que l'inhibition pharmacologiques ou par siRNA des différents membres HIF afin de déterminer la nature du facteur HIF impliquée dans la transcription du gène d'IL-8.

Nous avons démontré que l'hypoxie diminue la production d'IL-8 par LPS en hypoxie dans les neutrophiles primaires, alors que l'activité de ce promoteur est augmentée en hypoxie dans les PLB-985 « neutrophile-like ». Il serait approprié de vérifier les niveaux de transcrits d'ARNm primaires et matures. En effet, il est possible d'observer une dissociation entre les phénomènes transcriptionnels et post-transcriptionnels en hypoxie (Liu *et al.*, 2006). Par exemple, l'hypoxie active la transcription de gènes sous le contrôle de NF- κ B mais inhibe leur traduction selon une voie dépendante de ERK et AMPK (Liu *et al.*, 2006).

6. CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans notre laboratoire, nous avons démontré que les neutrophiles humains expriment et activent plusieurs facteurs de transcription en réponse à plusieurs stimuli inflammatoires. Cette réponse se traduit sur le plan fonctionnel, par la production des cytokines et chimiokines hautement importantes au cours de la réponse immunitaire. Dans un contexte physiologique, les neutrophiles procèdent principalement sous condition hypoxique, ce qui constitue une des caractéristiques majeures du site inflammatoire. Toutefois, l'influence de l'hypoxie sur l'activité transcriptionnelle du neutrophile, et particulièrement par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF, qui représente le facteur clé de la réponse cellulaire à l'hypoxie, n'a pas encore été mise en évidence. Des travaux antérieurs avaient suggéré l'importance du facteur de transcription HIF, dans la phagocytose et la survie des neutrophiles humains (Cramer *et al.*, 2003; Walmsley *et al.*, 2006; Walmsley *et al.*, 2005). Les objectifs de ce projet étaient de caractériser les protéines HIF chez les neutrophiles humains *in vitro* ; de vérifier l'activation des protéines de signalisation chez les neutrophiles humains ; d'étudier la production des cytokines en hypoxie et de déterminer certains mécanismes qui sont mis en jeu lors de cette réponse. Nos résultats appuient notre hypothèse sur le rôle de l'hypoxie dans la modulation de la production des cytokines par l'hypoxie et suggèrent que HIF pourrait être un régulateur de cette fonction en hypoxie. Nos résultats ont permis de dresser certains aspects uniques de l'expression du système HIF. Des études ultérieures vont permettre de vérifier la nature des complexes HIF et leur liaison à l'ADN, de montrer leur implication dans des réponses du neutrophile, et d'approfondir les mécanismes mobilisés en hypoxie.

7. REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de mes années universitaires.

Je tiens à remercier sincèrement Professeur Patrick McDonald et Professeure Claire Dubois, qui, en tant que Directeur et Co-Directrice de maîtrise, se sont toujours montrés à l'écoute et très disponibles tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'ils ont bien voulu me consacrer.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Professeur Marek Rola-Pleszczynski et Professeur Claude Asselin qui ont eu la gentillesse de lire et corriger ce travail.

J'exprime ma gratitude à mes collègues de travail qui ont accepté de répondre à mes questions avec gentillesse, Carl, Thornin, Alex et Marilyn.

Mes remerciements s'adressent également aux étudiants des deux laboratoires, et spécialement à Olga, François, Stéphanie et Thomas. Merci à Docteur Léonid Volkov, pour les conseils qu'il n'a jamais hésité d'offrir.

Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Merci également à mes sœurs et frères qui m'ont toujours encouragé.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma petite famille, mon époux Oualid, qui m'a toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire, et mon fils Wael, qui a rempli ces temps de bonheur.

Merci à tous et à toutes.

7. BIBLIOGRAPHIE

- Abdgawad, M., Pettersson, A., Gunnarsson, L., Bengtsson, A.A., Geborek, P., Nilsson, L., Segelmark, M., Hellmark, T. (2012). Decreased neutrophil apoptosis in quiescent ANCA-associated systemic vasculitis. *PLoS ONE*. **7**, e32439.
- Afonso, P.V., Janka-Junttila, M., Lee, Y.J., McCann, C.P., Oliver, C.M., Aamer, K.A., Losert, W., Cicerone, M.T., Parent, C.A. (2012). LTB4 is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. *Dev Cell*. **12**, 1079-1091.
- Ahluwalia, A., Tarnawski, A.S. (2012). Critical role of hypoxia sensor-HIF-1alpha in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem*. **19**, 90-97.
- Albrechtsen, M., Yeaman, G.R., Kerr, M.A. (1988). Characterization of the IgA receptor from human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, **64**, 201-205.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. **30**, 459-489.
- Amulic, B., Hayes, G. (2011b). Neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*. **21**, R297-298.
- Anand, R. J., Gribar, S. C., Li, J., Kohler, J.W., Branca, M.F., Dubowski, T., Sodhi, C.P., Hackam, D.J. (2007). Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. *J Leukoc Biol*. **82**, 1257-1265.
- Andersen, S., Donnem, T., Stenvold, H., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Busund, L.T., Bremnes R.M. (2011). Overexpression of the HIF hydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 and FIH are individually and collectively unfavorable prognosticators for NSCLC survival. *PLoS One*. **6**, e23847.
- Antohe, F. (2006). Endothelial cells and macrophages, partners in atherosclerotic plaque progression. *Arch Physiol Biochem*. **112**, 245-253.
- Aomatsu, K., Kato, T., Fujita, H., Hato, F., Oshitani, N., Kamata, N., Tamura, T., Arakawa, T., Kitagawa, S. (2008). Toll-like receptor agonists stimulate human neutrophil migration via activation of mitogen-activated protein kinases. *Immunology*. **123**, 171-180.
- Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. **279**, 38458-38465.
- Augstein, A., Poitz, D.M., Braun-Dullaeus, R.C., Strasser, R.H., Schmeisser, A. (2011). Cell-specific and hypoxia-dependent regulation of human HIF-3alpha: inhibition of the expression of HIF target genes in vascular cells. *Cell Mol Life Sci*. **68**, 2627-2642.
- Babior, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*. **397**, 342-344.
- Baggiolini, M., Loetscher, P., Moser, B. (1995). Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol*. **17**, 103-108.

- Baggiolini, M., Boulay, F., Badwey, J.A., Curnutte, J.T. (1993). Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J.* **7**, 1004-1010.
- Battaglia, F., Delfino, S., Merello, E., Puppo, M., Piva, R., Varesio, L., Bosco, M.C. (2008). Hypoxia transcriptionally induces macrophage-inflammatory protein-3alpha/CCL-20 in primary human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-kappaB. *J Leukoc Biol.* **83**, 648-662.
- Baugh, J.A., Gantier, M., Li, L., Byrne, A., Buckley, A., Donnelly, S.C. (2006). Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **347**, 895-903.
- Bazzoni, F., Cassatella, M.A., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B., Baggiolini, M. (1991). Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med.* **173**, 771-774.
- Beasley, N. J., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G.J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S., Harris, A.L. (2002). Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res.* **62**, 2493-2497.
- Beitner-Johnson, D., Rust, R.T., Hsieh, T., Millhorn, D.E. (2000). Regulation of CREB by moderate hypoxia in PC12 cells. *Adv Exp Med Biol.* **475**, 143-152.
- Belaiba, R.S., Bonello, S., Zahringer, C., Schmidt, S., Hess, J., Kietzmann, T., Gorlach, A. (2007). Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* **18**, 4691-4697.
- Berta, M.A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., Brahimi-Horn, M.C. (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **360**, 646-652.
- Bickel, M. (1993). The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol.* **64**, 456-460.
- Bilton, R., Trottier, E., Pouyssegur, J., Brahimi-Horn, M.C. (2006). ARDent about acetylation and deacetylation in hypoxia signalling. *Trends Cell Biol.* **16**, 616-621.
- Blengio, F., Raggi, F., Picrobon, D., Cappello, P., Eva, A., Giovarelli, M., Varesio, L., Bosco, M.C. (2013). The hypoxic environment reprograms the cytokine/chemokine expression profile of human mature dendritic cells. *Immunobiology.* **218**, 76-89.
- Blouin, C.C., Page, F. L., Soucy, G. M., Richard, D.E. (2004). Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages : implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood.* **103**, 1124-1130.
- Bodin, S., Welch, M.D. (2005). Plasma membrane organization is essential for balancing competing pseudopod- and uropod-promoting signals during neutrophil polarization and migration. *Mol Biol Cell.* **16**, 5773-5783.
- Borish, L.C., Steinke, J.W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* **111**, S460-475.
- Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. (2010). *Immunity.* **33** : 657-670.

- Borregaard, N., Theilgaard-Monch, K., Sorensen, O.E., Cowland, J.B. (2001). Regulation of human neutrophil granule protein expression. *Curr Opin Hematol.* **8**, 23-27.
- Borregaard, N., Cowland, J.B. (1997). Granules of the neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* **89**, 3503-3521.
- Borregaard, N., Herlin, T. (1982). Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest.* **70**, 550-557.
- Bosco, M.C., Varesio, L. (2012). Dendritic cell reprogramming by the hypoxic environment. *Immunobiology.* **70**, 550-557.
- Bosco, M.C., Pierobon, D., Blengio, F., Raggi, F., Vanni, C., Gattorno, M., Eva, A., Novelli, F., Cappello, P., Giovarelli, M., Varesio, L. (2011). Hypoxia modulates the gene expression profile of immunoregulatory receptors in human mature dendritic cells: identification of TREM-1 as a novel hypoxic marker in vitro and in vivo. *Blood.* **117**, 2625-2639.
- Bosco, M.C., Delfino, S., Ferlito, F., Battaglia, F., Puppo, M., Gregorio, A., Gambini, C., Gattorno, M., Martini, A., Varesio, L. (2008a). Hypoxic synovial environment and expression of macrophage inflammatory protein 3gamma/CCL20 in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 1833-1838.
- Bosco, M.C., Puppo, M., Blengio, F., Fraonc, T., Cappello, P., Giovarelli, M., Varesio, L. (2008b). Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology.* **213**, 733-749.
- Bovolenta, C., Gasperini, S., Cassatella, M.A. (1996). Granulocyte colony-stimulating factor induces the binding of STAT1 and STAT3 to the IFNgamma response region within the promoter of the Fc(gamma)RI/CD64 gene in human neutrophils. *FEBS Lett.* **386**, 239-242.
- Bracken, C.P., Fedele, A.O., Linke, S., Balrak, W., Lisy, K., Whitelaw, M.L., Pect, D.J. (2006). Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J Biol Chem.* **281**, 22575-22585.
- Bratton, D.L., Henson, P.M. (2011). Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* **32**, 350-357.
- Brizzi, M.F., Aronica, M.G., Rosso, A., Bagnara, G.P., Yarden, Y., Pegoraro, L. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* **16**, 3562-3567.
- Brooks, A.C., Menzies-Gow, N., Bailey, S.R., Cunningham, F.M., Elliott, J. (2010). Endotoxin-induced HIF-1alpha stabilisation in equine endothelial cells: synergistic action with hypoxia. *Inflamm Res.* **59**, 689-698.

