

Université de Sherbrooke

**Régulation de l'expression génique et de la sécrétion des cytokines chez le  
neutrophile humain : Implication de la voie des MAPK MEK/ERK et son  
découplage.**

Par

François Simard

Programme d'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

Le 26 Juillet 2012

Membres du jury d'évaluation

Patrick P. McDonald, Ph.D. Programme d'immunologie

Gilles Dupuis, Ph.D. Programme d'immunologie

François Boudreau, Ph.D. Département d'anatomie et de biologie cellulaire



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: 978-0-494-93302-2*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-93302-2*

#### 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

# **Régulation de l'expression génique et de la sécrétion des cytokines chez le neutrophile humain : Implication de la voie des MAPK MEK/ERK et son découplage.**

Par  
François Simard  
Programmes d'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, Faculté de médecine et des sciences de la santé. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le neutrophile humain est une composante essentielle du système immunitaire inné. Il joue un rôle-clé comme phagocyte professionnel pour la défense contre les agents externes. De plus, il a la capacité de libérer un large éventail de produits antimicrobiens et de produire également diverses protéines immunorégulatrices, dont une vaste gamme de cytokines (IL-8, MIP-1 $\alpha/\beta$ , IP-10, I-TAC, TNF- $\alpha$ , etc.). La génération de ces dernières permet le recrutement massif de neutrophiles et d'autres populations leucocytaires au site inflammatoire, contribuant ainsi au bon déroulement de la réponse inflammatoire.

La génération de cytokines par le neutrophile humain est induite par différents agonistes, dont des molécules bactériennes (LPS, peptides N-formylés) ou les médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance). Ces molécules vont activer des récepteurs à la surface du neutrophile et déclencher ainsi plusieurs voies de signalisation et des facteurs transcriptionnels. Dans la présente étude, nous avons déterminé l'impact de la voie de signalisation MEK/ERK dans l'induction de l'expression des cytokines chez le neutrophile humain isolé du sang périphérique. Nous avons noté un découplage du module MEK/ERK suite à une stimulation avec certains agonistes pro-inflammatoires (LPS, TNF- $\alpha$ ), mais pas pour d'autres (fMLP, GM-CSF). L'utilisation de différentes classes d'agonistes et d'inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation nous a permis de mettre en évidence les rôles différents de MEK et de ERK en ce qui concerne la sécrétion et la transcription de cytokines. Les kinases ERK et MEK sont toutes deux impliquées dans la sécrétion de cytokines, mais ERK est la seule des deux qui est associée à la transcription. Par contre, nous n'avons toujours pas identifié la kinase responsable de l'activation de ERK lorsque le module MEK/ERK est découplé. Enfin, à défaut d'identifier la kinase qui phosphoryle ERK, nous montrons que la MAP3K, TAK1, agit en amont de ERK et de MEK chez les neutrophiles. Nos résultats suggèrent que les thérapies basées sur l'inhibition de MEK devront être complétées d'une inhibition de ERK, en particulier dans des maladies inflammatoires chroniques à forte prédominance neutrophilique.

Mots clés : Neutrophiles humains, MAPK, Signalisation, MEK/ERK, Cytokines/chimiokines, transcription, traduction

## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>III</b>
<b>Liste des illustrations</b> .....	<b>V</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>VI</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
1. Aspect général de l'inflammation.....	1
2. La réaction inflammatoire.....	1
3. Les médiateurs peptidiques solubles.....	4
3.1 Les cytokines.....	4
3.2 Les chimiokines.....	5
3.2.1 Les chimiokines de maintenance.....	9
3.2.2 Les chimiokines inflammatoires.....	10
3.2.3 Les récepteurs de chimiokines.....	11
4. Régulation transcriptionnelle des cytokines inflammatoires.....	12
4.1 Remodelage de la chromatine.....	15
4.2 Les facteurs de transcription et l'enhanceosome.....	18
4.2.1 Le facteur transcriptionnel NFkB.....	19
4.2.2 Le facteur transcriptionnel AP-1.....	23
4.2.3 Les facteurs de transcription C/EBP.....	24
4.2.4 Le facteur transcriptionnel CREB.....	27
5. Le neutrophile humain.....	29
5.1 Fonctions classiques.....	30
5.1.1 La phagocytose.....	31
5.1.2 La dégranulation.....	32
5.1.3 La formation de ROS.....	34
5.1.4 La formation de Nets.....	36
5.1.5 L'induction de la réponse adaptative.....	39
5.2 Le neutrophile et l'inflammation.....	41
5.2.1 La production des médiateurs lipidiques.....	42

5.2.2 La production des médiateurs peptidiques.....	45
6. La famille des MAP kinases.....	48
6.1 La régulation des MAPKs par les MKPs.....	50
6.2 Les propriétés de la cascade MEK/ERK.....	51
6.2.1 Les propriétés de MEK.....	52
6.2.2 Les propriétés de ERK.....	53
6.2.3 Les substrats de ERK.....	54
6.2.4 La détermination de la spécificité de la cascade ERK.....	55
6.3 Rôle physiologique de la cascade ERK.....	57
6.3.1 La prolifération et l'oncogenèse.....	57
6.3.2 Le contrôle de cycle cellulaire.....	58
6.3.3 Autres procédés physiologiques.....	59
<b>Objectifs de l'étude.....</b>	<b>60</b>
<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>61</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>65</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>75</b>
<b>Conclusions générales.....</b>	<b>80</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>81</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>82</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1	Rôles des chimiokines et leurs récepteurs.....	7
Tableau 2	HDACs et la régulation des cytokines.....	17
Tableau 3	Nomenclature de la famille C/EBP.....	25
Tableau 4	Contenus des granules et vésicules de sécrétion du neutrophile.....	33
Tableau 5	Nomenclature, Propriétés et fonctions physiologiques des MKPs.....	51

## Liste des figures

### Introduction

Figure 1	Résumé de la phase cellulaire.....	3
Figure 2	Principales fonctions biologiques effectuées par les chimiokines.....	6
Figure 3	Modèle de régulation de la transcription.....	14
Figure 4	Famille NF- $\kappa$ B, IKK et I $\kappa$ B.....	20
Figure 5	Mécanismes d'activation du NF $\kappa$ B.....	22
Figure 6	Membres de la famille C/EBP.....	26
Figure 7	Quatre étapes de migration du neutrophile du vaisseau sanguin vers les tissus.....	30
Figure 8	Assemblage et activation de la NADPH oxydase.....	35
Figure 9	Mécanisme de formation des Nets.....	38
Figure 10	Métabolisme de l'acide arachidonique.....	43
Figure 11	Médiateurs peptidiques produits par le neutrophile.....	46
Figure 12	Cascades des MAPKs.....	49

### Résultats

Figure 1	Activation de ERK est découplée de MEK dans les neutrophiles stimulés au LPS et aux cytokines pro-inflammatoires.....	66
Figure 2	Impacts de l'activation de ERK sur la réponse des neutrophiles humains.....	69
Figure 3	Cibles potentielles de l'activation de ERK chez le neutrophile humain.....	71
Figure 4	Effets de l'inhibition de ERK sur le délai de l'apoptose en comparaison avec l'inhibition de MEK.....	73
Figure 5	Signalisation croisée entre ERK et les autres MAPKs et la signalisation en amont de ERK.....	74

## Liste des abréviations

5-LO	5-Lipoxygénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Protéine activatrice 1
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Albumine sérique de bovin
bZIP	« zipper » leucine basal
C3a	Protéine du complément 3a
C5a	Protéine du complément 5a
CD	Clusters de différenciation
C/EBP	Protéines liant la séquence activatrice CCAAT
CBP	Protéine liant CREB
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CREB	Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc
DBD	Domaine Liaison à l'ADN
DH	Test d'hypersensibilité à la DNaseI
ELISA	Essai immunoabsorbance enzymatique
ERK	Kinases régulant les signaux extracellulaires
fMLP	Peptide Méthionine-Leucine-Phénylalanine N-Formylé
G-CSF	Facteur stimulateur des colonies de granulocytes
GM-CSF	Facteur stimulateur des colonies de granulocytes et de macrophages
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
HDAC	Histone déacétylase
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
IFN	Interféron
IKK	Kinase de I $\kappa$ B
IL	Interleukine
IP-10	Protéine 10 induite par l'interféron- $\gamma$
I-TAC	Chimioattractant des cellules T alpha induit par l'interféron
JNK	Kinases N-terminales de c-Jun
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leukotriène B4
MIG	Monokine induite par l'INF- $\gamma$
MIP	Protéine inflammatoire agissant sur les macrophages
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
MEK	MAPs kinases de ERK
MKP	Phosphatase des MAPK
MPO	Myelopéroxydase
NES	Séquence d'export du noyau
NET	Piège extracellulaire des neutrophiles

NFκB	Facteur nucléaire kappa B
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PI	Iodure de propidium
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PS	Phosphatidylsérine
RHD	Domaine d'homologie à Rel
ROS	Espèces réactives oxygénées
Ser	Sérine
TAK	Kinase activé par TGF-β
TBS	Solution saline tamponnée avec du Tris
Thr	Thréonine
TNF-α	Facteur nécrosant les tumeurs-(
TNFR	Récepteur du facteur nécrosant les tumeurs
TGF-β	Facteur transformant la croissance-®
TLR	Récepteurs de type Toll-like
Tris	
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
Tyr	Tyrosine
VEGF	Facteurs de croissance du réseau vasculaire et de l'épithélium

## **Introduction**

### **1. Aspect général de l'inflammation**

L'inflammation représente un processus physiologique par lequel l'organisme répond à une menace endogène ou exogène, de nature biologique ou chimique. C'est un processus qui a comme but premier le maintien de l'homéostasie, donc l'initiation d'une réponse inflammatoire suite à l'intrusion d'un agent causal, visant un retour à l'état normal. Elle implique la participation de plusieurs médiateurs solubles (pro- et anti-inflammatoires) et de plusieurs types cellulaires, notamment les cellules lésées et les leucocytes. Il arrive parfois que la réaction survienne de façon incontrôlée et même parfois contre des propres composantes du soi. On assiste alors à une destruction des tissus environnants. Ainsi, la réaction inflammatoire est une arme à double tranchant qui peut très bien se retourner contre son hôte ; d'où l'importance de plusieurs rétrocontrôles de ce processus. (Paul 1999 ; Smith, 1994)

### **2. La réaction inflammatoire**

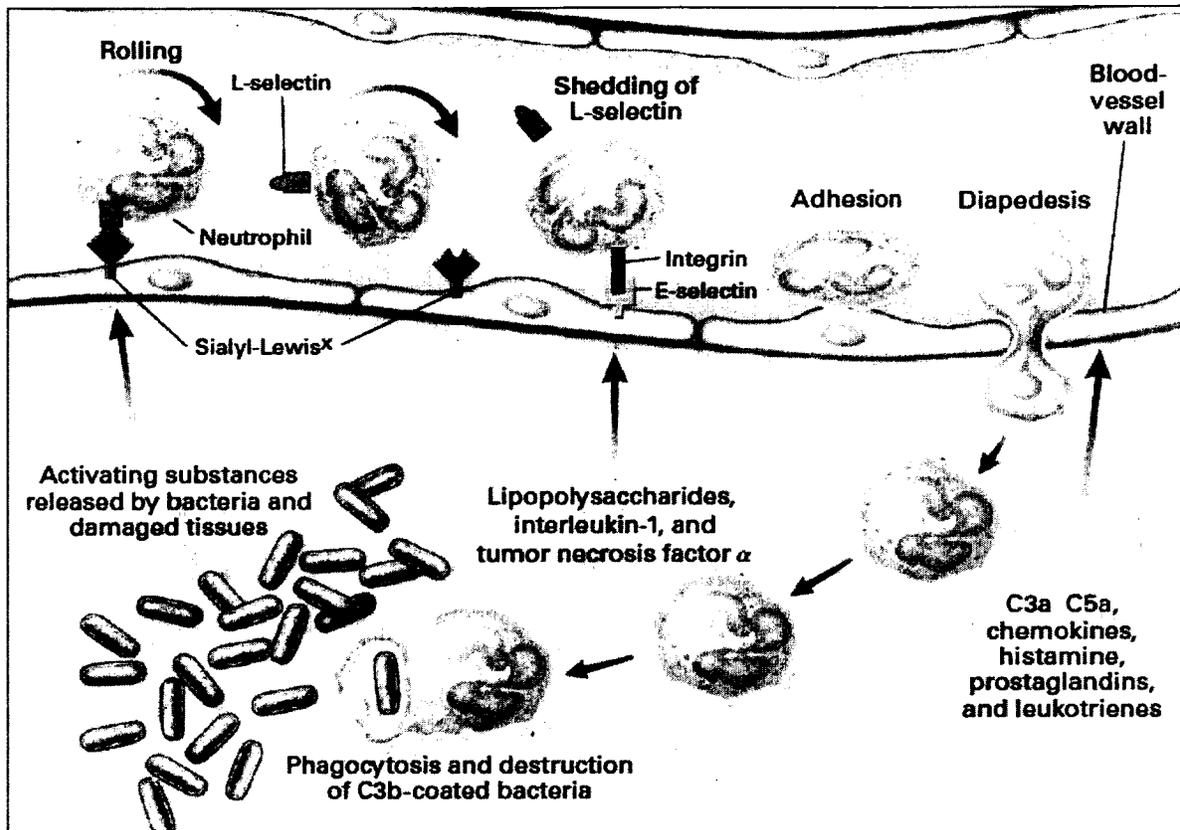
La réaction inflammatoire implique deux phases : la phase vasculaire et la phase cellulaire. La première consiste en l'altération de la microvascularité avoisinant le site infecté ou qui a subi une lésion. Cette altération est causée par plusieurs médiateurs inflammatoires. Il s'ensuit une cascade d'événements qui dépendent de la nature même du facteur d'agression. De façon générale, il y a tout d'abord un changement dans le débit vasculaire : une brève constriction artériolaire induite par des neuropeptides suivis d'une vasodilatation causée a priori par des médiateurs inflammatoires emmagasinés tels que l'histamine (mastocyte et basophiles) et la sérotonine (plaquettes) (White, 1999). Des médiateurs néoformés, tels les quinines, les prostaglandines, les leucotriènes et les facteurs activateurs des plaquettes (PAF), amplifient alors le phénomène de vasodilatation. Tout cela mène à un accroissement de l'afflux sanguin dans les capillaires de la région où se situe

l'agression. Les différents facteurs libérés mènent à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Sommairement, il y a contraction des cellules endothéliales sous l'effet de l'histamine, de la bradykinine, du PAF et des leucotriènes, de même qu'une rétraction des jonctions endothéliales via l'action du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  (Blum et *al.* 1997 ; Wojciak-Stothard et *al.* 1998) et enfin, le tout permettra la formation d'un œdème tissulaire dû à l'infiltration de liquides et de protéines sériques.

La deuxième phase de la réaction inflammatoire est le recrutement leucocytaire destiné à l'élimination des cellules nécrosées et/ou de l'agent externe (Figure 1). Ce recrutement est médié par la libération de molécules chimioattractives de classes diverses (plasmatiques, bactériennes, cellulaires) telles que le C3a, le C5a, le fMLP, le LTB<sub>4</sub>, le PAF et l'IL-8. Les leucocytes à l'intérieur des vaisseaux sanguins se dirigent selon le gradient croissant de ces molécules. Elles incitent aussi le processus de diapédèse, au cours duquel les cellules leucocytaires traversent la paroi des capillaires pour s'accumuler dans les tissus émettant les signaux de l'inflammation. Habituellement, les premières cellules à migrer vers les tissus lésés ou infectés sont les neutrophiles (Weiss, 1989). La migration des leucocytes dans les vaisseaux sanguins s'effectue par une cascade d'adhésions successives. Il y a tout d'abord une adhésion primaire transitoire et réversible aux cellules endothéliales, qu'on appelle le roulement et qui est possible grâce à l'action de divers sélectines. Par la suite, la présence de divers stimuli inflammatoires, dans les capillaires sanguins près du tissu enflammé, active les leucocytes et permet une adhésion ferme et stable à la surface endothéliale, contrôlée par les intégrines. Finalement, les cellules immunitaires passent à travers le capillaire sanguin via les jonctions intercellulaires, un processus nommé diapédèse (Muller 2002).

Si cela s'avère nécessaire, d'autres populations leucocytaires sont recrutées ultérieurement pour permettre l'établissement d'une réponse immune adaptative, beaucoup plus spécifique pour éliminer l'agent agresseur. Ce sont en bonne partie les cytokines et chimiokines, qui organisent et modulent le recrutement préférentiel de certains leucocytes en fonction du tissu concerné et des besoins. À moins qu'il y ait persistance de l'agent causal ou une défaillance dans la rétro inhibition,

l'inflammation finit par se résorber sinon l'inflammation aigüe se transforme en inflammation chronique, ce qui peut entrainer plusieurs problèmes de santé.



**Figure 1. Résumé de la phase cellulaire**

Les neutrophiles comptent parmi les premières cellules recrutées au site d'une infection et contribuent de façon importante à la réponse inflammatoire aigüe. Les neutrophiles roulent le long des vaisseaux sanguins, ils se lient aux cellules endothéliales via des molécules d'adhésion (sélectines). Lorsqu'il y a activation cellulaire, les intégrines sont activées ce qui permet une adhésion ferme. Les neutrophiles activés entrent dans les tissus, où ils sont attirés par des chimioattractants. Les neutrophiles peuvent alors phagocyter et détruire les bactéries, mais aussi générer des cytokines et des chimiokines (Delves et Roitt, 2000)

### 3. Les médiateurs peptidiques solubles

#### 3.1 Les cytokines

Les cytokines sont des peptides ou glycoprotéines solubles impliqués dans un grand nombre de processus au sein de l'organisme, et tout particulièrement dans la résistance naturelle ou acquise aux agents infectieux ou toxiques. Elles sont des messagers chimiques de la communication intercellulaire permettant l'échange d'information entre les cellules (Garofalo et Goldman, 1998 ; Townsend et McKenzie, 2000). Les cytokines possèdent deux caractéristiques particulières : la redondance (deux cytokines différentes peuvent avoir le même effet) et la pléiotropie (une seule cytokine peut exercer des effets multiples et variés sur divers types cellulaires), ce qui montre la complexité de leurs fonctions (Nesin et Cunningham-Rundles, 2000 ; Shuai et Liu, 2003). On inclut dans ce groupe de médiateurs les interleukines (IL), les interférons (IFN), les facteurs de croissance et les chimioquinas (discutés plus bas). Ces différentes molécules ont des poids moléculaires compris entre 8 et 45 kd. La plupart des cellules du système immunitaire, de même que plusieurs cellules différentes de l'hôte, relâchent des cytokines, ou répondent aux cytokines via différents récepteurs spécifiques, ou les deux. La diversité des sources, des effets, de l'action et des interrelations des différentes cytokines est tellement complexe qu'elle ne sera pas discutée en détail. Nous allons plutôt nous intéresser à deux cytokines, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , dû à leur importance fondamentale dans la phase aiguë de la réponse de l'hôte face aux pathogènes (Borish et Steinke, 2003 ; Rubinstein *et al.*, 1998).

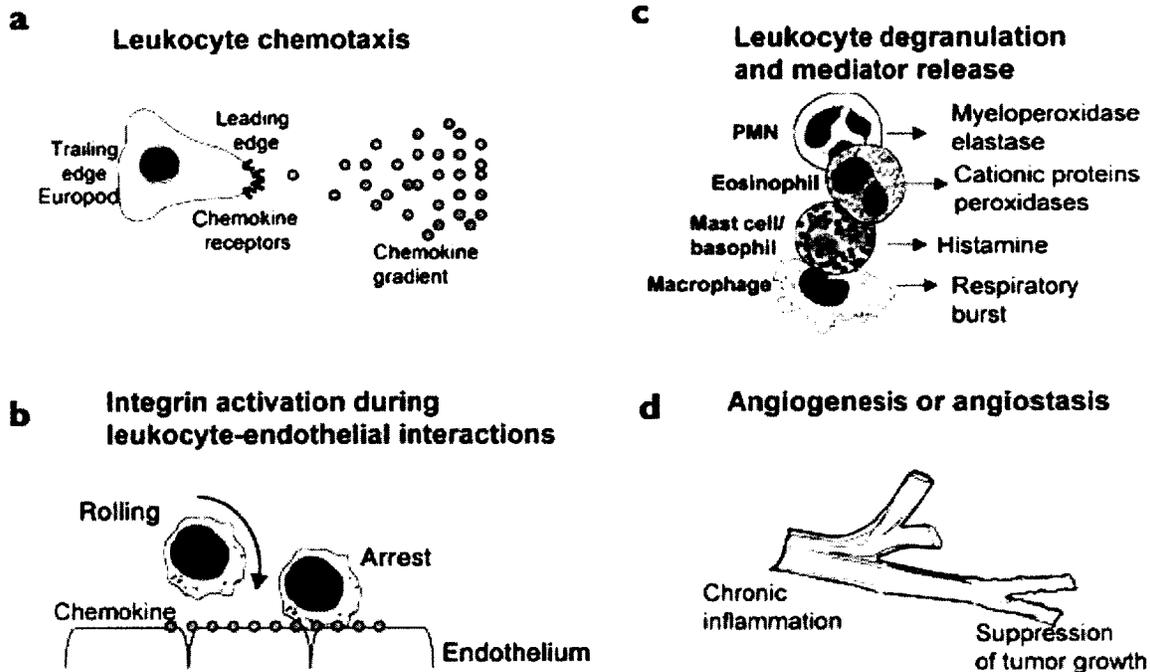
L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont des polypeptides d'environ 17 kd qui exercent un vaste éventail d'effets sur la réponse immune, l'inflammation, le métabolisme et l'hématopoïèse. L'IL-1 a été décrite originalement comme un « pyrogène endogène » se référant à son habileté à produire des fièvres chez les animaux. Le TNF- $\alpha$  produit quelques effets similaires à l'IL-1, il a été originalement nommé « cachectine » d'après les syndromes destructeurs qu'il produit suite à des injections chroniques chez la souris. Plusieurs des changements physiologiques, associés au sepsis de

bactéries Gram négatives, peuvent être reproduits par injection de ces deux cytokines chez des animaux sains. Dépendamment de la dose injectée, ces effets incluent la fièvre, l'hypotension et soit la neutrophilie ou bien la leucopénie. Dans le cas d'une infection bactérienne de type gram négative, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont produits par les phagocytes mononucléaires en réponse à l'activation des TLRs par le LPS bactérien. Ils vont par la suite activer la production d'autres cytokines et chimiokines, de médiateurs lipidiques (PAF et prostaglandines) et d'espèces réactives oxygénées (ROS). Ils induisent l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et les leucocytes, facilitent leur recrutement par le relâchement de la chimiokine IL-8 et stimulent la phagocytose chez les neutrophiles la phagocytose, la dégranulation et la flambée oxydative. Ceux-ci ont tous des effets importants et normalement bénéfiques pour l'hôte en réponse à une infection. Par contre, à des niveaux élevés il y a parfois des effets pathophysiologiques tels que l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la baisse des contractions du myocarde, des fuites capillaires, l'hypoperfusion des tissus, des désordres de la coagulation et plusieurs dysfonctionnements d'organes. Afin de contrer l'effet néfaste de ces cytokines, le corps humain produit plusieurs antagonistes qui modulent leurs effets, dont l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA), des récepteurs solubles du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 (Liao et *al.*, 1984 ; Engelmann et *al.*, 1990 ; McMannis et Plate, 1985) et des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Beutler et Cerami, 1989 ; Cohen, 2002 ; Oppenheim et Feldman, 2001)

### **3.2 Les chimiokines**

Les chimiokines constituent une vaste famille de protéines dont le poids moléculaire oscille entre 8 et 14 kDa, et elles possèdent des fonctions régulatrices importantes dans la réponse immune (voir figure 2). Lors de l'inflammation, elles induisent principalement le recrutement des cellules effectrices de l'immunité aux sites d'infection et/ou de tissus endommagés (Rollins, 1997). Leurs autres fonctions consistent en la régulation du trafic lymphocytaire, de l'angiogenèse, de la

dégranulation leucocytaire, ainsi que de la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Rossi et Zlonik., 2000 ; Mackay, 2001).



**Figure 2. Principales fonctions biologiques effectuées par les chimiokines**

(a) Les chemoattractants fournissent des signaux importants pour la mobilité leucocytaire par la formation de gradients que les cellules migratrices peuvent suivre. (b) Activation des intégrines par les chimiokines durant les interactions leucocytes-cellules endothéliales. (c) Les chimiokines induisent la dégranulation leucocytaire et la libération de médiateurs inflammatoires. Par exemple, CXCL8 (IL-8) stimule l'exocytose des granules des neutrophiles préstimulés avec du GM-CSF, du LPS, etc. Les chimiokines stimulent aussi la flambée oxydative, résultant en la production de ROS chez les neutrophiles préstimulés avec du GM-CSF, du LPS, etc. (d) Quelques chimiokines stimulent aussi l'angiogenèse ou l'angiostasie. Les chimiokines CXC « ELR » et la CCL2 possèdent des propriétés angiogéniques, alors que la CXCL10 (IP-10) et la CCL21 (SLC) possèdent des propriétés angiostatiques (Mackay, 2001).

Les chimiokines englobent aujourd'hui une quarantaine de membres identifiés (voir tableau 1) (D'ambrosio et al., 2003 ; Raman et al., 2011). La plupart des chimiokines se caractérisent par la présence de quatre résidus cystéines (NB, la

cystéine est un acide aminé non incorporé dans une séquence polypeptidique) conservées formant deux ponts disulfures entre la première et la troisième cystéine, et entre la deuxième et la quatrième cystéine. Le motif formé par les deux premières cystéines situées à l'extrémité N-terminale constitue le critère de classification (Baggiolini *et al.*, 1997). Il existe deux classes principales, à l'intérieur desquelles les membres d'un même groupe montrent une forte similarité de séquence. Il y a la classe des CC-chimiokines, où les deux premières cystéines sont adjacentes, et qui agit principalement sur les monocytes et les lymphocytes T. Il y a ensuite la classe des CXC-chimiokines, dans laquelle les deux premières cystéines sont séparées par un acide aminé quelconque, et dont les cellules cibles principales sont les neutrophiles et les lymphocytes. Les CXC-chimiokines sont encore subdivisées en deux catégories, ELR et non-ELR, définies par la présence ou l'absence d'un motif glutamate-leucine-arginine (ELR) situé avant la première cystéine. À ces deux classes s'ajoutent deux groupes secondaires, les XC et les CX<sub>3</sub>C. La première comporte deux membres tandis que l'autre compte seulement un membre (Kelner *et al.*, 1994 ; Bazan *et al.*, 1997 ; Laing et Secombes, 2004). La nomenclature initialement très complexe des chimiokines a été normalisée avec les dénominations CCL, CXCL, XCL et CX<sub>3</sub>CL selon l'arrangement de leurs extrémités N-terminales, comme montré dans le tableau 1 (Murphy *et al.*, 2000 ; Zlonik et Yoshie, 2000).

**Tableau 1. Rôles des chimiokines et leurs récepteurs**

Noms systématiques	Noms Communs	Récepteurs	Rôles physiologiques
<b>Famille des chimiokines de type CXC</b>			
CXCL1	GRO $\alpha$	CXCR2 > CXCR1	Inflammatoire
CXCL2	GRO $\beta$	CXCR2	Inflammatoire
CXCL3	GRO $\gamma$	CXCR2	Inflammatoire
CXCL4	PF-4	Inconnu	Inconnu
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Inconnu
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Inconnu
CXCL7	NAP-2	CXCR2	Inconnu
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Inflammatoire

CXCL9	MIG	CXCR3	Inflammatoire
CXCL10	IP-10	CXCR3	Inflammatoire
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Inflammatoire
CXCL12	SDF-1	CXCR4	Inconnu
CXCL13	BCA-1	CXCR5	Homéostatique
CXCL14	BRAK	Inconnu	Homéostatique
CXCL15	Lungkine	Inconnu	Inconnu
CXCL16	Aucun	CXCR6	Inflammatoire
<b>Famille de Chimioquinas de type CC</b>			
CCL1	I309	CCR8	Inflammatoire
CCL2	MCP-1	CCR2	Inflammatoire
CCL3	Mip-1 $\alpha$	CCR1,CCR5	Inflammatoire
CCL4	Mip-1 $\beta$	CCR5	Inflammatoire
CCL5	RANTES	CCR1,CCR3,CCR5	Inflammatoire
CCL6	C10	Inconnu	Inconnu
CCL7	MCP-3	CCR1,CCR2,CCR3	Inflammatoire
CCL8	MCP-2	CCR3	Inflammatoire
CCL9	Mip-1 $\gamma$	Inconnu	Inconnu
CCL10	Aucun	Inconnu	Inconnu
CCL11	Eotaxin	CCR3	Inflammatoire
CCL12	MCP-5	CCR2	Inconnu
CCL13	MCP-4	CCR2,CCR3	Inflammatoire
CCL14	CC-1	CCR1	Inconnu
CCL15	Leukotactine-1	CCR1,CCR3	Inconnu
CCL16	LEC	CCR1	Inconnu
CCL17	TARC	CCR4	Inflamm., Homéo.
CCL18	PARC	Inconnu	Homéostatique
CCL19	ELC	CCR7	Homéostatique
CCL20	LARC/Mip-3 $\alpha$	CCR6	Inflamm., Homéo.
CCL21	SLC	CR7	Homéostatique
CCL22	MDC	CCR4	Inflamm., Homéo.
CCL23	MPIF-1	CCR1	Inconnu
CCL24	MPIF-2	CCR3	Inflammatoire
CCL25	TECK	CCR9	Homéostatique
CCL26	Éotaxin-3	CCR3	Inflammatoire

CCL27	ESkine	CCR10	Homéostatique
CCL28	MEC	CCR10	Inflamm., Homéo.
<b>Famille des chimiokines de type XC</b>			
CL1	Lymphotactine $\alpha$	XCR1	Inconnu
CL2	Lymphotactine $\beta$	XCR1	Inconnu
<b>Famille des chimiokines de type CX<sub>3</sub>C</b>			
CX3CL1	Fractalkine/ neurotactine	CX3CR1	Inflammatoire

Adapté de Borish et Steike., 2003 et de Laing et Secombes, 2004.

Les chimiokines sont impliquées tant dans le développement et l'homéostasie du système immunitaire que dans le contrôle des réponses inflammatoires mobilisées pour défendre l'organisme contre les pathogènes et pour la réparation des tissus endommagés. Selon le rôle qu'elles accomplissent, il est possible de distinguer les chimiokines possédant une fonction de maintenance du système immunitaire de celles à fonctions pro-inflammatoires. Bien qu'il n'y ait pas de barrière stricte entre ces deux groupes, les gènes des chimiokines de maintenance sont généralement exprimés de manière constitutive et sont souvent essentiels pour l'organisme, tandis que les gènes de chimiokines pro-inflammatoires montrent une grande redondance et leur expression est inductible (Baggiolini, 1998 ; Moser et Loetscher, 2001).

### 3.2.1 Les chimiokines de maintenance

Les chimiokines homéostatiques sont responsables de la distribution spécifique des différentes populations de leucocytes dans les organes lymphoïdes. Elles sont exprimées de manière constitutive afin de fournir un signal permanent dirigeant les cellules dendritiques et des lymphocytes T et B immatures (Rossi et Zlonik, 2000 ; Ansel et Cyster, 2001 ; Ma *et al.*, 1998 ; Moser et Loetscher, 2001 ; Luther et Cyster, 2001).

L'angiogenèse est un processus biologique étroitement contrôlé lors du renouvellement des vaisseaux et de leur réparation, mais qui peut également se trouver associé à des maladies inflammatoires ainsi qu'à la croissance de tumeurs. Les chimiokines CXC exercent un contrôle sur l'angiogenèse par un équilibre entre les chimiokines CXC-ELR, qui sont de puissants facteurs angiogéniques produisant leurs effets par le chimiotactisme des cellules endothéliales, et les chimiokines CXC-non-ELR qui ont des propriétés angiostatiques (Belperio et *al.*, 2000 ; Strieter et *al.*, 1995).

### **3.2.2 Les chimiokines inflammatoires**

Lors des infections microbiennes, les chimiokines sont responsables du recrutement par chimiotactisme des cellules immunitaires telles que les granulocytes, les lymphocytes T et B, les cellules NK (Natural Killer), les monocytes et les cellules dendritiques (Rollins, 1997 ; Rossi et Zionick, 2000). De nombreuses cellules, telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes ou encore les macrophages, sécrètent les chimiokines pro-inflammatoires après une activation par des cytokines ou par des stimuli d'origine microbienne. La direction du mouvement leucocytaire est déterminée par un gradient de chimiokines qui s'étend jusqu'aux vaisseaux sanguins. Les chimiokines peuvent se lier aux groupements GAG (glycoaminoglycane) des protéoglycanes qui forment une couche à la surface des cellules endothéliales (Hoogewerf et *al.*, 1997 ; Koopmann et Krangel, 1997 ; Kuschert, 1997). Il semblerait qu'en s'ancrant aux groupements GAG contenus sur la matrice extracellulaire de l'endothélium, les chimiokines créent une piste qui est suivie par les leucocytes (Ali et *al.*, 2001 ; Kuschert et *al.*, 1999 ; Middleton et *al.*, 2002).

Le prototype de la chimiokine inflammatoire est l'IL-8, une chimiokine de type CXC. C'est l'un des plus puissants chimioattractants pour les neutrophiles (Peveri et *al.*, 1988). L'IL-8 peut être sécrétée suite à une stimulation avec des agents comme le LPS, le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  par les monocytes, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules épithéliales pulmonaires et par les

lymphocytes T activés. (Yoshimura *et al.*, 1987 ; Schröder *et al.*, 1988 ; Bazzoni *et al.*, 1991 ; Gimbrone *et al.*, 1989 ; Strieter *et al.*, 1989 ; Standiford *et al.*, 1990).

### 3.2.3 Les récepteurs de chimiokines

Comme pour plusieurs ligands biologiques, les effets des chimiokines sont médiés par des récepteurs à la surface membranaire faisant partie de la super famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Ces récepteurs englobent environ 5 % de la région codante du génome humain (Fredriksson *et al.*, 2003). Les récepteurs des chimiokines sont de la sous-famille de la classe A des récepteurs « rhodopsin-like ». Ils possèdent une séquence d'environ 350 résidus d'acides aminés, ainsi qu'un motif de 7 régions hydrophobes, qui comparativement à la rhodopsine, pourrait former des hélices transmembranaires et laissant du coup, une région N-terminale extracellulaire et une région C-terminale intracellulaire. À ce jour, 18 récepteurs de chimiokines ont été identifiés, dont 10 de la famille CCRs, 6 CXCRs, et un récepteur solitaire pour les familles CX3CR et XCR1 (Murphy, 2002 ; Murphy *et al.*, 2000). Les chimiokines de type CC activent seulement les récepteurs CC et les chimiokines de type CXC activent seulement les récepteurs CXC. Une exception bien connue est le complexe de récepteurs antigéniques Duffy à la surface des érythrocytes, qui peut se lier à la fois aux chimiokines CC et CXC (Lu *et al.*, 1995). Comme chaque récepteur peut lier plusieurs chimiokines, l'activité de chaque chimiokine sur les récepteurs a un « ordre hiérarchique », qui fait en sorte que certains ligands prévalent sur les autres. Par exemple, les chimiokines CCL11, CCL24 et CCL26 activent tous le récepteur CCR3, mais avec un rang distinct de potentiel d'action CCL11 > CCL24 > CCL26 (Duchesne *et al.*, 2006).