- Brown, K.D., Claudio, E., Siebenlist, U. (2008). The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* **10**, 212.
- Browning, D.D., Diehl, W.C., Hsu, M.H., Schraufstatter, I.U., Ye, R.D. (2000). Autocrine regulation of interleukin-8 production in human monocytes. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, L1129-1136.
- Broxmeyer, H.E., Sherry, B., Lu, L., Cooper, S., Carow, C., Wolpe, S.D., Cerami, A. (1989). Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory proteins 1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor cells. *J Exp Med.* **170**, 1583-1594.
- Brühl, H., Cohen, C.D., Linder, S., Kretzler, M., Schlöndorff, D., Mack, M. (2003). Post-translational and cell type-specific regulation of CXCR4 expression by cytokines. *Eur J Immunol.* **33**, 3028-3037.
- Carpagnano, G.E., Palladino, G.P., Lacedonia, D., Koutelou, A., Orlando, S., Foschino-Barbaro, M.P. (2011). Neutrophilic airways inflammation in lung cancer: the role of exhaled LTB-4 and IL-8. *BMC Cancer.* **11**, 226.
- Cartee, T.V., White, K.J., Newton-West, M., Swerlick, R.A. (2012). Hypoxia and hypoxia mimetics inhibit TNF-dependent VCAM1 induction in the 5A32 endothelial cell line via a hypoxia inducible factor dependent mechanism. *J Dermatol Sci.* **65**, 86-94.
- Carver, D.J., Gaston, B., Deronde, K., Palmer, L.A. (2007). Akt-mediated activation of HIF-1 in pulmonary vascular endothelial cells by S-nitrosoglutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **37**, 255-263.
- Cascao, R., Rosario, H.S., Souto-Carneiro, M.M., Fonseca, J.E. (2010). Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev.* **9**, 531-535.
- Cascio, S., D'Andrea, A., Ferla, R., Surmacz, E., Gulotta, E., Amodeo, V., Bazan, V., Gebbia, N., Russo, A. (2010). miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol.* **224**, 242-249.
- Cassatella, M.A., Locati, M., Mantovani, A. (2009). Never underestimate the power of a neutrophil. *Immunity.* **31**, 698-700.
- Cassatella, M.A., Gasperini, S., Bovolenta, C., Calzetti, F., Vollebregt, M., Scapini, P., Marchi, M., Suzuki, R., Suzuki, A., Yoshimura, A. (1999). Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood.* **94**, 2880-2889.
- Cassatella, M.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bertagnin, A., Luster, A.D., McDonald, P.P. (1997). Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur J Immunol.* **27**, 111-115.
- Cassatella, M.A. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* **16**, 21-26.

- Cassatella, M.A., Gasperini, S., Calzetti, F., McDonald, P.P., Trinchieri, G. (1995). Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon-gamma. *Biochem J.* **310**, 751-755.
- Cassatella, M.A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M., Constantin, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med.* **178**, 2207-2211.
- Chae, K.S., Kang, M.J., Lee, J.H., Ryu, B.K., Lee, M.G., Her, N.G., Ha, T.K., Han, J., Kim, Y.K., Chi, S.G. (2011). Opposite functions of HIF-alpha isoforms in VEGF induction by TGF-beta1 under non-hypoxic conditions. *Oncogene.* **30**, 1213-1228.
- Chandel, N.S., Trzyna, W.C., McClintock, D.S., Schumacker, P.T. (2000). Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol.* **15**, 1013-1021.
- Chen, K., Rajewsky, N. (2006). Deep conservation of microRNA-target relationships and 3'UTR motifs in vertebrates, flies, and nematodes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **71**, 149-56.
- Chen, H.M., Zhang, P., Voso, M.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Glass, C.K., Zhang, D.E., Tenen, D.G. (1995). Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood.* **85**, 2918-2928.
- Chilov, D., Camenisch, G., Kvietikova, I., Ziegler, U., Gassmann, M., Wenger, R.H. (1999). Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha. *J Cell Sci.* **112**, 1203-1212.
- Chiurchiu, V., Maccarrone, M. (2011). Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* **15**, 2605-2641.
- Cho, H., Ahn, D.R., Park, H., Yang, E.G. (2007). Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha. *FEBS Lett.* **581**, 1542-1548.
- Choi, J.C., Jung, J.W., Kwak, H.W., Song, J.H., Jeon, E.J., Shin, J.W., Park, I.W., Choi, B.W., Kim, J.Y. (2008). Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) augments acute lung injury via its neutrophil priming effects. *J Korean Med Sci.* **23**, 288-295.
- Cicchetti, G., Allen, P.G., Glogauer, M. (2002). Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med.* **13**, 220-228.
- Cloutier, A., Guindi, C., Larivee, P., Dubois, C.M., Amrani, A., McDonald, P.P. (2009). Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors. *J Immunol.* **182**, 563-571.

- Cloutier, A., Ear, T., Blais-Charron, E., Dubois, C.M., McDonald, P.P. (2007). Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils. *J Leukoc Biol.* **81**, 567-577.
- Cloutier, A., Ear, T., Borissevitch, O., Larivee, P., McDonald, P.P. (2003a). Inflammatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 signaling cascade in human neutrophils. *J Immunol.* **171**, 3751-3761.
- Cloutier, A., McDonald, P.P. (2003b). Transcription factor activation in human neutrophils. *Chem Immunol Allergy.* **83**, 1-23.
- Coëffier, E., Joseph, D., Vargaftig, B.B. (1994). Role of interleukin-5 in enhanced migration of eosinophils from airways of immunized guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* **113**, 749-756.
- Cole, K.E., Strick, C.A., Paradis, T.J., Ogborne, K.T., Loetscher, M., Gladue, R.P., Lin, W., Boyd, J.G., Moser, B., Wood, D.E., Sahagan, B.G., Neote, K. (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med.* **187**, 2009-2021.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoct, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., Van Veldhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D., Carmeliet, P. (2002). Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med.* **8**, 702-710.
- Couture, P., Paradis-Massie, J., Oualha, N., Thibault, G. (2009). Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts. *Exp Cell Res.* **315** : 2192-2206.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.F., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G.S., Gerber, H.P., Ferrara, N., Johnson, R.S. (2003). HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell.* **112**, 645-657.
- Crosby, M.E., Kulshreshtha, R., Ivan, M., Glazer, P.M. (2009). MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer Res.* **69**, 1221-1229.
- Culver, C., Sundqvist, A., Mudie, S., Melvin, A., Xirodimas, D., Rocha, S. (2010). Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* **30**, 4901-4921.
- Dana, N., Todd, R.F. 3rd., Pitt, J., Springer, T.A., Arnaout, M.A. (1984). Deficiency of a surface membrane glycoprotein (Mo1) in man. *J Clin Invest.* **73**, 153-159
- Dale, D.C., Boxer, L., Liles, C.D. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* **112**, 935-945.
- Dalmay, T., Edwards, D.R. (2006). MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene.* **25**, 6170-6175.
- Day, R.B., Link, D.C. (2011). Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci.* **69**, 1415-1423.

- De Oliveira, S., Reyes-Aldasoro, C.C., Candel, S., Renshaw, S.A., Mulero, V., Calado, A. (2013). Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol.* **190**, 4349-4359.
- Degrossoli, A., Giorgio, S. (2007). Functional alterations in macrophages after hypoxia selection. *Exp Biol Med.* **232**, 88-95.
- Demaria, M., Misale, S., Giorgi, C., Miano, V., Camporeale, A., Campisi, J., Pinton, P., Poli, V. (2012). STAT3 can serve as a hit in the process of malignant transformation of primary cells. *Cell Death Differ.* **19**, 1390-1397.
- Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S.G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E., Hartmann, E., Kohler, M. (2008). Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta.* **1783**, 394-404.
- Derouet, M., Thomas, L., Cross, A., Moots, R.J., Edwards, S.W. (2004). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem.* **279**, 26915-26921.
- Déry, M.A., Michaud, M.D., Richard, D.E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* **37**, 535-540.
- Dimova, E.Y., Jakubowska, M.M., Kietzmann, T. (2007). CREB binding to the hypoxia-inducible factor-1 responsive elements in the plasminogen activator inhibitor-1 promoter mediates the glucagon effect. *Thromb Haemost.* **98**, 296-303.
- Dong, F., Khalil, M., Kiedrowski, M., O'Connor, C., Petrovic, E., Zhou, X., Penn, M.S. (2010). Critical role for leukocyte hypoxia inducible factor-1alpha expression in post-myocardial infarction left ventricular remodeling. *Circ Res.* **106**, 601-610.
- Dumitru, C.A., Fechner, M.K., Hoffmann, T.K., Lang, S., Brandau, S. (2012). A novel p38-MAPK signaling axis modulates neutrophil biology in head and neck cancer. *J Leukoc Biol.* **91**, 591-8.
- Ear, T., Fortin, C.F., Simard, F.A., McDonald, P.P. (2010). Constitutive association of TGF-beta-activated kinase 1 with the I kappa B kinase complex in the nucleus and cytoplasm of human neutrophils and its impact on downstream processes. *J Immunol.* **184**, 3897-3906.
- Ear, T., McDonald, P.P. (2008). Cytokine generation, promoter activation, and oxidant-independent NF-kappaB activation in a transfectable human neutrophilic cellular model. *BMC Immunol.* **11**, 9-14.
- Ear, T., Cloutier, A., McDonald, P.P. (2005). Constitutive nuclear expression of the I kappa B kinase complex and its activation in human neutrophils. *J Immunol.* **175**, 1834-1842.
- El Guerrab, A., Zegrou, R., Nemlin, C.C., Vigier, F., Cayre, A., Penault-Llorca, F., Rossignol, F., Bignon, Y.J. (2011). Differential impact of EGFR-targeted therapies on hypoxia responses: implications for treatment sensitivity in triple-negative metastatic breast cancer. *PLoS ONE.* **6**, e25080.

- Elbarghati, L., Murdoch, C., Lewis, C.E. (2008). Effects of hypoxia on transcription factor expression in human monocytes and macrophages. *Immunobiology*. **213**, 899-908.
- Elks, P. M., Van Eeden, F.J., Dixon, G., Wang, X., Reyes-Aldasoro, C.C., Ingham, P.W., Whyte, M.K., Walmsley, S.R., Renshaw, S.A. (2011). Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha (Hif-1alpha) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood*. **118**, 712-722.
- Elvidge, G.P., Glenny, L., Appelhoff, R.J., Ratcliffe, P.J., Ragoussis, J., Gleadle, J.M. (2006). Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways. *J Biological Chem*. **281**, 15215-15226.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. **107**, 43-54.
- Erbel, P.J., Card, P.B., Karakuzu, O., Bruick, R.K., Gardner, K.H. (2003). Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix--loop--helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 15504-15509.
- Esche, C., Stellato, C., Beck, L.A. (2005). Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*. **125**, 615-628.
- Eubank, T.D., Roda, J.M., Liu, H., O'Neil, T., Marsh, C.B. (2011). Opposing roles for HIF-1alpha and HIF-2alpha in the regulation of angiogenesis by mononuclear phagocytes. *Blood*. **117**, 323-332.
- Eyles, J.L., Hickey, M.J., Norman, M.U., Croker, B.A., Roberts, A.W., Drake, S.F., James, W.G., Metcalf, D., Campbell, I.K., Wicks, I.P. (2008). A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood*. **112**, 5193-5201.
- Falgarone, G., Jaen, O., Boissier, M.C. (2005). Role for innate immunity in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. **72**, 17-25.
- Fang, H.Y., Hughes, R., Murdoch, C., Coffelt, S. B., Biswas, S.K., Harris, A.L., Johnson, R.S., Imityaz, H.Z., Simon, M.C., Fredlund, E., Greten, F.R., Rius, J., Lewis, C.E. (2009). Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood*. **114**, 844-859.
- Farber, J.M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol*. **61**, 246-257.
- Faurschou, M., Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. **5**, 1317-1327.

- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G., Semenza, G.L. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* **59**, 3915-3918.
- Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G.P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med.* **42**, 153-164.
- Fitzpatrick, S.F., Tambuwala, M.M., Bruning, U., Schaible, B., Scholz, C.C., Byrne, A., O'Connor, A., Gallagher, W.M., Lenihan, C.R., Garvey, J.F., Howell, K., Fallon, P. G., Cummins, E.P., Taylor, C.T. (2011). An intact canonical NF-kappaB pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia. *J Immunol.* **186**, 1091-1096.
- Flamant, L., Toffoli, S., Raes, M., Michiels, C. (2009). Hypoxia regulates inflammatory gene expression in endothelial cells. *Exp Cell Res.* **315**, 733-747.
- Fleit, H.B., Wright, S.D., Unkeless, J.C. (1982). Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**, 3275-3279.
- Florczyk, U., Czauderna, S., Stachurska, A., Tertilt, M., Nowak, W., Kozakowska, M., Poellinger, L., Jozkowicz, A., Loboda, A., Dulak, J. (2011). Opposite effects of HIF-1alpha and HIF-2alpha on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* **51**, 1882-1892.
- Flugel, D., Gorlach, A., Michiels, C., Kietzmann, T. (2007). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol.* **27**, 3253-3265.
- Fong, C.C., Zhang, Q., Shi, Y.F., Wu, R.S., Fong, W.F., Yang, M. (2007). Effect of hypoxia on RAW264.7 macrophages apoptosis and signaling. *Toxicology.* **235**, 52-61.
- Forristal, C.E., Wright, K.L., Hanley, N.A., Oreffo, R.O., Houghton, F.D. (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction.* **139**, 85-97.
- Fortin, C.F., Mayer, T.Z., Cloutier, A., McDonald, P.P. (2013). Translational control of human neutrophil responses by MNK1. *J Leukoc Biol.* JLB.0113012.
- Fortin, C.F., Cloutier, A., Ear, T., Sylvain-Prevost, S., Mayer, T.Z., Bouchelaghem, R., McDonald, P.P. (2011a). A class IA PI3K controls inflammatory cytokine production in human neutrophils. *Eur J Immunol.* **41**, 1709-1719.
- Fortin, C.F., Ear, T., McDonald, P.P. (2009). Autocrine role of endogenous interleukin-18 on inflammatory cytokine generation by human neutrophils. *FASEB J.* **23**, 194-203.
- Freedman, S.J., Sun, Z.Y., Kung, A.L., France, D.S., Wagner, G., Eck, M.J. (2003). Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by CITED2. *Nat Struct Biol.* **10**, 504-512.
- Friedman, A.D. (2002). Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene.* **21**, 3377-3390.

- Fukushima, K., Ishiguro, A., Shimbo, T. (1995). Transient elevation of granulocyte colony-stimulating factor levels in cerebrospinal fluid at the initial stage of aseptic meningitis in children. *Pediatr Res.* **37**, 160-164.
- Fukuzono, S., Kato, T., Fujita, H., Watanabe, N., Kitagawa, S. (2010). Granulocyte colony-stimulating factor negatively regulates Toll-like receptor agonist-induced cytokine production in human neutrophils. *Arch Biochem Biophys.* **495**, 144-151.
- Furze, R.C., Rankin, S.M. (2008). Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology.* **125**, 281-288.
- Fuxman Bass, J.I., Alvarez, M.E., Gabelloni, M.L., Vermeulen, M.E., Amaral, M.M., Geffner, J.R., Trevani, A.S. (2008). GM-CSF enhances a CpG-independent pathway of neutrophil activation triggered by bacterial DNA. *Mol Immunol.* **46**, 37-44.
- Gale, D.P., Maxwell, P.H. (2010). The role of HIF in immunity. *Int J Biochem Cell Biol.* **42**, 486-494.
- Gane, J., Stockley, R. (2011). Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD. *Thorax.* **67**, 553-561.
- Gangavarapu, P., Rajagopalan, L., Kolli, D., Guerrero-Plata, A., Garofalo, R.P., Rajarathnam, K. (2012). The monomer-dimer equilibrium and glycosaminoglycan interactions of chemokine CXCL8 regulate tissue-specific neutrophil recruitment. *J Leucoc Biol.* **91**, 259-265.
- Gately, M.K., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Chizzonite, R. (1992). Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol.* **143**, 127-142.
- Goldsby, R., Kindt, T.J., Osborne, B.A. (2001). *Immunologie.* 4e ed. Paris: Dunod, 688.
- Ghosh, S. (1999). Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunol Res.* **19**, 183-189.
- Ghosh S, Karin M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* **109**, Suppl:S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* **16**, 225-260.
- Gomez-Cambronero, J., Horn, J., Paul, C.C., Baumann, M.A. (2003). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J Immunol.* **171**, 6846-6855.
- Gonsalves, C., Kalra, V.K. (2010). Endothelin-1-induced macrophage inflammatory protein-1beta expression in monocytic cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and AP-1 and is negatively regulated by microRNA-195. *J Immunol.* **185**, 6253-6264.
- Gounni, A.S., Lamkhioued, B., Koussith, L., Ra, C., Renzi, P.M. (2001). Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI) : rôle in asthma. *FASEBJ.* **15**, 940-949.
- Gorlach, A. (2009). Regulation of HIF-1alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des.* **15**, 3844-3852.

- Gorospe, M., Tominaga, K., Wu, X., Fahling, M., Ivan, M. (2011). Post-Transcriptional Control of the Hypoxic Response by RNA-Binding Proteins and MicroRNAs. *Front Mol Neurosci.* **4**, 7.
- Gradin, K., Takasaki, C., Fujii-Kuriyama, Y., Sogawa K. (2002). The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem.* **277**, 23508-23514.
- Graham, G.J., Wright, E.G., Hewick, R., Wolpe, S.D., Wilkie, N.M., Donaldson, D., Lorimore, S., Pragnell I.B. (1990). Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature.* **29**, 442-444.
- Gray, M.J., Zhang, J., Ellis, L.M., Semenza, G.L., Evans, D.B., Watowich, S.S., Gallick, G.E. (2005). HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene.* **24**, 3110-3120.
- Groenman, F.A., Rutter, M., Wang, J., Caniggia, I., Tibboel, D., Post, M. (2007). Effect of chemical stabilizers of hypoxia-inducible factors on early lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **293**, L557-567.
- Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., Bradfield, C.A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr.* **7**, 205-213.
- Haddad, J.J. (2002). Recombinant human interleukin (IL)-1 beta-mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism. *Eur Cytokine Netw.* **13**, 250-260.
- Haddad, J.J., Land, S.C. (2001). A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS Lett.* **505**, 269-274.
- Hamilton, T., Li, X., Novotny, M., Pavicic, P.G.Jr., Datta, S., Zhao, C., Hartupee, J., Sun, D. (2012). Cell type- and stimulus-specific mechanisms for post-transcriptional control of neutrophil chemokine gene expression. *J Leukoc Biol.* **91**, 377-383.
- Hamilton, T., Novotny, M., Pavicic, P.J.Jr., Herjan, T., Hartupee, J., Sun, D., Zhao, C., Datta, S. (2010). Diversity in post-transcriptional control of neutrophil chemoattractant cytokine gene expression. *Cytokine.* **52**, 116-122.
- Hangai-Hoger, N., Tsai, A.G., Cabrales, P., Intaglietta, M. (2007). Terminal lymphatics: the potential "lethal corner" in the distribution of tissue pO₂. *Lymphat Res Biol.* **5**, 159-168.
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., Imura, N. (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α . *Biochem Biophys Res Commun.* **287**, 808-813.
- Hatfield, K.J., Bedringsaas, S.L., Rynningen, A., Gjertsen, B.T., Bruserud, O. (2010). Hypoxia increases HIF-1 α expression and constitutive cytokine release by primary human acute myeloid leukaemia cells. *Eur Cytokine Netw.* **21**, 154-164.

- Hattar, K., Grandel, U., Moeller, A., Fink, L., Iglhaut, J., Hartung, T., Morath, S., Seeger, W., Grimminger, F., Sibelius, U. (2006). Lipoteichoic acid (LTA) from *Staphylococcus aureus* stimulates human neutrophil cytokine release by a CD14-dependent, Toll-like-receptor-independent mechanism: Autocrine role of tumor necrosis factor-[alpha] in mediating LTA-induced interleukin-8 generation. *Crit Care Med.* **34**, 835-841.
- He, J.Q., Shumansky, K., Connett, J.E., Anthonisen, N.R., Pare, P.D., Sandford, A.J. (2008). Association of genetic variations in the CSF2 and CSF3 genes with lung function in smoking-induced COPD. *Eur Respir J.* **32**, 25-34.
- Heidbreder, M., Qadri, F., Jöhren, O., Dendorfer, A., Depping, R., Fröhlich, F., Wagner, K. F., Dominiak, P. (2007). Non-hypoxic induction of HIF-3alpha by 2-deoxy-D-glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun.* **352**, 437-443.
- Heikkilä, M., Pasanen, A., Kivirikko, K. I., Myllyharju, J. (2011). Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci.* **68**, 3885-3901.
- Hellwig-Burgel, T., Stiehl, D.P., Wagner, A.E., Metzen, E.J, Elkmann, W. (2005). Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res.* **25**, 297-310.
- Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Elkins, J.M., Schofield, C.J. (2003). The role of iron and 2-oxoglutarate oxygenases in signalling. *Biochem Soc Trans.* **31**, 510-515.
- Hickstein, D.D., Ozols, J., Williams, S.A., Baenziger, J.U., Locksley, R.M. (1987). Isolation and characterization of the receptor on human neutrophils that mediates cellular adherence. *J Biol Chem.* **262**, 5576-5580.
- Hirani, N., Antonicelli, F., Strieter, R.M., Wiesener, M.S., Ratcliffe, P.J., Haslett, C., Donnelly, S.C. (2001). The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages--a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Mol Med.* **7**, 685-697.
- Hirata, M., Kugimiya, F., Fukai, A., Saito, T., Yano, F., Ikeda, T., Mabuchi, A., Sapkota, B.R., Akunc, T., Nishida, N., Yoshimura, N., Nakagawa, T., Tokunaga, K., Nakamura, K., Chung, U.I., Kawaguchi, H. (2012). C/EBPbeta and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2alpha as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet.* **21**, 1111-1123.
- Hirota, K., Semenza, G.L. (2005). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun.* **338**, 610-616.
- Hirsila, M., Koivunen, P., Gunzler, V., Kivirikko, K. I., Myllyharju, J. (2003). Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* **278**, 30772-30780.
- Hockel, M., Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* **93**, 266-276.