À un moment précis, les leucocytes expriment plusieurs récepteurs de chimiokines et ces récepteurs peuvent être divisés en deux groupes : ceux qui sont exprimés constitutivement par les leucocytes et ceux qui sont induits lors de conditions inflammatoires. Les premiers sont normalement impliqués dans l'homéostasie, comme le CCR7, qui est essentiel pour la population des organes

lymphoïdes secondaires par les leucocytes, tandis que l'autre groupe est important pour le recrutement de certains leucocytes aux sites inflammatoires. Un bon exemple de cela est la différence de disposition des récepteurs de chimiokines à la surface des sous-espèces  $T_H1$  et  $T_H2$  de lymphocytes T après la polarisation, qui permet aux cellules de répondre sélectivement à plusieurs chimiokines (Bonecchi et al., 1998 ; Sallusto et al., 1998). Par contre, cette division entre les types de récepteurs n'est pas absolue, car certains facilitent à la fois la migration basale des leucocytes ainsi que leurs recrutements en milieu inflammatoire. Par exemple, CCR3 médie le recrutement des éosinophiles dans les poumons de souris allergiques et les dirige vers les intestins dans des conditions non inflammatoires (Ma et al., 2002 ; Gurish et al. 2002).

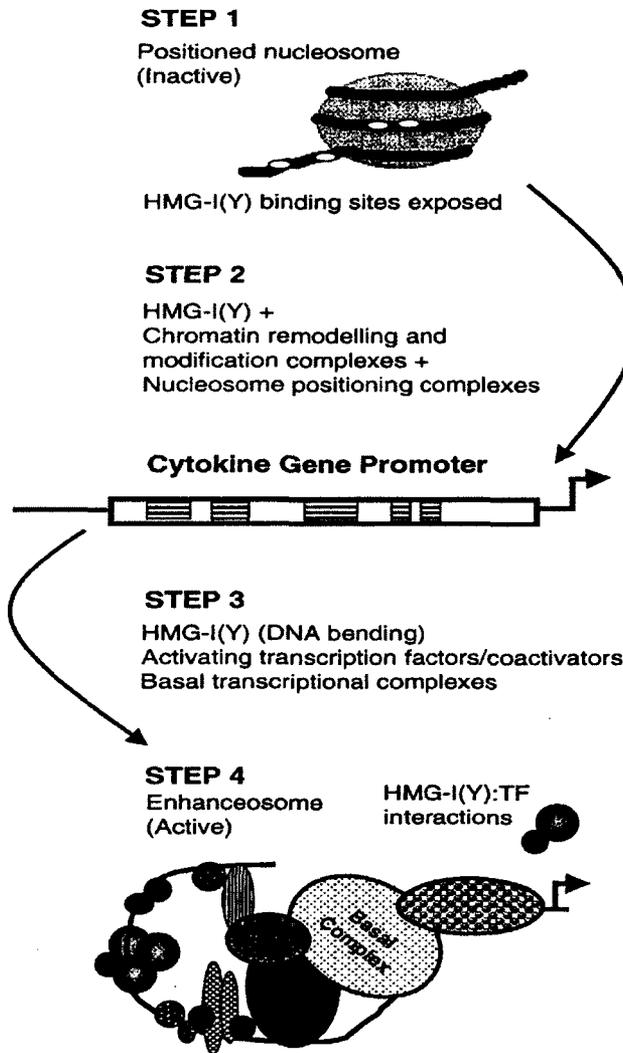
#### **4. Régulation transcriptionnelle des cytokines inflammatoires**

À son niveau le plus fondamental, la chromatine se constitue d'une structure répétée que l'on appelle le nucléosome. Chaque nucléosome contient un cœur de protéines histones (H2A, H2B, H2 et H4 organisés en octamères) à laquelle s'enroule environ 145 bp de la double hélice (Kornberg et Lorch, 1999). Cette structure appelée couramment « collier de perles » est par la suite compactée à un niveau plus élevé, la fibre de chromatine, et enfin en structure de chromosome. Sous sa forme condensée, la chromatine est généralement associée à la répression de la transcription d'où les multiples études sur le remodelage de la chromatine (Wolffe et Guschin, 2000 ; Kadonaga, 1998). Des changements dans la structure de la chromatine peuvent survenir en réponse à des signaux de développement et sont maintenus chez les cellules différenciées. De rapides changements dans la chromatine sont aussi possibles en réponse à des stimuli spécifiques externes. Par contre, dans ce cas, la chromatine revient à son état naturel après le départ du stimulus.

Les complexes de facteurs de transcription s'assemblent sur le promoteur et dans les régions activatrices des gènes, et servent de surfaces de recrutement pour les coactivateurs, les composantes basales de la machinerie transcriptionnelle et le

complexe enzymatique de la polymérase II (Carey, 1998). De plus, l'ordre de recrutement de ces différentes composantes des enhançoosomes est une étape importante (Agalioti et *al.*, 2000). On croit aussi que certains facteurs de transcription peuvent reconnaître leurs sites de fixation à l'ADN dans un contexte où la chromatine empêche la transcription d'un gène spécifique et permettre le recrutement de la machinerie de modification de la chromatine afin d'activer la transcription (Cosma et *al.*, 1999 ; Peterson et Workman, 2000).

Les gènes de cytokines sont habituellement exprimés rapidement suite à une stimulation. Afin de permettre aux différentes cellules d'exprimer rapidement les cytokines, des protéines de la famille HMGI(Y) (high-mobility group I(Y)) participent à la fois au remodelage de la chromatine et au recrutement de l'enhancoosome (Bustin et Reeves, 1996 ; Bustin, 1999) (voir figure 3).



**Figure 3. Modèle de régulation de la transcription.** Un modèle de la fonction de HMGI(Y) dans l'activation d'un promoteur de gènes de cytokines. Les rôles possibles de HMGI(Y) sont divisés en quatre étapes, soulignant le rôle individuel de HMGI(Y) dans chacune d'elles. Les sites de liaisons de HMGI(Y) sont représentés par des cercles blancs dans le nucléosome (étape 1) et par des barres lignées sur le diagramme linéaire (étapes 2). La protéine HMGI(Y) est représentée par un cercle noir dans la structure de l'enhanceosome (étape 4). Les autres cercles représentent les facteurs de transcription, les coactivateurs et la machinerie basale pour la transcription. Le modèle de la HMGI(Y) représente bien les deux niveaux de régulation de la transcription (Shannon et *al.*, 2001)

L'ADN lui-même peut être modifié par l'addition covalente d'un groupement méthyle sur la cytosine d'un dinucléotide CpG, catalysé par des ADN méthyles transférases. Environ 40 % des gènes contiennent des régions riches en dinucléotides CpG en amont du départ transcriptionnel, et on retrouve 70 % à 80 % de tous les dinucléotides CpG sous forme méthylés dans le génome humain (Bird, 2002). La méthylation est considérée comme un marqueur épigénétique stable qui est maintenu dans les cellules somatiques par l'ADN méthyltransférase I (DNMT I) avec la participation de DNMT3a et DNMT3b (Miranda et Jones, 2007 ; Delcuve et *al.*, 2009). La méthylation de l'ADN est généralement impliquée dans le « silencing » des gènes et peut réprimer leur expression directement en bloquant l'accès des facteurs de transcription à l'ADN (Li, 2002). L'ADN peut aussi être déméthylé comme dans le

cas du promoteur de l'IL-2 qui devient déméthylé 20 minutes suite à une stimulation (Bruniquel et Scharz, 2003 ; Ooi et Bestor, 2008). Les motifs de méthylation dans la plupart des types cellulaires résultent d'un équilibre des activités de méthylation (méthyltransférases) et de déméthylation (déméthylases) (Delcuve et al. 2009).

#### 4.1 Remodelage de la chromatine

Dans le noyau, les gènes de cytokines sont situés au plus bas niveau d'organisation de la chromatine et les récentes études démontrent que l'état d'arrangement de la chromatine, s'il est permissif ou non à la transcription, joue un rôle important sur le mécanisme de régulation de l'expression des gènes inductibles. L'altération de la structure de la chromatine peut être mesurée par l'hypersensibilité de l'ADN à la DNaseI (DH) et on en détecte suite à l'activation de plusieurs gènes de cytokines. Par exemple, il y a induction de site DH observé à 3 kb en amont du promoteur de *GM-CSF* et à 14 kb du promoteur de *l'IL-3* (Cockerill et al., 1993 ; Duncliffe et al., 1997). Il est à noter que le site DH de *l'IL-3* est seulement inductible dans les cellules T, le site DH du *GM-CSF* est quant à lui inductible dans toutes les cellules qui expriment du GM-CSF et dans le cas des deux gènes leurs sites DH contiennent des sites de liaison connus de facteurs de transcription. Plusieurs autres gènes de cytokines ont des sites inductibles à la DH, comme *l'IL-4*, *l'IL-13*, *l'IL-8* et *l'IL-6* nous portent ainsi à croire que la majorité des gènes de cytokines inductibles sont contrôlés par un remodelage de la chromatine (Monticelli et al., 2005 ; Nakamura et al., 1991 ; Armenante et al., 1999).

Il existe plusieurs types de modifications post-traductionnelles des histones incluant la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la phosphorylation et la sumoylation (Kouzarides, 2007). La plupart de ces modifications sont retrouvées sur les queues N- et C- terminales. Tandis que plusieurs sont associées avec une structure active de la chromatine, certaines autres sont plutôt répressives. Le patron combinatoire de modifications des histones est perçu par la cellule comme un code épigénétique complexe. Pour simplifier la complexité du code, on discutera ici des

deux modifications les plus importantes pour la chromatine, soit la méthylation et l'acétylation.

L'acétylation des histones est la modification la plus répandue et la mieux comprise. Par procédé spécifique, les résidus lysines (K) 9 et 14 sont acétylés par des enzymes appelés histones acétyltransférases (HATs) qui catalysent l'attachement d'un groupement acétyle. Les histones deacétylases (HDACs) sont des enzymes qui enlèvent ces groupements acétyles et agissent en concert avec les HATs pour maintenir un état d'équilibre (Munshi et *al.*, 2009 ; Min-Hao Kuo, 1998 ; Roth et *al.*, 2001).

La méthylation des histones est une forme beaucoup plus stable que l'acétylation (Berger, 2007) et compte parmi les modifications les moins bien comprises. L'histone la plus soumise à la méthylation est l'histone H3 suivie par l'histone H4 (Munshi et *al.*, 2009). Elle survient sur les résidus lysine (K) 4,9,27 et 36 sur l'histone H3 et en position 20 sur l'histone H4. La stabilité de la méthylation donne une marque épigénétique idéale pour la maintenance à long terme de l'état de la chromatine (Jenuwein et Allis, 2001). Les histones méthyltransférases (HMTs) sont les enzymes qui catalysent cette réaction. Elles reconnaissent les sites spécifiques des résidus lysines à méthyler, grâce à une région conservée de 130 acides aminés appelés domaine-SET (Jenuwein, 2001).

L'hyperacétylation des histones de concert avec une di- ou tri- méthylation du résidu K4 sur l'H3 (H3K4Me<sub>2</sub>, K4Me<sub>3</sub>) est généralement associée avec une décondensation de la chromatine, l'augmentation de l'accessibilité de l'ADN aux protéines d'encrage et à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle. En revanche, l'hypoacétylation et les méthylation H3K9Me<sub>2/3</sub> et H3K27Me<sub>3</sub> constituent des marques de répressions qui contribuent à la condensation de la chromatine et à l'arrêt de la transcription (Li, 2002 ; Cosgrove et *al.*, 2004, Cosgrove et Wolberger, 2005 ; Peterson et Laniel, 2004 ; Sims et Reinberg, 2006).

Dans le cadre de la régulation épigénétique des gènes de cytokines, la production de cytokines par des cellules du système immunitaire est sous la régulation du statut d'acétylation de leurs promoteurs (yao et *al.*, 2005 ; Zhang et *al.*, 2006). Il semblerait que l'implication des HDACs dans la régulation des cytokines ne

soit pas restreinte à une classe ou un sous-type de cytokines. En fait, les HDACs semblent participer dans la régulation des cytokines pro- et anti-inflammatoire. Le tableau 2 présente un sommaire des connaissances actuelles concernant la régulation des cytokines par les HDACs et des protéines permettant le recrutement des HDACs à des séquences spécifiques d'ADN.

**Tableau 2. HDACs et la régulation des cytokines.**

<b>HDAC</b>	<b>Cible Protéique</b>	<b>Cible génétique</b>	<b>Référence</b>
HDAC1	Sp1	<i>IL-1</i>	Enya <i>et al.</i> (2008)
HDAC7, 9	FOXP3	<i>IL-2</i>	Li <i>et al.</i> (2007)
HDAC1	ZEB1	<i>IL-2</i>	Wang <i>et al.</i> (2009)
HDAC1	—	<i>IL-12</i>	Lu <i>et al.</i> (2005)
HDAC1	GR	<i>IL-5</i>	Jee <i>et al.</i> (2005)
HDAC5	—	<i>IL-8</i>	Schmeck <i>et al.</i> (2008)
HDAC2	GR	<i>GM-CSF</i>	Ito <i>et al.</i> (2000)
HDAC1, 6, 8	—	<i>IFN-β</i>	Nusinzon et Horvath (2006)
HDAC1, 2	Sin3A	<i>Ifng</i>	Chang <i>et al.</i> (2008)
HDAC11	—	<i>IL-10</i>	Villagra <i>et al.</i> (2009)
HDAC1, 2, 3	—	<i>IL-4</i>	Valapour <i>et al.</i> (2002)
HDAC3	Pro-IL-16	<i>Skp2</i>	Zhang <i>et al.</i> (2008)
HDAC1	STAT5, C/EBPβ	<i>Id-1</i>	Xu <i>et al.</i> (2003)
HDAC3	STAT3	STAT3 target genes	Togi <i>et al.</i> (2009)
HDAC1, 2, 3	STAT3	STAT3 target genes	Yuan <i>et al.</i> (2005)
HDAC3	STAT1	STAT1 target genes	Krämer <i>et al.</i> (2009)
HDAC3, 4, 5	GATA-1	GATA-1 target genes	Watamoto <i>et al.</i> (2003)
HDAC3, 5	GATA-3	GATA-3 target genes	Chen <i>et al.</i> (2006)
HDAC3	GATA-2	GATA-2 target genes	Ozawa <i>et al.</i> (2001)
HDAC3	NF-κb	NF-κb target genes	Chen <i>et al.</i> (2001)

Adapté de Villagra et al. 2010.

#### **4.2 Les facteurs de transcription et l'enhanceosome**

L'expression contrôlée des gènes des cytokines et des chimiokines est une composante essentielle de la réponse immune. La nature des cytokines et des chimiokines produites, aussi bien que le temps et le lieu de leur production, sont des facteurs très importants dans l'établissement d'une réponse immune appropriée. L'expression aberrante de ces médiateurs est souvent associée à des conditions pathologiques, telles l'auto-immunité, l'atopie et l'inflammation chronique (Szekanecz et *al.*, 2003 ; Renauld, 2001 ; Godessart et Kunkel, 2001 ; Scapini et *al.*, 2000 ; Cassatella, 1999).

Dans le contexte de l'immunité innée et de l'inflammation, la reconnaissance des agents infectieux ainsi que différents stimuli inflammatoires, est un prélude à l'induction génique des cytokines et des chimiokines. On appelle signaux de danger les divers stimuli pouvant activer la sécrétion de cytokines. Ces signaux de danger peuvent être de diverses origines – bactérienne, virale, et même humaine lorsque le corps se sent agressé. Il existe différents récepteurs, spécifiques ou non, à la surface des cellules capables de percevoir les signaux de danger. Pour les molécules d'origine bactérienne et virale, les cellules sont munies de récepteurs de type toll-like, qui reconnaissent les motifs associés aux pathogènes (PAMPs), et pour les signaux venant du soi, ils sont reconnus par des récepteurs plus spécifiques. Tous ces récepteurs mènent à l'induction de la production de cytokines et chimiokines via l'activation de sentiers de signalisation spécifiques (Janeway et Medzhitov, 2002).

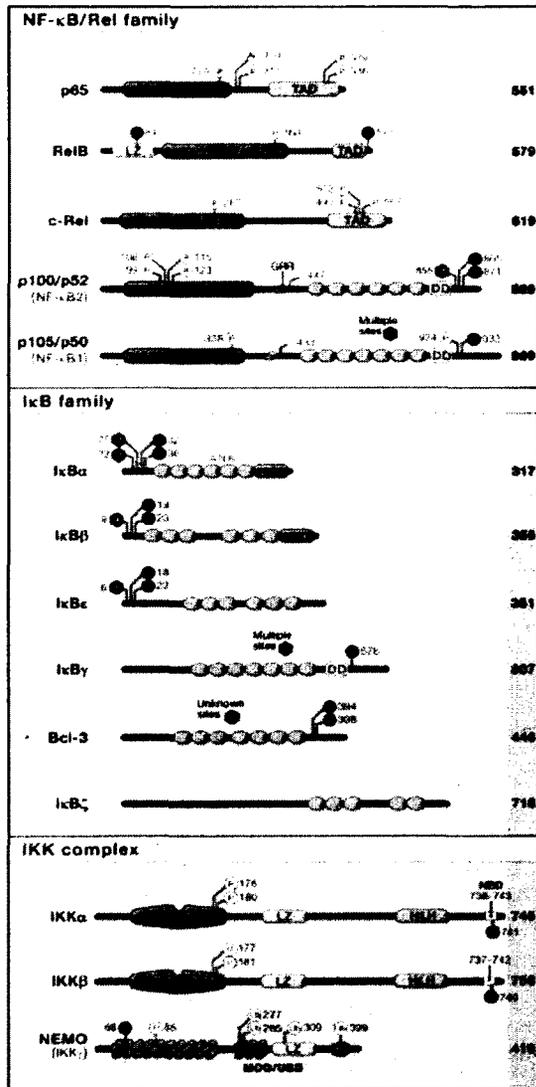
La modulation de l'expression génique se fait à plusieurs niveaux, la transcription, l'épissage alternatif des ARNm, la stabilité des ARNm et la traduction en protéine. Parmi ceux-ci, la transcription semble l'étape déterminante (Escoubet Lozach et *al.*, 2002). En plus des récepteurs, la transcription génique implique la participation de diverses protéines cellulaires : des kinases, des phosphatases, des coactivateurs et des répresseurs transcriptionnels, des protéines d'échafaudage, des facteurs de transcription et l'ARN polymérase II (Brivanlou et Darnell, 2002). Sous

l'action de signaux reçus par la cellule, il y aura induction et recrutement de divers coactivateurs qui participeront au remodelage de la chromatine qui permettra ainsi l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle, c'est-à-dire les divers facteurs de transcription qui recrutent à leur tour l'ARN polymérase II (Couray et Jia, 2001 ; Torchia et *al.*, 1998). Cet ensemble de protéines avec la participation de protéines architecturales et les séquences activatrices spécifiques sur l'ADN forment un complexe nommé enhanceosome (Merika et Thanos, 2001 ; Panne, 2008). En ce qui concerne l'expression inductible des cytokines et des chimiokines, les facteurs de transcription spécifiques NFκB, AP-1, STAT, C/EBP et CREB sont connus pour participer à la formation de l'enhanceosome. De ceux-ci, le facteur NFκB est le plus important (Holloway et *al.*, 2002). Dans les prochaines sections, les facteurs de transcription NFκB, AP-1, C/EBP et CREB ainsi que leurs mécanismes d'activation seront présentés dans le contexte de l'expression des cytokines et des chimiokines.

#### **4.2.1 Le facteur transcriptionnel NFκB**

Chez les mammifères, la famille NF-κB est constituée de cinq membres : NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), RelA (p65), RelB et c-Rel tous présentés à la figure 4. NF-κB1 et NF-κB2 sont synthétisés sous forme de larges précurseurs, p105 et p100, qui par des procédés post traductionnels deviennent les sous-unités p50 et p52 respectivement. Tous les membres de la famille NF-κB contiennent un domaine d'homologie à Rel (RHD) contenant la séquence de localisation au noyau (NLS) qui est impliquée dans la dimérisation, l'ancrage à une séquence spécifique de l'ADN et l'interaction avec les protéines inhibitrices IκB (Ghosh et *al.*, 1998). Par contre, p50 et p52 ne possèdent aucun domaine d'activation de la transcription, contrairement à RelA, RelB et c-Rel. Les protéines NF-κB forment de nombreux homo- et hétéro-dimères qui sont associés à des réponses biologiques spécifiques et ils régulent la transcription des gènes cibles. Par exemple, les homodimères de p50 ou p52 ont des fonctions de répresseur, tandis que les dimères qui contiennent Rel-A ou c-Rel sont des activateurs de la transcription. RelB démontre une plus grande flexibilité dans son rôle régulateur et peut être à la fois un activateur et un suppresseur (Ryseck et

*al.*, 1992 ; Ruben *et al.*, 1992). RelB ne fait aucun homodimère, mais forme des hétérodimères stables avec p50 et p52.

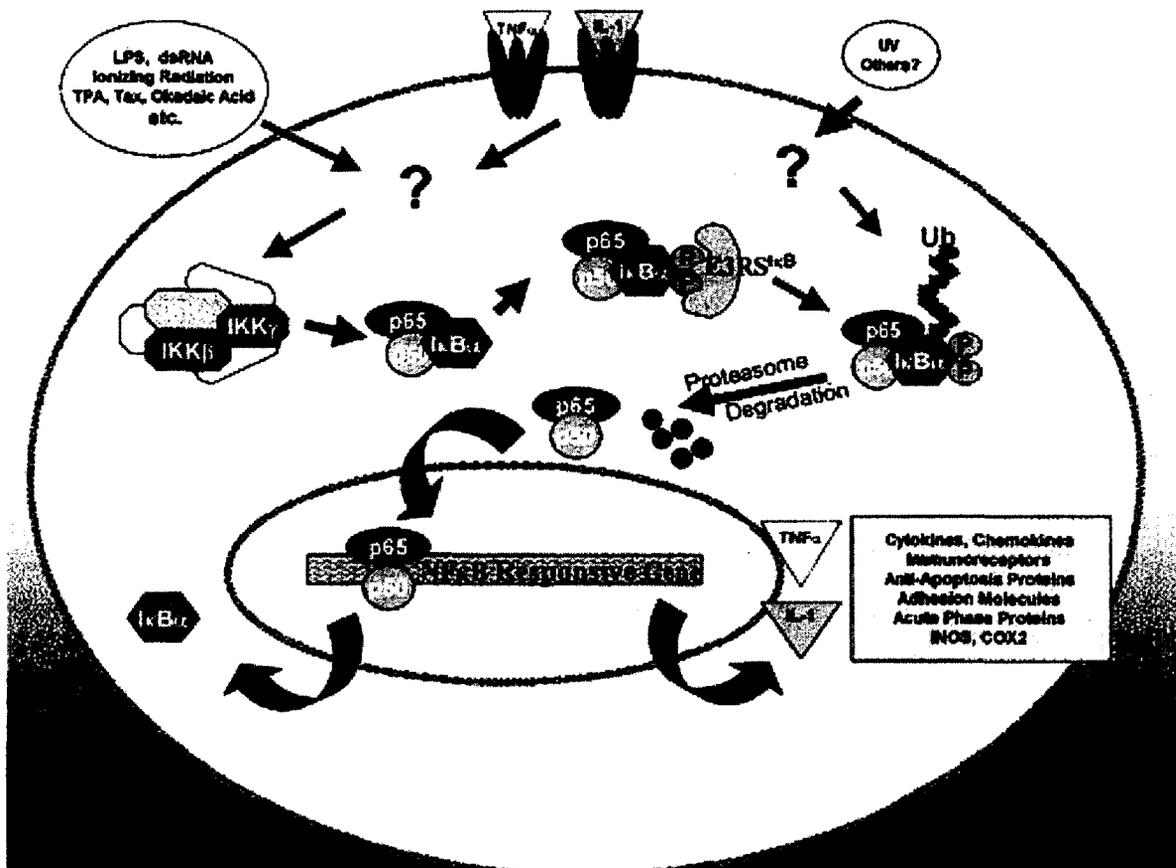


**Figure 4. La famille NF-κB, IKK et IκB.**

Les protéines membres de la famille NF-κB, IκB et IKK sont montrées ici. Le nombre d'acides aminés dans chaque protéine humaine est indiqué sur la droite. Les modifications postranscriptionnelles qui influencent l'activité des protéines ou leurs activations, sont indiquées par P, U ou Ac pour la phosphorylation, l'ubiquitination ou l'acétylation, respectivement. Les sites de phosphorylations et d'ubiquitination qui médie la dégradation protéasomale sont indiqués par des Ps et Ubs rouge. RHD, Domaine d'homologie à Rel ; TAD, domaine de transactivation ; LZ, domaine leucine zipper ; GRR, région riche en glycine ; HLH, domaine hélice-loop-hélice ; Z, domaine à doigt de zinc ; CC1/2, domaines coiled-coiled ; NBD, domaine de liaison à NEMO ; MOD/UBD, domaine d'oligomérisation minimum et domaine de liaison à l'ubiquitine ; DD, domaine de mort (Hayden et Gosh, 2008)

Dans la majorité des types cellulaires, les dimères de NF-κB sont maintenus dans le cytoplasme par les IκBs, une famille d'inhibiteurs spécifiques se liant au RHD et interférant avec le signal de localisation au noyau. Ces protéines qui comprennent IκBα, IκBβ et IκBγ, contiennent de six à sept domaines de répétition ankyrine qui permettent la liaison au RHD. Ces domaines ankyrines sont aussi présents sur la queue C- terminal de p100 et p105, ils fonctionnent comme les IκBs et retiennent leurs partenaires Rel au cytoplasme (Mercurio *et al.* 1993).

La voie de signalisation principale menant à la translocation des dimères de NF- $\kappa$ B au noyau est illustrée à la figure 5. Les cytokines pro-inflammatoires ainsi que les motifs associés aux pathogènes (PAMPs), stimulent différents récepteurs comme le récepteur du TNF (TNFR), les récepteurs de type Toll-like (TLR) et les récepteurs de la super famille de l'interleukines-1 (IL-1R), causant l'activation du complexe I $\kappa$ B kinase (IKK). La forme la plus commune est composée des deux sous-unités catalytiques IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , ainsi que d'une sous-unité régulatrice IKK $\gamma$  aussi connue sous le nom de NEMO. Lorsque le complexe IKK est activé, il catalyse la phosphorylation des I $\kappa$ Bs (sur les sérines 32 et 36 pour I $\kappa$ B $\alpha$ ), la polyubiquitination (sur les lysines 21 et 22 pour I $\kappa$ B $\alpha$ ) menant ainsi à la dégradation des I $\kappa$ B par le protéasome 26S. La relâche des dimères de NF- $\kappa$ B (dans ce cas le plus commun est le dimère composé de p50 et RelA) permet le transport jusqu'au noyau, la liaison à l'ADN et l'activation de la transcription des gènes (Ghosh et Karin, 2002).



**Figure 5. Mécanismes d'activation du NFκB**

Plusieurs stimuli, incluant les cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1, activent les IKK via l'action de composantes plus ou moins connues. Une fois activé, IKK phosphoryle IκB, mène à sa reconnaissance par E3RS<sup>IκB</sup>, laquelle effectue la polyubiquitination d'IκB. Cela cible IκB pour une dégranulation rapide par le protéasome 26S. La dégradation d'IκB permet l'exposition de la séquence de localisation nucléaire de NF-κB résultant en sa translocation au noyau. Dans le noyau, NF-κB régule la transcription de gènes cibles, incluant IκB, lequel termine l'activité NF-κB. Quelques gènes cibles de NF-κB codent pour des médiateurs inflammatoires, tels que TNFα et IL-1 et bien sûr des chimiokines, lesquelles mènent au recrutement de cellules additionnelles afin de poursuivre la réponse inflammatoire (Karin et Ben-Neriah., 2000)

Les gènes du TNF-α, de l'IL-1 α/β, de l'IL-1ra, de IL-12, de l'IL-8 de Groα, de IP-1β, d'IP-10 et de MIP-3α sont des exemples de cytokines et de chimiokines sous le contrôle de NFκB. (Pahl, 1999 ; Sugita et al., 2002).

#### 4.2.2 Le facteur transcriptionnel AP-1

Depuis sa découverte en 1987, le facteur de transcription AP-1 a été étudié intensivement afin d'élucider le rôle de chacune de ses composantes dans la prolifération et la transformation. Par contre, on a par la suite établi que le facteur AP-1 affecte aussi l'inflammation, la différenciation, l'apoptose, la migration cellulaire et la guérison des blessures (Lee et al., 1987 ; Hess et al., 2004 ; Shaulian et Karin, 2002 ; Wagner et Eferi, 2005).

Le facteur AP-1 est dimérique et contient des protéines de plusieurs familles qui ont en commun un domaine « basic leucine zipper » (bZIP) essentiel pour la dimérisation et l'ancrage à l'ADN. Les protéines majoritaires de AP-1 sont les sous-familles Jun(c-Jun, JunB et JunD) et Fos (c-Fos, FosB, Fra1 et Fra2). D'autres protéines qui sont des composantes de AP-1 font partie des facteurs ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JPD1 et JPD2). Enfin, le dernier groupe appartenant à AP-1 qui est aussi moins étudié est la sous-famille Maf(c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K et Nrl) (Eychene et al., 2008).

Les différentes combinaisons de protéines de la famille AP-1 déterminent à la fois sa spécificité d'ancrage et son affinité pour différents gènes (Hess, et al., 2004). Les protéines Jun peuvent donner à la fois des homo- ou des hétérodimères, tandis que les protéines Fos peuvent seulement se dimériser avec les protéines Jun pour s'ancrer à l'ADN. Les hétérodimères Jun-Fos se lient préférentiellement à une séquence consensus héptamérique connue comme l'élément de réponse à TPA (TRE) (5'-TGA(C/G)TCA-3'), tandis que les dimères Jun-ATF se lient avec une plus grande affinité à une autre séquence consensus connue sous le nom d'élément de réponse à l'AMP cyclique (CRE) (5'-TGACGTCA-3'). Les séquences auxquelles AP-1 se lie diffèrent selon les interactions avec d'autres protéines comme NFAT ou des protéines des familles Ets et Smad (Chinenov et Kerppola, 2001).

En plus de sa faculté à former différents dimères, la protéine AP-1 est régulée à des niveaux post-traductionnels. Plusieurs cascades de signalisation des MAP kinases (MAPK) ont démontré une participation dans la régulation de AP-1 (Shaulian et Karin, 2002). La MAPK prédominante dans l'activité de Jun est JNK, qui

est activée par différents facteurs incluant les hormones, les cytokines, les facteurs de croissance, les dérégulations dans l'expression des oncogènes et par une variété de stress génotoxiques comme les radiations UV. Trois gènes distincts (JNK 1,2, 3) sont soumis à l'épissage alternatif pour former une dizaine d'isoformes de JNK (Gupta et *al.*, 1996). JNK1 et JNK2 sont exprimées de façon ubiquitaire, tandis que JNK3 est exprimée principalement au cerveau et, à un plus faible niveau, au cœur et aux testicules. JNK se lie à c-Jun et phosphoryle deux résidus sérines (Ser 63/73) et thréonines (Thr 91/93) (Derijard et *al.*, 1994 ; Hibi et *al.*, 1993 ; Morton et *al.*, 2003). En plus, il est démontré que JNK peut aussi phosphoryler JunD malgré le fait qu'il ne possède aucun site d'ancrage pour JNK (Kallunki et *al.*, 1996). L'habilité de JNK à phosphoryler JunB est plus controversée (Kallunki et *al.*, 1996 ; Li et *al.*, 1999).

L'expression génique de plusieurs cytokines et chimiokines est sous le contrôle partiel du facteur de transcription AP-1. Des exemples sont l'IL-8, IL-1 $\beta$ , l'IL-1ra, le TNF- $\alpha$ , MCP-1, l'IL-6, le GM-CSF, RANTES et MIP-1 $\beta$  (Yasumoto et *al.*, 1992 ; Smith et *al.*, 1992 ; Hurme et Matikainen, 1993 ; Sung et *al.* 1991 ; Proffitt et *al.*, 1995).

#### **4.2.3 Les facteurs de transcription C/EBP**

La première protéine C/EBP a été identifiée comme un facteur stable à la chaleur et capable d'interagir avec la séquence CCAAT présente dans plusieurs promoteurs de gènes (Johnson et McKnight, 1989). Le gène de C/EBP a été cloné en 1988 et ces études ont permis de découvrir le domaine bZIP permettant l'ancrage à l'ADN et la dimérisation (Landschulz et *al.*, 1988 ; Landshultz et *al.*, 1989). En 1992, on compte cinq autres membres de la famille C/EBP, qui contiennent tous des domaines bZIP à leurs queues C-terminal (Akira et *al.*, 1990 ; Poli et *al.*, 1990 ; Descombes et *al.*, 1990 ; Chang et *al.*, 1990 ; Roman et *al.*, 1990 ; Cao et *al.*, 1991 ; Williams et *al.*, 1991 ; Ron et Habener, 1992). Depuis, les fonctions de la famille C/EBP ont été bien étudiées et on les considère désormais comme des facteurs clé pour plusieurs réponses dont la croissance cellulaire, la différenciation, la réponse immune et l'inflammation.

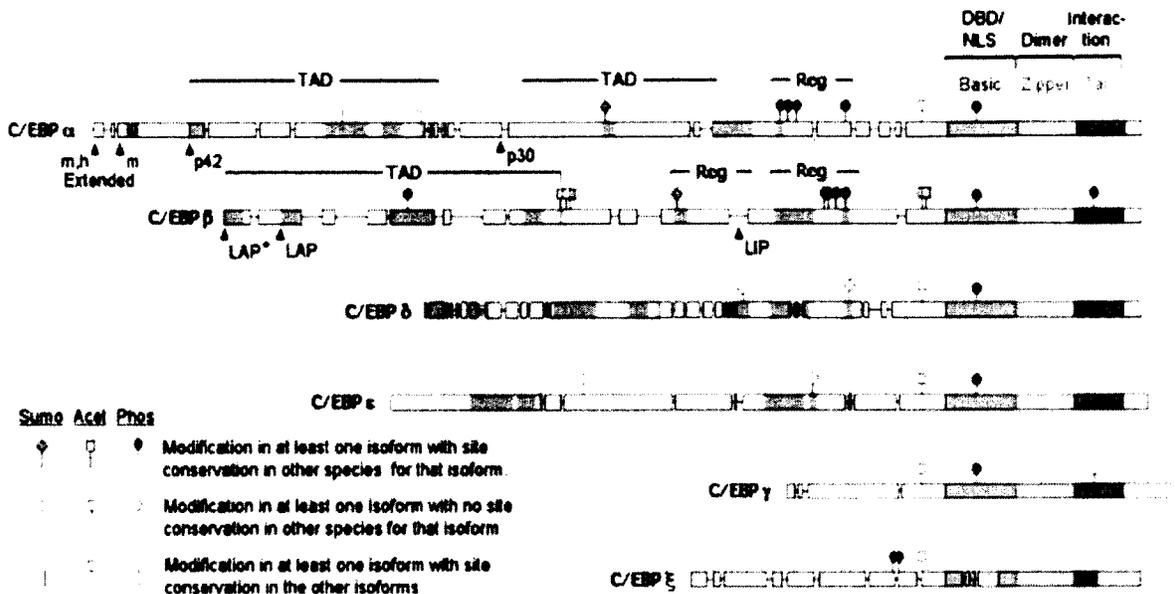
Les six membres de la famille C/EBP étaient nommés selon le laboratoire qui avait fait sa découverte. Afin d'éviter la confusion, on a adopté une nomenclature systématique (tableau 3) (Cao et *al.*, 1991).