- Högel, H., Rantanen, K., Jokilehto, T., Grenman, R., Jaakkola, P.M. (2011). Prolyl hydroxylase PHD3 enhances the hypoxic survival and G1 to S transition of carcinoma cells. *PLoS One*. **6**(11):e27112.
- Holland, S.M. (2010). Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. **38**, 3-10.
- Holmquist, L., Jögi, A., Pählman, S. (2005). Phenotypic persistence after reoxygenation of hypoxic neuroblastoma cells. *Int J Cancer*. **116**, 218-225.
- Hong, Y., Eleftheriou, D., Hussain, A.A., Price-Kuehne, F.E., Savage, C.O., Jayne, D., Little, M.A., Salama, A.D., Klein, N.J., Brogan, P.A. (2012). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *J Am Soc Nephrol*. **23**, 49-62.
- Huang, C., Han, Y., Wang, Y., Sun, X., Yan, S., Yeh, E.T., Chen, Y., Cang, H., Li, H., Shi, G., Cheng, J., Tang, X., Yi, J. (2009). SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J*. **28**, 2748-2762.
- Huang, K.T., Dobrovic, A., Fox, S.B. (2010). No evidence for DNA methylation of von Hippel-Lindau ubiquitin ligase complex genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. **124**, 853-856.
- Hur, E., Chang, K.Y., Lee, E., Lee, S.K., Park, H. (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Pharmacol*. **59**, 1216-24.
- Ihle, J.N., Nosaka, T., Thierfelder, W., Quelle, F.W., Shimoda, K. (1997). Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells*. **Suppl 1**:105-11.
- Ikejiri, A., Nagai, S., Goda, N., Kurebayashi, Y., Osada-Oka, M., Takubo, K., Suda, T., Koyasu, S. (2012). Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations. *Int Immunol*. **24**, 137-146.
- Imtiyaz, H.Z., Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*. **345**, 105-120.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P.J. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. **292**, 468-472.
- Jablonska, E., Jablonski, J. (2002). Effect of IL-18 on the release of IL-6 and its soluble receptors: sIL-6Ralpha and sgp130 by human neutrophils. *Immunol Invest*. **31**, 159-167.
- Jantsch, J., Chakravorty, D., Turza, N., Prechtel, A.T., Buchholz, B., Gerlach, R.G., Volke, M., Glasner, J., Warnecke, C., Wiesener, M.S., Eckardt, K.U., Steinkasserer, A., Hensel, M., Willam, C. (2008). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol*. **180**, 4697-4705.
- Jeong, H.J., Chung, H.S., Lee, B.R., Kim, S.J., Yoo, S.J., Hong, S.H., Kim, H.M. (2003). Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1alpha and NF-kappaB activation

- on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **306**, 805-811.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., Kim, K.W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* **111**, 709-720.
- Ji, Y.Q., Zhang, Y.Q., Li, M.Q., Du, M.R., Wei, W.W., Li da, J. (2011). EPO improves the proliferation and inhibits apoptosis of trophoblast and decidual stromal cells through activating STAT-5 and inactivating p38 signal in human early pregnancy. *Int J Clin Exp Pathol.* **4**, 765-774.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., Semenza, G.L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* **271**, 17771-17778.
- Jokilehto, T., Rantanen, K., Luukkaa, M., Heikkinen, P., Grenman, R., Minn, H., Kronqvist, P., Jaakkola, P.M. (2006). Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res.* **12**, 1080-1087.
- Joung, Y.H., Park, J.H., Park, T., Lee, C.S., Kim, O.H., Ye, S.K., Yang, U.M., Lee, K. J., Yang, Y.M. (2003). Hypoxia activates signal transducers and activators of transcription 5 (STAT5) and increases its binding activity to the GAS element in mammary epithelial cells. *Exp Mol Med.* **35**, 350-357.
- Jozsef, L., Khreiss, T., El Kebir, D., Filep, J.G. (2006). Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *J Immunol.* **176**, 1195-1202.
- Juncos, L.A., Ren, Y., Arima, S., Ito, S. (1992). Vasodilator and constrictor actions of Platelet-activating Factor in the isolated microperfused afferent arteriole of the rabbit kidney. *J Clin Invest.* **91**, 1374-1379.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* **274**, 6519-6525.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells : inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J.* **17**, 6573-6586.
- Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 5667-5672.
- Kang, X., Li, J., Zou, Y., Yi, J., Zhang, H., Cao, M., Yeh, E.T., Cheng, J. (2010). PIASy stimulates HIF1 α SUMOylation and negatively regulates HIF1 α activity in response to hypoxia. *Oncogene.* **29**, 5568-5578.

- Kaplan, M.J. (2011). Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol.* **7**, 691-699.
- Karhausen, J., Haase, V.H., Colgan, S.P. (2005). Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. *Cell Cycle.* **4**, 256-258.
- Karin, M., Liu, Zg., Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* **9**, 240-246.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Burdick, M.D., Kunkel, S.L. (1994). Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol.* **152**, 3559-3569.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Kunkel, S.L. (1993). Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med.* **178**, 63-72.
- Katayama, Y., Hidalgo, A., Chang, J., Peired, A., Frenette, P.S. (2005). CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med.* **201**, 1183-1189.
- Katschinski, D.M., Le, L., Schindler, S.G., Thomas, T., Voss, A.K., Wenger, R.H. (2004). Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Cell Physiol Biochem.* **14**, 351-360.
- Kawaguchi, H., Yasuda, H. (1986). Platelet-activating factor stimulates prostaglandin synthesis in cultured cells. *Hypertension.* **8**, 192-197.
- Kawai, T., Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-Like Receptors. *Curr Opin Immunol.* **17**, 338-344.
- Kenneth, N.S., Rocha, S. (2008). Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem J.* **414**, 19-29.
- Kewley, R.J., Whitelaw, M.L. (2005). Phosphorylation inhibits DNA-binding of alternatively spliced aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Biochem Biophys Res Commun.* **338**, 660-667.
- Khaled, A.R., Durum, S.K. (2002). The role of cytokines in lymphocyte homeostasis. *Biotechniques.* **Oct;Suppl**, 40-45.
- Khandrika, L., Lieberman, R., Koul, S., Kumar, B., Maroni, P., Chandhoke, R., Meacham, R.B., Koul, H.K. (2009). Hypoxia-associated p38 mitogen-activated protein kinase-mediated androgen receptor activation and increased HIF-1alpha levels contribute to emergence of an aggressive phenotype in prostate cancer. *Oncogene.* **28**, 1248-1260.
- Kiefer, K., Oropallo, M.A., Cancro, M.P., Marshak-Rothstein, A. (2012). Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. *Immunol Cell Biol.* **90**, 498-504.
- Kim, H.Y., Kim, Y.H., Nam, B.H., Kong, H.J., Kim, H.H., Kim, Y.J., An, W.G., Cheong, J. (2007). HIF-1alpha expression in response to lipopolysaccharide mediates induction of hepatic inflammatory cytokine TNFalpha. *Exp Cell Res.* **313**, 1866-1876.
- Kim, K.S., Rajagopal, V., Gonsalves, C., Johnson, C., Kalra, V.K. (2006). A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *J Immunol.* **177**, 7211-7224.

- Kim, S.Y., Jeong, E., Joung, S.M., Lee, J.Y. (2012). PI3K/Akt contributes to increased expression of Toll-like receptor 4 in macrophages exposed to hypoxic stress. *Biochem Biophys Res Commun.* **419**, 466-471.
- Kim, S.Y., Choi, Y.J., Joung, S.M., Lee, B.H., Jung, Y.S., Lee, J.Y. (2010). Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology.* **129**, 516-524.
- Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 376-385.
- Knight, J.S., Kaplan, M.J. (2012). Lupus neutrophils: 'NET' gain in understanding lupus pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* **24**, 441-450.
- Koga, F., Kihara, K., Neckers, L. (2009). Inhibition of cancer invasion and metastasis by targeting the molecular chaperone heat-shock protein 90. *Anticancer Res.* **29**, 797-807.
- Köhler, T., Reizis, B., Johnson, R.S., Weighardt, H., Förster, I. (2012). Influence of hypoxia-inducible factor 1 α on dendritic cell differentiation and migration. *Eur J Immunol.* **42**, 1226-1236.
- Kong, X., Alvarez-Castelao, B., Lin, Z., Castano, J.G., Caro, J. (2007). Constitutive/hypoxic degradation of HIF- α proteins by the proteasome is independent of von Hippel Lindau protein ubiquitylation and the transactivation activity of the protein. *J Biol Chem.* **282**, 15498-15505.
- Konisti, S., Kiriakidis, S., Paleolog, E.M. (2012). Hypoxia-a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* **8**, 153-162.
- Koumenis, C., Wouters, B.G. (2006). "Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol Cancer Res.* **4**, 423-436.
- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F.J., Davuluri, R., Liu, C.G., Croce, C.M., Negrini, M., Calin, G.A., Ivan, M. (2007). A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol.* **27**, 1859-1867.
- Kumar, V., Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol.* **10**, 1325-1334.
- Kuschel, A., Simon, P., Tug, S. (2012). Functional regulation of HIF-1 α under normoxia-- is there more than post-translational regulation? *J Cell Physiol.* **227**, 514-524.
- Kwong, C.H., Malech, H.L., Rotrosen, D., Leto, T.L. (1993). Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. *Biochemistry.* **32**, 5711-5717.
- Lacy, P. (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol.* **2**, 98-108.
- Lacy, P., Eitzen, G. (2008). Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front Biosci.* **13**, 5559-5570.