**Tableau 3. Nomenclature de la famille C/EBP**

Nom	Noms Alternatifs
C/EBP $\alpha$	p42, p30
C/EBP $\beta$	NF-IL6, LAP*, LAP, LIP, CRP2, IL-6DBP, C/EBP $\beta$ 1, C/EBP $\beta$ 2
C/EBP $\gamma$	Ig/EBP
C/EBP $\delta$	NF-IL6 $\beta$ , CRP3
C/EBP $\epsilon$	CRP1
C/EBP $\zeta$	CHOP, GADD153, DDIT3

Adapté de Tsukada et *al.*, 2011.

Tous les membres de la famille C/EBP partagent une séquence identique (>90 %) dans les acides aminés 55-88 en C-terminal, et contiennent le domaine bZIP (voir figure 6). Le « zipper » leucine (en vert) permet la dimérisation du facteur de transcription. Cette séquence est adjacente à une région basique qui constitue aussi le domaine de liaison à l'ADN (DBD) (Landschulz et *al.*, 1989). Le DBD sert aussi de séquence de localisation au noyau (LaCasse et Lefebvre, 1995 ; Williams et *al.*, 1997). Un domaine additionnel a été récemment identifié et s'associe avec plusieurs modules bZIP (Petosa et *al.*, 2006). Ce domaine, une extension du domaine de dimérisation, agit comme un motif d'interaction protéine-protéine pour diverses associations qui médient soit la transactivation ou la répression de gènes (Tahirov et *al.*, 2002 ; Listman et *al.*, 2005). Toutes les isoformes de C/EBP possèdent cette séquence en N-terminal. En plus de pouvoir former des homodimères, les C/EBPs peuvent aussi se dimériser avec des membres de la famille CREB/ATF, augmentant ainsi le nombre de sites de liaison à l'ADN (Kohler et *al.*, 1999).



### Figure 6. Les membres de la famille C/EBP

Les six isoformes gène-spécifiques de C/EBP sont présentées par un graphique linéaire qui montre les homologies entre les espèces pour chacun des isoformes (boîtes ouvertes) tout comme les régions conservées entre isoformes (régions roses interconnectées par des lignes). L'homologie de la région bZIP n'est pas montrée, mais est généralement hautement conservée (à l'exception des modifications associées au DBD basique de C/EBPζ). Les modifications post traductionnelles sont indiquées par les figures de la légende. Les flèches indiquent des sites alternatifs de début de la transcription. Les lettres m et h désignent les sites murins- ou humains- d'initiation de la transcription donnant à la protéine C/EBPα un site de localisation au noyau (zone ombragée bleue) (Tsukada et *al.*, 2011).

Les facteurs C/EBP peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, l'acétylation et la sumoylation, qui peuvent affecter leur activité ainsi que leur localisation. En général, la phosphorylation joue un rôle positif pour C/EBPα/β, même si dans certaines circonstances elle inhibe C/EBPα (Ross et *al.*, 2005 ; Radomska et *al.*, 2006). La sumoylation a des effets inhibiteurs sur C/EBPα et C/EBPβ et les sites de sumoylation sont aussi présents chez les isoformes γ et δ. L'acétylation de C/EBPβ agit sur son association avec des corégulateurs comme les HDACs et peut avoir des effets activateurs autant que répresseurs (Nerlov, 2008 ; Khanna-Gupta, 2008). Plusieurs kinases sont responsables de la phosphorylation des différents membres de la famille C/EBP. La protéine caséine kinase (CK) II médie la phosphorylation de

C/EBP $\delta$  et augmente ainsi son affinité à l'ADN (Osada et *al.*, 1996). Par contre, la phosphorylation du site DBD de C/EBP $\alpha$  provoque l'effet contraire (Mahoney et *al.*, 1992 ; Trautwein et *al.*, 1994). La MAPK ERK peut aussi phosphoryler C/EBP $\alpha$  et inhiber la différenciation myéloïde induite par ce facteur en faveur du développement de monocyte (Ross et *al.*, 2005). Il a été démontré que la MAPK p38 phosphoryle la Thr73 sur C/EBP $\epsilon$  et augmente son interaction avec NF- $\kappa$ B et son ancrage à l'ADN (Chumakov et *al.*, 2007). La phosphorylation de C/EBP $\beta$  sur la Thr 235 par la MAPK ERK2 est déterminante pour sa capacité de transactivation (Hanlon et *al.*, 2001 ; Nakajima et *al.*, 1993). Chez le neutrophile, cette phosphorylation est extrêmement importante pour l'induction des gènes inflammatoires (Cloutier et *al.*, 2009).

Des études ont démontré l'importance de la famille C/EBP dans la transcription de gènes de cytokines. Ils ont entre autres trouvé des séquences d'ancrage pour les C/EBPs dans les sites d'initiation de la transcription des gènes codant pour l'INF- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 (p40), MCP-1, Mip-1 $\alpha$ , Mib-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Poli, 1998).

#### **4.2.4 Le facteur transcriptionnel CREB**

Les facteurs de transcription CREB répondent à l'augmentation d'AMP cyclique ; leur famille comprend les facteurs CREB, CREM et ATF-1. Ces facteurs comportent des composantes structurales spécifiques dont un domaine de transactivation qui consiste en un domaine inductible par kinase (KID) et un domaine constitutivement actif riche en glutamine (Q2). Tous les membres de la famille CREB possèdent aussi un domaine bZIP en C-terminal et se lient à l'ADN à la séquence CRE par une dimérisation par le « zipper » leucine. La séquence cible CRE existe sous deux formes, une complète (5'-TGACGTCA-3') et une moins active à demi complète (5'-CGTCA-3') (Shaywitz et Greenberg, 1999 ; Mayr et Montminy, 2001 ; Sakamoto et Frank, 2009).

CREB est l'un des facteurs de transcription dépendant de la phosphorylation les plus étudiés. Plusieurs kinases sérine-thréonine différentes sont connues pour

promouvoir la phosphorylation de CREB à son site d'activation de la transcription, la sérine 133. Parmi celles-ci, on retrouve la protéine kinase A dépendante de l'AMP cyclique (PKA), la protéine kinase C (PKC ; incluant PKC $\epsilon$ ), des calmoduline kinases (CaMKs ; e.g. CAMK-IV) qui répondent aux flux de calcium provenant de l'environnement extracellulaire, mais aussi des réserves intracellulaires et la kinase du ribosome S6 pp90 (pp90 RSK) (Brindle et *al.*, 1993 ; Enslin et *al.*, 1995 ; Gubina et *al.*, 2001). Une fois la sérine 133 de CREB phosphorylée, CREB peut interagir avec deux coactivateurs pour initier la transcription, CBP et p300. Ces derniers sont aussi des cofacteurs pour d'autres facteurs de transcription, et aident la modulation de la transcription par l'acétylation des histones et le recrutement de différents facteurs pour la polymérisation de l'ARN (Shaywitz et Greenberg, 1999 ; Mayr et Montminy, 2001 ; Sakamoto et Frank, 2009).

En 2004, une analyse du génome entier des cellules PC12 de rat a identifié tous les gènes qui sont des cibles de CREB, nommé le *regulon* de CREB. Cette analyse a permis de confirmer les cibles déjà connues et d'en identifier de nouvelles regroupées dans les catégories suivantes : des facteurs de transcription, des molécules de signalisation, des molécules associées aux neurones, des facteurs métaboliques et des facteurs impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération (Impey et *al.*, 2004). Ces nombreuses cibles ont permis d'expliquer l'implication de CREB dans de nombreux procédés cellulaires comme la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, la réponse adaptative, l'homéostasie du glucose, la spermatogénèse, le rythme circadien et la plasticité synaptique (Mayr et Montminy, 2001). Par contre, étant donné que cette étude a été réalisée sur des cellules provenant d'une lignée de phéochromocytomes de rats, la liste des cibles de CREB ne reflète peut-être pas le comportement de CREB dans tous les types cellulaires. De plus, CREB s'est révélé impliqué dans l'induction de la transcription de gènes en relation avec le système immunitaire qui possèdent une séquence CRE. Cette liste inclut l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10, le TNF- $\alpha$ , Mip-1 $\alpha$  et Mip-1 $\beta$  (Brenner et *al.*, 2003 ; Hughes-Fulford et *al.*, 2005 ; Jaramillo et Olivier, 2002).

## 5. Le neutrophile humain

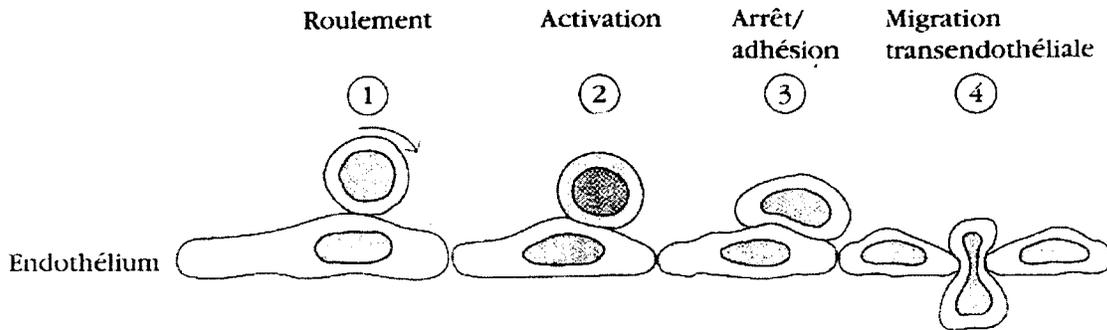
Le neutrophile, aussi fréquemment nommé leucocyte polymorphonucléaire (PMN), a été décrit pour la première fois par Paul Ehrlich au début des années 1900 (Ehrlich et *al.*, 1900). Ce sont des cellules de 12 à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre et elles sont caractérisées par un noyau polylobé et de nombreuses granules cytoplasmiques. Représentant 50 % à 70 % des globules blancs totaux dans le sang, il est le leucocyte le plus abondant dans la circulation sanguine (Goldsby et *al.*, 2001). Dans la sous-famille des granulocytes, les neutrophiles sont les plus nombreux, constituant à eux seuls plus de 95 % de cette population cellulaire, tandis que les éosinophiles et les basophiles représentent respectivement environ 4 % et 1 % de cette classe (Goldsby et *al.*, 2001). Le PMN est un constituant très important pour l'immunité innée, et surtout pour la réaction inflammatoire, car il est le premier leucocyte à migrer, en très grand nombre, vers le site enflammé (Skubitz, 2003 ; Theilgaard-Mönch et *al.*, 2005). De plus, il possède des moyens très efficaces pour éliminer l'invasion de l'organisme par des micro-organismes.

Comme les autres cellules du système immunitaire, le neutrophile est formé dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique. Selon les concentrations et les facteurs de croissance qui l'influencent, cette cellule peut se différencier et devenir une cellule progénitrice myéloïde, menant à la formation des monocytes, des macrophages et des neutrophiles, ou se transformer en cellule lymphoïde, menant à la formation des lymphocytes. La présence combinée de GM-CSF et d'interleukine (IL)-3 favorise la différenciation de la lignée myéloïde et l'addition d'IL-6 permet de progresser dans la lignée jusqu'au progéniteur des granulocytes/macrophages. Il suffit ensuite que ce précurseur soit en présence de GM-CSF et de G-CSF et qu'il subisse quelques étapes de maturation supplémentaires pour finalement donner un neutrophile prêt à passer dans la circulation sanguine et à défendre l'organisme (Skubitz, 2003 ; Theilgaard-Mönch et *al.*, 2005).

## 5.1 Fonctions classiques

Les neutrophiles en circulation et en périphérie ont une durée de vie relativement courte. Après avoir migré de la moelle osseuse à la circulation sanguine, ils patrouillent pendant environ 7 à 12 heures. Par contre, dans un contexte inflammatoire, ils peuvent survivre jusqu'à quelques jours afin d'accomplir leur action (Akgul et *al.*, 2001). Suite à la migration transendothéliale vers le site enflammé, les principales fonctions de défense du neutrophile sont la phagocytose, la dégranulation, la formation de ROS, la formation de Nets et l'activation de la réponse adaptative.

La migration du neutrophile des vaisseaux sanguins vers les tissus peut être décrite en quatre étapes. En conditions normales, les neutrophiles s'attachent faiblement aux cellules endothéliales qui forment la paroi interne du vaisseau sanguin. Ceci est dû à des molécules d'adhésion de faibles affinités, les sélectines et les « mucine-like », exprimées à la surface des cellules endothéliales et des neutrophiles (par exemple, respectivement la P-sélectine et la P-sélectine ligand (PSGL-1)). Emportés par le flux sanguin, ils roulent littéralement sur la paroi du vaisseau : on appelle cette étape le roulement ou « rolling » (Goldsby et *al.*, 2001). Si, durant cette première étape, le leucocyte est en contact avec des produits bactériens (ex : peptides N-formylés (fMLP), lipopolysaccharides (LPS)) ou autres produits inflammatoires (leucotriène (LT) B<sub>4</sub>, IL-8, fragments du complément), il entre alors dans la deuxième étape : l'activation (Goldsby et *al.*, 2001).



**Figure 7. Les quatre étapes de la migration du neutrophile du vaisseau sanguin vers les tissus (Goldsby et *al.*, 2001).**

Une fois la cellule activée (c'est le cas du neutrophile, mais aussi de la cellule endothéliale en condition inflammatoire), elle exprime de nouvelles molécules à sa surface : des molécules d'adhésion de forte affinité telles que les intégrines chez les leucocytes et les molécules de la superfamille des immunoglobulines sur l'endothélium. Lorsque, par exemple, LFA-1 (Leucocyte function associated antigen) se lie à son ligand ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire), le leucocyte se fixe fermement à la paroi du vaisseau sanguin : c'est l'adhésion ferme, l'étape 3 de la migration. Finalement, le neutrophile réorganise son cytosquelette pour se faufiler à travers la couche de cellules endothéliales, habituellement guidé par un gradient de concentration de chimioattractant ( $LTB_4$ , C5a, IL-8, fMLP) : c'est la migration transendothéliale ou la diapédèse (Goldsby et *al.*, 2001). Cette migration peut s'effectuer par deux routes distinctes, la migration paracellulaire s'effectue aux jonctions de deux cellules endothéliales et la migration transcellulaire se s'effectue au travers de l'endothélium dans les parties les plus fines. Pour la migration paracellulaire, le mécanisme requiert la redistribution des molécules de jonctions, par les cellules endothéliales inflammées, qui bloquent la voie aux cellules migrantes. C'est le cas de la famille des cadhérines (Shaw et *al.*, 2001). Quelques molécules de jonction endothéliale se font médiatrices à la migration transendothéliale. Ces molécules incluent des membres de la superfamilles des immunoglobulines comme PECAM1, ICAM1, ICAM2, JAM-A, JAM-B, JAM-C et la molécule endothéliale d'adhésion cellule-sélective (ESAM), tout comme la molécule

CD99 qui n'est pas une immunoglobuline (Ley et *al.*, 2007). La migration transcellulaire ne représente une voie que pratique une minorité des cellules migrantes. La migration du leucocyte commence par l'extension de la membrane en protubérance qui entre dans la cellule endothéliale. Grâce à la molécule ICAM1 qui est redistribuée via des calvéoles vers une région riche en actine-F, il y aura formation d'un tunnel stabilisé par l'actine qui permettra la migration de la cellule (Ley et *al.*, 2007).

### **5.1.1 La phagocytose**

Les neutrophiles procèdent à l'ingestion de microorganismes invasifs aux sites d'infection par un procédé nommé la phagocytose. Les bactéries possèdent une diversité de structures, conservées à travers l'évolution, qui facilitent une reconnaissance directe par le neutrophile. Des molécules comme le LPS, les lipoprotéines, l'acide lipoteichoïque (LTA) et les flagellines comprennent des motifs associés aux pathogènes (PAMPs) qui interagissent avec des récepteurs membranaires à la surface des neutrophiles. Les neutrophiles expriment les TLRs 1,2,4-10, et d'autres récepteurs comme les protéines de reconnaissance des peptidoglycanes (Hayashi et *al.*, 2003). En général, la liaison d'une molécule bactérienne avec un récepteur reconnaissant les PAMPs active une transduction de voies signalétiques qui ultimement prolonge la vie des neutrophiles, facilite l'adhésion, la phagocytose et contribue à activer plusieurs autres défenses du système immunitaire inné, qui seront discutés dans les sections suivantes (Hayashi et *al.*, 2003 ; Sabroe et *al.*, 2003). La phagocytose par les PMNs est augmentée par l'opsonisation des microbes par des protéines de l'hôte comme les anticorps ou le complément. La reconnaissance d'épitopes sur la surface microbienne par des anticorps spécifiques permet la déposition de composantes du complément par l'activation de la voie classique du complément. Les anticorps liés à la surface des microbes sont reconnus par des récepteurs spécifiques pour la région Fc de l'anticorps à la surface du neutrophile. Ces récepteurs sont le CD64 (FcγRI, récepteur d'IgG), CD32 (FcγRIIa, récepteur de faible affinité aux IgGs), CD16

(Fc $\gamma$ RIIIb, récepteur de faible affinité aux IgGs), CD89 (Fc $\alpha$ R, récepteur d'IgA) et CD23 (Fc $\epsilon$  RI, récepteur IgE) (Mantovani, 1975 ; Fleit et *al.*, 1989 ; Albrechtsen et *al.*, 1988 ; Gounni et *al.*, 2001) qui sont tous présent à la surface des neutrophiles au repos à part CD64 qui est inductible. Les microbes opsonisés avec le complément sont efficacement reconnus par des récepteurs à la surface des PMNs, comme le ClqR, CD35 (CR1), CD11b/CD18 (CR3) et CD11c/CD18 (CR4) (Eggleton et *al.*, 1995 ; Rabellino et *al.*, 1978 ; Ross et *al.*, 1978 ; Dana et *al.*, 1984 ; Hickstein et *al.*, 1987 ; Myones et *al.*, 1988). L'activation de ces récepteurs d'opsonines initie des changements dans le cytosquelette qui sous-tend le procédé physique de la phagocytose (Kobayashi et De Leo, 2009).

### **5.1.2 La dégranulation**

Dans leur cytoplasme, les neutrophiles sont remplis de plusieurs variétés de granules enrichies avec plusieurs puissantes molécules antimicrobiennes (i.e. des peptides cationiques, des protéases, des lactoferrines, de la myelopéroxydase (MPO), etc.). De plus, sur la base de la présence ou de l'absence de MPO, ces granules peuvent être catégorisées comme peroxydase positive (granules primaires ou azurophiliques) ou peroxydase négative (granules secondaires ou spécifiques) (Bainton et Farquhar, 1968). En considérant les fonctions des granules du neutrophile, on peut les classer sur la base de leurs contenus matriciels et ceux intégrés à la membrane (voir tableau 4).

## Tableau 4. Contenus des granules et vésicules de sécrétion du neutrophile

Content of neutrophil granules and secretory vesicles

Azurophil granules	Specific granules	Gelatinase granules	Secretory vesicles
<i>Membrane</i>			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Alkaline phosphatase
CD68	CD15	Cytochrome <i>b<sub>558</sub></i>	CD10
Preseilin 1	CD66	Diacylglycerol deacetylating enzyme	CD11b/CD18
Stomatin	CD67	fMLP-R	CD13
V-type H <sup>+</sup> -ATPase	Cytochrome <i>b<sub>558</sub></i>	Leukolysin	CD14
	fMLP-R	NRAMP-1	CD16
	Fibronectin-R	SCAMP	CD45
	G-protein <sub>α</sub> -subunit	SNAP-23, -25	CR1
	Laminin-R	uPA-R	C1q-R
	Leukolysin	VAMP-2	Cytochrome <i>b<sub>558</sub></i>
	NB1 antigen	V-type H <sup>+</sup> -ATPase	Decay-accelerating factor (DAF)
	19-kDa protein		fMLP-R
	155-kDa protein		Leukolysin
	Rap1, Rap2		VAMP-2
	SCAMP		V-type H <sup>+</sup> -ATPase
	SNAP-23, -25		
	Stomatin		
	Thrombospondin-R		
	TNF-R		
	uPA-R		
	VAMP-2		
	Vitronectin-R		
<i>Matrix</i>			
Acid β-glycerophosphatase	β <sub>2</sub> -Microglobulin	Acetyltransferase	Plasma proteins
Acid mucopolysaccharide	Collagenase	β <sub>2</sub> -Microglobulin	
α <sub>1</sub> -Antitrypsin	CRISP-3 (SGP-28)	CRISP-3	
α-Mannosidase	Gelatinase	Gelatinase	
Azurocidin	hCAP-18	Lysozyme	
BPI	Histaminase		
β-Glycerophosphatase	Heparanase		
β-Glucuronidase	Lactoferrin		
Cathepsins	Lysozyme		
Defensins	NGAL		
Elastase	uPA		
Lysozyme	Sialidase		
MPO	Transcobalamin-I		
N-acetyl-β-glucosaminidase			
Proteinase-3			
Sialidase			
Ubiquitin-protein			

Adapté de Borregaard et Cowland, 1997

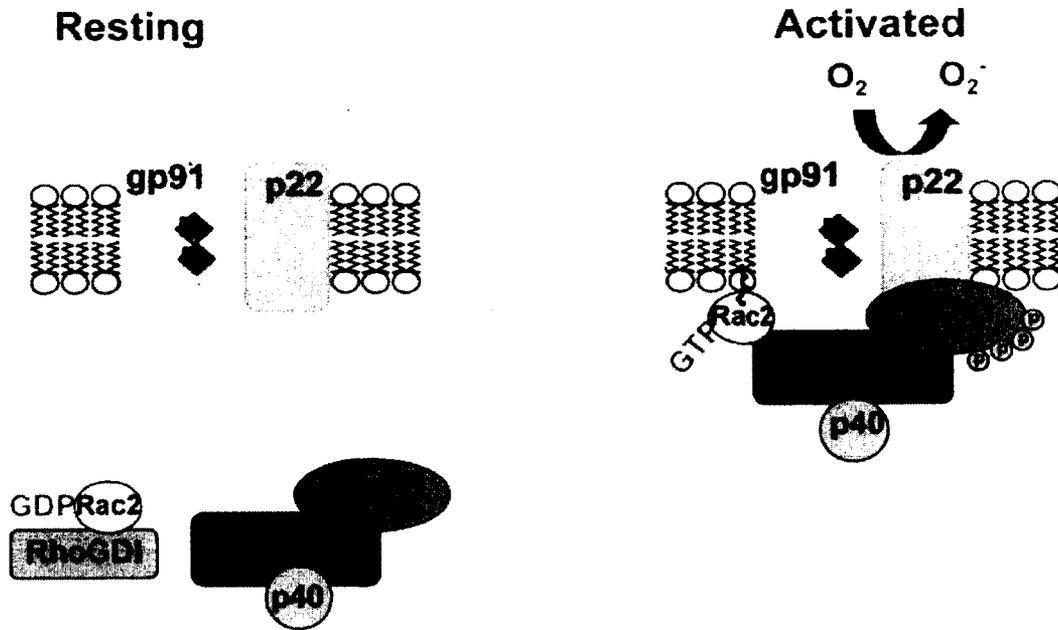
Le phénomène d'exocytose des granules est très intéressant. Les granules qui sont formées dans des étapes plus précoces de la maturation des neutrophiles montrent une capacité minime d'exocytose durant une infection ou une inflammation (i.e. les granules azurophiles sont formées durant une phase plus précoce que les granules spécifiques) (Sengeløv et *al.*, 1995 ; Sengeløv et *al.*, 1993 ;

Borregaard et *al.*, 2007). Tandis que les granules qui sont formées durant les dernières phases de maturation (i.e. les granules gélatinases et les vésicules sécrétoires) montrent un phénomène d'exocytose beaucoup plus rapide (Borregaard et *al.*, 2007 ; Kjeldsen et *al.*, 1992 ; Kjeldsen et *al.*, 1993). En fait, la tendance pour l'exocytose dépend de la densité d'expression de VAMP-2 : plus elle est élevée, plus la granule sera sécrétée rapidement (vésicules sécrétoires> granules gélatinases> granules spécifiques> granules azurophiliques) (Borregaard et *al.*, 2007).

### 5.1.3 La formation de ROS

Comme discuté précédemment, la dégranulation mène à l'activation et à la sécrétion de plusieurs composantes antimicrobiennes du neutrophile. C'est aussi le cas pour la flambée oxydative (ou respiratoire) qui est générée par le complexe NADPH oxydase. La flambée oxydative peut être induite quand un agoniste soluble, comme le fMLF, déclenche l'activation de l'assemblage du complexe NADPH oxydase à la membrane du phagosome (Decoursey et ligeti, 2005 ; Nauseef et *al.*, 1991 ; Dahlgren et Karlsson, 1999). La génération des ROS est un des aspects qui définit le neutrophile ; la magnitude de génération des ROS dans les neutrophiles dépasse largement ce qui est observé chez le macrophage (VanderVen et *al.*, 2009).

Après l'activation du neutrophile, les composantes cytosoliques p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et p40<sup>phox</sup> s'associent avec gp91<sup>phox</sup>(NOX2) et p22<sup>phox</sup> associées à la membrane. Même si les composantes liées à la membrane sont habituellement retrouvées dans les granules spécifiques, on peut aussi les retrouver, dans certains cas, dans la membrane plasmique et dans les granules sécrétives (Jesaitis et *al.*, 1990 ; Sengeløv et *al.*, 1992). La présence des GTPases RAC1 ou -2 est aussi requise pour l'activation (voir figure 8) (Vignais, 2002). Rac2 est la GTPase essentielle durant la phagocytose médiée par FcγR dans les neutrophiles (Kim et Dinauer, 2001).



**Figure 8. Assemblage et activation de la NADPH oxydase.**

Chez les neutrophiles au repos, les composants de la NADPH oxydase sont spatialement séparés dans la membrane et le cytosol. Situé dans la membrane, le flavocytochrome b558 est une protéine hème hétérodimérique composée de sous unités gp91phox et p22phox. Outre le complexe de p47phox, p67phox, et p40phox, le cytosol contient Rac2, un membre de la famille Rho des petites GTPases, dans son état GDP inactif et associé à RhoGDI (GDP-dissociation inhibitor). Suite à une stimulation, le p47phox subit une phosphorylation sur plusieurs résidus sérine et transloque, avec p67phox et p40phox, à la membrane, alors que Rac2 subit un échange GDP-GTP, la translocation de Rac2 à la membrane est indépendante de celle des protéines cytosoliques phox. À la membrane, le complexe oxydase assemblé transfère des électrons à partir du NADPH cytosolique, au travers les groupes hème du gp91phox, à la molécule d'oxygène, ce qui produit un anion superoxyde (Nauseef, 2007).

L'activation de la NADPH oxydase réduit l'oxygène moléculaire en anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) selon la réaction :  $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$  (Ago et al. 1999). Ensuite, les superoxydes dismutent spontanément en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et l'action catalytique de la myéloperoxydase (MPO) transforme le peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux en présence de l'halogène Cl<sup>-</sup>. Il existe d'autres espèces incluent le peroxyde d'oxygène, les radicaux hydroxyles, l'acide hypochlorique, O<sup>-</sup>, et possiblement de l'ozone ; toutes ces espèces ont des effets microbicides (Klebanoff, 2005). La description récente de la formation d'ozone

requiert l'O<sup>•</sup> et des anticorps (Babior et *al.*, 2003) ; par contre, ce mécanisme est encore controversé (Kettle et *al.*, 2004 ; Kettle et Winterbourn, 2005 ; Yamashita et *al.*, 2008). Il est bien établi que l'activation de la NADPH oxydase a un rôle important dans la lutte contre les bactéries et les champignons (Segal, 2005). Des défauts dans des sous-unités de la NADPH oxydase entraînent la CGD (maladie granulomateuse chronique), une maladie grave et potentiellement mortelle qui est caractérisée par une déficience dans la capacité de produire une flambée oxydative, ce qui entraîne des infections récurrentes (Matute et *al.*, 2009).

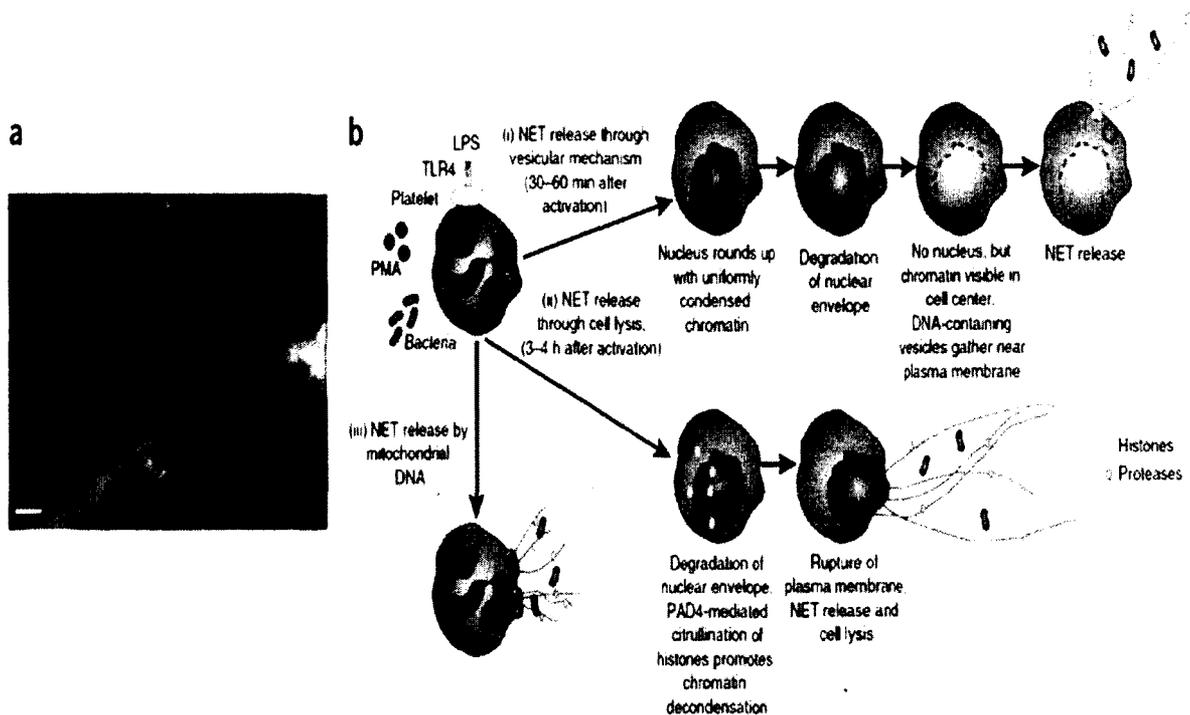
Outre leur rôle dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux, les espèces réactives oxygénées agissent comme des seconds messagers qui participeraient à la régulation de signaux intracellulaires en modulant l'activité de protéines kinases, de phosphatase et de facteurs de transcription (Finkel, 1998 ; Rhee et *al.*, 2005). À titre d'exemple, quoique l'effet des ROS varie en fonction du type cellulaire étudié, les ROS peuvent affecter la production de certaines cytokines par les neutrophiles murins en modulant l'activation de la p38 MAPK, de ERK, de AKT et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Asehnoune et *al.*, 2004). Par contre, cela ne s'applique pas au neutrophile humain (Ear et McDonald, 2008).

#### **5.1.4 La formation de Nets**

En plus de leur activité phagocytaire, les neutrophiles peuvent aussi former ce que l'on appelle les *neutrophil extracellular traps* (NETs) pour réguler la sévérité de l'infection (Papayannopoulos et Zychlinsky, 2009). La formation des Nets est une conséquence de la relâche dans le milieu extracellulaire de la chromatine décondensée des neutrophiles. Les Nets sont aussi constitués de protéines granulaires (dont des sérines protéases), ainsi que de certaines protéines cytoplasmiques. Ces Nets sont capables d'agglutiner les bactéries Gram négatives et Gram positives (Brinkmann et *al.*, 2004). Dans plusieurs espèces vertébrées incluant les humains, les souris, les poules et les poissons, les Nets jouent un rôle important dans le confinement de l'infection et de l'inflammation (Palic et *al.*, 2007 ; Wartha et *al.*, 2007 ; Chuammitri et *al.*, 2009). Les Nets se sont montrés efficaces contre

plusieurs microorganismes comme *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogènes*, *Bacillus anthracis*, *Mycobactérium tuberculosis*, des champignons, *Candida albicans* et des parasites comme *Leishmania amazonensis* (Fuchs et al., 2007 ; Urban et al., 2006 ; Brikmann et Zychlinsky, 2007 ; Von Kockritz-Blickwede et al., 2008 ; Guimaraes-Costa et al., 2009 ; Ramos-Kichik et al., 2009).

À ce jour, trois modèles de relargage des Nets dans l'espace extracellulaire des neutrophiles ont été décrits : (i) un qui implique la relâche des Nets suite à la mort des neutrophiles, le second (ii) implique l'extrusion de la chromatine de même que les sérines protéases à partir de neutrophiles intacts et le troisième (iii), même s'il n'a été observé qu'une seule fois, consiste au relargage de l'ADN mitochondrial par les neutrophiles (voir figure 9) (Clark et al., 2007). Le premier mécanisme de la formation de Nets par les PMNs se passe 2 à 3 heures suite à une stimulation avec soit du phorbol myristate acétate (PMA), soit *S. aureus*, soit *C. albicans* (Brickmann et al., 2004). Le second procédé de formation de NET implique une reconnaissance de LPS ou d'une bactérie pathogène par les plaquettes ou les neutrophiles. Ce second procédé de formation de NET se produit très rapidement, soit quelques minutes après exposition aux stimuli. Par contre, ce procédé est lié aux obstructions vasculaires observées lors du sepsis. Durant le sepsis, les plaquettes reconnaissent les bactéries Gram-négatives via leurs TLR4. Les plaquettes se lient ensuite avidement aux neutrophiles adhérents, ce qui cause la formation de NET en quelques minutes. Ce processus capture les bactéries dans la circulation systémique, mais aussi cause des dommages aux cellules endothéliales et hépatiques (Clark et al., 2007).



**Figure 9. Mécanisme de formation des NETs**

(a) L'adhésion des plaquettes induite par le LPS résulte dans la formation de NET. L'image représente des neutrophiles visualisés par une lumière blanche à travers un filtre orange en utilisant l'illumination de champs noirs et la microscopie à fluorescence avec le vert de SYTOX pour la coloration de l'ADN en vert. L'échelle est représentative de 10 $\mu$ m. (b) Divers mécanismes de relâche ont été observés. (i) Les Nets peuvent être relâchés par un mécanisme vésiculaire. Initialement, les noyaux des neutrophiles deviennent ronds avec de la chromatine uniformément condensée, ensuite survient le bris de la membrane nucléaire. Dans ces cellules, de petites vésicules contenant de l'ADN peuvent être observées dans le cytoplasme tout près de la membrane plasmique. Les vésicules viennent à fusionner avec la membrane plasmique et les Nets sont relâchés pour attraper les bactéries. (ii) Les Nets peuvent aussi être relâchés par une lyse cellulaire, et typiquement cela prend plus de temps que le mécanisme vésiculaire. L'enveloppe nucléaire est dégradée et la décondensation de la chromatine survient à cause de la citrullination des histones médiées par PAD4. (iii) La relâche des Nets par les mitochondries a aussi été observée dans une étude. Par contre, les étapes de ce procédé restent pauvrement caractérisées (Phillipson et Kubas, 2011).

Le mécanisme moléculaire de formation des Nets n'est pas encore clair, mais on croit que les ROS joueraient un rôle central. Cette suggestion est basée sur le fait que les neutrophiles isolés de patients atteints de la maladie granulomateuse

chronique (CGD), une maladie empêchant la formation de ROS, sont incapables de former des Nets efficaces (Fuchs et *al.*, 2007 ; von Kockritz-Blickwede et *al.*, 2008 ; Clark et Klebanoff, 1978). Les neutrophiles des patients atteints de CGD sont incapables de tuer *Aspergillus nidulans in vitro*, mais des thérapies géniques qui rétablissent la formation des Nets dans ces patients rétablissent leur capacité de lutter contre les aspergilloses (Segal et *al.*, 1998 ; Bianchi et *al.*, 2009). Donc, la formation des Nets par les neutrophiles aide à contenir les infections en plus de diminuer l'inflammation en diminuant la charge de pathogènes (Papayannopoulos et Zychlinsky, 2009).

### 5.1.5 L'induction de la réponse adaptative

La réponse immune adaptative comprend l'activation de la réponse immunitaire des cellules T et B contre les organismes pathogènes (i.e. bactéries, virus, champignons ou parasites). D'anciennes observations suggèrent que les neutrophiles sont des joueurs clés de la réponse immunitaire innée, qui a un rôle important dans la phagocytose des bactéries et dans la relâche de molécules antimicrobiennes. En revanche, les cellules T sont plus fréquentes dans la défense contre les infections par les virus, la réponse immune antitumorale ou la pathogenèse des maladies auto-immunes. Aujourd'hui, ce scénario est en raffinement et les résultats expérimentaux s'accumulent et soutiennent un rôle des neutrophiles dans l'activation des cellules T dans les infections bactériennes, la colocalisation des neutrophiles et des cellules T aux sites d'infections bactériennes chroniques ou persistantes, ou des conditions inflammatoires comme les cancers. Par exemple, chez les patients souffrant d'ostéomyélites associées aux implants, la population majoritaire est composée de neutrophiles (50-70 %), mais le reste des 30% de la population cellulaire est composée majoritairement de cellules T (jusqu'à 70 %) (Wagner et *al.*, 2003). De plus, les PMNs peuvent aussi contribuer au développement d'hypersensibilité retardée (HSR) en relâchant la chimiokine MCP-1/CCL2 et aident à la transition de la réponse innée à la réponse adaptative (Yamashiro et *al.*, 2001 ; Rand et *al.*, 1996). La sérine protéase appelée cathepsine G

sécritée par les neutrophiles a tendance à se lier aux lymphocytes et module la réponse humorale spécifique à l'antigène chez la souris (Hase-Yamazaki et Aoki, 1995 ; Yamazaki et Aoki, 1997 ; Tani et *al.*, 2001). La coadministration de cathepsine G et d'un antigène chez la souris cause une augmentation significative de production d'anticorps contre cet antigène accompagné d'une augmentation de production significative d'INF- $\gamma$  et d'une induction de synthèse d'IL-4 (Pharn, 2008). Donc, les sérines protéases du neutrophile ont un potentiel d'adjuvant et pourraient bien être utilisées à l'avenir dans la fabrication de vaccins.

Les neutrophiles, en induisant la maturation des DCs immature et en augmentant l'expression de molécules de costimulation (HLA-DR, CD86, CD46, etc.), procurent les signaux pour l'induction de la réponse immune des cellules T. L'interaction des neutrophiles avec les DCs induit la production d'IL-12 par les DCs et promeut leur maturation et l'activation des cellules T (Megiovanni et *al.*, 2006 ; van Gisbergen et *al.*, 2005a). Ceci est dû à la capacité des DCs matures à polariser les cellules T et à différencier les cellules T en Th1 et Th2. Par exemple, les DCs cultivés en présence de neutrophiles sont capables d'induire principalement la réponse immune de type Th1 (van Gisbergen et *al.*, 2005b). La même situation est observée dans les muqueuses intestinales enflammées de patients atteints de la maladie de Crohn, où les neutrophiles et les DCs sont retrouvés à proximité et l'inflammation qui est principalement causée par une induction de la réponse immunitaire de type Th1 (te Velde et *al.*, 2003). Donc, l'interaction des neutrophiles avec les DCs pourrait contribuer à l'induction de la réponse Th1 et de la génération de dommages tissulaires exagérés (van Gisbergen et *al.*, 2005c ; van Gisbergen et *al.*, 2005 b).

En plus d'activer les DCs afin de stimuler la réponse immune dépendante des cellules T, les neutrophiles peuvent aussi agir comme des cellules présentatrices d'antigènes, car ils expriment le CMH de classe II quand ils sont présents comme cellules témoin dans les essais de présentation d'antigènes entre monocytes et cellule T ou quand ils sont cultivés en présence de GM-CSF, IL-3 et INF- $\gamma$  (Gosselin et *al.*, 1993 ; Mudzinski et *al.*, 1995). Donc, les neutrophiles prétraités avec des cellules immunitaires (i.e. monocytes ou macrophage) sont capables d'agir comme des cellules présentatrices d'antigènes (APCs). Les neutrophiles cultivés en présence de

sérum autologue, d'INF- $\gamma$  et de GM-CSF expriment de haut niveau de CMH de classe II, de CD80 et CD86 (des molécules de costimulation), ce qui fait d'eux des APCs efficaces, qui sont capables d'induire une forte réponse immune des cellules T contre l'antigène (Radsak et *al.*, 2000). Les neutrophiles peuvent aussi présenter les antigènes des bactéries phagocytées aux cellules T cytotoxiques via un CMH de classe I sans promouvoir leur cytolysse (Potter et Harding, 2001). Cette voie alternative de présentation d'antigène par les neutrophiles peut être inhibée par la cytochalasine D (un inhibiteur de la polymérisation d'actine), tandis qu'elle n'est pas affectée par la lactacystine (un inhibiteur du protéasome) ou la brefeldine A (un bloqueur du transport antérograde du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi) (Ashtekar et Saha, 2003). En plus d'exprimer les molécules de CMH de classe I et II, les neutrophiles humains peuvent aussi exprimer constitutivement d'autres molécules accessoires nommées B7-1 qui interagissent avec CD28 à la surface des cellules T (Windhagen, 1999). Cette interaction entre CD28 et B7-1 augmente la sécrétion d'INF- $\gamma$  par les cellules T (Venuprasad et *al.*, 2003). Donc, l'expression de ces molécules effectrices de costimulation par les neutrophiles et leurs interactions avec les ligands correspondants à la surface des cellules T peuvent participer à différentes fonctions effectrices de ces cellules T durant les infections ou les désordres inflammatoires (Scapini et *al.*, 2000 ; Iking-Konert et *al.*, 2001).

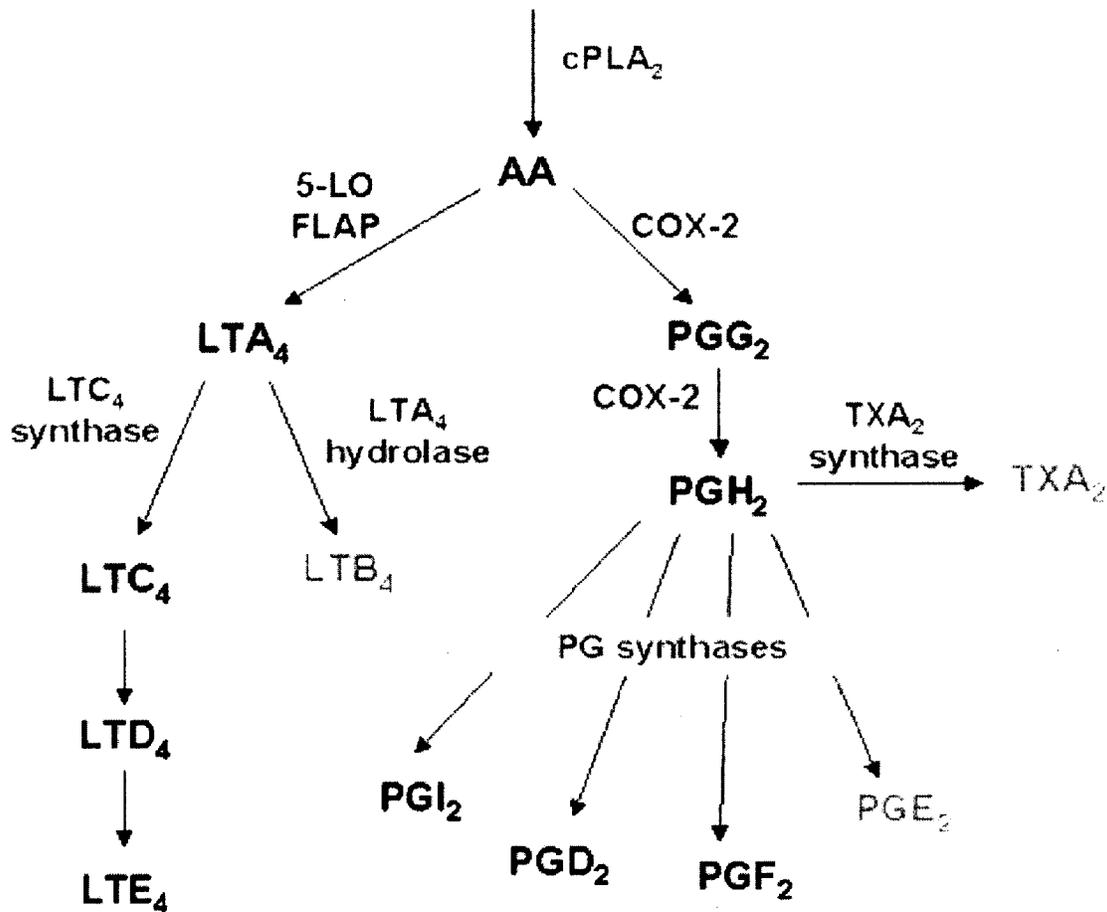
## **5.2 Le neutrophile et l'inflammation**

En plus de ses fonctions classiques, le neutrophile a aussi la capacité de sécréter une panoplie de médiateurs servant à communiquer avec les cellules environnantes. Le neutrophile est généralement le première cellule immune à rejoindre les sites d'inflammations où, en plus de ses fonctions microbicides, il peut aussi orchestrer l'évolution de la réponse immunitaire, influencer les cellules à proximité du site enflammé et amener d'autres leucocytes à migrer au site grâce à la production de médiateurs peptidiques et lipidiques.

### 5.2.1 La production de médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques sont formés à partir des phospholipides membranaires. Ceux issus du métabolisme de l'acide arachidonique, un des acides gras retrouvés abondamment dans les phospholipides, sont nommés eicosanoïdes. Les principaux eicosanoïdes générés par le neutrophile sont le leucotriène (LT)<sub>B<sub>4</sub></sub>, la prostaglandine (PG)<sub>E<sub>2</sub></sub> et le thromboxane (TX)<sub>A<sub>2</sub></sub> (Ford-Hutchinson et *al.*, 1980 ; Zurier, 1976 ; Goldstein et *al.*, 1978).

Lorsque l'activation du neutrophile induit une hausse de calcium intracellulaire, l'enzyme cytosolique phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) de type IV transloque majoritairement à la membrane nucléaire et clive préférentiellement les phospholipides ayant un acide arachidonique en position *sn*-2 (Dennis, 1994 ; Clark et *al.*, 1991). L'acide arachidonique libéré sert ensuite de précurseur à plusieurs voies métaboliques, dont deux importantes : la voie de formation des leucotriènes et la voie de formation des prostanoïdes (voir figure 10).



**Figure 10. Métabolisme de l'acide arachidonique**

La partie en jaune représente une membrane de phospholipides disposés en bicouche, d'où la  $cPLA_2$  prend son substrat. Les éléments en vert sont les principales enzymes impliquées dans la voie de synthèse et les produits en orange sont les trois médiateurs générés en plus grande quantité chez le neutrophile : le  $LTB_4$ , la  $PGE_2$  et le  $TXA_2$  (Simmons et *al.*, 2004 ; Norel et Brink, 2004).

La hausse de calcium intracellulaire induit aussi la translocation de la 5-lipoxygénase (5-LO) à la membrane du noyau (Ford-Hutchinson et *al.*, 1980 ; Penrose et *al.*, 1999). À l'aide de la « Five Lipoxygenase Activating Protein » (FLAP), la 5-LO prend en charge l'acide arachidonique et procède à deux modifications successives pour produire du leucotriène A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) (Reid et *al.*, 1990). Par la suite, le LTA<sub>4</sub> peut diffuser à l'extérieur de la cellule et être utilisé par les cellules

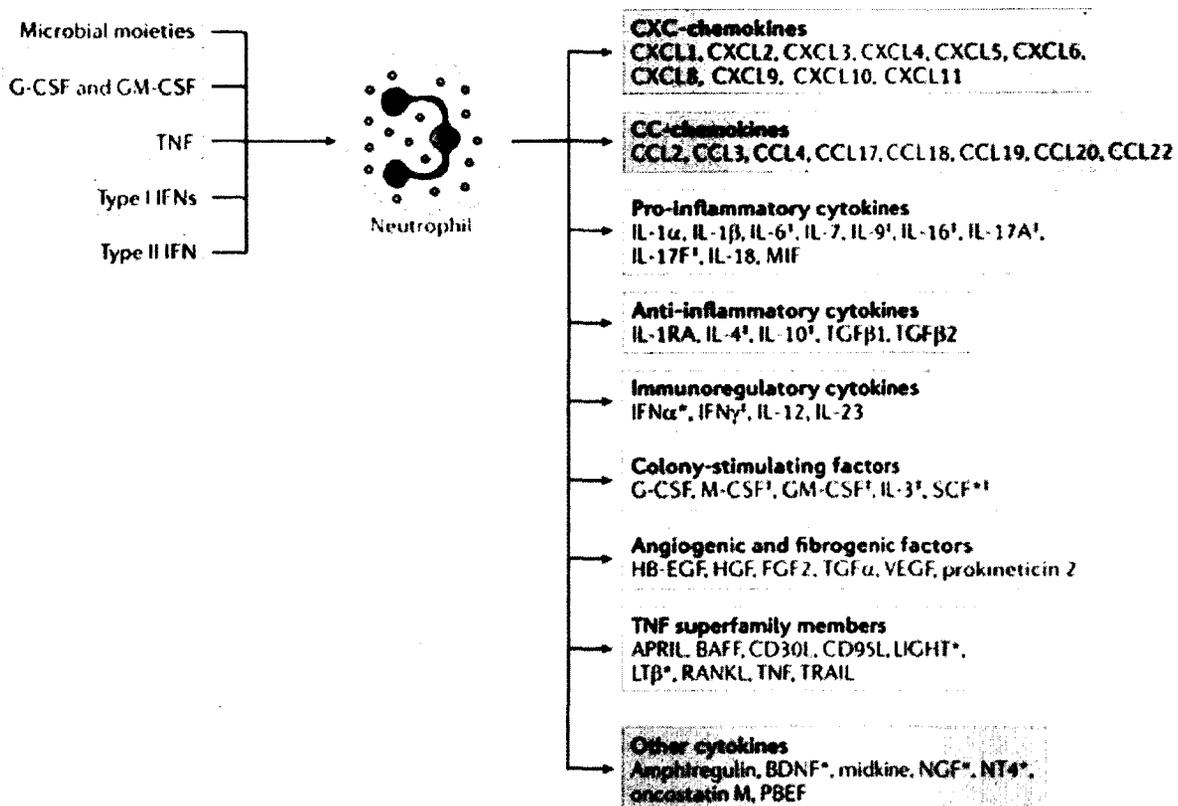
environnantes ou peut se transformer en LTB<sub>4</sub> à l'aide de la LTA<sub>4</sub> hydrolase cytosolique. Chez le neutrophile humain, c'est principalement le LTB<sub>4</sub> qui est libéré. D'ailleurs, le neutrophile est le plus grand producteur de LTB<sub>4</sub> (Penrose et *al.*, 1999). Bien que le LTB<sub>4</sub> exerce plusieurs effets au site inflammatoire, comme l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'adhésion aux cellules endothéliales, ses principales actions chez le neutrophile sont d'être un activateur efficace et un puissant chimioattractant (Rosenberg et Gallin, 1999). Une concentration de 10<sup>-10</sup> M suffit en effet pour déclencher la chimiotaxie chez les neutrophiles (Ford-Hichinson et *al.*, 1980). Le LTA<sub>4</sub> peut aussi être utilisé comme substrat par la LTC<sub>4</sub> synthase d'autres types cellulaires. D'autres cystéinyl leucotriènes dérivés du LTC<sub>4</sub>, comme le LTD<sub>4</sub> et le LTE<sub>4</sub>, peuvent être formés par des enzymes extracellulaires. L'expression de la LTC<sub>4</sub> synthase est restreinte aux éosinophiles, aux basophiles, aux mastocytes et aux monocytes-macrophages ; ce type de leucotriènes n'est donc pas généré par le neutrophile (Penrose et *al.*, 1999). La libération des cystéinyl leucotriènes a des effets sur les muscles lisses, entraînant la constriction des vaisseaux sanguins et, chez les personnes atteintes d'asthme, la constriction des bronches (Norel et Brink, 2004).

La première étape dans la formation des prostanoides est la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine G<sub>2</sub> puis en prostaglandine H<sub>2</sub>, précurseur commun de tous les prostanoides. Ces deux modifications sont effectuées par la même enzyme : la prostaglandine endoperoxyde H synthase, aujourd'hui fréquemment nommée COX (Smith et *al.*, 1996). Chez l'humain, deux isoformes de COX sont connues : COX-1 et COX-2. La prochaine étape de la formation des prostanoides se produit quand les PGH<sub>2</sub> engendrées par les deux COXs se réorganisent spontanément en un mélange de PGD<sub>2</sub> PGE<sub>2</sub> et PGF<sub>2</sub> ou sont prises en charge par différentes enzymes (Griffiths, 1999). En effet, plusieurs types de prostaglandine synthases catalysent la formation des PGs tandis que la thromboxane syntase se sert de PGH<sub>2</sub> pour former du TXA<sub>2</sub>. Une fois produits, ces médiateurs sortent de la cellule spontanément ou par des transporteurs et peuvent aller activer leur récepteur respectif. Huit récepteurs à prostanoides couplés aux protéines G sont caractérisés jusqu'à maintenant, incluant les quatre récepteurs EP

liant la PGE<sub>2</sub> (Griffiths, 1999 ; Smith et *al.*, 2000). Chez le neutrophile, les prostanoides majoritairement produits sont la PGE<sub>2</sub> et le TXA<sub>2</sub> et ils ont des effets bien distincts (Zurier, 1976 ; Goldstein et *al.*, 1978). Le TXA<sub>2</sub> a des effets généralement pro-inflammatoires, comme l'activation et l'agrégation plaquettaire ainsi que la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  chez les monocytes (James et *al.*, 2001). Il a également des effets vasoconstricteurs, mais aucun effet sur le neutrophile n'est répertorié (Pouliot et *al.*, 1998). Par contre, la PGE<sub>2</sub> peut avoir des actions pro- et anti-inflammatoires, dépendamment de la situation, de la cellule et du récepteur impliqué. Elle peut causer une hyperalgésie et une vasodilatation, participer à l'extravasation des fluides (œdème) et à la fièvre, contribuant ainsi grandement à l'inflammation. D'un autre côté, la PGE<sub>2</sub> peut supprimer l'activation du monocyte et sa production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ . Il peut inhiber la plupart des fonctions inflammatoires du neutrophile, comme la chimiotaxie et la production d'anions superoxydes, via une augmentation d'AMPC intracellulaire passant probablement par les récepteurs EP2 ou EP4 (James et *al.*, 2001, Griffiths, 1999).

### 5.2.2 La production de médiateurs peptidiques

Bien que les monocytes et les lymphocytes aient longtemps été considérés comme des sources majeures de cytokines parmi les cellules sanguines, il est maintenant évident que les cytokines sont aussi produites par plusieurs autres types cellulaires, dont les neutrophiles (Lloyd et Oppenheim, 1992 ; Cassatella, 1995 et 1999, Cassatella et *al.*, 1997 ; Hachicha et *al.*, 1998 ; Scapini et *al.*, 2000 ; Lapinet et *al.*, 2000). En réponse à une stimulation appropriée, les neutrophiles produisent une vaste gamme de médiateurs peptidiques comprenant les cytokines pro-inflammatoires comme : l'IL-1 $\alpha/\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'INF- $\alpha/-\gamma$  et l'IL-12 ; les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-1RA et le TGF- $\beta$  ; les chimiokines comme l'IL-8, le GRO- $\alpha/-\beta$ , l'IP-10, le MIG, l'I-TAC, le MIP-1 $\alpha/\beta$  et le MIP-3 $\alpha/\beta$  ; les facteurs de croissance comme le G-CSF, le GM-CSF, le VEGF et le HGF, ainsi que plusieurs autres (voir figure 11).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 11. Médiateurs peptidiques produits par le neutrophile.**

Il a été démontré que les neutrophiles, soit spontanément ou suivant une stimulation appropriée, expriment et/ou produisent plusieurs cytokines, chimiokines et des facteurs de croissances. L'expression et/ou la production de ces facteurs ont été validées non seulement par des techniques d'expression génique, mais aussi par l'immunohistochimie, ELISA ou essai biologique pour les cytokines spécifiques, exercé sur les cellules humaines et/ou de souris. \* Réfère à des études effectuées seulement au niveau de l'ARNm. † Indique que les données sont controversées pour les neutrophiles humains (Mantovani et *al.*, 2011).

Étant donné que les neutrophiles sont généralement les premières cellules recrutées massivement au site inflammatoire, ils pourraient, via la production et la sécrétion de cytokines et de chimiokines, orchestrer le recrutement sélectif d'autres populations leucocytaires au site inflammatoire (Woodman et *al.*, 1998 ; Chang, 1981 ; Abramson et Weissmann, 1981 ; Bennouna et *al.*, 2003 ; Wittamer et *al.*, 2005 ; van Gisbergen et *al.*, 2005a ; Nathan, 2006). Par exemple, l'afflux de différentes populations leucocytaires au site inflammatoire se reflète dans les

chimiokines produites par les neutrophiles : l'IL-8 et le GRO- $\alpha$  recrutent principalement les neutrophiles ; l'IP-10, le MIG et l'I-TAC attirent essentiellement les lymphocytes et les cellules NK ; le MIP-1 $\alpha/\beta$  et le MIP-3 $\alpha/\beta$  recrutent les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques immatures et matures, les éosinophiles et les basophiles (Cassatella, 1999). De plus, les cytokines produites par les neutrophiles influencent la réponse immune. L'IL-12 induit les cellules NK et les lymphocytes T à produire de l'INF- $\gamma$ , augmentant ainsi la cytotoxicité médiée par les cellules et induit la polarisation des lymphocytes T vers le type Th1 (Trinchieri, 1998 ; Gately *et al.*, 1998). Le BLYS contribue à la prolifération et à la maturation des lymphocytes B (Scapini *et al.*, 2005). Les neutrophiles activés peuvent induire la maturation des cellules dendritiques, d'une part par la production de TNF- $\alpha$  et, d'autre part, grâce à l'interaction des molécules d'adhésion CD11b/CD18 des neutrophiles avec le DC-SIGN des cellules dendritiques. Cette interaction a été mise en évidence par l'augmentation de marqueurs de maturation, tel que le CD83, et par la production d'IL-12 lorsque les cellules dendritiques immatures sont en coculture avec les neutrophiles activés. Par ailleurs, la stimulation des cellules dendritiques par les neutrophiles augmente la capacité des DCs à induire la prolifération des lymphocytes T, suggérant ainsi que les neutrophiles peuvent induire la maturation fonctionnelle des DCs et l'induction de réponses accrues des cellules T par les DC (van Gisbergen *et al.*, 2005bc).

Grâce à cette vaste gamme de médiateurs, les neutrophiles peuvent non seulement influencer directement la réponse inflammatoire, mais ils peuvent aussi mettre sur pied une réponse immune spécifique à divers agents pathogènes. Qui plus est, ils peuvent aussi influencer d'autres processus comme l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la guérison des plaies et la résolution de l'inflammation (Nathan, 2006 ; Appelberg, 2007).

Notre laboratoire se spécialise dans les voies de signalisation et les facteurs de transcription menant à la production de cytokines par le neutrophile. Notre groupe a jusqu'à présent démontré que le facteur de transcription AP-1 n'est pas impliqué dans la transcription ; cela est en grande partie attribué au fait que c-Jun n'est que faiblement exprimé chez le neutrophile et que l'inhibition de la kinase JNK

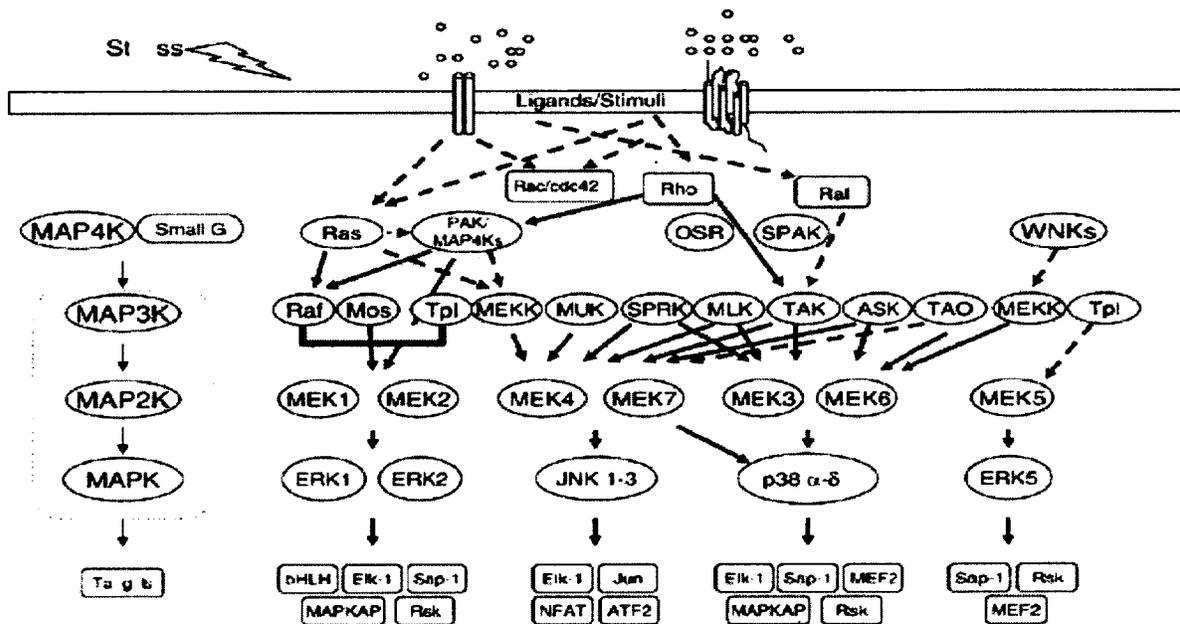
ne diminue pas la production de cytokines (Cloutier et *al.*, 2003). Par contre, les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et C/EBP $\beta$  sont particulièrement importants pour la transcription de plusieurs de cytokines (Cloutier et *al.*, 2007 ; Ear et *al.* 2008 ; Cloutier et *al.*, 2009). L'activation de ces facteurs de transcription se fait via plusieurs voies de signalisation. Le laboratoire a mis en évidence l'implication de plusieurs kinases dans la transmission du signal dont : le complexe IKK, ERK 1/2, p38, TAK1 et PI3K (Ear et *al.*, 2005 ; Cloutier et *al.*, 2007 ; Ear et *al.*, 2010 ; Fortin et *al.*, 2011). Ce qui est étonnant avec ces résultats c'est que la kinase MEK1 est seulement impliquée dans la traduction de l'ARNm en protéine et non dans la transcription de l'ADN – contrairement `à des observations faites chez plusieurs autres types leucocytaires. Les sections suivantes se consacreront à la MAPK ERK 1/2 , ses caractéristiques, et ses fonctions.

## **6. La famille des MAP kinases**

L'activation séquentielle des protéines kinases est un mécanisme commun de transduction de signaux à plusieurs types cellulaires (Cambell et *al.*, 1995). Durant les dernières années, plusieurs cascades de signalisation intracellulaires ont été élucidées, incluant le groupe des MAPKs (Seger et Krebs, 1995 ; Chang et Karim, 2001 ; Pearson et *al.*, 2001 ; Johnson et Lapadat, 2002 ; Bogoyevitch et Court, 2004). Ces cascades coopèrent dans la transmission de signaux extracellulaires jusqu'à leurs cibles intracellulaires et ceci régule plusieurs procédés, dont la prolifération, la différenciation, le développement, la réponse au stress et l'apoptose. Chacune de ces cascades de signalisation consiste en plusieurs composantes de protéines kinases qui s'entre-activent séquentiellement par phosphorylation. En plus, chacune des composantes dans les cascades distinctes sont composées de plusieurs isoformes similaires, cela augmente la complexité et donne un éventail d'activités plus varié au système des MAPK (Johnson et Lapadat, 2002).

Chaque cascade de MAPK est activée soit par une petite protéine G liant le GTP, soit par une protéine adaptatrice, qui transmettent le signal directement ou par une kinase médiatrice (MAP4K) à la MAPK kinase kinase (MAP3K).

Subséquentement, le signal est transmis aux composantes situées plus bas dans la cascade qui se réfèrent dans l'ordre, MAP2K, MAPK et les protéines kinases activées par les MAPKs (MAPKAPK) (Seger et Krebs, 1995 ; Chang et Karim, 2001 ; Pearson *et al.*, 2001 ; Johnson et Lapadat, 2002 ; Bogoyevitch et Court, 2004) (voir figure 12). Il est important de savoir que la plupart des kinases d'une même voie partagent le même site de phosphorylation qui est situé dans un endroit qu'on appelle l'hélice d'activation (Canagarajah *et al.*, 1997). Par exemple, pour les MAPKs, les sites de phosphorylation sont une thréonine (Thr) et une tyrosine (Tyr), organisées dans un motif Thr-Xaa-Tyr, où le groupement au milieu est utilisé pour distinguer les différentes MAPKs (Payne *et al.*, 1991).



**Figure 12. Les cascades des MAPKs.**

Une illustration qui démontre la complexité de la signalisation des 6 tiers des MAPKs (Rho/Raf, MAP4K, MAP3K, MAP2K, MAPK, MAPKAPK). Malgré tout le travail effectué, certains points restent encore nébuleux dans l'activation des voies de signalisations (Raman *et al.*, 2007).

Les quatre grandes cascades de signalisation sont connues sous le nom de leur MAPK : (1) la kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK) (Sturgill et Ray, 1986 ; Boulton *et al.*, 1991) ; la kinase N-terminale de c-Jun (JNK) (Derijard *et al.*, 1994 ; Kyriakis *et al.*, 1994) ; (3) la MAPK p38 (Freshney *et al.*, 1994 ; Han *et al.*,

1994 ; Rouse et *al.*, 1994) ; et ERK5 (Zhou et *al.*, 1995 ; Lee et *al.*, 1995). Les MAPKs se distinguent par leur rôle physiologique : ERK joue un rôle dans la prolifération et la différenciation, JNK et p38 sont majoritairement impliquées dans la réponse au stress et dans l'apoptose, et ERK5 semble transmettre à la fois des signaux mitogéniques et de stress. Par contre, toutes ces fonctions dépendent du type cellulaire et des conditions dans lesquelles elles se trouvent. Par exemple, ERK peut participer à l'apoptose et JNK à la prolifération sous certaines conditions (Bacus et *al.*, 2001 ; Hess et *al.*, 2002).

### **6.1 La régulation des MAPKs par les MKPs**

Le résultat physiologique de la signalisation par les MAPKs dépend à la fois de l'intensité et de la durée d'activation de la kinase (Marshall, 1995). Les facteurs qui influencent la régulation temporelle des MAPKs sont divers et très complexes. Ceci inclut la densité et le niveau d'internalisation des récepteurs membranaires, l'association des composantes de signalisation des MAPKs avec des protéines d'échafaudage, et l'équilibre entre l'activation de la kinase et la régulation négative de celle-ci par les protéines phosphatases (Volmat et Pouyssegur, 2001 ; Morrison et Davis, 2003 ; Murphy et Blenis, 2006). Cette dernière classe de protéines est maintenant connue pour jouer un rôle important dans la régulation des MAPKs (Keyse, 2000 ; Saxena et Mustellin, 2000). En particulier, une famille de 10 phosphatases de MAPK (MKPs) agit pour déphosphoryler et inactiver les isoformes de MAPK chez les mammifères. En plus, certaines MKPs sont capables de réguler différemment les isoformes des MAPKs (Camps et *al.*, 2000; Theodosiou et Ashworth, 2002). Les différentes MKPs, leurs localisations, leurs substrats et leurs fonctions physiologiques sont résumés au tableau 5.

**Tableau 5. La nomenclature, les propriétés et les fonctions physiologiques des MKPs**

Gène	MKP	Noms alternatifs	Localisation Cellulaire	Substrats préférés	Fonctions physiologiques
DUSP1	MKP-1	CL100, erp, 3CH134, hVH1	Noyau	JNK, p38, ERK	Régulateur négatif de fonction immunologique. Protège les souris contre le choc endotoxique létal. Joue un rôle clé dans l'homéostasie.
DUSP4	MKP-2	Typ1, Sty8, hVH2	Noyau	JNK, p38, ERK	
DUSP2		PAC-1	Noyau	ERK, p38	Régulateur positif de la réponse immunitaire. Les souris « knockouts » sont résistantes à l'inflammation.
DUSP5		hVH-3, B23	Noyau	ERK	
DUSP6	MKP-3	Pyst1, rVH6	Cytoplasme	ERK	Boucle de régulation négative de ERK2 dans la signalisation du EGFR.
DUSP7	MKP-X	Pyst2, B59	Cytoplasme	ERK	
DUSP9	MKP-4	Pyst3	Cytoplasme	ERK > p38	Essentiel pour le développement placental.
DUSP8		M3/6, hVH5, HB5	Cytoplasme / noyau	JNK, p38	
DUSP10	MKP-5		Cytoplasme / noyau	JNK, p38	Des fonctions dans l'immunité innée et adaptative.
DUSP16	MKP-7		Cytoplasme / noyau	JNK, p38	

(Adapté de Owens et Keyse, 2007)

## 6.2 Les propriétés de la cascade MEK/ERK

La cascade de la kinase ERK a été la première à être élucidée (Seger et Krebs, 1995). L'une des étapes les plus importantes de la régulation de la cascade est la phosphorylation de ERK par MEK. Cette étape semble responsable de la spécificité

de la cascade et de son impressionnante coopérativité (Ferrell, 1996). Cette régulation est possible grâce aux structures uniques et aux caractéristiques des deux kinases, qui seront décrites ci-dessous.