- Laderoute, K.R., Calaoagan, J.M., Knapp, M., Johnson, R.S. (2004). Glucose utilization is essential for hypoxia-inducible factor 1 alpha-dependent phosphorylation of c-Jun. *Mol Cell Biol.* **24**, 4128-4137.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- Lancaster, D.E., McNeill, L.A., McDonough, M.A., Aplin, R.T., Hewitson, K.S., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Schofield, C.J. (2004). Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FII) activity. *Biochem J.* **383**, 429-437.
- Land, S.C., Tee, A.R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem.* **282**, 20534-20543.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., Whitelaw, M.L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* **295**, 858-861.
- Lang, R. (2005). Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology.* **210**, 63-76.
- Lapouge, K., Smith, S.J., Groemping, Y., Rittinger, K. (2002). Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem.* **277**, 10121-10128.
- Lärfars, G., Lantoine, F., Devynck, M.A., Palmblad, J., Gyllenhammar, H. (1999). Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B4, C4, and D4 in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* **15**, 1399-1405.
- Larsen, H., Muz, B., Khong, T.L., Feldmann, M., Paleolog, E.M. (2012). Differential effects of Th1 versus Th2 cytokines in combination with hypoxia on HIFs and angiogenesis in RA. *Arthritis Res Ther.* **14**(4):R180.
- Laudanna, C., Constantin, G., Baron, P., Scarpini, E., Scarlato, G., Cabrini, G., Dehecchi, C., Rossi, F., Cassatella, M.A., Berton, G. (1994). Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem* **269**, 4021-4026.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., Semenza, G.L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* **21**, 3995-4004.
- Lawlor, K.E, Campbell, I.K., Metcalf, D., O'Donnell, K., van Nieuwenhuijze, A., Roberts, A.W., Wicks, I.P. (2004). Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 11398-11403.

- Lee, H.T., Chang, Y.C., Tu, Y.F., Huang, C.C. (2010). CREB activation mediates VEGF-A's protection of neurons and cerebral vascular endothelial cells. *J Neurochem.* **113**, 79-91.
- Lee, M.Y., Joung, Y.H., Lim, E.J., Park, J.H., Ye, S.K., Park, T., Zhang, Z., Park, D.K., Lee, K.J., Yang, Y.M. (2006). Phosphorylation and activation of STAT proteins by hypoxia in breast cancer cells. *Breast.* **15**, 187-195.
- Lee, V.M., Quinn, A.P., Jennings, S.C., Ng, L.L (2003). Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia. *J Hypertens.* **21**, 395-402.
- Lee, Y.M., Jeong, C.H., Koo, S.Y., Son, M.J., Song, H.S., Bae, S.K., Raleigh, J.A., Chung, H.Y., Yoo, M.A., Kim, K.W. (2001). Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn.* **220**, 175-186.
- Lefort, C.T., Ley, K. (2012). Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol.* **3**, 157.
- Lefort, C.T., Rossaint, J., Moser, M., Petrich, B.G., Zarbock, A., Monkley, S.J., Critchley, D.R., Ginsberg, M.H., Fassler, R., Ley, K. (2012). Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood.* **3**, 4275-4282.
- Lehman, J.A., Calvo, V., Gomez-Cambronero, J. (2003). Mechanism of ribosomal p70S6 kinase activation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in neutrophils: cooperation of a MEK-related, THR421/SER424 kinase and a rapamycin-sensitive, m-TOR-related THR389 kinase. *J Biol Chem.* **278**, 28130-28138.
- Leonard, M.O., Howell, K., Madden, S.F., Costello, C.M., Higgins, D.G., Taylor, C. T., McLoughlin, P. (2008). Hypoxia selectively activates the CREB family of transcription factors in the in vivo lung. *Am J Respir Crit Care Med.* **178**, 977-983.
- Lew, D.P. (1998). Neutrophils, L'inflammation. Paris : J. Libbey Eurotext, 565.
- Levine, S.L., Perdew, G.H. (2001). Aryl hydrocarbon receptor (AhR)/AhR nuclear translocator (ARNT) activity is unaltered by phosphorylation of a periodicity/ARNT/single-minded (PAS)-region serine residue. *Mol Pharmacol.* **59**, 557-566.
- Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z.N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M.W., Li, C.Y. (2007). Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell.* **26**, 63-74.
- Li, M., Riddle, S.R., Frid, M.G., El Kasmi, K.C., McKinsey, T.A., Sokol, R.J., Strassheim, D., Meyrick, B., Yeager, M.E., Flockton, A.R., McKeon, B.A., Lemon, D.D., Horn, T.R., Anwar, A., Barajas, C., Stenmark, K.R. (2011). Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension. *J Immunol.* **187**, 2711-2722.

- Li, Q.F., Wang, X.R., Yang, Y.W., Lin, H. (2006). Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1alpha. *Cell Res.* **16**, 548-558.
- Li, Z., Wang, D., Messing, E.M., Wu, G. (2005). VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha. *EMBO Rep.* **6**, 373-378.
- Liaskou, E., Wilson, D.V., Oo, Y.H. (2012). Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm.* **2012**, 949157.
- Lillard, J.W.Jr., Singh, U.P., Boyaka, P.N., Singh, S., Taub, D.D., McGhee, J.R. (2003). MIP-1alpha and MIP-1beta differentially mediate mucosal and systemic adaptive immunity. *Blood.* **101**, 807-814.
- Lim, J.H., Jung, C.R., Lee, C.H., Im, D.S. (2008). Egr-1 and serum response factor are involved in growth factors- and serum-mediated induction of E2-EPF UCP expression that regulates the VHL-HIF pathway. *J Cell Biochem.* **105**, 1117-1127.
- Lin, A.H, Morton, D.R., Gorman, R.R. (1982). Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine stimulates leukotriene B₄ synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest.* **70**, 1058-1065.
- Lin, Y.T., Wang, C.T., Gershwin, M.E., Chiang, B.L. (2011). The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev.* **10**, 482-489.
- Lindbom, L., Werr, J. (2002). Integrin-dependent neutrophil migration in extravascular tissue. *Semin Immunol.* **14**, 115-121.
- Linke, S., Stojkoski, C., Kewley, R.J., Booker, G.W., Whitelaw, M.L., Pect, D.J. (2004) Substrate requirements of the oxygen-sensing asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* **279**, 14391-14397.
- Liu, F.Q., Liu, Y., Lui, V.C., Lamb, J.R., Tam, P.K., Chen, Y. (2008). Hypoxia modulates lipopolysaccharide induced TNF-alpha expression in murine macrophages. *Exp Cell Res.* **314**, 1327-1336.
- Liu, H.S., Chen, Y.H., Hung, P.F., Kao, Y.H. (2006). Inhibitory effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on the ERK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **290**, 273-281.
- Liu, J., Li, X., Yue, Y., Li, J., He, T., He, Y. (2005). The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell Mol Immunol.* **2**, 455-460.
- Liu, S.P., Lee, S.D., Lee, H.T., Liu, D.D., Wang, H.J., Liu, R.S., Lin, S.Z., Su, C.Y., Li, H., Shyu, W.C. (2010). Granulocyte colony-stimulating factor activating HIF-1alpha acts synergistically with erythropoietin to promote tissue plasticity. *PLoS ONE.* **5**, e10093.
- Liu, Y.N., Pan, S.L., Peng, C.Y., Huang, D.Y., Guh, J.H., Chen, C.C., Shen, C.C., Teng, C.M. (2010). Moscatilin repressed lipopolysaccharide-induced HIF-1alpha accumulation and NF-kappaB activation in murine RAW264.7 cells. *Shock.* **33**, 70-75.

- Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N., Semenza, G.L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell*. **25**, 207-217.
- Loboda, A., Jozkowicz, A., Dulak, J. (2012). HIF-1 versus HIF-2-is one more important than the other? *Vascul Pharmacol*. **56**, 245-251.
- Loboda, A., Jozkowicz, A., Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cell*. **29**, 435-442.
- Lofstedt, T., Fredlund, E., Holmquist-Mengelbier, L., Pietras, A., Ovenberger, M., Poellinger, L., Pahlman, S. (2007). Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer. *Cell Cycle*. **6**, 919-926.
- Long, W.P., Chen, X., Perdew, G.H. (1999). Protein kinase C modulates aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein-mediated transactivation potential in a dimer context. *J Biol Chem*. **274**, 12391-12400.
- Lukashev, D., Caldwell, C., Ohta, A., Chen, P., Sitkovsky, M. (2001). Differential regulation of two alternatively spliced isoforms of hypoxia-inducible factor-1 alpha in activated T lymphocytes. *J Biol Chem*. **276**, 48754-48763.
- Ma, X., Chang, W., Zhang, C., Zhou, X., Yu, F. (2012). Staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa B activation in neutrophils. *PLoS ONE*. **7**, e34970.
- Macaubas, C., Nguyen, K., Milojevic, D., Park, J. L., Mellins, E.D. (2009). Oligoarticular and polyarticular JIA: epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. **5**, 616-626.
- Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., Poellinger, L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem*. **277**, 32405-32408.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. **414**, 550-554.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. **11**, 519-531.
- Mantovani, A., Savino, B., Locati, M., Zammataro, L., Allavena, P., Bonecchi, R. (2010). The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. **21**, 27-39.
- Mantovani, A. (2009). The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell*. **16**, 173-174.
- Mantovani, B. (1975). Different rôles of IgG and complément receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*, **115**, 15-17.

- Marmon, S., Cammer, M., Raine, C.S., Lisanti, M.P. (2009). Transcellular migration of neutrophils is a quantitatively significant pathway across dermal microvascular endothelial cells. *Exp Dermatol.* **18**, 88-90.
- Maroni, P., Bendinelli, P., Matteucci, E., Desiderio, M.A. (2007). HGF induces CXCR4 and CXCL12-mediated tumor invasion through Ets1 and NF-kappaB. *Carcinogenesis.* **28**, 267-279.
- Martin, W.J., Harper, J.L. (2010). Innate inflammation and resolution in acute gout. *Immunol Cell Biol.* **88**, 15-19.
- Mastrogiannaki, M., Matak, P., Keith, B., Simon, M.C., Vaulont, S., Peyssonnaud, C. (2009). HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest.* **119**, 1159-1166.
- Maxwell, P.J., Gallagher, R., Seaton, A., Wilson, C., Scullin, P., Pettigrew, J., Stratford, I. J., Williams, K.J., Johnston, P.G., Waugh, D.J. (2007). HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene.* **26**, 7333-7345.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001). Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* **11**, 293-299.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* **399**, 271-275.
- Maynard, M.A., Evans, A.J., Shi, W., Kim, W.Y., Liu, F.F., Ohh, M. (2007). Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle.* **6**, 2810-2816.
- Maynard, M.A., Evans, A.J., Hosomi, T., Hara, S., Jewett, M.A., Ohh, M. (2005). Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J.* **19**, 1396-1406.
- Maynard, M.A., Qi, H., Chung, J., Lee, E.H., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Ohh, M. (2003). Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem.* **278**, 11032-11040.
- McDonald, P.P., Bovolenta, C., Cassatella, M.A. (1998a). 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**, 13165-13173.
- McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S., Cassatella, M.A. (1998b). Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood.* **92**, 4828-4835.
- McDonald, P.P., Bald, A., Cassatella, M.A. (1997a). Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood.* **89**, 3421-3433.

- McDonald, P.P., Cassatella, M. A. (1997b). Activation of transcription factor NF-kappa B by phagocytic stimuli in human neutrophils. *FEBS Lett.* **412**, 583-586.
- Mecklenburgh, K.I., Walmsley, S.R., Cowburn, A.S., Wiesener, M., Reed, B.J., Upton, P. D., Deighton, J., Greening, A.P., Chilvers, E.R. (2002). Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood.* **100**, 3008-3016.
- Melani, C., Mattia, G.F., Silvani, A., Care, A., Rivoltini, L., Parmiani, G., Colombo, M.P. (1993). Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood.* **81**, 2744-2749.
- Melvin, A., Rocha, S. (2012). Chromatin as an oxygen sensor and active player in the hypoxia response. *Cell Signal.* **24**, 35-43.
- Meyer-Hoffert, U., Wiedow, O. (2010). Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. *Curr Opin Hematol.* **18**, 19-24.
- Micallef, M.J., Tanimoto, T., Kohno, K., Ikeda, M., Kurimoto, M. (1997). Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res.* **57**, 4557-4563.
- Min, Y., Ghose, S., Boelte, K., Li, J., Yang, L., Lin, P.C. (2011). C/EBP-delta regulates VEGF-C autocrine signaling in lymphangiogenesis and metastasis of lung cancer through HIF-1alpha. *Oncogene.* **30**, 4901-4909.
- Mo, J.H., Choi, I.J., Jeong, W.J., Jeon, E.H., Ahn, S.H. (2012). HIF-1alpha and HSP90: target molecules selected from a tumorigenic papillary thyroid carcinoma cell line. *Cancer Sci.* **103**, 464-471.
- Mollen, K.P., McCloskey, C.A., Tanaka, H., Prince, J.M., Levy, R.M., Zuckerbraun, B. S., Billiar, T.R. (2007). Hypoxia activates c-Jun N-terminal kinase via Rac1-dependent reactive oxygen species production in hepatocytes. *Shock.* **28**, 270-277.
- Montecucco, F., Steffens, S., Burger, F., Da Costa, A., Bianchi, G., Bertolotto, M., Mach, F., Dallegri, F., Ottonello, L. (2008). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cell Signal.* **20**, 557-568.
- Morimoto, D., Yoshida, D., Noha, M., Suzuki, M., Osamura, R.Y., Teramoto, A. (2006). Phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) as a marker of hypoxia in pituitary adenoma. *J Neurooncol.* **79**, 143-150.
- Moser, C., Jensen, P.O., Pressler, T., Frederiksen, B., Lanng, S., Kharazmi, A., Koch, C., Hoiby, N. (2005). Serum concentrations of GM-CSF and G-CSF correlate with the Th1/Th2 cytokine response in cystic fibrosis patients with chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* **113**, 400-409.
- Mottet, D., Ruys, S.P., Demazy, C., Raes, M., Michiels, C. (2005). Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer.* **117**, 764-774.

- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. **8**, 618-631.
- Muz, B., Khan, M.N., Kiriakidis, S., Paleolog, E.M. (2009). Hypoxia. The role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. **11**, 201.
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S., Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. **281**, 33095-33106.
- Myones, B.L., Dalzell, J.G., Hogg, N., Ross, G.D. (1988). Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J Clin Invest*. **82**, 640-651.
- Nam, Y.H., Min, D., Park, S.J., Kim, K.A., Lee, Y.A., Shin, M.H. (2011). NF-kappaB and CREB are involved in IL-8 production of human neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. *Korean J Parasitol*, **49**, 291-294.
- Nerlov, C. (2007). The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol*. **17**, 318-324.
- Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A.D., Zhang, H., Li, H.S., Watowich, S.S. (2010). STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. *Blood*. **115**, 3354-3363.
- Nishi, H., Nakada, T., Hokamura, M., Osakabe, Y., Itokazu, O., Huang, L.E., Isaka, K. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 transactivates transforming growth factor-beta3 in trophoblast. *Endocrinology*. **145**, 4113-4118.
- Nishi, K., Oda, T., Takabuchi, S., Oda, S., Fukuda, K., Adachi, T., Semenza, G.L., Shingu, K., Hirota, K. (2008). LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal*. **10**, 983-995.
- Nissim Ben Efraim, A.H., Eliashar, R., Levi-Schaffer, F. (2010). Hypoxia modulates human eosinophil function. *Clin Mol Allergy*. **19**, 8-10.
- Nizet, V., Johnson, R.S. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. **9**, 609-617.
- Nordenfelt, P., Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol*. **90**, 271-284.
- Oeckinghaus, A., Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **1**(4):a000034.
- O'Flaherty, J.T., Wykle, R.L., Thomas, M.J., McCall, C.E. (1948). Neutrophil degranulation responses to combinations of arachidonate metabolites and platelet-activating factor. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. **43**, 3-23.

- O'Reilly, S.M., Leonard, M.O., Kieran, N., Comerford, K.M., Cummins, E., Pouliot, M., Lee, S.B., Taylor, C.T. (2006). Hypoxia induces epithelial amphiregulin gene expression in a CREB-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol.* **290**, C592-600.
- O'Shea, J.J., Gadina, M., Schreiber, R.D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell.* **109** Suppl:S121-31.
- Oshima, M., Mimura, J., Sekine, H., Okawa, H., Fujii-Kuriyama, Y. (2009). *J Biol Chem.* **284**, 11017-11026.
- Oudijk, E.J., Nijhuis, E.H., Zwank, M.D., Van De Graaf, E.A., Mager, H.J., Coffey, P.J., Lammers, J.W., Koenderman, L. (2005). Systemic inflammation in COPD visualised by gene profiling in peripheral blood neutrophils. *Thorax.* **60**, 538-544.
- Palazón A, Martínez-Forero I, Teijeira A, Morales-Kastresana A, Alfaro C, Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Peñuelas I, Hervás-Stubbs S, Rouzaut A, de Landázuri MO, Jure-Kunkel M, Aragonés J, Melero I. (2012). The HIF-1 α hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB) for immunotherapy. *Cancer Discov.* **2**, 608-23.
- Palma, C., Cassone, D., Serbousek, D., Pearson, C.A., Djeu, J.Y. (1992). Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect Immun.* **60**, 4604-4611.
- Palmer, L.A., Gaston, B., Johns, R.A. (2000). Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol Pharmacol.* **58**, 1197-203.
- Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* **30**, 513-521.
- Park, S.K., Dadak, A.M., Haase, V.H., Fontana, L., Giaccia, A.J, Johnson, R.S. (2003). Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α): role of cytoplasmic trapping of HIF-2 α . *Mol Cell Biol.* **23**, 4949-4971.
- Pasanen, A., Heikkila, M., Rautavuoma, K., Hirsila, M., Kivirikko, K.I., Myllyharju, J. (2010). Hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2. *Int J Biochem Cell Biol.* **42**, 1189-1200.
- Peet, D., Linke, S. (2006). Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation. *Novartis Found Symp.* **272**, 37-49.
- Pfafflin, A., Brodbeck, K., Heilig, C.W., Haring, H.U., Schleicher, E.D., Weigert, C. (2006). Increased glucose uptake and metabolism in mesangial cells overexpressing glucose transporter 1 increases interleukin-6 and vascular endothelial growth factor production: role of AP-1 and HIF-1 α . *Cell Physiol Biochem.* **18**, 199-210.
- Phillipson, M., Kubes, P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* **17**, 1381-1390.
- Pick, R., Brechtefeld, A., Walzog B. (2013). Intraluminal crawling versus interstitial

- neutrophil migration during inflammation. *Mol Immunol.* **55**, 70-75.
- Pitsillides, A.A., Beier, F. (2011). Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol.* **7**, 654-663.
- Popa-Nita, O., Naccache, P.H. (2010). Crystal-induced neutrophil activation. *Immunol Cell Biol.* **88**, 32-40.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. (1990). Platelet-activating factor. *J Biol Chem.* **265**, 17381-17384.
- Quayle, J.A., Adams, S., Bucknall, R.C., Edwards, S.W. (1994). Cytokine expression by inflammatory neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **8**, 233-239.
- Rabellino, E.M., Ross, G.D., Polley, M.J. (1978). Membrane receptors of mouse leukocytes. I. Two types of complement receptors for different regions of C3. *J Immunol.* **120**, 879-885.
- Ramanathan, M., Luo, W., Csoka, B., Hasko, G., Lukashev, D., Sitkovsky, M. V., Leibovich, S.J. (2009). Differential regulation of HIF-1alpha isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A(2A) receptor agonists. *J Leukoc Biol.* **86**, 681-689.
- Rankin, E.B., Rha, J., Selak, M.A., Unger, T.L., Keith, B., Liu, Q., Haase, V.H. (2009). Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. *Mol Cell Biol.* **29**, 4527-4538.
- Rankin, E.B., Biju, M.P., Liu, Q., Unger, T.L., Rha, J., Johnson, R.S., Simon, M.C., Keith, B., Haase, V.H. (2007). Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest.* **117**, 1068-1077.
- Ratcliffe, P.J. (2007). HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest.* **117**, 862-865.
- Ratthé, C., Pelletier, M., Chiasson, S., Girard, D. (2007). Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling. *J Leukoc Biol.* **81**, 1287-1296.
- Reichel, A.C., Rehberg, M., Bihari, P., Moser, C.M., Linder, S., Khandoga, A., Krombach, F. (2008). Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *J Leukoc Biol.* **83**, 864-874.
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science.* **256**, 1193-1195.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A.S., Nizet, V., Johnson, R.S., Haddad, G.G., Karin, M. (2008). NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature.* **453**, 807-811.
- Roda, J.M., Wang, Y., Sumner, L.A., Phillips, G.S., Marsh, C.B., Eubank, T.D. (2012). Stabilization of HIF-2alpha induces sVEGFR-1 production from tumor-associated macrophages and decreases tumor growth in a murine melanoma model. *J Immunol.* **189**, 3168-3177.