### 6.2.1 Les propriétés de MEK

Il existe trois membres de la famille MEK : MEK1 (45 kDa), MEK2 (46 kDa) et la forme inactive MEK1b (43 kDa). Le mécanisme d'activation de MEK comprend la phosphorylation de deux résidus sérines (Alessi et *al.*, 1994). La mutation des deux sérines a permis de déterminer l'importance de la Ser218 et Ser 222 pour l'activité maximale de MEK1 (Alessi et *al.*, 1994 ; Cowley et *al.*, 1994 ; Seger et *al.*, 1994 ; Zheng et Guan, 1994). La phosphorylation de chacune d'entre elles est suffisante pour une activité partielle, même si la Ser222 joue probablement un plus grand rôle (Seger et *al.*, 1994). MEK est une kinase hautement sélective pour la forme native de ERK. Jusqu'à présent, on ne lui connaît aucun autre substrat (Seger et *al.*, 1992a). Il a été démontré que MEK ne reconnaît pas la forme dénaturée de ERK ou des peptides contenant le site de phosphorylation de ERK (Seger et *al.*, 1991). En plus, MEK possède d'autres sites de phosphorylation pour sa régulation. Par exemple, la phosphorylation de la Ser298 de MEK1 par PAK1 démontre un rôle accessoire et augmente la phosphorylation de ERK en facilitant la formation d'un complexe entre les deux kinases (Resing et *al.*, 1995 ; Eblen et *al.*, 2002). Il existe une boucle de rétro-inhibition dans laquelle l'activation de ERK inhibe PAK1 (Eblen et *al.*, 2004). Plusieurs autres sites de phosphorylation ont été découverts, comme la Ser 386 et la Thr 286, mais leurs rôles demeurent mal compris (Matsuda et *al.*, 1993 ; Rossomando et *al.*, 1994 ; Eblen et *al.*, 2002). Un autre domaine de régulation très important est situé à la région N-terminale et contient 73 acides aminés (MEK 1) (Seger et *al.*, 1992 b ; Crews et *al.*, 1992). Entre autres, cette région possède une séquence d'export du noyau (NES) et une région d'attache pour ERK (Fukuda et *al.*, 1996 ; Jaaro et *al.*, 1997 ; Tanoue et *al.*, 2000). Ces deux régions sont vitales pour la phosphorylation de ERK à la fois *in vivo* et dans les cellules transfectées ainsi que pour la localisation cellulaire de MEK et de ERK (Jaaro et *al.*, 1997 ; Xu et *al.*, 1999).

Il existe aussi une région riche en proline qui est requise pour l'activation de ERK (Dang et *al.*, 1998). Finalement, la partie C-terminale est impliquée dans la détermination de sa localisation cellulaire (Cha et *al.*, 2001).

### 6.2.2 Les propriétés de ERK

La famille ERK est encodée par deux gènes distincts, ERK1 et ERK2, qui produisent des protéines de 44 kDa (ERK1) et 42 kDa (ERK2). Ces protéines ont en commun un motif d'activation Thr-Glu-Tyr (Seeger et Krebs, 1995). MEK est la seule kinase connue ayant la capacité de phosphoryler simultanément les deux résidus Thr et Tyr des kinases ERK. Par contre, ERK peut s'associer avec plusieurs autres protéines (Chuderland et Seeger, 2005). ERK est une kinase dite « dirigée par la proline », ce qui veut dire qu'elle phosphoryle les résidus Ser et Thr, voisins de proline. Les séquences Pro-Leu-Ser et Thr-Pro sont les deux séquences consensus les plus répandues pour ERK (Gonzalez et *al.*, 1991). Par contre, il existe d'autres substrats de ERK qui ne contiennent aucune proline à proximité, mais il a été démontré que cela diminuait l'efficacité de la phosphorylation (Haycock et *al.*, 1992 ; Songyanget *al.*, 1996).

La phosphorylation des résidus Tyr et Thr cause un changement de forme chez ERK2 permettant la formation d'une poche pour la réception de substrats possédant la séquence consensus, facilitant ainsi la phosphorylation de leurs résidus Ser/Thr par ERK2 et augmentant de 5 à 6 fois l'activité basale (Canagarajah et *al.*, 1997 ; Zhang et *al.*, 1994). Dans sa forme inactive (très faible activité), c'est la Tyr 185 non phosphorylée qui bloque partiellement l'accès du site de liaison aux substrats potentiels (Zhang et *al.*, 1994). De plus, les résidus Tyr et Thr ne sont pas seulement importants pour l'activation de la kinase, mais aussi pour son détachement de MEK (Wolf et *al.*, 2001). Plusieurs régions dans la boucle d'activation de ERK sont importantes pour l'association de ERK avec MEK. Parmi ceux-ci on retrouve des résidus dans le sous-domaine III de ERK, plusieurs régions en C- et N- terminale, les acides aminés 19-25 de ERK2 et les résidus 312-320 que l'on nomme aussi la séquence de rétention cytosolique ou encore le motif commun

d'ancrage (Brunet et Pouysségur, 1996 ; Wilsbacher et *al.*, 1999 ; Eblen et *al.*, 2001 ; Tanoue et *al.*, 2000 ; Rubinfeld et *al.*, 1999). Cette dernière est la plus solide et l'interaction serait régie particulièrement par les résidus 316 et 319 tout comme les résidus hydrophobiques (Xu et *al.*, 2001). Il est physiquement impossible qu'une seule molécule de MEK1 interagisse avec toutes ces régions de ERK2 en même temps, car elles sont trop éloignées les unes des autres. Il est donc possible que deux types d'interactions existent entre ERK2 et MEK1. La première est requise pour l'activation directe de ERK2 par MEK1 et impliquerait les régions situées près de la boucle d'activation (Wilsbacher et *al.*, 1999). Tandis que la seconde ferait intervenir la séquence de rétention cytosolique pour l'interaction directe entre ERK et MEK, sans toutefois promouvoir la phosphorylation (Fukuda et *al.*, 1997 ; Bardwell et *al.*, 2001 ; Bardwell et *al.*, 2003 ; Rubinsfeld et *al.*, 1999). Par contre, il est possible que cette interaction nécessite l'aide de protéines d'échafaudage comme MP1 ou KSR (Morrisson et Davis, 2003). Finalement, la séquence de rétention cytosolique pourrait aussi servir de site d'attache aux MKPs, aux Tyr phosphatases ainsi qu'à différents substrats de ERK (Bardwell et *al.*, 2003 ; Zhang et *al.*, 2003).

### **6.2.3 Les substrats de ERK**

ERK est l'une des kinases cellulaires les plus prolifiques. On lui connaît plus de 150 substrats dans divers compartiments cellulaires comme le cytosol, le cytosquelette et le noyau, qui exercent des fonctions diverses dans la cellule (Yoon et Seger, 2006). Ceci dit, la présence des séquences consensus Pro-Leu-Ser/ Thr-Pro sur les substrats n'est pas un gage de phosphorylation par ERK. En plus de posséder la séquence consensus, le substrat potentiel doit interagir physiquement avec ERK. Jusqu'à présent, il existe deux motifs pour l'interaction de ERK avec ses substrats. Le motif le plus répandu est le domaine D avec une séquence consensus Arg/Lys<sub>2</sub>-Xaa<sub>2-6</sub>-φaa-Xaa-φaa (où φaa est un acide aminé hydrophobique et Xaa un acide aminé quelconque) (Holland et Cooper 1999 ; Sharrocks et *al.*, 2000). Le domaine D interagit avec le motif CRS de ERK (Rubinfeld et *al.*, 1999 ; Tanoue et *al.*, 2000). Le deuxième motif présent chez plusieurs substrats de ERK est connu sous le nom de

motif DEF (site d'ancrage de ERK) qui consiste en deux résidus Phe séparés par un résidu quelconque et suivi par un résidu Pro (Fantz et *al.*, 2001 ; Jacobs et *al.*, 1999 ; MacKenzie et *al.*, 2000). Cette séquence Phe-Xaa-Phe-Pro peut se coupler à une poche hydrophobe située dans un large lobe de ERK tout près de la zone catalytique (Lee et *al.*, 2004). La combinaison de ces trois sites d'interaction avec ERK contribue à la spécificité des substrats et à leurs affinités pour ERK.

#### **6.2.4 La spécificité de la cascade ERK**

Les diverses fonctions physiologiques régulées par la cascade de ERK posent la question de savoir quel mécanisme détermine la spécificité des signaux de ERK. L'un de ces mécanismes a été observé chez les cellules PC12. Dans cette lignée cellulaire, une stimulation par le NGF résulte en une activation soutenue de ERK et mène à la différenciation en cellules contenant des dendrites. D'un autre côté, une stimulation par le EGF mène plutôt à une activation transitoire de ERK et en résulte la prolifération cellulaire (Peraldi et *al.*, 1993 ; Marshall, 1995 ; York et *al.*, 1998). Ainsi, la durée et la force des signaux pourraient déterminer la spécificité de la cascade ERK. Un autre facteur pouvant contribuer à la spécificité de la signalisation est la présence de protéines d'échafaudage qui créent des complexes multienzymatiques (Chuderland et Seger, 2005). Ces protéines d'échafaudage facilitent et accélèrent l'activation de ERK et les protègent aussi contre des signaux non pertinents. MP1, KSR, l'arrestine, la paxiline font partie de l'échafaudage de la cascade ERK (Schaeffer et *al.*, 1998 ; Yu et *al.*, 1998 ; Luttrell et *al.*, 2001 ; Ishibe et *al.*, 2004). Leur interaction avec ERK produit une compartimentation et dirige la réponse cellulaire vers une fonction spécifique (Chuderland et Seger, 2005).

Parmi les étapes clés dans le mécanisme de signalisation des cascades de MAPK on retrouve les changements dans la localisation cellulaire. Dans la plupart des cellules au repos, les composantes de la cascade des MAPKs sont principalement situées dans le cytosol. Par contre, cette localisation change rapidement suite à une stimulation cellulaire. Dans la cascade ERK, la stimulation extracellulaire induit le recrutement de Raf-1 à la membrane plasmique et la translocation de MEK, ERK et

RSK au noyau (Leevers et *al.*, 1994 ; Jaaro et *al.*, 1997 ; Chen et *al.*, 1992). Des évidences indiquent que certaines fonctions de ERK et RSK sont complètement dépendantes de leur localisation cellulaire. La prévention de la translocation de ERK au noyau inhibe la transcription de gènes. De plus, l'activité de RSK2 dans le noyau est nécessaire pour la transcription du gène de c-Fos (Roux et Blenis, 2004). Suite à une stimulation, la plupart des molécules de ERK migrent et s'accumulent dans le noyau. Dans plusieurs systèmes, cette accumulation se prolonge et on peut observer de grandes quantités de ERK dans le noyau bien après le déclin de l'activité de ERK. Par exemple, dans les cellules Rat-1, l'activité maximale de ERK se trouve à 15 minutes après la stimulation, et cette activité se décline rapidement à cause de la déphosphorylation de phospho-Thr, qui précède celle de phospho-Tyr (Yao et *al.*, 2000 ; Yung et *al.*, 1997). Dans ce système, le nombre de ERK présent au noyau (actif et inactif) atteint son summum à 30 minutes après la stimulation et on en retrouve encore sous la forme inactive bien après 60 minutes. Cette accumulation de la forme inactive de ERK suggère que le noyau serait le site de la terminaison du signal de ERK (Volmat et *al.*, 2001).

Au contraire de ERK, il a été suggéré que leur régulateur MEK était absent du noyau à la fois avant et après une stimulation extracellulaire (Lenormand et *al.*, 1993). MEK contient une petite séquence d'acide aminé dans sa région N-terminale, qui agit comme une séquence d'export du noyau (NES) qui explique probablement sa localisation au cytosol (Fukuda et *al.*, 1996 ; Jaaro et *al.*, 1997). Par contre, en enlevant la séquence NES ou en utilisant des inhibiteurs d'export du noyau, il a été démontré que MEK se dirige dans le noyau. La séquence NES permet une exportation rapide du noyau, d'où l'apparente localisation dans le cytosol de MEK (Yao et *al.*, 2001). Le rôle de MEK au noyau est encore incertain, mais son exportation sert aussi comme mécanisme d'export pour ERK (Adachi et *al.*, 2000). Dans les cellules au repos, ERK est toujours associé avec MEK, lors de la stimulation la phosphorylation de ERK dissocie les deux kinases et cela est suffisant pour permettre la translocation de ERK au noyau (Rubinfeld et *al.*, 1999 ; Fukuda et *al.*, 1997). Il existe d'autres protéines permettant de séquestrer ERK au cytosol comme MKP3, les microtubules et PEA-15 (Pouyssegur et *al.*, 2002 ; Reszka et *al.*, 1995 ;

Whitehurst et *al.*, 2004). Pour conclure, la localisation cellulaire de ERK semble très importante pour la régulation de son activité, mais les détails exacts de sa localisation restent à être déterminés.

### **6.3 Les rôles physiologiques de la cascade ERK**

Même si l'activation de la cascade ERK était initialement connue pour son implication dans la transmission et le contrôle des signaux mitogéniques, cette cascade est aussi impliquée pour la différenciation, le développement, la réponse au stress et la détermination de la morphologie.

#### **6.3.1 ERK dans la prolifération et l'oncogenèse**

La cascade ERK a été directement impliquée dans l'induction de la prolifération et dans la transformation oncogénique. Plusieurs évidences nous permettent d'incriminer ERK, incluant le fait que l'activité de ERK est stimulée durant la transformation provoquée par Ras et que la prolifération et l'oncogenèse sont inhibées par la phosphatase MKP1 (Kyriakis et *al.*, 1992 ; Sun et *al.*, 1993). L'utilisation de dominant négatif et de MEK1 constitutivement actif a prouvé une fois pour toutes la participation de cette voie dans la prolifération et l'oncogenèse. On a même prouvé que la cascade ERK à elle seule était suffisante pour induire la transformation et l'immortalisation de cellules (Cowley et *al.*, 1994 ; Seger et *al.*, 1994 ; Manser et *al.*, 1994). De plus, l'activation constitutive de ERK a été observée dans plus de 50 lignées cellulaires dérivées de tumeurs. Enfin, il est intéressant de noter que l'inhibiteur spécifique de MEK (PD184352) atténue la croissance des tumeurs d'origines humaines et murines chez la souris (Sebolt-Leopold et *al.*, 1999).

### 6.3.2 Le contrôle du cycle cellulaire

L'activation soutenue de ERK semble requise par plusieurs types cellulaires afin de passer du point de restriction G1 et entrer dans la phase S, dans laquelle l'ADN cellulaire est répliqué (Pages et *al.*, 1993). Même si l'activation de ERK est liée au cycle cellulaire, l'endroit où la cascade ERK pourrait interagir avec la machinerie du cycle cellulaire n'est pas encore clair. L'expression des cyclines de type D, qui sont des sous-unités régulatrices pour les sous-unités catalytiques des kinases cyclines dépendantes 4 et 6 (CDK4 et CDK6), contrôlent la phase précoce de la transition à la phase S. Un lien critique entre la transduction du signal et le cycle cellulaire a été suggéré lorsqu'on a découvert que la surexpression de dominant négatif de MEK et de ERK, ou la surexpression de MKP1, inhibent l'expression de la cycline D1. La surexpression de mutants constitutivement actifs de MEK ou de Raf-1 augmente l'expression de la cycline D1 (Lavoie et *al.*, 1996 ; Woods et *al.*, 1997). Il a aussi été démontré que l'augmentation de l'expression de la cycline D1 provoqué par la cascade ERK dépendait aussi de la voie de signalisation de la PI3-kinase (Treinies et *al.*, 1999). En plus de la régulation de CDK4 et CDK6 par la synthèse de la cycline de type D, ERK participe aussi à la dégradation de p27Kip1, un inhibiteur de la voie CDK, en le phosphorylant (Assoian, 2004 ; Kawada et *al.*, 1997). Tandis qu'une faible activation de Raf-1 cause une progression du cycle cellulaire, une forte activation cause un arrêt du cycle cellulaire (Sewing et *al.*, 1997). L'activation de Ras, ou une activation soutenue de ERK, accélère la mise en place de la sénescence dans certains types cellulaires et va induire l'arrête de la croissance dans d'autres (Serrano et *al.*, 1997 ; Woods et *al.*, 1997 ; Sewing et *al.*, 1997 ; Lloyd et *al.*, 1997). De plus, il existe des évidences d'une signalisation croisée entre la voie de signalisation de prolifération/différenciation de Ras/Raf/ERK et la fonction d'arrêt de la croissance de gènes suppresseurs de tumeurs comprenant p53, p16 et Rb (Sidransky et Hollstein, 1996). Donc, une signalisation soutenue de Ras ou Raf-1 activerait p53 et/ou p21 de même que l'expression de p16, menant à un arrêt de croissance (Lin et *al.*, 1998 ; Zhu et *al.*, 1998).

### 6.3.3 Autres procédés physiologiques

Une autre réponse physiologique qui semble être régulée par ERK est la différenciation cellulaire. Différents membres de la cascade des MAPKs, incluant ERK, sont impliqués dans les procédés de différenciation de monocytes, de développement de neurites dans les cellules PC12, de maturation de cellules T, dans le développement des mastocytes et dans le développement des neutrophiles (Kharbanda et *al.*, 1994 ; Qiu et Green, 1992 ; Alberola-Ila et *al.*, 1995 ; Tsai et *al.*, 1993 ; Geest et *al.*, 2009). Dans les cellules somatiques, les MAPKs sont activées en réponse à plusieurs stimuli. Il n'est donc pas surprenant de les voir impliquées dans la différenciation et la prolifération de plusieurs types cellulaires. Les implications ont été démontrées dans plusieurs systèmes, dont l'embryogenèse de *Drosophila* et de *Xenopus* (Tsuda et *al.*, 1993 ; Gabay et *al.*, 1997 ; Haccard et *al.*, 1993).

Dans la plupart des types cellulaires, la cascade ERK semble jouer un rôle antiapoptotique. Il a été démontré dans les cellules PC12 que l'inhibition de la cascade ERK corrèle avec la mort cellulaire (Xia et *al.*, 1995). En plus de cela, l'activation de la cascade ERK protège les cellules MIH3T3 contre l'apoptose induite par la doxorubicine (von Gise et *al.*, 2001). La prévention de l'apoptose par la cascade ERK peut se faire par Raf-1 qui permet la phosphorylation de la protéine mitochondriale Bad, l'empêchant d'interagir avec Bcl-2 et inhibant l'apoptose. Cette protection contre l'apoptose induite par Raf-1 implique l'activation de MEK, de ERK et de RSK (Blagosklonny et *al.*, 1997). Chez le neutrophile humain, la voie MEK/ERK est aussi impliquée dans la régulation de l'apoptose. L'activation des deux kinases est démontrée pour retarder l'apoptose des neutrophiles stimulés par des cytokines et des composantes bactériennes (Downey et *al.*, 1998 ; Klein et *al.*, 2001)

Enfin, la dernière fonction physiologique pouvant être régulée par ERK, est la réponse immunologique face au stress. Parmi les substrats de ERK, on retrouve la famille de la p90 kDa kinase ribosomale S6 (RSK) (Jones et *al.*, 1988). Ce qui est le plus intéressant vient du fait que les substrats de RSK incluent plusieurs facteurs de transcription connus pour participer à la transcription de gènes de cytokines comme CREB, I $\kappa$ B $\alpha$ /NF $\kappa$ B et c-Fos (Xing et *al.*, 1996 ; Ghoda et *al.*, 1997 ; Schouten et

*al.*, 1997). Un autre substrat de ERK, MSK1, est connu pour influencer l'activation de CREB (Deak *et al.*, 1998). De plus, l'inhibition de ERK empêche l'induction des gènes sous le contrôle de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  (Aubert *et al.*, 1999). Bref, on a déjà démontré l'importance de ces différents facteurs pour la transcription de plusieurs cytokines et chimiokines et étant donné que ERK influence l'activation de tous ces facteurs de transcription, il semblerait alors que ERK joue un rôle important dans la réponse inflammatoire.

### **Objectifs de l'étude**

À la lumière de ce qui précède, il est intrigant de constater que chez les neutrophiles, la voie MEK/ERK n'a aucune implication dans la transcription (Cloutier 2007). Or, nos résultats préliminaires montrent que dans certaines conditions chez le neutrophile, l'inhibition de MEK n'a pas d'effet sur la phosphorylation de ERK. Pour mon projet de maîtrise, j'émetts l'hypothèse que les kinases ERK 1/2 peuvent activées indépendamment de MEK, et qu'elles sont impliquées dans la transcription de gènes de cytokines. Pour répondre à mon hypothèse, je vais tout d'abord vérifier l'efficacité de l'inhibition de MEK, et l'activation de ERK dans ces conditions. Ensuite, je vais me tourner vers des inhibiteurs sélectifs de ERK 1/2 afin de déterminer leurs effets directs sur la transcription, la production de cytokines, et l'apoptose retardée. Enfin, je vais examiner les effets de l'inhibition de ERK sur les autres voies de signalisation du neutrophile. Cette étude permettra de clarifier le rôle de ERK chez le neutrophile, une cellule en partie responsable de maladies inflammatoires chroniques comme la goutte et la polyarthrite rhumatoïde. L'élucidation des différentes voies de signalisation menant à la production de cytokines par le neutrophile pourra permettre l'avènement de thérapies ciblées sur les maladies inflammatoires chroniques à prédominance neutrophilique.

## Matériels et méthodes

### *Anticorps et réactifs*

Les anticorps dirigés contre phospho-ERK (Thr202/Tyr204) (#9101), MEK(#9122), phosph-MEK (Ser 217/221) (#9154), phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (#4631) phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (#9234), phospho-S6 protéine ribosomale (Ser 235/236) (#2211), phospho-Mnk1 (Thr 197/202) (#2111), phospho-MSK1 (Ser 360) (#9594), phospho-SAPK/JNK (Thr 183/Tyr185) (#9251), phospho-RelA (Ser536) (#3037), phospho-CEBP $\beta$  (Thr235) (#3084), et phospho-CREB (Ser 133) (#9191) ont été achetés de Cell Signaling (Beverly, MA). Les anticorps dirigés contre l'actine (sc-1616), ERK (sc-93, sc-154), I $\kappa$ B- $\alpha$  (sc-371), p38 MAPK (sc-535) venaient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Le Ficoll-Plaques provient de GE Biosciences (Baie d'Urfé, Qc) ; le RPMI 1640 sans endotoxine (< 2 pg/ml) et le FCS viennent de Wisent (St-Bruno, Qc). Les cytokines recombinantes humaines proviennent de R&D Systems (Minneapolis, MN), et le LPS UltraPure (d'*E. coli* 0111 : B4) provient de InVivoGen (San Diego, CA). Le N-formyl-méthionyl-phénylalanine (fMLP) et le phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) viennent de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le diisopropyl fluorophosphate (DFP) vient de Bishop Inc. (Burlington, Ont.). Les inhibiteurs de protéase aprotinine, 4-(2-aminométhyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), leupeptine et la pepstatine A proviennent tous de Roche (Laval, Qc). Les différents inhibiteurs de kinases ont été achetés chez Cedarlane Labs (Mississauga) et les inhibiteurs de ERK (328 007, 328 007, 328 009) ont été achetés chez Calbiochem (San Diego, CA, USA). Tous les autres réactifs étaient de la plus grande qualité disponible et toutes les solutions ont été préparées en utilisant de l'eau de grade clinique sans pyrogènes.

### *Isolement et culture cellulaire*

Les neutrophiles ont été isolés du sang périphérique de donneurs sains sous les conditions aseptiques sans endotoxines selon la méthode de Boyum à l'exception que toute la procédure a été effectuée à température ambiante. (Boyum 1968). Brièvement, le sang a été prélevé par venipuncture et centrifugé à 200xg, 10 min ; le

plasma a été enlevé et remplacé par du PBS stérile. Après la sédimentation au dextran, les cellules ont été centrifugées sur du Ficoll-Plaqué ; l'anneau de PBMC a été soigneusement recueilli, et les érythrocytes contenus dans le culot granulocytaire ont été enlevés par lyse hypotonique avec de l'eau (20s). Les neutrophiles ont été resuspendus dans du RPMI 1640 supplémenté de 10% FCS et de L-glutamine, à une concentration finale de  $5 \times 10^6$  cellules/ml (à moins qu'autrement spécifié). Tel que déterminé par coloration Wright/Giemsa, la préparation de neutrophiles contenait moins de 0,5% de monocytes ou de lymphocytes. La viabilité des neutrophiles excédait 98% après trois heures en culture, déterminée par exclusion au bleu de Trypan. Les cellules isolées ont été mises en culture dans des pétris (traités pour la culture cellulaire) à 37°C sous une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub> ; dans quelques expériences, les cellules ont été cultivées dans des tubes de polypropylène à 37°C, avec une agitation occasionnelle.

#### *Électrophorèses et Immunobuvardages de type Western*

Pour les échantillons cellulaires totaux (« Whole cell samples »), les incubations ont été arrêtées en ajoutant un volume équivalent de PBS froid contenant du DFP (2 mM concentration finale) et des inhibiteurs de phosphatases (10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), avant une centrifugation de 5 min à 300g. Les cellules ont été resuspendues dans le PBS froid supplémenté d'inhibiteurs de protéases (1 mM DFP, 1 mM PMSF, 1 mM AEBSF et 10 µg/ml d'aprotinine, de leupeptine et de pepstatine A) en plus des inhibiteurs de phosphatases mentionnés ci-haut. Du tampon d'échantillons bouillant a été ajouté directement dans la resuspension, lequel a été vortexé brièvement et bouillit 3 min à 100°C. Les échantillons ainsi préparés ont été soniqués pour défaire la chromatine et entreposés à -20°C avant l'analyse. Tous les échantillons sont analysés par migration électroporétique de type SDS-PAGE selon la méthode de Laemmli sur des gels de 10-12 % (Laemmli, 1970). Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur de membranes de nitrocellulose, lesquelles ont été colorées au Rouge de Ponceau, décolorées, bloquées (avec du TBS contenant 5% de lait écrémé ou de la BSA 4%), puis

analysées avec les différents anticorps tel que décrit par McDonald et al. (McDonald et al., 1997).

#### *Immunoprécipitations et essais kinases in vitro*

Les neutrophiles ( $20 \times 10^6$  cellules/1,5ml) ont été incubés à 37°C en présence ou en absence d'inhibiteurs et/ou de stimuli; la réaction a été terminée par une centrifugation de 15 s à 12 000 xg. Les culots de cellules ont été lysés dans 1 ml de tampon de lyse froid (20 mM Tris pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA et 100 mM NaCl) contenant les inhibiteurs de protéases et de phosphatases et centrifugé à 15 000 rpm pendant 15 min à 4°C. Les surnagants ont ensuite été incubé avec 1,5 µg/ml d'anticorps contre ERK ou MEK pour 60 min, suivi d'une incubation durant la nuit avec les billes couplées avec des protéines-G sépharose 4FF à 4 °C. Pour l'analyse par immunobuvardage, les billes ont été lavées deux fois dans le tampon de lyse et deux fois avec du PBS avant de resuspendre et chauffer dans 30 µL de tampon d'échantillon. On a analysé ensuite par électrophorèse comme mentionnée ci-haut. Pour l'analyse par essai kinase, on a lavé les billes deux fois dans le tampon de lyse et deux fois dans le tampon kinase (20 mM PIPES pH 7.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl). Les billes ont été ensuite resuspendues dans 30 µL de tampon de kinase contenant 1 µg de MBP et 20 µM d'<sup>32</sup>PATP. Les échantillons ont été incubés pendant 30 min à 30°C avec des agitations fréquentes et la réaction est terminée par l'ajout de tampon d'échantillonnage bouillant 5x. Les échantillons résultants ont été migrés sur un gel 15% SDS-PAGE, suivi d'un séchage et d'une autoradiographie.

#### *Isolement de l'ARN et analyse par PCR en temps réel*

Les neutrophiles ont été incubés en présence ou en absence de stimuli et/ou d'inhibiteurs pour le temps désiré. L'ARN a été extrait en utilisant le protocole de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987) et transcrit inversement avec des décimères aléatoires (Ambion, Austin, TX) et SuperScript II (InVitrogen, Burlington, On). L'ADNc résultant a été analysé par PCR en temps réel semiquantitatif en utilisant le protocole de Dussault et Pouliot (Dussault et Pouliot, 2006), dans un Rotorgene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Les amorces

de nucléotides utilisées ont été : IL-8 (forward 5'-AGGAAGCTCACTGGTGGCTG-3'; reverse 5'-TAGGCACAATCCAGGTG-GC-3'); MIP-1 $\alpha$  (Avant 5'-AGCTGACTACTTTGAGACGAGCA-3'; arrière 5'-CGGCTTCGCTTGGTTAGGA-3'); MIP-1 $\beta$  (Avant 5'-CTGCT-CTCCAGCGCTCTCA-3'; arrière 5'-GTAAGAAAAGCAGCAGGCGG-3'); TNF- $\alpha$  (Avant 5'-TCTTCTCGAACCCCGAGTGA-3'; arrière 5'-CC-TCTGATGGCACCACCAG-3'); et 18S (avant 5'-AGGAATTGACGGA-AGGGCAC-3'; arrière 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'). Pour les analyses de transcrits primaires par (PT)-PCR nous avons utilisé les amorces suivantes: IL-8 (Avant 5'-ATTGAGAGTGGACCACACTG-3'; arrière 5'-ACTACTGTAATCCTA-ACACCTG-3'); MIP-1 $\alpha$  (Avant 5'-GTCAGTCCTTTCTTGGCTCTG-3'; Arrière 5'-GATACCCACAACGAAACTCAGAC-3'); MIP-1 $\beta$  (Avant 5'-AAACCTCTTTGCCACCAATACC-3'; arrière 5'-AGGACTCTGCCTACA-CCTTGAC-3'); et TNF- $\alpha$  (Avant 5'-TCAGGATCATCTTCTCGAACC-3'; arrière 5'-GAGTCCTTCTCACATTGTCTC-3').

### *ELISA*

Les neutrophiles (3 x 10<sup>6</sup> cellules/ 600  $\mu$ L) ont été cultivés dans des plaques de 12 puits à 37°C sous une atmosphère contenant entre autre 5% de CO<sub>2</sub> en présence ou en absence de stimuli et/ou d'inhibiteurs, pour le temps indiqué. Les surnageants cellulaires aussi bien que les cellules ont été soigneusement prélevés, congelés rapidement dans l'azote liquide puis entreposés à -80°C. Les concentrations de cytokines et chimiokines ont été déterminées par ELISA « sandwich », utilisant les anticorps de capture et de détection de R&D Systems. La limite de détection de ces ELISA est de 10 pg.

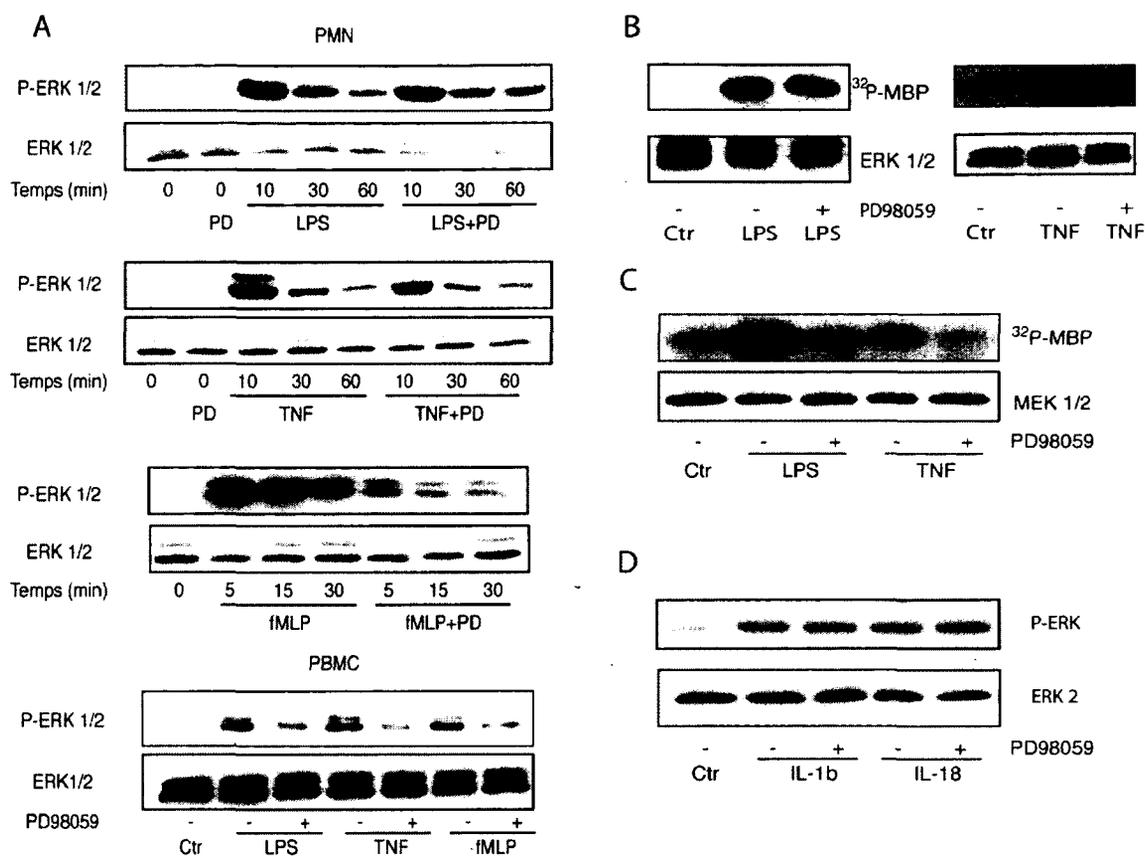
### *Détermination de l'apoptose des neutrophiles*

Les neutrophiles (5 x 10<sup>5</sup> cellules) ont été lavés deux fois dans du PBS froid et incubé pendant 30 min avec du FITC conjugué à l'anexine V et avec de l'iodure de propidium. Les cellules marquées ont été lavées et analysées (un minimum de 10 000 cellules) au moyen d'un instrument FACScan (BD Biosciences) en utilisant le logiciel CellQuest (BD Biosciences).

## Résultats

### **L'activation de ERK est indépendante de l'activation de MEK chez les neutrophiles stimulés au LPS et au TNF- $\alpha$ .**

Dans le cadre d'études sur le rôle de la voie de signalisation MEK/ERK dans la réponse du neutrophile, les auteurs ont été surpris d'observer que cette voie affecte la sécrétion de cytokines, mais pas la transcription (Cloutier *et al.*, 2007). En effet, tel que mentionné dans l'introduction, ERK affecte l'activité de plusieurs facteurs de transcription importants pour l'induction de gènes de cytokines dans d'autres types cellulaires, dont les facteurs C/EBP $\beta$ , qui sont aussi important chez le neutrophile (Cloutier *et al.* 2009). Il semble donc que chez le neutrophile humain, l'inhibition de MEK1/2 aurait une efficacité limitée. Afin de le vérifier, nous avons utilisé les inhibiteurs sélectifs de MEK, PD98059 et U0126, avec des neutrophiles humains stimulés soit avec du LPS, du TNF- $\alpha$  ou du fMLP et comparé les résultats avec des monocytes autologues, car nous savons que les inhibiteurs sont efficaces avec ces cellules (Foreback *et al.*, 1998). La figure 1A montre que l'inhibiteur PD98059 n'a aucun effet sur la phosphorylation de la kinase ERK chez le neutrophile stimulé au LPS et au TNF- $\alpha$ . En revanche, la figure montre que le PD98059 inhibe cette réponse chez le neutrophile stimulé au fMLP et chez les monocytes avec tous les stimuli, tel qu'attendu. On observe les mêmes résultats avec le U0126 (résultats non montrés). Même si les inhibiteurs de MEK n'ont aucun effet sur la phosphorylation de ERK, nous avons aussi mesuré leurs effets sur l'activité enzymatique de ERK. Nous avons donc immunoprécipité ERK et avons fait un essai kinase. La figure 1B montre que l'utilisation de l'inhibiteur PD98059 n'a aucun effet sur l'activité de ERK chez le neutrophile stimulé au LPS et au TNF- $\alpha$ , bien qu'il bloque complètement l'activité kinase de MEK, tel qu'attendu (Fig 1C). Nous observons aussi un découplage de MEK et ERK avec d'autres cytokines que le TNF $\alpha$  (i.e. IL-1 $\beta$  et IL-18) ou d'autres ligands de TLR que le LPS (i.e. peptidoglycane) (Fig 1D).



**Figure 1. L'activation de ERK est découplée de MEK chez les neutrophiles stimulés au LPS et aux cytokines pro-inflammatoires.** (A) Les PMNs et les PBMCs ont été préincubés (30 min à 37 °C) avec 20  $\mu$ M de PD98059 ou un diluant contrôle avant la stimulation de 5 à 60 min (15 min pour les PBMC) avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF- $\alpha$ , 30  $\mu$ M fMLP ou un diluant contrôle. Les niveaux cellulaires de ERK 1/2 phosphorylé (Thr 202/Tyr 204) ou de ERK 1/2 (comme contrôle de charge) ont ensuite été déterminés par une analyse d'immunobuvardage. (B) Les PMNs ont été prétraitées (30 min. à 37 °C) avec 20  $\mu$ M de PD98059 ou un diluant contrôle avant la stimulation de 15 min avec 300 ng/ml de LPS ultra-pure, 100 U/ml TNF- $\alpha$  ou un diluant contrôle. Les cellules ont par la suite été lysées, et la kinase ERK 1/2 a été immunoprécipité ; les immunoprécipités résultants ont été divisés en deux parties, qui étaient, soit directement soumises a un essai kinase en utilisant la protéine MBP comme substrat, soit procédé par immuno-buvardage pour l'analyse de leurs contenus en ERK 1/2 (contrôle de charge). (C) Les cellules ont été prétraitées (30 min. à 37 °C) avec 20  $\mu$ M de PD98059 ou un diluant contrôle avant la stimulation de 15 min avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF- $\alpha$  ou un diluant contrôle. Les cellules ont par la suite été lysées, et la kinase MEK1/2 a été immunoprécipitée des lysats ; les immunoprécipités résultants ont été divisés en deux parties, qui étaient, soit directement soumis a un essai kinase en utilisant la protéine MBP comme substrat,

soit procédé par immuno-buvardage pour l'analyse de leurs contenus en MEK1/2 . (D) Les PMNs ont été préincubés (30 min à 37°C) avec 20 µM de PD98059 ou un diluant contrôle avant la stimulation de 15 min avec 10 µM d'IL-1β, 10 nM IL-18 ou un diluant contrôle. Les niveaux cellulaires de ERK 1/2 phosphorylé (Thr 202/Tyr 204) ou de ERK 2 (comme contrôle de charge) ont ensuite été déterminés par une analyse d'immuno-buvardage. Les expériences représentent au moins trois expériences indépendantes.

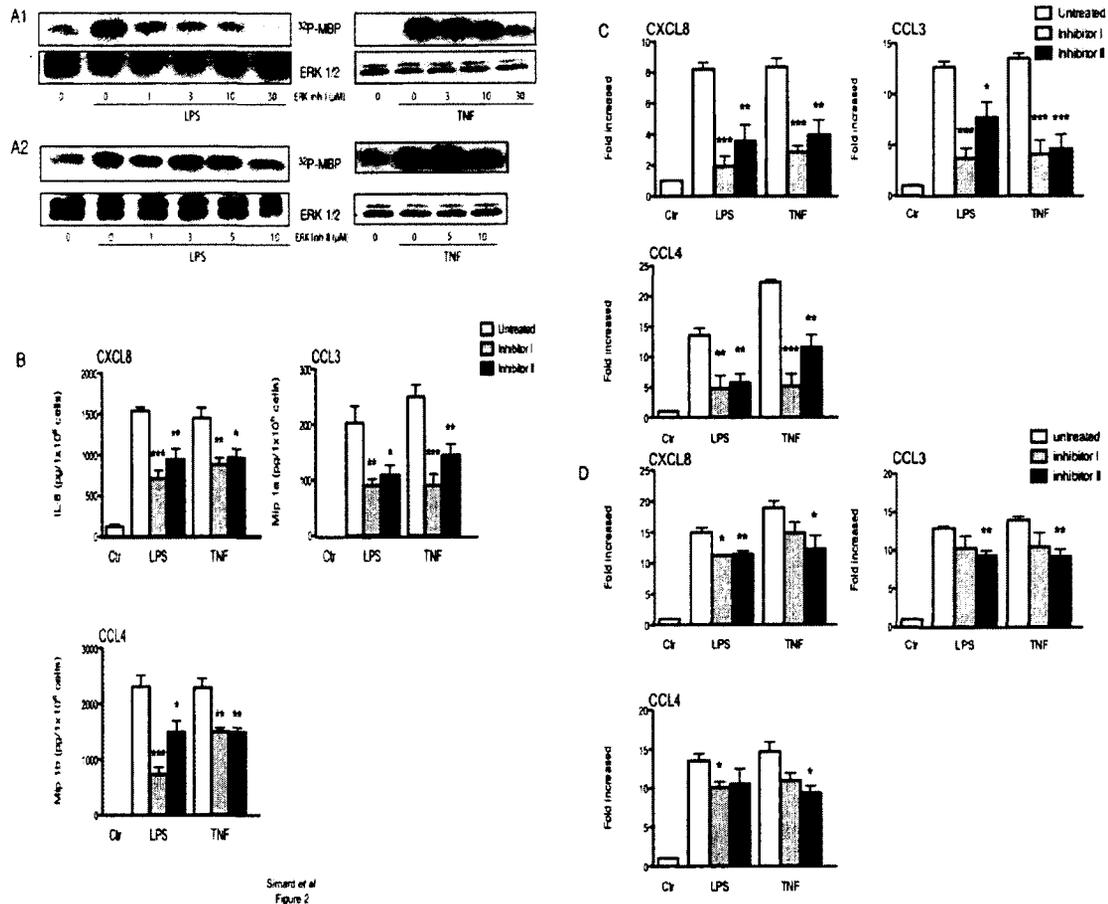
### **Impacts de l'activation de ERK sur les réponses des neutrophiles humains**

Afin de déterminer les effets de ERK chez les neutrophiles humains stimulés au LPS et au TNF-α, nous avons eu recours à trois différents inhibiteurs sélectifs pour ERK. Avant d'utiliser des inhibiteurs cependant, il est nécessaire de connaître les concentrations requises pour inhiber leur cible. Pour ce faire, nous avons prétraité les neutrophiles avec diverses concentrations des trois inhibiteurs pour ensuite les stimuler, procéder à une immunoprécipitation de ERK et soumettre à un essai kinase. Comme montré à la figure 2A, le composé connu sous le nom de « ERK inhibitor I » est efficace à une concentration de 10 µM ; un autre composé connu sous le nom « ERK inhibitor II » (ou FR180204) réussit aussi à empêcher l'activation de ERK à 10 µM. Par contre, le dernier composé connu sous le nom de « ERK inhibitor III » s'est révélé inefficace, même à des concentrations aussi élevées que 50 µM (résultats non montrés). Nous avons donc utilisé des concentrations de 10 µM pour les deux premiers inhibiteurs afin de bloquer l'activité de ERK chez le neutrophile humain stimulé au LPS et au TNF-α.

Nous avons premièrement étudié l'impact de la kinase ERK sur la production de chimiokines chez le neutrophile humain. Nous avons donc prétraité les cellules avec les inhibiteurs de ERK puis les avons stimulées avec le LPS ou le TNF-α pour une période de 6 h avant de prélever les surnageants pour l'analyse ELISA. Comme le montre la figure 2B, les deux inhibiteurs ont significativement diminué la relâche de CXCL8 tout comme celle de CCL3 et CCL4 chez les neutrophiles humains stimulés au LPS et au TNF-α. Parce que la production de cytokines inductibles est généralement précédée par une augmentation des transcrits d'ARNm correspondants, nous avons

étudié l'effet d'inhibiteurs de ERK sur cette réponse. Nous avons prétraité les cellules avec les deux inhibiteurs de ERK pour ensuite les stimuler avec du LPS ou du TNF- $\alpha$ . Après trente minutes, nous avons lysé les cellules et extrait l'ARNm comme décrit dans la section Méthodes. Ensuite, nous avons transcrit l'ARNm en ADN complémentaire et nous l'avons analysé par PCR semi-quantitatif. Comme le montre la figure 2C, les deux inhibiteurs ont significativement diminué la quantité relative d'ARNm des gènes de cytokines des neutrophiles humains stimulés au LPS et au TNF- $\alpha$ .

Le fait que nous observions moins d'ARNm chez les neutrophiles traités avec les inhibiteurs de ERK, pourrait être dû à une diminution de la transcription des gènes d'intérêt ou encore à une stabilisation de l'ARNm. Afin d'éliminer l'hypothèse de la stabilisation de l'ARNm, nous avons utilisé la même méthode qu'auparavant, mais cette fois-ci avec des amorces situées dans le premier intron de l'ARNm naissant. Ainsi, nous avons directement mesuré le taux de transcription. Comme le montre la figure 2D, il y a une baisse significative du taux d'ARNm naissant chez les neutrophiles stimulés au LPS et au TNF- $\alpha$ . Toutefois, il semble avoir un effet de stabilisation de l'ARNm car le niveau de diminution de transcription semble être moins important que la réduction des niveaux totaux des ARNm des gènes d'intérêts.



Smart et al  
Figure 2

**Figure 2. Impacts de l'activation de ERK sur la réponse des neutrophiles humains.** (A) Les cellules ont été préincubées (30 min à 37°C) avec des concentrations croissantes de ERK inhibitor I (0 à 30 μM), de ERK inhibitor II (0 à 10 μM) ou un diluant contrôle avant la stimulation de 15 min avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF-α ou un diluant contrôle. Les cellules ont par la suite été lysées, et la kinase ERK 1/2 a été immunoprécipitée; les immunoprécipités résultants ont été divisés en deux parties, qui étaient, soit directement soumises à un essai kinase en utilisant la protéine MBP comme substrat, soit procédé par immuno-buvardage pour l'analyse de leurs contenus en ERK 1/2 (contrôle de charge). (B) Les cellules ont été prétraitées (30 min, 37 °C) avec 10 μM de ERK inhibitor I, 10 μM de ERK inhibitor II ou du diluant contrôle avant la stimulation de 6 h avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF-α ou un diluant contrôle. Les surnageants de cultures ont été prélevés et analysés par ELISA. (C) Les cellules (40 x 10<sup>6</sup>/condition) ont été prétraitées (30 min, 37°C) avec 10 μM de ERK inhibitor I, 10 μM de ERK inhibitor II ou du diluant contrôle avant la stimulation de 60 min avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF-α ou un diluant contrôle. La totalité de l'ARN a été isolé, transcript inversement et analysé pour l'expression des gènes de cytokines par PCR en temps réel. Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'ARNr 18S et représentées comme l'augmentation par rapport aux cellules non

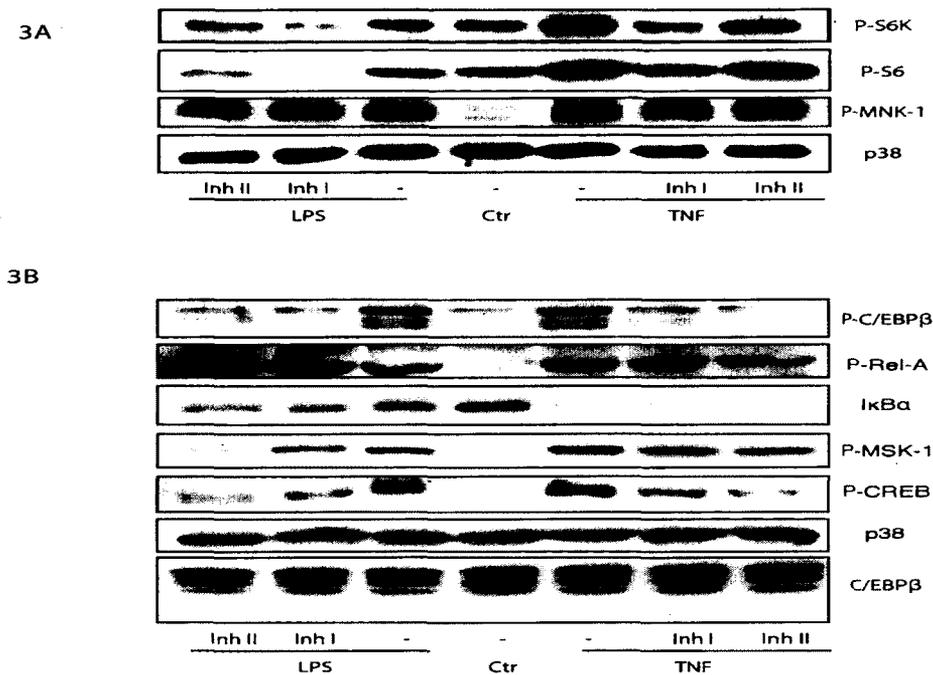
stimulées. (D) L'ARN rétrotranscrit de l'expérience précédente a été analysé par RT-PCR en temps réel (en utilisant des amorces situées dans le premier intron du gène donné), donc une mesure de l'activité transcriptionnelle. Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'ARNr 18S et représentées comme l'augmentation par rapport aux cellules non stimulées. Les expériences représentent au moins trois expériences indépendantes, les ELISA et les PCR en temps réel ont été faites en duplicata. \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **Cibles potentielles de l'action de ERK chez le neutrophile humain**

On a déjà démontré que ERK peut influencer la transcription des cytokines et leur sécrétion ultérieure. Par contre, nous ne savons pas encore sur quels intermédiaires ERK agit pour produire ces événements. Dans cette partie, nous explorons les facteurs de transcription et de traduction qui sont affectés par l'inhibition de ERK. Suite à un prétraitement avec les inhibiteurs de ERK et une stimulation de 15 minutes avec du LPS et du TNF- $\alpha$ , les neutrophiles ont été lysés et analysés par western blot. On observe dans la figure 4A que l'induction de la phosphorylation de la p70S6K produite par le LPS et le TNF- $\alpha$  a été abolie par les inhibiteurs de ERK et nous observons, par le fait même, une diminution de la phosphorylation de la sous-unité ribosomale S6. Nous observons aussi que la phosphorylation de la protéine MNK1, induite par le LPS et le TNF- $\alpha$ , n'est aucunement affectée par les deux inhibiteurs de ERK.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la baisse du niveau de transcription des gènes de cytokines provoquée par les inhibiteurs de ERK chez le neutrophile humain. Suite à un prétraitement avec les inhibiteurs de ERK et une stimulation de 15 minutes avec du LPS et du TNF- $\alpha$ , les neutrophiles ont été lysés et analysés par western blot. Ainsi, nous avons observé l'état de phosphorylation de trois facteurs de transcriptions (RelA, CREB, C/EBP $\beta$ ) et de protéines interagissant dans leurs voies de signalisation (I $\kappa$ B $\alpha$ , MSK1). Comme illustré à la figure 4B, les inhibiteurs de ERK n'ont pas affecté la phosphorylation induite par le LPS et le TNF sur la protéine RelA, le membre le plus important de la famille NF- $\kappa$ B. Tel que décrit dans la section Introduction, Rel-A est transloqué au noyau suite à la dégradation de son inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  via le complexe IKK. Nous avons donc analysé la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$ . Nous

observons que la dégradation engendrée par le LPS et le TNF- $\alpha$  n'est pas affectée par les inhibiteurs de ERK. Par contre, la figure montre que les inhibiteurs ont influencé le niveau de phosphorylation des facteurs de transcription CREB et CEBP/ $\beta$ , ainsi que de la kinase effectrice MSK1.

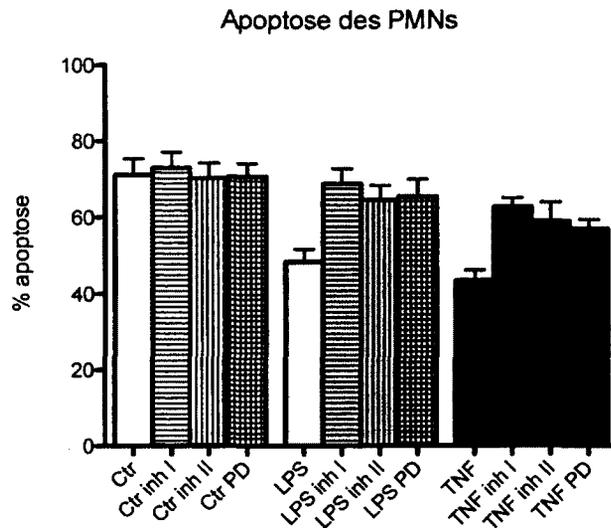


**Figure 3. Cibles potentielles de l'activation de ERK chez le neutrophile humain.**

Les cellules ont été prétraitées (30 min, 37°C) avec 10  $\mu$ M de ERK inhibiteur I, 10  $\mu$ M de ERK inhibiteur II ou du diluant contrôle avant la stimulation de 15 min avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF- $\alpha$  ou un diluant contrôle. (A) Les échantillons ont été analysés par immuno-buvardage avec des phospho-anticorps des cibles traductionnelles ; les membranes sont aussi analysées pour la présence de p38 (contrôle de charge). (B) Les échantillons ont été analysés par immuno-buvardage avec des phospho-anticorps des cibles transcriptionnelles ; les membranes ont été aussi analysées pour la présence de p38 et C/EBP $\beta$  (contrôle de charge). Les expériences représentent au moins trois expériences indépendantes.

## **Effets des inhibiteurs de MEK et de ERK sur le retard de l'apoptose du neutrophile humain**

Les neutrophiles en culture entrent en apoptose après seulement quelques heures de culture. Par contre, le phénomène peut être retardé par une exposition avec plusieurs agonistes du neutrophile comme le LPS et le TNF- $\alpha$ . Ces considérations nous ont incité à déterminer si la kinase ERK participe aussi à la modulation de l'apoptose du neutrophile. Nous avons donc prétraité les neutrophiles avec des inhibiteurs de ERK et de MEK pour ensuite les stimuler pendant 24 h avec du LPS ou du TNF- $\alpha$ . Nous avons procédé à un double marquage au PI et à l'annexine V-FITC suivi d'une analyse au FACscan. Le marquage à l'annexinV-FITC cible la PS et émet une fluorescence verte. En-cas normal, la PS se retrouve seulement sur le feuillet interne de la membrane cytoplasmique. Par contre, chez les cellules apoptotiques, il y a bris de l'asymétrie membranaire et on retrouve la PS à la surface. Les cellules sont donc colorées en vert quand elles sont en apoptose ou lorsque la membrane n'est plus intacte. Le marquage au PI permet de vérifier l'intégrité de la membrane cytoplasmique et nucléaire, car il se lie à l'ADN puis émet une fluorescence rouge. Les cellules qui présentent un marquage au PI sont considérées comme nécrotiques. Par contre, les cellules en apoptose tardive ont tendance à présenter une faible perte d'intégrité de la membrane cytoplasmique donnant une cellule à coloration moyenne au PI. Le double marquage donne donc quatre populations. Comme montrée à la figure 4, l'apoptose constitutive des neutrophiles n'est pas affectée par la présence des inhibiteurs de ERK et de l'inhibiteur de MEK. Par contre, chez les neutrophiles stimulés au LPS et au TNF- $\alpha$  on remarque un retard de l'apoptose chez les cellules non prétraitées. Ce retard de l'apoptose est perdu lorsqu'on utilise soit les inhibiteurs de ERK ou l'inhibiteur de MEK.



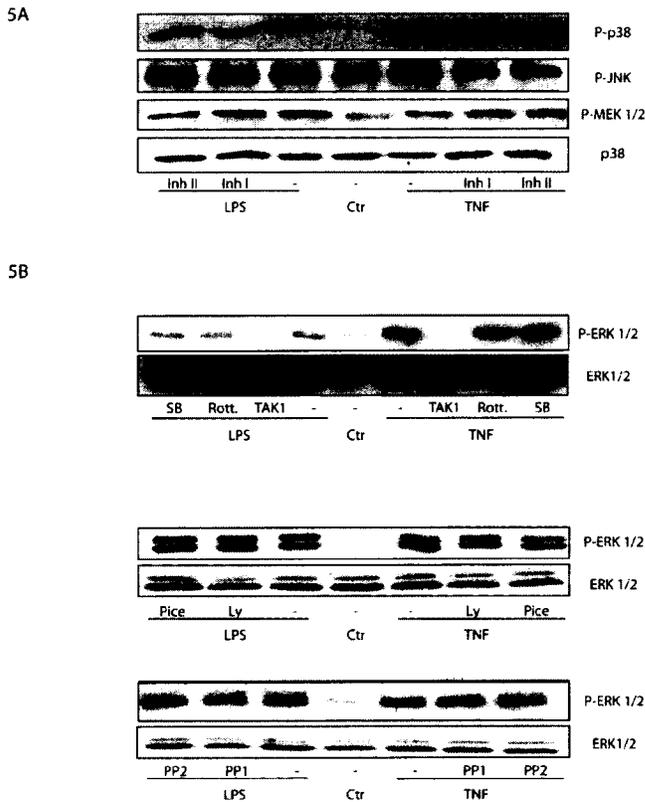
**Figure 4. Les effets de l'inhibition de ERK sur le délai de l'apoptose en comparaison avec l'inhibition de MEK.** Les cellules ont été prétraitées (30 min, 37°C) avec 10  $\mu$ M de ERK inhibitor I, 10  $\mu$ M de ERK inhibitor II, 20  $\mu$ M de PD98059 ou du diluant contrôle avant la stimulation de 24 h avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF- $\alpha$  ou un diluant contrôle. Les cellules ont été ensuite isolées et analysées (un minimum de 10 000 écellules) par FACS, le profil Annexin V<sup>+</sup> et PI<sup>-</sup> sont considérés comme neutrophiles apoptotiques. Les expériences représentent au moins trois expériences indépendantes réalisées en duplicata. \*p<0.1, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### Échange en ERK et les différentes MAPK, et signalisation en amont

Afin d'investiguer sur la possibilité de la kinase ERK de participer à la signalisation d'autres voies MAPKs, nous avons prétraité les neutrophiles avec les deux inhibiteurs de ERK pour ensuite les stimuler pendant 15 minutes avec du LPS et du TNF- $\alpha$ . Nous avons ensuite lysé les cellules et analysé le niveau de phosphorylation de composantes des voies de signalisation MAPK. Comme le montre la figure 5A, on n'observe aucun impact direct des inhibiteurs de ERK sur la phosphorylation, induite par le LPS et le TNF- $\alpha$ , des kinases p38, JNK1 et MEK 1/2.

Afin d'étudier la signalisation en amont, nous avons utilisé des inhibiteurs de kinases pouvant interagir sur la signalisation de ERK. Nous avons donc prétraité les

neutrophiles avec des inhibiteurs des kinases Syk, p38, PKC, Src, TAK1 et PI3K/AKT et stimulé pendant 15 minutes avec du LPS ou du TNF- $\alpha$ . Suite à la lyse cellulaire, nous avons analysé l'état de phosphorylation de la kinase ERK par western blot. Comme montré sur les trois panneaux de la figure 5B, le seul inhibiteur à avoir affecté la phosphorylation de ERK dans les neutrophiles humains stimulés au LPS et au TNF- $\alpha$ , est celui de la MP3K TAK1.



**Figure 5. Signalisation croisée entre ERK et les autres MAPKs et la signalisation en amont de ERK.** (A) Les cellules ont été prétraitées (30 min, 37°C) avec 10  $\mu$ M de ERK inhibiteur I, 10  $\mu$ M de ERK inhibiteur II ou du diluant contrôle avant la stimulation de 15 min avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF- $\alpha$  ou un diluant contrôle. Les échantillons ont été analysés par immuno-buvardage avec des phospho-anticorps des ciblent MAPKs ; les membranes ont aussi été analysées pour la présence de p38 (contrôle de charge). (B) Les cellules ont été prétraitées (30 min, 37°C) avec 3  $\mu$ M SB202190 (p38), 20  $\mu$ M Rottlerin (PKC), 1  $\mu$ M 5z-7-oxozeaenon (TAK1), 8  $\mu$ M piceatannol (syk), 10  $\mu$ M Ly294002 (PI3K), 10  $\mu$ M PP1 (Src), 10  $\mu$ M PP2 (Src) ou un diluant contrôle avant la stimulation de 15 min avec 300 ng/ml de LPS ultra-pur, 100 U/ml TNF- $\alpha$  ou un diluant contrôle. Les niveaux cellulaires de ERK 1/2 phosphorylé (Thr 202/Tyr 204) ou de ERK 1/2 (comme

contrôle de charge) ont ensuite été déterminés par une analyse d'immunobuvardage. Les expériences représentent au moins trois expériences indépendantes.

## **Discussion**

Même si Cloutier et *al.* ont démontré précédemment que l'inhibition pharmacologique de MEK procède par un effet sur la traduction de cytokines, ils ont observé aucun effet sur la transcription (Cloutier et *al.*, 2007). Cependant, des études dans d'autres types cellulaires montrent que la voie MEK/ERK a aussi des effets sur la transcription, incluant la phosphorylation de TBP et de C/EBP $\beta$  (Biggs et *al.*, 1998 ; Popik et *al.*, 1998). Par contre, les neutrophiles humains se comportent souvent différemment des autres types de cellules myéloïdes. Maintenant on connaît l'une de ces raisons. Chez le neutrophile humain stimulé avec des facteurs pro-inflammatoires, MEK participe à la traduction des cytokines, mais c'est ERK qui affecte la transcription des gènes et de façon indépendante de MEK. On observe dans nos résultats que MEK n'est pas la kinase responsable de l'activation de ERK chez les neutrophiles stimulés avec LPS ou TNF- $\alpha$  et c'est la première fois qu'on identifie un découplage dans le module MEK/ERK. On n'observe pas les mêmes effets chez d'autres types cellulaires ou encore chez les neutrophiles stimulés au GM-CSF (résultats non montrés) ou au fMLP. Il semblerait donc que la voie MEK/ERK soit découplée chez les neutrophiles en réponse à des cytokines inflammatoires ou à des ligands des TLR2/4. Cette observation suscite certaines questions comme, quel est le rôle de ERK pour la production de cytokines chez les neutrophiles humains et quelle kinase est responsable de la phosphorylation de ERK si ce n'est pas MEK?

Pour répondre à la première question, nous avons utilisé des inhibiteurs sélectifs de ERK 1/2 et nous montrons que le prétraitement des neutrophiles avec ceux-ci inhibe l'induction de la transcription des gènes de CXCL8, CCL3 et CCL4 et affecte aussi la relâche des protéines correspondantes. Contrairement aux anciens résultats du laboratoire obtenus par l'inhibition de MEK (Cloutier et *al.*, 2007), ces résultats concordent plus avec ce qui est observé dans d'autres cellules où ERK participe à la

la transcription et relâche des cytokines (Whitehurst et Gebbert, 1996 ; Schmid-Alliana et *al.*, 1998). Comme ERK est connue pour stabiliser l'ARNm dans d'autres types cellulaires (Esnault et Malter, 2002), nous voulions être certains que la baisse du niveau d'ARNm est bien provoquée par une diminution de la transcription (par opposition à une diminution de la stabilité de l'ARNm). Les observations que nous avons faites montrent que le niveau d'ARNm naissant est aussi à la baisse quand nous utilisons des inhibiteurs de ERK. Les effets observés sont donc dus, du moins en partie, à une diminution de la transcription provoquée par l'inhibition de ERK. Donc, ERK est impliquée à la fois dans la transcription des gènes de cytokines et dans la génération de leurs protéines correspondantes.

Cette conclusion est appuyée par nos autres observations sur la capacité des inhibiteurs de ERK d'empêcher la phosphorylation de facteur de transcription et de traduction, qui sont les joueurs clés de la production de cytokines chez les neutrophiles et les autres cellules. Dans différents types cellulaires, l'activation de la voie ERK affecte la traduction de protéines dépendantes de l'assemblage des protéines de la coiffe de l'ARNm en activant deux facteurs impliqués dans ce processus, soit la kinase phosphorylant la petite sous-unité ribosomale S6 (p70S6K) et la kinase MNK1 qui initie l'assemblage des protéines de la famille eIF4 au niveau du cap de l'ARNm (Waskiewicz et *al.*, 1997). La phosphorylation de la sous-unité S6 par la p70S6K est un événement clé pour l'assemblage du ribosome, tandis que la phosphorylation de MNK1 entraîne l'activation de la famille eIF4 et de la protéine 4E-BP pour le recrutement du ribosome au niveau de la coiffe de l'ARNm (von der Haar et *al.*, 2004). Nous montrons ici que les inhibiteurs de ERK affectent la phosphorylation de la kinase ribosomale S6 et son substrat, mais pas la kinase MNK1. Par contre, il est intéressant de voir que ERK n'affecte l'état de phosphorylation de MNK1. Dans la littérature, MNK1 est l'une des composantes effectrices de la voie MEK/ERK, il est donc surprenant de ne voir aucun effet des inhibiteurs (Yoon et Seger, 2006). Nous montrons donc ici que ERK affecte la traduction en aidant l'assemblage du ribosome, mais ne participerait pas à son recrutement à la coiffe de l'ARNm. Incidemment, ces effets sont les mêmes qu'on

observe en utilisant les inhibiteurs de MEK (Cloutier et *al.*, 2007). Ces résultats soulignent la redondance entre les voies MEK et ERK au plan de leurs effets traductionnels.

C'est au niveau de la transcription que les effets des deux kinases diffèrent vraiment. L'étude de Cloutier et *al.*, ne montre aucun effet des inhibiteurs de MEK sur la transcription des gènes de cytokines en comparaison avec la diminution du niveau d'ARNm de cytokines qu'on remarque avec les inhibiteurs de ERK (Cloutier et *al.*, 2007). Nous montrons au surplus que l'inhibition de ERK atténue grandement l'activation des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et CREB. Dans ce contexte, les études du laboratoire ont démontré l'importance de C/EBP $\beta$  pour l'expression des gènes de cytokines par le neutrophile humain (Cloutier et *al.*, 2007 ; Cloutier et *al.*, 2009). Chez le macrophage le facteur de transcription CREB a été identifié comme étant impliqué dans la transcription des chimiokines CCL3 et CCL4 (Jaramillo et Olivier, 2002). Une étude en cours présentement dans le laboratoire montre aussi la participation de ce facteur de transcription pour l'expression de l'IL-8 du CCL3 et du CCL4 (résultats non montrés). La kinase MSK1 est reconnue pour être activée par ERK et être impliquée dans l'activation de CREB, mais aussi dans la régulation de l'expression de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  (Funding et *al.*, 2006). La kinase MSK1 pourrait en outre agir directement sur la transcription en phosphorylant l'histone H3 sur le résidu sérine 10. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 entraîne un remodelage de la chromatine pour la transcription précoce de gènes (Zhong et *al.*, 2000). Ceci met en lumière les conséquences potentielles de nos résultats qui montrent l'influence exercée par ERK sur MSK-1. Par contre, nous avons observé que ERK n'affecte aucunement la phosphorylation de RelA, la sous-unité de NF- $\kappa$ B la plus importante dans la transcription des gènes de cytokines. Bref, nous démontrons ici que ERK est impliquée à la fois dans la traduction et la transcription des gènes de cytokines et cela se fait par l'intermédiaire des kinases p70S6K, MSK1 et des facteurs de transcription CREB et C/EBP $\beta$ .

Le retard de l'apoptose est une fonction extrêmement importante pour les neutrophiles humains dans un contexte d'inflammation. Dans le cas des stimuli LPS et TNF- $\alpha$ , le retard de l'apoptose implique la MAPK p38 et la voie MEK/ERK (Dunican et *al.*, 2000 ; François et *al.*, 2005 ; Avdi et *al.*, 2002 ; Kilpatrick et *al.*, 2006 ; Sabroe et *al.*, 2003). Par ailleurs, il a été suggéré que chez des neutrophiles exposés à des chimioattractants comme le LTB<sub>4</sub>, la voie MEK/ERK participe au retard de l'apoptose en augmentant l'expression du gène codant pour Mcl-1 et en diminuant l'expression de celui codant pour Bax (Pétrin et *al.*, 2006). Nous observons que les inhibiteurs de ERK et de MEK dans le milieu de culture n'affectent pas l'apoptose spontanée chez les neutrophiles non stimulés. Par contre, l'inhibition de ERK ou de MEK renverse les effets antiapoptotiques du LPS et du TNF- $\alpha$ . Ainsi, ERK tout comme MEK s'avèrent des intermédiaires cruciaux pour la modulation de l'apoptose chez le neutrophile humain. Vu les résultats similaires en utilisant les inhibiteurs de MEK et de ERK, nous sommes tentés de croire que dans le cas de l'apoptose, les deux kinases ont des effets redondants. Il reste toutefois beaucoup de travail à faire pour vérifier si MEK et ERK affectent les mêmes facteurs pro- ou antiapoptotiques.