- Roda, J.M., Sumner, L.A., Evans, R., Phillips, G.S., Marsh, C.B., Eubank, T.D. (2011). Hypoxia-inducible factor-2 α regulates GM-CSF-derived soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 production from macrophages and inhibits tumor growth and angiogenesis. *J Immunol.* **187**, 1970-1976.
- Rosen, S.D., Bertozzi, C.R. (1994). The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol.* **6**, 663-673.
- Ross, G.D., Jarowski, C.I., Rabellino, E.M., Winchester, R.J. (1978). The sequential appearance of Ia-like antigens and two different complement receptors during the maturation of human neutrophils. *J Exp Med.* **147**, 730-744.
- Rotrosen, D., Yeung, C.L., Leto, T.L., Malech, H.L., Kwong, C.H. (1992). Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* **256**, 1459-1462.
- Ruas, J.L., Berchner-Pfannschmidt, U., Malik, S., Gradin, K., Fandrey, J., Roeder, R.G., Pereira, T., Poellinger, L. (2010). Complex regulation of the transactivation function of hypoxia-inducible factor-1 alpha by direct interaction with two distinct domains of the CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem.* **285**, 2601-2609.
- Ruas, J.L., Poellinger, L., Pereira, T. (2005). Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci.* **118**, 301-311.
- Ryan, H.E., Lo, J., Johnson, R.S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* **17**, 3005-3015.
- Ryu, J.H., Yang, S., Shin, Y., Rhee, J., Chun, C.H., Chun, J.S. (2011). Interleukin-6 plays an essential role in hypoxia-inducible factor 2alpha-induced experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis Rheum.* **63**, 2732-2743.
- Sadik, C.D., Luster, A.D. (2012). Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J Leukoc Biol.* **91**, 207-215.
- Aquiles Sanchez, J., Karni, R.J., Wangh, L.J. (1997). Fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of the relationship between chromosome location and nuclear morphology in human neutrophils. *Chromosoma.* **106**, 168-177.
- Sandhu, J.K., Privora, H.F., Wenckebach, G., Birnboim, H.C. (2000). Neutrophils, nitric oxide synthase, and mutations in the mutatact murine tumor model. *Am J Pathol.* **156**, 509-518.
- Sang, N., Stichl, D.P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., Caro, J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem.* **278**, 14013-14019.
- Santos, C.I., Costa-Pereira, A.P. (2011). Signal transducers and activators of transcription—from cytokine signalling to cancer biology. *Biochim Biophys Acta.* **1816**, 38-49.
- Sato, M., Sakota, M., Nakayama, K. (2010). Human PRP19 interacts with prolyl-hydroxylase PHD3 and inhibits cell death in hypoxia. *Exp Cell Res.* **316**, 2871-2882.
- Scapini, P., Carletto, A., Nardelli, B., Calzetti, F., Roschke, V., Merigo, F., Tamassia, N., Pieropan, S., Biasi, D., Sbarbati, A., Sozzani, S., Bambera, L., Cassatella, M.A. (2005). Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte

- stimulator pool (BLYS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood*. **105**, 830-837.
- Scapini, P., Nardelli, B., Nadali, G., Calzetti, F., Pizzolo, G., Montecucco, C., Cassatella, M.A. (2003). G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLYS. *J Exp Med*. **197**, 297-302.
- Scapini, P., Laudanna, C., Pinardi, C., Allavena, P., Mantovani, A., Sozzani, S., Cassatella, M.A. (2001). Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol*. **31**, 1981-1988.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M.A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. **177**, 195-203.
- Schmidt, C., Lee, W.L., Zemans, R.L., Yamashita, C., Downey, G.P. (2011). On, around, and through: neutrophil-endothelial interactions in innate immunity. *Physiology*. **26**, 334-347.
- Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **5**, 343-354.
- Schuster, D.P., Brody, S.L., Zhou, Z., Bernstein, M., Arch, R., Link, D., Mueckler, M. (2007). Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **292**, L845-851.
- Scortegagna, M., Ding, K., Zhang, Q., Oktay, Y., Bennett, M.J., Bennett, M., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Moe, O., Garcia, J.A. (2005). HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood*. **105**, 3133-3140.
- Scortegagna, M., Ding, K., Oktay, Y., Gaur, A., Thurmond, F., Yan, L.J., Marck, B.T., Matsumoto, A.M., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bennett, M.J., Garcia, J.A. (2003a). Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet*. **35**, 331-340.
- Scortegagna, M., Morris, M.A., Oktay, Y., Bennett, M., Garcia, J.A. (2003b). The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood*. **102**, 1634-1640.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. **148**, 399-408.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. **33**, 207-214.
- Semenza, G. L., Shimoda, L.A., Prabhakar, N.R. (2006). Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp*. **272**, 2-8.
- Sengelov, H., Kjeldsen, L., Borregaard, N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*. **150**, 1535-1543.
- Serhan, C.N., Yacoubian, S., Yang, R. (2008). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol*. **3**, 279-312.

- Shiao, S.L., Ganesan, A.P., Rugo, H.S., Coussens, L.M. (2011). Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. *Genes Dev.* **25**, 2559-2572.
- Shimoda, K., Okamura, S., Omori, F., Mizuno, Y., Hara, T., Aoki, T., Akeda, H., Ueda, K., Niho, Y. (1991). Detection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in cerebrospinal fluid of patients with aseptic meningitis. *Acta Haematol.* **86**, 36-39.
- Shyu, K.G., Wang, M.T., Wang, B.W., Chang, C.C., Leu, J.G., Kuan, P., Chang, H. (2002). Intramyocardial injection of naked DNA encoding IIF-1 α /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc Res.* **54**, 576-583.
- Smolinska, M.J., Page, T.H., Urbaniak, A.M., Mutch, B.E., Horwood, N.J. (2011). Hck tyrosine kinase regulates TLR4-induced TNF and IL-6 production via AP-1. *J Immunol.* **187**, 6043-6051.
- Smith, M.F.Jr., Carl, V.S., Lodie, T., Fenton, M.J. (1998). Secretory interleukin-1 receptor antagonist gene expression requires both a PU.1 and a novel composite NF- κ B/PU.1/GA-binding protein binding site. *J Biol Chem.* **273**, 24272-24279.
- Soehnlein, O., Lindbom, L. (2009). Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. *J Leukoc Biol.* **85**, 344-351.
- Song, X.W., Li, Q., Lin, L., Wang, X.C., Li, D.F., Wang, G.K., Ren, A.J., Wang, Y.R., Qin, Y.W., Yuan, W.J., Jing, Q. (2010). MicroRNAs are dynamically regulated in hypertrophic hearts, and miR-199a is essential for the maintenance of cell size in cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* **225**, 437-443.
- Souto, J.C., Vila, L., Bru, A. (2011). Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Med Res Rev.* **31**, 311-363.
- St-Onge, M., Flaman, N., Biarc, J., Picard, S., Bouchard, L., Dussault, A.A., Laflamme, C., James, M.J., Caughey, G.E., Cleland, L.G., Borgeat, P., Pouliot, M. (2007). Characterization of prostaglandin E2 generation through the cyclooxygenase (COX)-2 pathway in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* **1771**, 1235-1245.
- Staples, K.J., Sotoodehnejadnematlahi, F., Pearson, H., Frankenberger, M., Francescut, L., Ziegler-Heitbrock, L., Burke, B. (2011). Monocyte-derived macrophages matured under prolonged hypoxia transcriptionally up-regulate HIF-1 α mRNA. *Immunobiology.* **216**, 832-839.
- Stegeman, H., Kaanders, J.H., Wheeler, D.L., Van Der Kogel, A.J., Verheijen, M.M., Waaijer, S.J., Iida, M., Grenman, R., Span, P.N., Bussink, J. (2012). Activation of AKT by hypoxia: a potential target for hypoxic tumors of the head and neck. *BMC Cancer.* **12**, 463.
- Steinmann, U., Borkowski, J., Wolburg, H., Schröppel, B., Findeisen, P., Weiss, C., Ishikawa, H., Schwerk, C., Schrotten, H., Tenenbaum, T. (2013). Transmigration of polymorphonuclear neutrophils and monocytes through the human blood-cerebrospinal fluid barrier after bacterial infection in vitro. *J Neuroinflammation.* **10**, 30-33

- Strieter, R.M., Kasahara, K., Allen, R.M., Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Becker, F.S., Chensue, S.W., Kunkel, S.L. (1992). Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am J Pathol.* **141**, 397-407.
- Sumbayev, V.V., Yasinska, I., Oniku, A.E., Streatfield, C.L., Gibbs, B.F. (2012). Involvement of hypoxia-inducible factor-1 in the inflammatory responses of human LAD2 mast cells and basophils. *PLoS ONE.* **7**, e34259.
- Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., Chilvers, E.R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* **31**, 318-324.
- Tacchini, L., Dansi, P., Matteucci, E., Desiderio, M.A. (2001). Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis.* **22**, 1363-1371.
- Taguchi, A., Yanagisawa, K., Tanaka, M., Cao, K., Matsuyama, Y., Goto, H., Takahashi, T. (2008). Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res.* **68**, 5540-5545.
- Takahashi, G.W., Andrews, D.F.3rd, Lilly, M.B., Singer, J.W., Alderson, M.R. (1993). Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood.* **81**, 357-364.
- Takeda, N., O'Dea, E.L., Doedens, A., Kim, J.W., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M.C., Hoffmann, A., Johnson, R.S. (2010). Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* **24**, 491-501.
- Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* **157**, 411-421.
- Tamassia, N., Le Moigne, V., Calzetti, F., Donini, M., Gasperini, S., Ear, T., Cloutier, A., Martinez, F.O., Fabbri, M., Locati, M., Mantovani, A., McDonald, P.P., Cassatella, M.A. (2007). The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J Immunol.* **178**, 7344-7356.
- Tambuwalla, M.M., Cummins, E.P., Lenihan, C.R., Kiss, J., Stauch, M., Scholz, C.C., Fraisl, P., Lasitschka, F., Mollenhauer, M., Saunders, S.P., Maxwell, P.H., Carmeliet, P., Fallon, P.G., Schneider, M., Taylor, C.T. (2010). Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitis through reduced epithelial cell apoptosis and increased barrier function. *Gastroenterology.* **139**, 2093-2101.
- Tanino, Y., Coombe, D.R., Gill, S.E., Kett, W.C., Kajikawa, O., Proudfoot, A.E.I., Wells, T.N.C., Parks, W.C., Wight, T.N., Martin, T.R., Frevert, R.W. (2010). Kinetics of Chemokine-Glycosaminoglycan Interactions Control Neutrophil Migration into the Airways of the Lungs. *J Immunol.* **184**, 2677-2685.
- Tapper, H., Furuya, W., Grinstein, S. (2002). Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *J Immunol.* **68**, 5287-5296.