Les interactions entre les différentes voies de signalisations sont habituellement, dépendantes du contexte cellulaire et jouent un rôle important dans le bon fonctionnement des réponses biologiques. Puisqu'il existe déjà plusieurs exemples de signalisation croisée entre les voies MAPK (Junttila et *al.*, 2008 ; Wagner et Nebreda, 2009), nous voulions investiguer si tel était le cas chez le neutrophile. Nous avons observé que l'inhibition de ERK dans le neutrophile humain n'affecte pas la phosphorylation des autres MAPK comme p38, JNK et MEK 1/2. Par contre, étant donné que nous n'avons considéré que des temps courts (0-120 min), il est toujours possible que ERK joue un rôle indirect sur ces kinases à plus long terme. Par exemple, il est reconnu que ERK induit la traduction de la MAPK phosphatase 1, 2 et 3 (MKP1, MKP2, MKP3), et participe ainsi à la rétro-inhibition des MAPKs p38 et JNK (Wang et Liu, 2007 ; Brondello et *al.*, 1997 ; Ekerot et *al.*, 2008). De plus, il a été rapporté que ERK participe aussi dans la régulation post-transcriptionnelle de MKP1 en la phosphorylant, réduisant le phénomène de polyubiquitination et de

dégradation de la phosphatase (Brondello et *al.*, 1999). Des recherches dans le laboratoire sont présentement en cours pour évaluer le rôle des MKPs dans l'inflammation induite par le neutrophile et la possible implication de la kinase ERK dans ce processus.

Il reste maintenant une grande question sans réponse. Puisque ce n'est pas MEK qui est responsable de l'activation de ERK chez les neutrophiles humains stimulés au LPS et au TNF $\alpha$ , quelle kinase joue ce rôle? Pour le savoir, nous avons effectué une recherche bibliographique sur toutes les kinases qui peuvent affecter l'activation de ERK. Nous avons ainsi recensé plusieurs candidats comme Syk, p38, PKC, Src, TAK1 et PI3K/AKT (Martelli et *al.*, 2000 ; Juntitilla et *al.*, 2008 ; Downey et *al.*, 1996 ; Gardner et *al.*, 1993 ; Ear et *al.*, 2010 ; Grammer et Blenis, 1997). Or, nous avons observé que le seul inhibiteur à avoir affecté la signalisation de ERK chez les neutrophiles humains stimulés au LPS et au TNF- $\alpha$ , est celui de la MAP3K TAK1. Cette interaction avait déjà été démontrée dans le laboratoire (Ear et *al.*, 2010), mais nous croyions alors que cette inhibition impliquait MEK. Comme nous en avons discuté dans l'introduction, le module de signalisation des MAPKs est toujours le même, les MAP3Ks activent les MAP2Ks, qui ensuite activent les MAPKs. Il serait alors bien surprenant que TAK1 active directement ERK. faute d'information et en l'absence d'inhibiteurs sélectifs pour la plupart des MAP2Ks, nous avons dû arrêter les recherches sur MAP2K qui est responsable de la phosphorylation de ERK. L'une des voies alternatives de l'activation de ERK que nous n'avons pas investiguée est celle passant par TLR-2. Cette dernière est une MAP3K qui active le complexe IKK dans les cellules myéloïdes et augmente l'activation de ERK (Patriotis et *al.*, 1994). Par contre, dans les neutrophiles l'inhibition du complexe IKK n'affecte pas l'activation de ERK par le LPS et le TNF $\alpha$  (Cloutier et *al.*, 2007). Le laboratoire toujours à la recherche de l'identité de la kinase de ERK dans le neutrophile stimulé au LPS et au TNF $\alpha$  afin de résoudre cette question.

## Conclusion générale

Les propriétés intrinsèques du neutrophile humain en font une cellule unique dans sa fonction immune. Malgré le fait qu'il se comporte à plusieurs égards comme d'autres leucocytes de la lignée myéloïde, plusieurs de ses réponses montrent des différences marquées. Une des raisons sous-jacentes est que la machinerie de signalisation du neutrophile a plusieurs caractéristiques uniques. Certaines de ces différences ont été découvertes dans notre laboratoire. La première a été l'expression constitutive de protéines RelA dans le noyau et le cytoplasme. Par la suite, le laboratoire a montré la présence et l'activation du complexe IKK dans ces mêmes deux compartiments chez le neutrophile humain (Ear et *al.*, 2005). Des travaux subséquents ont révélé qu'il se passait la même chose avec la MAP3K TAK1, c'est-à-dire qu'elle se retrouve à la fois dans le cytoplasme et le noyau du neutrophile humain (Ear et *al.*, 2010). Par ailleurs, le laboratoire a rapporté l'absence d'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 causé par l'absence du facteur c-Jun (Cloutier et *al.*, 2003). Enfin, les résultats que nous dévoilons dans ce mémoire mettent en évidence une autre caractéristique unique de la signalisation chez le neutrophile, à savoir la façon dont ERK est activée. Pour la première fois, nous observons que MEK n'est pas toujours la kinase qui active ERK. Même si nous n'avons pas encore trouvé quelle kinase est responsable de l'activation de ERK, nous avons clairement identifié que MEK et ERK fonctionnent de façon indépendante dans les neutrophiles stimulés au LPS et aux cytokines pro-inflammatoires. Pour ce qui est du rôle de ERK dans la transcription et la traduction des gènes de cytokines, ainsi que son rôle dans le délai de l'apoptose, tout semble concorder avec ce que l'on retrouve dans la littérature. La recherche sur les variantes de signalisation du neutrophile humain pourrait permettre une plus grande compréhension de ce pilier du système immunitaire inné. De plus, elle pourrait identifier des cibles pour le traitement de maladies inflammatoires à prédominance neutrophilique comme la polyarthrite rhumatoïde et la goutte (Sadik et *al.*, 2011). Les inhibiteurs de MEK sont de plus en plus utilisés dans les traitements contre différents types de cancers (Rusconi et *al.*, 2012). En vue des résultats de notre étude, l'utilisation des

inhibiteurs de ERK pour remplacer ceux de MEK serait à considérer, au cas où un découplage du module MEK/ERK soit présent dans d'autres types cellulaires.

## **Remerciements**

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Patrick McDonald pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a accordée. J'aimerais aussi remercier tous mes collègues du laboratoire anciens et nouveaux : Thornin, Carl, Alexandre, Stéphanie, Thomas et Dominic pour leur soutien et leur aide pendant mon projet de maîtrise. J'aimerais remercier notamment notre technicienne Olga pour l'isolement de nos neutrophiles. J'aimerais spécialement remercier ma blonde Maud pour m'avoir appuyé durant ma maîtrise et pour les corrections qu'elle a apportées à ce mémoire. Un merci spécial à tous les membres de ma famille, sans qui je n'aurais jamais été aussi loin.

## Bibliographie

- Abramson, S., Weissman, G. (1981). The release of inflammatory mediators from neutrophils. *Ric Clin Lab*, **11** : 91-99.
- Adachi, M., Fukuda, M., Nishida, E. (2000). Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol*, **148** : 849-856.
- Avdi, N.J., Malcom, K.C., Nick, J.A., Worthen, G.S. (2002). A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*, **277**: 40687-40696.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the INF- $\beta$  promoter. *Cell*, **103** : 667-678.
- Ago, T., Nuno, H., Ito, T., Sumimoto, H. (1999). Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*, **274**: 33644-33653.
- Akgul, C., Moulding, D.A., et Edwards, S.W. (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* **487**, 318-322.
- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, H., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T., Kishimoto, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*, **9** : 1897-1906.
- Alberola-Ila, J., Forbush, K.A., Seger, R., Krebs, E.G., Perlmutter, R.M. (1995). Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature*, **373** : 620-623.
- Albrechtsen, M., Yeaman, G.R., Kerr, M.A. (1988). Characterization of the IgA receptor from human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, **64** : 201-205.
- Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sivanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J., Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*, **13** : 1610-1619.
- Ali, S., Palmer, A.C., Fritchley, S.J., Maley, Y., Kirby, J.A. (2001). Multimerization of monocyte chemoattractant protein-1 is not required for glycosaminoglycan-dependant transendothelial chemotaxis. *Biochem J*, **358** : 737-745.

Ansel, K.M., et Cyster, J.G. (2001). Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol*, **13** : 172-179.

Appelberg, R. (2007). Neutrophils and intracellular pathogens : beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol*, **15** : 87-95

Armenante, F., Merola, M., Furia, A., Tovey, M., Palmieri, M. (1999). Interleukin-6 repression is associated with a distinctive chromatin structure of the gene. *Nucleic Acids Res*, **27** : 4483-4490.

Asehnoune, K., Strasheim, D., Mitra, S., Kim, J.Y., Abraham, E. (2004). Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependant activator of NF-kappaB. *J Immunol*, **172** : 2522-2529.

Ashtekar, R.A., Saha, B. (2003). Poly's plea : membership to the club of APCs. *Trends Immunol*, **24** : 485-490.

Assoian, R.K. (2004). Stopping and going with p27kip1. *Dev Cell*, **6** : 458-459.

Aubert, J., Dessolin, S., Belmonte, N., Li, M., McKenzie, F.R., Staccini, L., Villageois, P., Barhanin, B., Vernallis, A., Smith, A.G., Aihaud, G., Dani, C. (1999). Leukemia inhibitory factor and its receptor promote adipocyte differentiation via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*, **274** : 24965-24972

Babior, B.M., Takeuchi, C., Ruedi, J., Gutierrez, A., Wentworth, P. (2003). Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100** : 3031-3034.

Babior, B.M. (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, **16** : 42-47.

Bacus, S.S., Gudkov, A.V., Lowe, M., Lyass, L., Yung, Y., Komarov, A.P., Keyomarsi, K., Yarden, Y., Seger, R. (2001). Taxol-induced apoptosis depend on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene*, **20** : 147-155.

Bardwell, A.J., Flatau, L.J., Matsukuma, K., Thorner, J., Bardwell, L. (2001). A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem*, **276** : 10374-10386.

Bardwell, A.J., Abdollahi, M., Bardwell, L. (2003). Docking sites on mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases, MAPK phosphatases and the Elk-1 transcription factor compete for MAPK binding and are crucial for enzymic activity. *Biochem J*, **370** : 1077-1085.

- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlonik, A., Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokines with a CX3C motif. *Nature*, **385** : 640-644.
- Baggiolini, M., Delwad, B., et Moser, B. (1997). Human chemokines : an update. *Annu Rev Immunol*, **15** : 675-705.
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, **392** : 565-568.
- Bainton, D.F., Farquhar, M.G. (1968). Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smears. II. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells. *J Cell Biol*, **39** : 286-317.
- 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.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D., Strieter, R.M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*, **68** : 1-8.
- Bennouna, S., Bliss, S.K., Curiel, T.J., Denkers, E.Y. (2003). Cross-talk in the innate immune system : neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol*, **171** : 6052-6058.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, **447** : 407-412.
- Beutler, B., et Cerami, A. (1989). The biologie of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, **7** : 625-655.
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R.A., Zychlinsky, A., Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, **114** : 2619-2622.
- Biggs, J.R., Ahn, N.G., Kraft, A.S. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in U937 leukemic cells induces phosphorylation of the amino terminus of the TATA-binding protein. *Cell Growth Differ*, **9**: 667-676.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16** : 6-21.
- Blagosklonny, M.V., Giannakakou, P., el-Deiry, W.S., Kingston, D.G., Higgs, P.I., Neckers, L., Fojo, T. (1997). Raf-1/bcl-2 phosphorylation : a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res*, **57** : 130-135.

Blum, M.S., Toninelli, E., Anderson, J.M., Balda, M.S., Zhou, J., O'Donnell, L., Pardi, R., Bender, J.R. (1997). Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am. J. Physiol.* **273** (1 Pt 2) : H286-294.

Bogoyevitch, M.A., Court, N.W. (2004). Counting on mitogen-activated protein kinases- ERKS 3,4,5,6,7 and 8. *Cell Signal*, **16** : 1345-1354.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s and Th2s). *J Exp Med*, **187** : 129-134.

Borish, L.C., et Steinke, J.W. (2003). Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, **111** : 5460-5475.

Borregaard, N., Cowland, J.B. (1999). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, **89** : 3503-3521.

Borregaard, N., Sorensen, O.E., Theilgaard-Monch, K. (2007). Neutrophil granules : a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*, **28** : 340-345.

Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbresser, S.D., De Pinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D. (1991). ERKs : a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, **65** : 663-675.

Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, **97**: 77-89.

Brenner, S., Prösch, S., Schenke-Layland, K., Riese, U., Gausmann, U., Platzer, C. (2003). cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem*, **278** : 5597-5604.

Brindle, P., Linke, S., Montminy, M. (1993). Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature*, **364** : 821-824.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, **303** : 1532-1535.

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

Brivanlou, A.H., Darnell J.E. Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, **295** : 813-818.

Brondello, J.M., Brunet, A., Pouyssegu, J., McKenzie, F.R. (1997). The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44 MAPK cascade. *J Biol Chem*. **272**: 1368-1376.

Brondello, J. M., Pouyssegu, J., McKenzie, F. R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44<sup>MAPK</sup>-dependent phosphorylation. *Science* **286**: 2514-2517.

Brunet, A., Pouyssegu, J. (1996). Identification of MAP kinase domains by redirecting stress signals into growth factor responses. *Science*, **272** : 1652-1655.

Bruniquel, D., Scharz, R.H. (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol*, **4** : 235-240.

Bustin, M. (1999). Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol*, **19** : 5237-5246.

Bustin, M., Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins : architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **54** : 35-100.

Campbell, J. S., Seger, R., Graves, J.D., Graves, L.M., Jensen, A.M., Krebs, E.G. (1995). The MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*, **50** : 131-159.

Camps, M., Nichols, A., Arkinstall, S. (2000). Dual specificity phosphatases : a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J*. **14** : 6-16.

Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, **90** : 859-869.

Cao, Z., Umek, R.M., McKnight, S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, **5** : 1538-1552.

Carey, M. (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*, **92** : 5-8.

Cassatella, M.A. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*, **16** : 21-26.

Cassatella, M.A. (1999). Neutrophil-derived proteins : selling cytokines by the pound. *Adv Immunol*, **74** : 369-509.

Cassatella, M.A., Gasperini, S., Russo, M.P. (1997). Cytokines expression and release by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci*, **832** : 233-242.

Cham H., Lee, E.K., Shapiro, P. (2001). Identification of a C-terminal region that regulates mitogen-activated protein kinases kinase-1 cytoplasmic localization and ERK activation. *J Biol Chem*, **276** : 48494-48501.

Chang, C.J., Chen, T.T., Lei, H.Y., Chen, D.S., Lee, S.C. (1990). Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Mol Cell Biol*, **10** : 6642-6653.

Chang, K.P. (1981). Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg*, **30** : 322-333.

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

Chang, S., Collins, P.L., Aune, T.M. (2008). T-Bet dependent removal of Sin3A-histone deacetylase complexes at the *Ifng* locus drives Th1 differentiation. *J Immunol*, **181** : 8372-8381.

Chen, R.H., Sarnecki, C., Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*, **12** : 915-927.

Chen, G.Y., Osada, H., Santamaria-babi, L.F., Kannagi, R. (2006). Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on TH1/Th2 lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103** : 16894-16899.

Chen L.F., Mu, Y., Greene, W.C. (2001). Duration of nuclear NF-kappa B action regulated by reversible acetylation. *Science*, **293** : 1653-1657.

Chinenov, Y., Kerppola, T.K. (2001). Close encounters of many kinds : Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, **20** : 2438-2452.

Choi, M., Rolle, S., Wellner, M., Cardoso, M.C., Scheidereit, C., Luft, F.C., Kettritz, R. (2003). Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood*, **102**: 2259-2267.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**: 156-159.

- Chuammitri, P., Ostojic, J., Andreasen, C.B., Redmond, S.B., Lamont, S.J., Palic, D. (2009). Chicken heterophil extracellular traps (HETs) : novel defense mechanism of chicken heterophils. *Vet Immunol Immunopathol*, **129** : 126-131.
- Chuderland, D., Seger, R. (2005). Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol*, **29** : 57-74.
- Chumakov, A.M., Silla, A., Williamson, E.A., Koeffler, H.P. (2007). Modulation of DNA binding properties of CCAAT/enhancer binding protein  $\epsilon$  by heterodimer formation and interaction with NF $\kappa$ B pathway. *Blood*, **109** : 4209-4219.
- Clark, F.A., Klebanoff, S.J. (1978). Chronic granulomatous disease : studies of family with impaired neutrophil chemotactic metabolic and bactericidal function. *Am J Med*, **65** : 941-948.
- Clark, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N., Knopf, J.L. (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca (2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, **65** : 1043-1051.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., Keys, E.M., Allen-Vercoe, E., DeVinney, R., Doig, C.J., Green, F.H.Y., Kubes, P. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophils extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*, **13** : 463-469.
- Cloutier, A., McDonald, P.P. (2003). Transcription factor activation in human neutrophils. *Chem Immunol Allergy*, **83**: 1-23.
- Cloutier, A., Ear, T., Borissevitch, O., Larivée, P., McDonald, P.P. (2003). Inflammatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-Terminal kinase/AP-1 signaling cascade in human Neutrophils. *J Immunol*, **171**: 3751-3761.
- 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 Leuk Biol*, **81**: 567-577.
- 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.
- Cockerill, P.N., Shannon, M.F., Bert, A.G., Ryan, G.R., Vadas, M.A. (1993). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/ interleukin 3 is regulated by a cyclosporin A- sensitive enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90** : 2466-2470.
- Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., Wolberger, C. (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol*, **11** : 1037-1043.

Cosgrove, M.S., Wolberger, C. (2005). How does the histone code work ? *Biochem Cell Biol*, **83** : 468-476.

Cosma, M.P., Tanaka, T. et Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell*, **97** : 299-311.

Courey, A.J., Jia, S. (2001). Transcriptional repression : the long and the short of it. *Genes Dev*, **15** : 2786-2796.

Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., Marshall, C.J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, **77** : 841-852.

Crews, C.M., Alessandrini, A., Erikson, R.L. (1992). The primary structure of MEK. A protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, **258** : 478-480.

Dahlgren, C., Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods*, **232** : 3-14.

D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F. (2003). Chemokine receptors in inflammation : an overview. *J Immunol Methods*, **273** : 3-13.

Dana, N., Todd, R.F. III, Pitt, J., Springer, T.A., Arnaout, M.A. (1984). Deficiency of a surface membrane glycoprotein (Mo1) in man. *J Clin Invest*, **73** : 153-159.

Dang, A., Frost, J.A., Cobb, M.H. (1998). The MEK1 proline-rich insert is required for efficient activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2 in mammalian cells. *J Biol Chem*, **273** : 19909-19913.

Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., Alessi, D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J*, **17** : 4426-4441.

Decoursey, T.E., Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidative activity. *Cell Mol Life Sci*, **62** : 2173-2193.

Delcuve, G.P., Rastegar, M., Davie, J.R. (2009). Epigenetic control. *J Cell Physiol*, **219** : 243-250.

Delves, P.J. and Roitt, I.M. (2000). The immune system : First of two parts. *N Engl J Med*, **343** (1) : 37-49.

Dennis, E.A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem*, **269** : 13057-13060.

Dérjard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., Davis, R.J. (1994). JNK1 : a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76** : 1025-1037.

Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E., Schibler, U. (1990). LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev*, **4** : 1541-1551.

Dimmeler, S., Zeiher, A.M. (2000). Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept*, **90** : 19-25.

Downey, G.P., Butler, J.R., Brumell, J., Borregaard, N., Kjeldsen, L., Sue-A-Quan, A.K., Grinstein, S. (1996). Chemotactic peptide-induced activation of MEK-2, the predominant isoform in human neutrophils. Inhibition by wortmannin. *J Biol Chem*, **271**: 21005-21011.

Downey, G.P., Butler, J.R., Tapper, H., Flialkow, L., Saltiel, E.R., Rubin, B.B., Grinstein, S. (1998). Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J Immunol*, **160**: 434-443.

Duchesnes, C.E., Murphy, P.M., Williams, T.J., Pease, J.E. (2006). Alanine scanning mutagenesis of the chemokine receptor CCR3 reveals distinct extracellular residues involved in recognition of the eotaxin family of chemokines. *Mol Immunol*, **43** : 1221-1231.

Dunican, A.L., Leuenroth, S.J., Grutkoski, P., Ayala, A., Simms, H.H. (2000). TNFalpha-induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 production. *Shock*, **14**: 284-288.

Dussault, A.A., Pouliot, M. (2006). Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online*, **8**: 1-10.

Ear, T., Cloutier, A., McDonald, P.P. (2005). Constitutive nuclear expression of the I kappa B kinase complex and its activation in neutrophils. *J Immunology*, **175**: 1834-1842.

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., 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.

Eblen, S.T., Catling, A.D., Assanah, M.C., Weber, M.J. (2001). Biochemical and biological functions of the N-terminal, noncatalytic domain of extracellular signal-regulated kinase 2. *Mol Cell Biol*, **21** : 249-259.

Eblen, S.T., Slack, J.K., Weber, M.J., Catling, A.D. (2002). Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Mol Cell Biol*, **22** : 8023-8033.

Eblen, S.T., Slack-Davis, J.K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J.T., Weber, M.J., Catling, A.D. (2004). Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol*, **24** : 2308-2317.

Eggleton, P., Ghebrehiwet, B., Sastry, K.N., Coburn, J.P., Zaner, K.S. (1995). Identification of a gC1q-binding protein (gC1q-R) on the surface of human neutrophils. Subcellular localization and binding properties in comparison with the cC1q-R. *J Clin Invest*, **95** : 1569-1578.

Ehrlich, P., Lazarus, A., Myers, W., Woodhead, G.S. (1900) *Histology of the Blood: Normal and Pathological*. Cambridge, The University Press : 75.

Ekerot, M., Stavridis, M. P., Delavaine, L., Mitchell, M. P., Staples, C., Owens, D. M., Keenan, I. D., Dickinson, R. J., Storey, K. G., Keyse, S. M. (2008). Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochem J*. **412**: 287-298.

Engelmann, H., Novick, D., Wallach, D. (1990). Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem*, **265**: 1531-1536.

Enslin, H., Tokumitsu, H., Soderling, T.R. (1995). Phosphorylation of CREB by CaM-kinase IV activated by CaM-kinase IV kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **207** : 1038-1043.

Enya, K., Hayashi, H., Takii, T., Ohoka, N., Kanata, S., Okamoto, T. (2008). The interaction with SP1 and reduction in the activity of histone deacetylase 1 are critical for the constitutive gene expression of IL-1 alpha in human melanoma cells. *J Leukoc Biol*, **83** : 190-199.

Escoubet-Lozach, L., Glass, C.K., Wasserman, S.I. (2002). The role of transcription factors in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, **110** : 553-564.

Esnaud, S., Malter, J.S. (2002). Extracellular signal-regulated kinase mediates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA stabilization in tumor necrosis factor-alpha plus fibronectin-activated peripheral blood eosinophils. *Blood*, **99** : 4048-4052.

Eychène, A., Rocques N., Pouponnot, C. (2008). A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer*, **8** : 683-693.

Fantz, D.A., Jacobs, D., Glossip, D., Kornfeld, K. (2001). Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *J Biol Chem*, **276** : 27256-27265.

Ferrell, J.E. Jr. (1996). Tripping the switch fantastic : how a protein kinase cascade can convert graded inputs onto switch-like outputs. *Trends Biochem Sci*, **21** : 460-466.

Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **10** : 248-253.

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.

Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doid, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J. (1980). Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, **286** : 264-265.

Foreback, J.L., Sarma, V., Yeager, N.R., Younkin, E.M., Remick, D.G., Ward, P.A. (1998). Blood mononuclear cell production of TNF-alpha and IL-8: engagement of different signal transduction pathways including the p42 MAP kinase pathway. *J Leukoc Biol*, **64**: 124-133.

Fortin, C.F., Cloutier, A., Ear, T., Sylvain-Prévost, S., Mayer, T.Z., Bouchelaghem, R., McDonald, P.P. (2011). *Eur J Immunol*, **41**: 1709-1719.

François, S., El Benna, J., Dang, P.M., Pedruzzi, E., Gougerot-Pocidalo, M.A., Elbim, C. (2005). Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol*, **174**: 3633-3642.

Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, **63** : 1256-1272.

Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., Saklatvala, J. (1994). Interleukine-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, **78** : 1039-1049.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, **176** : 231-241.

Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., Nishida, E. (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH<sub>2</sub>-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem*, **271** : 20024-20028.

Fukuda, M., Gotoh, Y., Nishida, E. (1997a). Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase : its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J*, **16** : 1901-1908.

Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., Nishida, E. (1997 b). A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem*, **272** : 32642-32648.

Funding, A.T., Johansen, C., Kragballe, K., Otkjaer, K., Jensen, U.B., Madsen, M.W., Fjording, M.S., Finnemann, J., Skak-Nielsen, T., Paludan, S.R., Iversen, L. (2006). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is activated in lesional psoriatic epidermis and regulates the expression of pro-inflammatory cytokines. *J Invest Dermatol*, **126**: 1784-1791.

Gabay, L., Seger, R., Shilo, B.Z. (1997). In situ activation pattern of Drosophila EGF receptor pathway during development. *Science*, **277** : 1103-1106.

Gardner, A.M., Vaillancourt, R.R., Johnson, G.L. (1993). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase by G protein and tyrosine kinase oncoproteins. *J Biol Chem*, **268**: 17896-17901.

Garofalo, R.P., et Goldman, A.S. (1998). Cytokines, chemokines and colony-stimulating factors in human milk : the 1997 update. *Biol Neonate*, **77** : 134-142.

Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U., Presky, D.H. (1998). The interleukin-12/interleukin-12 receptor system : role in normal and pathologic immune response. *Annu Rev Immunol*, **16** : 495-521.

Geest, C.R., Buitenhuis, M., Groot Koerkamp, M.J., Holstege, F.C., Vellenga, E., Coffey, P.J. (2009). Tight control of MEK-ERK activation is essential in regulating proliferation, survival, and cytokine production of CD34<sup>+</sup>-derived neutrophil progenitors. *Blood*, **114** : 3402-3412.

Ghoda, L., Lin, X., Greene, W.C. (1997). The 90-kDa ribosomal S6 kinase (p90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of I $\kappa$ B $\alpha$  and stimulates its degradation in vitro. *J Biol Chem*, **272** : 21281-21288.

Ghosh, S., Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell*, **109** : S81-S96.

Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. (1998). NF-kappaB and Rel proteins : evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16** : 225-260.

Gimbrone, M.A.J., Obin, M.S., Brock, A.F., Luis, E.A., Hass, P.E., Hebert, C.A., Yip, Y.K., Leung, D.W., Lowe, D.G., Kohr, W.J. (1989). Endothelial interleukin-1 : a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science*, **246** : 1601-1603.

Godessart, N., Kunkel S.L. (2001). Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*, **13** : 670-675.

Goldsby, R., Kindt, T.J., Osborne, B.A. (2001). Immunologie. 4<sup>e</sup> ed., Paris : Dunod.

Goldstein, I.M., Malmsten, C.L., Kindahl, H., Kaplan, H.B., Rådmark, O., Samuelsson, B., Weissmann, G. (1978). Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, **148** : 787-792.

Gonzalez, F.A., Raden, D.L., Davis, R.J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem*, **266** : 22159-22163.

Gosselin, E.J., Wardwell, K., Rigby, W.F., Guyre, P.M. (1993). Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocytes/macrophages colony stimulating factor, INF- $\gamma$ , IL-3. *J Immunol*, **151** : 1482-1490.

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) : role in asthma. *FASEB J*, **15** : 940-949.

Grammer, T.C., Blenis, J. (1997). Evidence for MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAPkinases. *Oncogene*, **14**: 1635-1642.

Griffiths, R.J. (1999). *Prostaglandins and Inflammation*, In *Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates*, J.I. Gallin, R. Snyderman, Editor. Lippincott Williams and Wilkins : Philadelphia. p. 349-356.

Gubida, E., Luo, X., Kwon, E., Sakamoto, K., Shi, Y.F., Mufson, R.A. (2001). Betac cytokine receptor-induced stimulation of cAMP response element binding protein phosphorylation requires protein kinase C in myeloid cells : a novel cytokine signal transduction cascade. *J Immunol*, **167** : 4303-4310.

- Guimaraes-Costa, A.B., Nascimento, M.T.C., Froment, G.S., Soares, R.P.P., Morgado, F.N., Conceição-Silva, F., Saraiva, E.M. (2009). Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106** : 6748-6753.
- Gupta, S., Barrett, A.J., Whitmarsh, J., Sluss, H.K., Dérijard, B., Davis, R.J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*, **15** : 2760-2770.
- Gurish, M.F., Humbles, A., Tao, H., Finkelstein, S., Boyce, J.A., Gerard, C. (2002). CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*. *J Immunol*, **168** : 5730-5736.
- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erickson, E., Maller, J.L. (1993). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science*, **262** : 1262-1265.
- Hachicha, M., Rathanaswami, P., Naccache, P.H., McColl, S.R. (1998). Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. *J Immunol*, **160** : 449-454.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265** : 808-811.
- Hanlon, M., Sturgill, T.W., Sealy, L. (2001). ERK2- and p90(Rsk2)- dependent pathways regulate the CCAAT/enhancer-binding protein-beta interaction with serum response factor. *J Biol Chem*, **276** : 38449-38456.
- Hase-Yamazaki, T., Aoki, Y. (1995). Stimulation of human lymphocytes by cathepsin G. *Cell Immunol*, **160** : 24-32.
- Hayashi, F., Means, T.K., Luster, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, **102** : 2660-2669.
- Haycock, J.W., Ahn, N.G., Cobb, M.H., Krebs, E.G. (1992). ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89** : 2365-2369.
- Hayden, M.S., Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell*, **132** : 344-362.
- Hess, J., Angel, P., Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits : quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, **117** : 5965-5973.

Hess, P., Pihan, G., Sawyers, C.L., Flavell, R.A., Davis, R.J. (2002). Survival signalling mediated by c-Jun NH(2)-terminal kinase in transformed B lymphoblasts. *Nat Genet*, **32** : 201-205.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, **7** : 2135-2148.

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.

Holland, P.M., Cooper, J.A. (1999). Protein modification : Docking sites for kinases. *Curr Biol*, **9** : R329-321.

Holloway, A.F., Rao, S., Shannon, M.F. (2002). Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol Immunol*, **38** : 567-580.

Hoogewerf, A.J., Kushert, G.S., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A., Wells, T.N. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, **36** : 13570-13578.

Hoshino, R., Chatani, Y., Yamari, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J., Kohno, M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*, **18** : 813-822.

Hughes-Fulford, M., Sugano, E., Schopper, T., Li, C.F., Boonyaratanakornkit, J.B. Cogoli, A. (2005). Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell Signal*, **17** : 1111-1124.

Hurme, M., Matikainen, S. (1993). Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, enhances the phorbol ester-induced interleukin-1 beta expression via an AP-1 mediated mechanism. *Scand J Immunol*, **38** : 570-574.

Iking-Konert, C., Vogt, S., Radsak, M., Wagner, C., Hansch, G.M., Andrassy, K. (2001). Polymorphonuclear neutrophils in Wegner's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Intl*, **60** : 2247-2262.

Impey, S., McCorkle, S.R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J.M., Yochum, G.S. Boss, J.M., McWeeney, S., Dunn, J.J., Mandel, G., Goodman, R.H. (2004). Defining the CREB regulon : a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, **119** : 1041-1054.

Irani, K. (2000). Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*, **87** : 179-183.

Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z.X., Cantley, L.G. (2004). Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol Cell*, **16** : 257-267.

Ito, K., Barnes, P.J., Adcock, I.M. (2000). Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta -induced histone H4 acetylation on lysine 8 and 12. *Mol Cell Biol*, **20** : 6891-6903.

Jaaro, H., Rubinfeld, H., Hanoch, T., Seger, R. (1997). Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94** : 3742-3747.

Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., Kornfeld, K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev*, **13** : 163-175.

James, M.J., Penglis, P.S., Caughey, G.E., Demasi, M., Cleland, L.G. (2001). Eicosanoid production by human monocytes : does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response ? *Inflamm Res*, **50** : 249-253.

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

Jaramillo, M., Olivier, M. (2002). Hydrogen peroxide induces murine macrophage chemokines gene transcription via extracellular signal-regulated kinase- and cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)-dependant pathways: involvement of NF-kappa B, activator protein 1, and cAMP response element binding protein. *J Immunol*, **169**: 7026-7038.

Jee, Y.-K., Gilmour, J., Kelly, A., Bowen, H., Richards, D., Soh, C. (2005). Repression of interleukin-5 transcription by the glucocorticoid receptor targets GATA3 signaling and involves histone deacetylase recruitment. *J Biol Chem*, **280** : 23243-23250.

Jenuwein, T. (2001). Re-SET-ing heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol*, **11** : 266-273.

Jenuwein, T., Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science*, **293** : 1074-1080.

Jesaitis, A.J., Buescher, E.S., Harrison, D., Quinn, M.T., Parkos, C.A., Livesey, S., Linner, J. (1990). Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J Clin Invest*, **85** : 821-835.

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

Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem*, **58** : 799-839.

Jones, S.W., Erikson, E., Blenis, J., Maller, J., Erikson, R.L. (1988). A Xenopus ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85** : 3377-3381.

Junttila, M.R., Li, S.P., Westermarck, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, **22**: 954-965.

Kadonaga, J.T. (1998). Eukaryotic transcription : an interlaced network of transcription factors and chromatin modifying machines. *Cell*, **92** : 307-313.

Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., Karin, M. (1996). C-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*, **87** : 929-939.

Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination : the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*, **18** : 621-663.

Kawada, M., Yamagoes, S., Murakami, Y., Suzuki, K., Mizuno, S., Uehara, Y. (1997). Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene*, **15** : 629-637.

Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J. (1994). Lymphotoxin : a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, **266** : 1395-1399.

Kettle, A.J., Clark, B.M., Winterbourn, C.C. (2004). Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid : implications for the hypothesis that neutrophils produce ozone. *J Biol Chem*, **279** : 18521-18525.

Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (2005). Do neutrophils produce ozone ? An appraisal of current evidence. *Biofactors*, **24** : 41-45.

Keyse, S.M. (2000). Protein phosphatase and the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **12** : 186-192.

Khanna-Gupta, A., Sumoylation and the function of CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Blood Cells Mol Dis*, **41** : 77-81.

Kharbanda, S., Saleem, A., Emoto, Y., Stone, R., Rapp, U., Kufe, D. (1994). Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*, **269** : 872-878.

Kilpatrick, L.E., Sun, S., Mackie, D., Baik, F., Li, H., Korchak, H.M. (2006). Regulation of the TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of  $\delta$ -PKC and ERK 1/2. *J Leukoc Biol*, **80**: 1512-1521.

Kim, C., Dinauer, M.C. (2001). Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol*, **166** : 123-132.

Kjeldsen, L., Bjerrum, O.W., Askaa, J., Borregaard, N. (1992). Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase containing granules. *Biochem J*, **287** : 603-610.

Kjeldsen, L., Bainton, D.F., Sengløv, H., Borregaard, N. (1993). Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils : identification of a distinct gelatinase containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood*, **82** : 3183-3191.

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

Klein, J.B., Buridi, A., Coxon, P.Y., Rane, M.J., Manning, T., Kettritz, R., McLeish, K.R. (2001). Role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in chemoattractant and LPS delay of constitutive neutrophil apoptosis. *Cell Signal*, **13**: 335-343.

Kobayashi, S.D., DeLeo, F.R. (2009). Role of neutrophils in innate immunity : a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, **1** : 309-333.

Kohler, J.J., Metallo, S.J., Sneider, T.L., Schepartz, A. (1999). DNA specificity enhanced by sequential binding of protein monomers. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96** : 11735-11739.