- Taylor, C. T. (2008). Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *J Physiol.* **586**, 4055-4059.
- Tazzyman, S., Lewis, C. E., Murdoch, C. (2009). Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol.* **90**, 222-231.
- Teng, M., Jiang, X.P., Zhang, Q., Zhang, J.P., Zhang, D.X., Liang, G.P., Huang, Y.S. (2012). Microtubular Stability Affects pVHL-Mediated Regulation of HIF-1alpha via the p38/MAPK Pathway in Hypoxic Cardiomyocytes. *PLoS ONE.* **7**, e35017.
- Thobe, B.M., Frink, M., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., Bland, K.I. Chaudry, I.H. (2006). Src family kinases regulate p38 MAPK-mediated IL-6 production in Kupffer cells following hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol.* **291**, C476-482.
- Thomas, C.J., Schroder, K. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* **34**, 317-328.
- Tojo, M., Matsuzaki, K., Minami, T., Honda, Y., Yasuda, H., Chiba, T., Saya, H., Fujii-Kuriyama, Y., Nakao, M. (2002). The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem.* **277**, 46576-46585.
- Treml, J.F., Hao, Y., Stadanlick, J.E., Cancro, M.P. (2009). The BLyS family: toward a molecular understanding of B cell homeostasis. *Cell Biochem Biophys.* **53**, 1-16.
- Tu, L., Chen, A., Delahunty, M.D., Moore, K.L., Watson, S.R., McEver, R.P., Tedder, T.F. (1996). L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity. *J Immunol.* **157**, 3995-4004.
- Ungureanu, D., Saharinen, P., Junttila, I., Hilton, D.J., Silvennoinen, O. (2002). Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol.* **22**, 3316-26.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**, 44-49.
- Van Den Beucken, T., Magagnin, M.G., Jutten, B., Seigneuric, R., Lambin, P., Koritzinsky, M.Wouters, B.G. (2011). Translational control is a major contributor to hypoxia induced gene expression. *Radiother Oncol.* **99**, 379-384.
- van Hagen, M., Overmeer, R.M., Abolvardi, S.S., Vertegaal, A.C. (2010). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1922-1931.
- Van Uden, P., Kenneth, N. S., Rocha, S. (2008). Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J.* **412**, 477-484.
- Vanharanta, S., Shu, W., Brenet, F., Hakimi, A.A., Heguy, A., Viale, A., Reuter, V.E., Hsich, J.J., Scandura, J.M., Massagué, J. (2013). Epigenetic expansion of VHL-HIF signal output drives multiorgan metastasis in renal cancer. *Nat Med.* **19**, 50-56.
- Vincent, K.A., Shyu, K.G., Luo, Y., Magner, M., Tio, R.A., Jiang, C., Goldberg, M.A., Akita, G.Y., Gregory, R.J., Isner, J.M. (2000). Angiogenesis is induced in a rabbit

- model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation*. **31**, 2255-2261.
- Vink, A., Schoneveld, A.H., Lamers, D., Houben, A.J., Van Der Groep, P., Van Diest, P.J., Pasterkamp, G. (2007). HIF-1 alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. *Atherosclerosis*. **195**, e69-75.
- Vissers, M.C., Wilkie, R.P. (2007). Ascorbate deficiency results in impaired neutrophil apoptosis and clearance and is associated with up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Leukoc Biol*. **81**, 1236-1244.
- Wada, T., Shimba, S., Tezuka, M. (2006). Transcriptional regulation of the hypoxia inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) gene during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull*. **29**, 49-54.
- Walmsley, S.R., Cowburn, A.S., Clatworthy, M.R., Morrell, N.W., Roper, E.C., Singleton, V., Maxwell, P., Whyte, M.K., Chilvers, E.R. (2006). Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel Lindau protein (pVHL) display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis. *Blood*. **108**, 3176-3178.
- Walmsley, S.R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R.S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A.M., Cowburn, A.S., Johnson, N., Chilvers, E.R. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med*. **201**, 105-115.
- Wang, G., Zhou, D., Wang, C., Gao, Y., Zhou, Q., Qian, G., DeCoster, M.A. (2010). Hypoxic preconditioning suppresses group III secreted phospholipase A2-induced apoptosis via JAK2-STAT3 activation in cortical neurons. *J Neurochem*. **114**, 1039-1048.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. (1995a). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 5510-5514.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Semenza, G.L. (1995b). Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. **216**, 669-675.
- Wang, G.L., Semenza, G.L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Leukoc Biol*. **268**, 21513-21518.
- Wang, G.S., Qian, G.S., Zhou, D.S., Zhao, J.Q. (2005). JAK-STAT signaling pathway in pulmonary arterial smooth muscle cells is activated by hypoxia. *Cell Biol Int*. **29**, 598-603.
- Watson, J.A., Watson, C.J., McCann, A., Baugh, J. (2010). Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response. *Epigenetics*. **5**, 293-296.
- Wedel, A., Ziegler-Heitbrock, H.W. (1995). The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiology*. **193**, 171-185.

- Wenger, R.H., Stiehl, D.P., Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. **2005**, re12.
- Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*. **16**, 1151-1162.
- Wenger, R.H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Camenisch, G., Gassmann, M. (1998). Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur J Biochem*. **253**, 771-777.
- Wenzel, S.E. (1997). Arachidonic acid metabolites: mediators of inflammation in asthma. *Pharmacotherapy*. **17**, 3S-12S.
- Westra, J., Brouwer, E., Van Roosmalen, I.A., Doornbos-Van Der Meer, B., Van Leeuwen, M.A., Posthumus, M.D., Kallenberg, C.G. (2010). Expression and regulation of HIF-1 α in macrophages under inflammatory conditions; significant reduction of VEGF by CaMKII inhibitor. *BMC Musculoskelet Disord*. **11**, 61.
- Wiesener, M.S., Jurgensen, J.S., Rosenberger, C., Scholze, C.K., Horstrup, J.H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U.A., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Bachmann, S., Maxwell, P.H., Eckardt, K.U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. **17**, 271-273.
- Williams, M.R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P., Luscinskas, F.W. (2011). Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol*. **32**, 461-469.
- Wong, D.L., Tai, T.C., Wong-Faull, D.C., Claycomb, R., Siddall, B.J., Bell, R. A., Kvetnansky, R. (2010). Stress and adrenergic function: HIF1 α , a potential regulatory switch. *Cell Mol Neurobiol*. **30**, 1451-1457.
- Woodfin, A., Voisin, A.B., Imhof, B.A., Dejana, E., Engelhardt, B., Nourshargh, S. (2009). Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*. **113**, 6246-6257.
- Wouters, B.G., Van Den Beucken, T., Magagnin, M.G., Koritzinsky, M., Fels, D., Koumenis, C. (2005). Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation. *Semin Cell Dev Biol*. **16**, 487-501.
- Wright, H.L., Chikura, B., Bucknall, R.C., Moots, R.J., Edwards, S.W. (2011). Changes in expression of membrane TNF, NF- κ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Ann Rheum Dis*. **70**, 537-543.
- Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C., Edwards, S.W. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. **49**, 1618-1631.
- Wu, S., Gao, J., Dinh, Q.T., Chen, C., Fimmel, S. (2008). IL-8 production and AP-1 transactivation induced by UVA in human keratinocytes: roles of D-alpha-tocopherol. *Mol Immunol*. **45**, 2288-2296.
- Xu, L., Pathak, P.S., Fukumura, D. (2004). Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways

- contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* **10**, 701-707.
- Yamaji-Kegan, K., Su, Q., Angelini, D.J., Johns, R.A. (2009). IL-4 is proangiogenic in the lung under hypoxic conditions. *J Immunol.* **182**, 5469-5476.
- Yao, S.Y., Soutto, M., Sriram, S. (2008). Bacterial cell wall products increases stabilization of HIF-1 alpha in an oligodendrocyte cell line preconditioned by cobalt chloride or desferrioxamine. *J Neuroimmunol.* **200**, 17-26.
- Yeremian, A., Santacana, M., Sorolla, A., Llobet, D., Encinas, M., Velasco, A., Bahi, N., Eritja, N., Domingo, M., Oliva, E., Dolcet, X., Matias-Guiu, X. (2011). Nuclear factor-kappaB2/p100 promotes endometrial carcinoma cell survival under hypoxia in a HIF-1alpha independent manner. *Lab Invest.* **91**, 859-871.
- Yoshie, O. (2005). Role of chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Nihon Rinsho.* **63**, 437-443.
- Yoshino, Y., Aoyagi, M., Tamaki, M., Duan, L., Morimoto, T., Ohno, K. (2006). Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF secretion in human malignant glioma cells. *Int J Oncol.* **29**, 981-987.
- Yasinska, I.M., Sumbayev, V.V. (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* **549**, 105-109.
- Yuan, Q.S., Shen, Q., Rigor, R.R. Wu, M.H. (2012). Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res.* **83**, 82-88.
- Yun, S.P., Lee, M.Y., Ryu, J.M., Song, C. H., Han, H.J. (2009). Role of HIF-1alpha and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17beta-estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol.* **296**, C317-326.
- Zahler, S., Hoffmann, A., Gloe, T., Pohl, U. (2003). Gap-junctional coupling between neutrophils and endothelial cells: a novel modulator of transendothelial migration. *J Leukoc Biol.* **73**, 118-126.
- Zarbock, A., Ley, K. (2011). Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. *Arch Biochem Biophys.* **510**, 112-119.
- Zemans, R.L., Colgan, S.P., Downey, G.P. (2009). Transcellular Migration of Neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **40**, 519-535.
- Zhang, D., Li, J., Costa, M., Gao, J., Huang, C. (2010a). JNK1 mediates degradation HIF-1alpha by a VHL-independent mechanism that involves the chaperones Hsp90/Hsp70. *Cancer Res.* **70**, 813-823.
- Zhang, H., Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A.D., Li, H.S., Murray, P.J., Watowich, S.S. (2010b). STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood.* **116**, 2462-2471.
- Zhang, J., Song, L.P., Huang, Y., Zhao, Q., Zhao, K. W., Chen, G.Q. (2008). Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and its role in the differentiation of

- myeloid leukemic cells induced by all-trans retinoic acid. *Haematologica*. **93**, 1480-1487.
- Zhang, W., Petrovic, J.M., Callaghan, D., Jones, A., Cui, H., Howlett, C., Stanimirovic, D. (2006). Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures. *J Neuroimmunol*. **174**, 63-73.
- Zhang, W., Chen, H. (2002) The study on the interleukin-8 (IL-8). *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. **19**, 697-702.
- Zhang, Y., Yoneyama, H., Wang, Y., Ishikawa, S., Hashimoto, S., Gao, J.L., Murphy, P., Matsushima, K. (2004). Mobilization of dendritic cell precursors into the circulation by administration of MIP-1alpha in mice. *J Natl Cancer Inst*. **96**, 201-209.
- Zhou, J., Brune, B. (2006). Cytokines and hormones in the regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. **4**, 189-197.
- Zhou, J., Hara, K., Inoue, M., Hamada, S., Yasuda, H., Moriyama, H., Endo, H., Hirota, K., Yonezawa, K., Nagata, M., Yokono, K. (2007). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by glucose availability under hypoxic conditions. *Kobe J Med Sci*. **53**, 283-296.
- Zhou, J., Schmid, T., Frank, R., Brune, B. (2004). PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem*. **279**, 13506-13513.
- Zimmermann, H.W., Seidler, S., Gassler, N., Nattermann, J., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F. (2011). Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One*. **6**, e21381
- Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Mehra, M., Prescott, S.M. (1990). Endothelial cell-associated platelet-activating factor : a novel mechanism for signaling intracellular adhesion. *J Cell Biol*. **110**, 529-540.
- Zinkernagel, A.S., Peyssonnaud, C., Johnson, R.S., Nizet, V. (2008). Pharmacologic augmentation of hypoxia-inducible factor-1alpha with mimosine boosts the bactericidal capacity of phagocytes. *J Infect Dis*. **197**, 214-217.
- Zlotnik, A., Yoshie, O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. **36**, 705-716.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., Nomiya, H. (2006). The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*. **7**, 243.