Koopman, W., Krangel, M.S. (1997). Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha. *J Biol Chem*, **272** : 10103-10109.

Kornberg, R.D., et Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryotic chromosome. *Cell*, **89** : 285-294.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their fonction. *Cell*, **128** : 693-705.

- Krämer, O.H., Knauer, S.K., Greiner, G., Jandt, E., Reichardt, S., Gährs, K.H. (2009). A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev*, **23** : 223-235.
- Kuschert, G.S., Hubbard, R.E., Power, C.A., Wells, T.N., Hoogewerf, A.J. (1997). Solid-phase binding assay to study interaction of chemokines with glycosaminoglycans. *Methods Enzymol*, **287** : 369-378.
- Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., Wells, T.N. (1999). Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*, **38** : 12959-12968.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, **358** : 417-421.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, **369** : 156-160.
- Lacasse, E.C., Lefebvre, Y.A. (1995). Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, **23** : 1647-1656.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Laing, K.J., Secombes, C.J. (2004). Chemokines. *Dev Comp Immunol*, **28** (3) : 443-460.
- Lanschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J., McKnight, S.L. (1988). Isolation and recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev*, **2** : 786-800.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. (1989). The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science*, **243** : 1681-1688.
- Lapinet, J.A., Scapini, P., Calzetti, F., Perez, O., Cassatella, M.A. (2000). Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun*, **68** : 6917-6923.
- Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*, **271** : 20608-20616
- Lee, J.D., Ulevitch, R.J., Han, J. (1995). Primary structure of BMK1 : a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **213** : 715-724.

Lee, T., Hoofnagle, A.N., Kubuyama, Y., Stroud, J., Min, X., Goldsmith, E.J., Chen, L., Resing, K.A., Ahn, N.G. (2004). Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell*, **14** : 43-55.

Lee, W., Mitchell, P., Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, **49**: 741-52

Leevers, S.J., Paterson, H.F., Marshall, C.J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, **369** : 411-414.

Lenormand, P., Sardet, C., Pagès, G., L'Allemain, G., Brunet, A., Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol*, **122** : 1079-1088.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.L., Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, **7**: 676-689.

Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K.T., Bembas, K., Tao, R. (2007). FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc of Natl Acad Sci*, **104** : 4571-4576.

Li, B., Tournier, C., Davis, R.J., Flavell, R.A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J*, **18** : 420-432.

Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, **3** : 662-673.

Liao, Z., Grimshaw, R.S., Rosenstreich, D.L. (1984). Identification of a specific interleukin 1 inhibitor in the urine of febrile patients. *J Exp Med*, **159**: 126-136.

Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*, **12** : 3008-3019.

Listman, J.A., Wara-aswapati, N., Race, J.E., Blystone, L.W., Walker-Kopp, N., Yang, Z. (2005). Conserved ETS domain arginines mediate DNA binding, nuclear localization, and a novel mode of bZIP interaction. *J Biol Chem*, **280** : 41421-41428.

Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J. (1992). Poly's lament : the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today*, **13** : 169-172.

Lloyd, A.C., Obermüller, F., Staddon, S., Barth, C.F., McMahon, M., Land, H. (1997). Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev*, **11** : 663-677.

Lu, J., Sun, H., Wang, X., Liu, C., Xu, X., Li, F. (2005). Interleukin-12 p40 promoter activity is regulated by the reversible acetylation mediated by HDAC1 and p300. *Cytokine*, **31** : 46-51.

Lu, Z.H., Wang, Z.X., Horuk, R., Hesselgesser, J., Lou, Y.C., Hadley, T.J. (1995). The promiscuous chemokine binding profile of the Duffy antigen/receptor for chemokines is primarily localized to sequences in the amino-terminal domain. *J Biol Chem*, **270** : 26239-26245.

Luther, S.A., Cyster, J.G. (2001). Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*, **2** (2) : 102-107.

Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., Lefkowitz, R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98** : 2449-2454.

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, Kishimoto, T., Bronson, R.T., Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1 deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** : 9448-9453.

Ma, W., P.J., Bryce, Humbles, A.A., Laouini, D., Yalcindag, A., Alenius, H. (2002). CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. *J Clin Invest*, **109** : 621-628.

Mackay, C.R. (2001). Chemokines : immunology's high impact factors. *Nat Immunol*, **2** (2) : 95-101.

MacKenzie, S.J., Baillie, G.S., McPhee, I., Bolger G.B., Houslay, M.D. (2000). ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH2-terminal UCR regions. *J Biol Chem*, **275** : 16609-16617.

Mahoney, C.W., Shuman, J., McKnight, S.L. Chen, H.C., Huang, K.P. (1992). Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding. *J Biol Chem*, **267** : 19396-19403.

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S., Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, **367** : 40-46.

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, B. (1975). Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*, **115** : 15-17.

Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling : transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80** : 179-185.

Martelli, M.P., Lin, H., Zhang, W., Samelson, L.E., Bierer, B.E. (2000). Signaling via LAT (linker for T-cell activation) and Syk/ZAP70 is required for ERK activation and NFAT transcriptional activation following CD2 stimulation. *Blood*, **96**: 2181-2190.

Matsuda, S., Gotoh, Y., Nishida, E. (1993). Phosphorylation of Xenopus mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase kinase and MAP kinase. *J Biol Chem*, **268** : 3277-3281.

Matute, J.D., Arias, A.A., Wright, N.A.M., Wrobel, I., Waterhouse, C.C.M., Li, X.J., Marchal, C.C., Stull, N.D., Lewis, D.B., Steele, M., Kellner, J.D., Yu, W., Meroueh, S.O., Nauseef, W.M., Dinauer, M.C. (2009). A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutation in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*, **114** : 3309-3315.

Mayr, B., Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependant factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2** : 599-609.

McDonald, P.P., Bald, A., Cassatella, M.A. (1997). Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood*, **89**: 3421-3433.

McMannis, J.D., Plate, J.M. (1985). Xenogeneic antiserum to soluble products from activated lymphoid cells inhibits interleukin 1-mediated functions in the helper pathway of cytolytic-effector-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 1513-1517.

Megiovanni, A.M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J.C., Boudaly, S. (2006). Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigen molecules to dendritic cells : a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol*, **79** : 977-988.

Mercurio, F., DiDonato, J.A., Rosette, C., Karin, M. (1993). p105 and p98 precursor proteins play an active role in NK-kappa B-mediated signal transduction. *Genes Dev*, **7** : 705-718.

Merika, M., Thanos, D. (2001). Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev*, **11** : 205-208.

- Middleton, J., Patterson, A.M., Gardner, L., Schmutz, C., Ashton, B.A. (2002). Leukocyte extravasation : chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, **100** : 3853-3860.
- Min-Hao Kuo, C.D.A. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, **20** : 615-626.
- Miranda, T.B., Jones, P.A. (2007). DNA methylation : the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol*, **213** : 384-390.
- Monticelli, S., Lee, D.U., Nardone, J., Bolton, D.L., Rao, A. (2005). Chromatin-based regulation of cytokine transcription in Th2 cells and mast cells. *Int Immunol*, **17** : 1513-1524.
- Morrison, D.K., Davis, R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19** : 91-118.
- Morton, S., Davis, R.J., McLaren, A., Cohen, P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J*, **22** : 3876-3886.
- Moser, B., Loetscher, P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, **2**(2) : 123-128.
- Mudzinski, S.P., Christian, T.P., Guo, T.L., Cirenza, E., Hazlett, K.R., Gosselin, E.J. (1995). Expression of HLA-DR (major histocompatibility complex II) on neutrophils from patients treated with granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor for mobilization of stem cells. *Blood*, **86** : 2452-2453.
- Muller, W.A. (2002). Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest*, **82** (5) : 521-533.
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., Jyothy, A. (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics*, **36** : 75-88.
- Murohy, L.O., Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity : the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*, **31** : 268-275.
- Murphy, P.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokines receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, **54** : 227-229.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, **52** : 145-176.

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.

Nakajima, T., Kinoshita, S., Sagagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T. (1993). Phosphorylation at threonine-253 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90** : 2207-2211.

Nakamura, H., Yoshimura, K., Jaffe, H.A., Crystal, R.G. (1991). Interleukine-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem*, **266** : 19611-19617.

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity : challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, **6** : 173-182.

Nauseef, W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes : an integrated view. *Immunol Rev*, **219** : 88-102.

Nauseef, W.M., Volpp, B.D., McCormick, S., Leidal, K.G., Clark, R.A. (1991). Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosol oxidase components. *J Biol Chem*, **266** : 5911-5917.

Nerlov, C. (2008). C/EBPs : recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol*, **20** : 180-185.

Nesin, M., et Cunningham-Rundles, S. (2000). Cytokines and neonates. *Am J Perinatol*, **17** : 393-404.

Norel, X., Brink, C. (2004). The quest for new cysteinyl-leukotriène and lipoxin receptors : recent clues. *Pharmacol Ther*, **103** : 81-94.

Nusinzon, I., Horvath, C.M. (2006). Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation. *Mol Cell Biol*, **26** : 3106-3113.

Ooi, S.K., Bestor, T.H. (2008). The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, **133** : 1145-1148.

Oppenheim, J.J. et Feldman, M. (2001) Introduction to the role of cytokines in innate host defense and adaptive immunity. In: Oppenheim JJ, Feldman M, Durum SK, Hirano T, Vilcek J, Nicola NA, editor. *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense*. 1. Vol. 1. San Diego: Academic Press: 3-20.

Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T., Imagawa, M. (1996). DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem*, **271**: 3891-3896.

Owens, D.M., Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signaling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, **26**: 3203-3213.

Ozawa, Y., Towatari, M., Tsuzuki, S., Hayakawa, F., Maeda, T., Miyata, Y. (2001). Histone deacetylase 3 associates with represses the transcription factor GATA-2. *Blood*, **98**: 2116-2123.

Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Melochem S., Pouysségur, J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90** :8319-8323.

Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**: 6853-6866.

Palic, D., Ostojic, J., Andreasen, C.B., Roth, J.A. (2007). Fish casts NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol*, **31**: 805-816.

Panne, D. (2008). The enhancoesome. *Curr Opin Struct Biol*, **18**: 236-242.

Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A. (2009). Nets: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*, **30**: 513-521.

Patriotis, C., Makris, A., Chernoff, J., Tsiichlis, P.N. (1994). Tlp-2 acts in concert with Ras and Raf-1 to activate mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 9755-9759.

Paul, W.E. (1999) Fundamental immunology. 4th edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia ; Chapitre 32, p1051-1066.

Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*, **10** : 885-892.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways : regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, **22** : 153-183.

- Penrose, J., Austen, K.F., Lam, B.K. (1999). *Leucotrienes : biosynthetic pathway, release, and receptor-mediated actions with relevance to disease states*, In *Inflammation : Basic principles and clinical correlates*, J.I.a.R.S. Gallin, Editor. Lippincott Williams and Wilkins : Philadelphia. p. 361-369.
- Peraldi, P., Scimeca, J.C., Filloux, C., Van Obberghen, E. (1993). Regulation of extracellular signal-regulated protein kinase-1 (ERK-1 ; pp44/mitogen-activated protein kinase) by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells : implication of ERK1 inhibitory activities. *Endocrinology*, **132** : 2578-2585.
- Peterson, C.L., Laniel, M.A. (2004). Histones and histones modifications. *Curr Biol*, **14** : R546-551.
- Peterson, C.L. et Workman, J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodelling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev*, **10** : 187-195.
- Petosa, C., Morand, P., Baudin, F., Moulin, M., Artero, J.B., Muller, C.W. (2006). Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol Cell*, **21** : 565-572.
- Pétrin, D., Turcotte, S., Gilbert, A.K., Rola-Pleszczynski, M., Stamkova, J. (2006). The anti-apoptotic effect of leukotriene B4 in neutrophils: a role for phosphatidylinositol 3-kinase, extracellular signal-regulated kinase and Mcl-1. *Cell Signal*, **18**: 479-487.
- Peveri, P., Walz, A., Dewalt, B., Baggiolini, M. (1988). A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, **167** : 1547-1559.
- Pharn, C.T.N. (2008). Neutrophil serine-proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol*, **40** : 1317-1333.
- Philipson, M., Kubes, P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*, **17** : 1381-1390.
- Poli, V. (1998). The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*, **273** : 29279-29282.
- Poli, V., Mancini, F.P., Cortese, R. (1990). IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell*, **63** : 643-653.
- Popik, W., Hesselgesser, J.E., Pitha, P.M. (1998). Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J Vir*, **72**: 6406-6413.

- Potter, N.S., Harding, C.V. (2001). Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J Immunol*, **167** : 2538-2546.
- Pouliot, M., Gilbert, C., Borgeat, P., Poubelle, P.E., Bourgoin, S., Créminion, C., Maclouf, J., McColl, S.R., Naccache, P.H. (1998). Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. *FASEB J*, **12** : 1109-1123.
- Pouysségur, J., Volmat, V., Lenormand, P. (2002). Fidelity and spacio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol*, **64** : 755-763.
- Proffitt, J., Crabtree, G., Grove, M., Daubersies, P., Bailleul, B., Wright, E., Plumb, M. (1996). An ATF/CREB-binding site is essential for cell-specific and inducible transcription of the murine MIP-1 beta cytokine gene. *Gene*, **152** : 173-179.
- Qui, M.S., Green, S.H. (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron*, **9** : 705-717.
- 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.
- Radomska, H.S., Basseres, D.S., Zheng, R., Zhang, P., Dayaram, T., Yamamoto, Y. (2006). Block of C/EBP alpha function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *J Exp Med*, **203** : 371-381.
- Radsak, M., Iking-Konert, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., Hansch, G.M. (2000). Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T cell activation : major histocompatibility complex class II restricted antigen dependent induction of T cell proliferation. *Immunology*, **101** : 521-530.
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res*, **317** : 575-589.
- Raman, M., Chen, W., Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, **26** : 3100-3112.
- Ramos-Kichik, V., Silva-Garcia, R., Serafin-Lopez, J., Rojas-Espinosa, O., Rivera-Gutierrez, S., Estarada-Parra, S., Estrada-Garcia, I. (2009). Effect of mycobacterium tuberculosis trapped in NETs on macrophage proinflammatory response. *J Immunol*, **182** : 83.

Rand, M.L., Warren, J.S., Mansour, J.S., Newman, W., Ringlerm D.J. (1996). Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol*, **148** : 855-864.

Reid, G.K., Kargman, S., Vickers, P.J., Mancini, J.A., Léveillé, C., Ethier, D., Miller, D.K., Gillard, J.W., Dixon, R.A., Evans, J.F. (1990). Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J Biol*, **265**: 19818-19823.

Renauld, J.C. (2001). New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*, **54** : 577-589.

Resing, K.A., Mansour, S.J., Hermann, A.S., Johnson, R.S., Candia, J.M., Fukasawa, K., Vandle Woude, G.F., Ahn, N.G. (1995). Determination of v-Mos-catalyzed phosphorylation sites and autophosphorylation sites on MAP kinase kinase by ESI/MS. *Biochemistry*, **34** : 2610-2620.

Reszka, A.A., Seger, R., Diltz, C.D., Krebs, E.G., Fischer, E.H. (1995). Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92** : 8881-8885.

Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S., Woo, H.A. (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol*, **17** : 183-189.

Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood*, **90** : 909-928.

Roman, C., Platero, J.S., Shuman, J., Calame, K. (1990). Ig/EBP-1 : a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev*, **4** : 1404-1415.

Ron, D., Haener, J.F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, **6** : 439-453.

Rosenberg, H.F., Gallin, J.I. (1999). *Inflammation*, In *Fundamental Immunology, Fourth edition*, W.E. Paul, Editor. Lippincott-Raven : Philadelphia. p. 1051-1066.

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.

Rossi, D., Zlotnick, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, **18** : 217-242.

- Rossomando, A.J., Dent, P., Sturgill, T.W., Marshak, D.R. (1994). Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **14** : 1594-1602.
- Ross, S.E., Radomska, H.S., Wu, B., Zhang, P., Winnay, J.N., Bajnok, L. (2004). Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis. *Mol Cell Biol*, **24** : 675-686.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **70** : 81-120.
- Rousse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, **78** : 1027-1037.
- Roux, P.P., Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases : a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68** : 320-344.
- Ruben, S.M., Klement, J.F., Coleman, T.A., Maher, M., Chen, C.H., Rosen, C.A. (1992). I-Rel : a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes Dev*, **6** : 745-760.
- Rubinfeld, H., Hanoch, T., Seger, R. (1999). Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem*, **274** : 30349-30352.
- Rubinstein, M., Dinarello, C.A., Openheim, J.J., et Hertzog, P. (1998). Recent advances in cytokines, cytokine receptors and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev*, **9** : 175-181.
- Rusconi, P., Caiola, E., Brogini, M. (2012). RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology. *Curr Med Chem*, **19** : 1164-1176.
- Ryseck, R.P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobranski, P., Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NK-kB. *Mol Cell Biol*, **12** : 674-684.
- Sabroe, I., Prince, L.R., Jones, E.C., Horsburg, M.J., Foster, S.J. (2003). Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span, *J Immunol*, **170** : 5268-5275.
- Sadik, C.D., Kim, N.D., Luster, A.D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*, **32**: 452-460.

Sakamoto, K.M., Frank, D.A. (2009). CREB in the pathophysiology of cancer : implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, **15** : 2583-2587.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarised T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med*, **187** : 875-883.

Saxena, M., Mustelin, T. (2000). Extracellular signals and scores of phosphatases : all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol*, **12** : 387-396.

Scapini, P., Carletto, A., Nardelli, B., Calzetti, F., Roschke, V., Merigo, F., Tamassia, N., Pieropan, S., Biasi, D., Sbarbati, A., Sozzani, S., Bambara, 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., 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.

Schaeffer, H.J., Catling, A.D., Eblen, S.T., Collier, L.S., Krauss, A., Weber, M.J. (1998). MP1 : a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science*, **281** : 1668-1671.

Schmeck, B., Lorenz, J., N'Guessan, P.D., Opitz, B., Van Laak, V., Zahlten, J. (2008). Histone acetylation and flagellin are essential for *Legionella pneumophila*-induced cytokine expression. *J Immunol*, **181** : 940-947.

Schmid-Alliana, A., Menou, L., Manié, S., Schmid-Antomarchi, H., Millet, M.A., Giuriato, S., Ferrua, B., Rossi, B. (1998). Microtubule integrity regulates src-like and extracellular signal-regulated kinase activities in human pro-monocytic cells. Importance for interleukin-1 production. *J Biol Chem*, **273**: 3394-3400.

Schouten, G.J., Vertegaal, A.C., Whiteside, S.T., Israel, A., Toebes, M., Dorsman, J.C., van der Eb, A.J., Zanterna, A. (1997). I $\kappa$ B $\alpha$  is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase. *EMBO J*, **16** : 3133-3144.

Schröder, J.M., Mrowietz, U., et Christopher, E. (1988). Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity. *J Immunol*, **140** : 3534-3540.

Sebolt-Leopold, J.S., Dudley, D.T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R.C., Tecle, H., Barret, S.D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W.R., Saltiel, A.R. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med*, **5** : 810-816.

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

Segal, B.H., DeCarlo, E.S., Kwon-Chung, K.J., Malech, H.L., Gallin, J.I., Holland, S.M. (1998). *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*, **77** : 345-354.

Seger, R., Ahn, N.G., Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Panayotatos, N., Radziejewska, E., Ericsson, L., Bratlien, R.L., Cobb, M.H., Krebs, E.G. (1991). Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues : implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88** : 6142-6146.

Seger, R., Ahn, N.G., Posada, J., Munar, E.S., Jensen, A.M., Cooper, J.A., Cobb, M.H., Krebs, E.G. (1992a). Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem*, **267** : 14 373- 14381.

Seger, R., Segerm D., Lozeman, F.J., Ahn, N.G., Graves, L.M., Campbell, J.S., Ericsson, L., Harrylock, M., Jensen, A.M., Krebs, E.G. (1992 b). Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem*, **267** : 25628-25631.

Seger, R., Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, **9** : 726-735.

Seger, R., Seger, D., Reszka, A.A., Munar, E.S., Eldar-Finkelman, H., Dobrowolska, G., Jensen, A.M., Campbell, J.S., Fischer, E.H., Krebs, E.G. (1994). Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells. Evidence that MAPKK involvement in cellular proliferation is regulated by phosphorylation of serine residues in its kinase subdomains VII and VIII. *J Biol Chem*, **269** : 25699-25709.

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

Sengeløv, H., Kjeldsen, L., Borregaard, N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*, **150** : 1535-1543.

Sengeløv, H., Nielsen, M.H., Borregaard, N. (1992). Separation of human neutrophil plasma membrane from intracellular vesicles containing alkaline phosphatase and NADPH oxidase activity by free flow electrophoresis. *J Biol Chem*, **267** : 14912-14917.

Serhan, C.N. (2005). Novel omega-3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol Therapeutics*, **105** : 7-21.

- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88** : 593-602.
- Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A.C., Land, H. (1997). High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17** : 5588-5597.
- Sharrocks, A.D., Yang, S.H., Galanis, A. (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci*, **25** : 448-453.
- Shaulian, E., Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, **4** : E131-136.
- Shaw, S. K., Bamba, P. S., Perkins, B. N. & Luscinikas, F. W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol*, **167**: 2323-2330
- Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. (1999). CREB : a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*, **68** : 821-861.
- Shuai, K., et Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **3** : 900-911.
- Shannon, M.F., Coles, L.S., Attema, J., Diamond, P. (2001). The role of architectural transcription factors in cytokine gene transcription. *J Leukoc Biol*, **69** : 21-32.
- Sidransky, D., Hollstein, M. (1996). Clinical implication of the p53 gene. *Annu Rev Med*, **47** : 285-301.
- Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes : the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, **56** : 387-437.
- Sims, R.J. 3rd, Reinberg, D. (2006). Histone H3 Lys 4 methylation : caught in a bind ? *Genes Dev*, **20** : 2779-2786.
- Skubitz, K. (2003) Neutrophilic leukocytes. In *Wintrobe's Clinical Hematology*. G. F. L. R. P. G. . ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York, Vol.1, p. 267.
- Smith, J.A. (1994) Neutrophils, host defense and inflammation : a double-edge sword. *J Leukoc Biol*, **56**(6) : 672-686.
- Smith, M.F. Jr., Eidlen, D., Brewer, M.T., Eisenberg, S.P., Arend, W.P., Gutierrez-Hartmann, A. (1992). Human IL-1 receptor antagonist promoter. Cell type-specific activity and identification of regulatory regions. *J Immunol*, **149** : 2000-2007.

- Smith, W.L., Dewitt, D.L., Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases : structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, **69** : 145-182.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., Dewitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthase (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, **271** : 33157-33160.
- Songyang, Z., LU, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L.H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, T.R., Bartleson, C., Graves, D.J., DeMaggio, A.J., Hoekstra, M.F., Blenis, J., Hunter, T., Cantlaym L.C. (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases : primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and ERK1. *Mol Cell Biol*, **16** : 6486-6493.
- Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Basha, M.A., Chensue, S.W., Lynch, J.P. 3rd, Toews, G.B., Westwick, J., Strieter, R.M. (1990). Interleukine-8 gene expression by pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest*, **86** : 1945-1953.
- Strieter, R.M., Phan, S.H., Showell, H.J., Remick, D.G., Lynch, J.P., Genord, M., Raiford, C., Eskandari, M., Marks, R.M., Kunkel, S.L. (1989). Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblasts. *J Biol Chem*, **264** : 10621-10626.
- Sturgill, T.W., Ray, L.B. (1986). Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **134** : 565-571.
- Sugita, S., Kohno, T., Yamamoto, K., Imaizumi, Y., Nakajima, H., Ishimaru, T., Matsuyama, T. (2002). Induction of macrophage-inflammatory protein-3alpha gene expression by TNF-dependent NF-kappaB activation. *J Immunol*, **168** : 5621-8.
- Sun, H., Charles, C.H., Lau, L.F., Tonks, N.K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, **75** : 487-493.
- Sung, S.J., Walters, J.A., Hudson, J., Gimble, J.M. (1991). Tumor necrosis factor-alpha mRNA accumulation in human myelomonocytic lines. Role of transcriptional regulation by DNA sequence motifs and mRNA stabilization. *J Immunol*, **147** : 2047-2054.
- Szekanecz, Z., Kim, J., Koch, A.E. (2003). Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin Immunol*, **15** : 15-21.
- Tahirov, T.H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M. (2002). Mechanism of c-Myb-C/EBP  $\beta$  cooperation from separated sites on a promoter. *Cell*, **108** : 57-70.

Tani, K., Murphy, W.J., Chertov, O., Oppenheim, J.J., Wang, J.M. (2001). The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and up regulates antigen-specific IG production in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **282** : 971-976.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, **2** : 110-116.

te Velde, A.A., van Kooyk, Y., Braat, H., Hommes, D.W., DelleMijn, T.A., Slors, J.F., van Deventer, S.J., Vyth-Dreese, F.A. (2003). Increased expression of DC-SIGN<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>IL-18<sup>+</sup> and CD83<sup>+</sup>IL-12<sup>-</sup>IL-18<sup>-</sup> dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Eur J Immunol*, **33** : 143-151.

Theilgaard-Monch, K., Porse, B.T., et Borregaard, N. (2006) Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol* **18**, 54-60.

Theodosiou, A., Ashworth, A. (2002). MAP kinases phosphatases. *Genome Biol*, **3**: REVIEWS3009.

Togi, S., Kamitani, S., Kawakami, S., Ikeda, O., Muromoto, R., Nanbo, A. (2009). HDAC3 influences phosphorylation of STAT3 at serine 727 by interaction with PP2A. *Biochem Biophys Res Commun*, **379** : 616-620.

Torchia, J., Glass, C., Rosenfeld, M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol*, **10** : 373-383.

Townsend, M.J., et McKenzie, A.N. (2000). Untavelling the net ? Cytokines and diseases. *J Cell Sci*, **113** (Pt 20) : 3549-3550.

Trautwein, C., van der Geer, P., Karin, M., Hunter, T., Chojkier, M. (1994). Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J Clin Invest*, **93** : 2554-2561.

Treinies, I., Paterson, H.F., Hooper, S., Wilson, R., Marshall, C.J. (1999). Activated MEK stimulates expression of AP-1 componants independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, **19** : 321-329.

Trinchieri, G. (1998). Interleukine-12 : a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol*, **70** : 83-243.

Tsai, M., Chen, R.H., Tam, S.Y., Blenis, J., Galli, S.J. (1993). Activation of MAP kinases, pp90<sup>rsk</sup> and pp70-S6 kinases in mouse mast cells by signaling through the c-kit receptor tyrosine kinase or Fc epsilon RI : rapamycin inhibits activation of pp70-S6 kinase and proliferation in mouse mast cells. *Eur J Immunol*, **23** : 3286-3291.

Tsuda, L., Inoue, Y.H., Yoo, M.A., Mizuno, M., Hata, M., Lim, Y.M., Adachi-Yamada, T., Ryo, H., Masamune, Y., Nishida, Y. (1993). A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the raf kinase in *Drosophila*. *Cell*, **72** : 407-414.

Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y., Auron, P.E. (2011). The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine*, **54** : 6-19.

Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006). Neutrophils extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*, **8** : 668-676.

Valapour, M., Guao, J., Schroder, J.T., Keen, J., Cianferoni, A., Casolaro, V. (2002). Histone deacetylation inhibits IL4 gene expression in T cells. *J Allergy Clin Immunol*, **109** : 238-245.

VanderVen, B.C., Yates, R.M., Russel, D.G. (2009). Intraphagosomal measurement of the magnitude and duration of the oxidative burst. *Traffic*, **10** : 372-378.

van Gisbergen, K.P., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y. (2005a). Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol*, **26** : 626-631.

van Gisbergen, K.P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y. (2005 b). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med*, **201** : 1281-1292.

van Gisbergen, K.P., Ludwig, I.S., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y. (2005c). Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett*, **579** : 6159-6168.

Venuprasad, K., Chattopadhyay, S., Saha, B. (2003). CD28 signaling in neutrophils induces T cell chemotactic factor(s) modulating T cell response. *Hum Immunol*, **46** : 38-43.

Vignais, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase : structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*, **59** : 1428-1459

Villagra, A., Cheng, F., Wang, H.-W., Suarez, I., Glozak, M., Maurin, M., Seto, E. (2009). The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol*, **10** : 92-100.

- Villagra, A., Sotomayor, E.M., Seto, E. (2010). Histone deacetylases and the immunological network : implication in cancer and inflammation Histone deacetylases and immune response. *Oncogene*, **29** : 157-173.
- Volmat, V., Camps, M., Arkininstall, S., Pouysségur, J., Lenormand, P. (2001). The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J Cell Sci*, **114** : 3433-3443.
- Volmat, V., Pouyssegur, J. (2001). Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biol Cell*, **93** : 71-79.
- von der Haar, T., Gross, J.D., Wagner, G., McCarthy, J.E. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nature Struct Mol Biol*, **11**: 503-511.
- von Gise, A., Lorenz, P., Wellbrock, C., Hemmings, B., Berberich-Siebelt, F., Rapp, U.R., Troppmair, J. (2001). Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependant signals. *Mol Cell Biol*, **21** : 2324-2336.
- Von Kockritz-Blickwede, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann, K., Norrby-Teglung, A., Rohde, M., Medina, E. (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*, **111** : 3070-3080.
- Wagner, C., Kondella, K., Bernschneider, T., Heppert, V., Wentzensen, A., Hansch, G.M. (2003). Post traumatic osteitis : analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection. *Shock*, **20** : 503-510.
- Wagner, E.F., Eferi, R. (2005). Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev*, **208** : 126-140.
- Wagner, E.F., Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*, **9**: 537-549.
- Wang, J., Lee, S., Teh, C.E.-Y., Bunting, K., Ma, L., Shannon, M.F. (2009). The transcription repressor, ZEB1, cooperates with CtBP2 and HDAC1 to suppress IL-2 gene activation in T cells. *Int Immunol* **21** : 227-235.
- Wang, X., Liu, Y. (2007). Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell Signal*, **19**: 1372-1382.
- Wartha, F., Beiter, K., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2007). Neutrophil extracellular traps : casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, **10** : 52-56.

Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J*, **16**: 1909-1920.

Watanabe, K., Towatari, M., Ozawa, Y., Miyata, Y., Okamoto, M., Abe, A. (2003). Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene*, **2** : 9176-9184.

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

White, M. (1999) Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103** (3 Pt 2) : S378-381.

Whitehurst, C.E., Geppert, T.D. (1996). MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J Immunol*, **156**: 1020-1029.

Whitehurst, A.W., Robinson, F.L., Moore, M.S., Cobb, M.H. (2004). The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *J Biol Chem*, **279** : 12840-12847.

Williams, S.C., Angerer, N.D., Johnson, P.F. (1997). C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene Expr*, **6** : 371-385.

Williams, S.C., Cantewell, C.A., Johnson, P.F. (1991). A family of C/EBP related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers *in vitro*. *Genes Dev*, **5** : 1553-1567.

Wilsbacher, J.L., Goldsmith, E.J., Cobb, M.H. (1999). Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK involves multiple regions of MAP kinases. *J Biol Chem*, **274** : 16988-16994.

Windhagen, A. (1999). Human polymorphonuclear neutrophils express a B7-1-like molecule. *J Leukoc Biol*, **66** : 945-952.

Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Deschamps-Latssha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils : molecules, functions and athophysiological aspects. *Lab. Invest.*, **80** (5) : 617-653.

Wittamer, V., Bondue, B., Guillabert, A., Vassart, G., Parmentier, M., Communi, D. (2005). Neutrophil-mediated maturation of chemorin : a link between innate and adaptive immunity. *J Immunol*, **175** : 487-493.

Wojciak-Stothard, B., Entwistle, A., Garg, R., Ridley, A.J. (1998). Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, **176**(1) : 150-165.

Wolffe, A.P. et Guschin, D. (2000). Review : chromatin structure features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol*, **129** : 102-122.

Wolf, I., Rubinfeld, H., Yoon, S., Marmor, G., Hanoch, T., Seger, R. (2001). Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *J Biol Chem*, **276** : 24490-24497.

Woodman, R.C., Johnston, B., Hickey, M.J., Teoh, D., Reinhardt, P., Poon, B.Y., Kubes, P. (1998). The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment : a study using CD43-deficient mice. *J Exp Med*, **188** : 2181-2186.

Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., McMahon, M. (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17** : 5598-5611.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **1995** : 1326-1331.

Xing, J., Ginty, D.D., Greenberg, M.E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, **273** : 959-963.

Xu, B., Stippec, S., Robinson, F.L., Cobb, M.H. (2001). Hydrophobic as well as charged residues in both MEK1 and ERK2 are important for their proper docking. *J Biol Chem*, **276** : 26509-26515.

Xu, B., Wilsbacher, J.L., Collisson, T., Cobb, M.H. (1999). The N-terminal ERK-binding site of MEK1 is required for efficient feedback phosphorylation by ERK2 in vitro and ERK activation in vivo. *J Biol Chem*, **274** : 34029-34035.

Xu, M., Nie, L., Kim, S.-H., Sun, X.-H. (2003). STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBP $\beta$ . *EMBO J*, **22** : 893-904.

Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J.M., Yang, D., Gong, W.H., Yoshimura, T. (2001). Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils : inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol*, **69** : 698-704.

Yamashita, K., Miyoshi, T., Arai, T., Endo, N., Itoh, H., Makino, K., Mizugishi, K., Uchiyama, T., Sasada, M. (2008). Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105** : 16912-16917.

Yamazaki, T., Aoki, Y. (1997). Cathepsin G binds to human lymphocytes. *J Leukoc Biol*, **61** : 73-79.

Yao, Z., Dolginov, Y., Hanoch, Yung, Y., Ridner, G., Lando, Z., Zharhary, D., Seger, R. (2000). Detection of partially phosphorylated forms of ERK by monoclonal antibodies reveals spatial regulation of ERK activity by phosphatases. *FEBS Lett*, **468** : 37-42.

Yao, Z., Flash, I., Raviv, Z., Yung, Y., Asscher, Y., Pleban, S., Seger, R. (2001). Non-regulated and stimulated mechanisms cooperate in the nuclear accumulation of MEK1. *Oncogene*, **20** : 7588-7596.

Yao, Y., Li, W., Kaplan, M.H., Chang, C-H. (2005). Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med*, **201** : 1899-1903.

Yasumoto, K., Okamoto, S., Mukaida, N., Murakami, S., Mai, M., Matsushima, K. (1992). Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem*, **267** : 22506-22511.

Yoon, S., Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase : Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, **24** : 21-44.

York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., Stork, P.J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, **392** : 622-626.

Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J., Leonard, E.J. (1987). Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84** : 9233-9237.

Yu, W., Fantl, W.J., Harrowe, G., Williams, L.T. (1998). Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol*, **8** : 56-64.

Yuan, Z.I., Guan, Y.J., Chatterjee, D., Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residues. *Science*, **307** : 269-273.

Yung, Y., Dolginov, Y., Yao, Z., Rubinfeld, H., Micheal, D., Hanoch, T., Roubini, E., Lando, Z., Zharhary, D., Seger, R. (1997). Detection of ERK activation by novel monoclonal antibody. *FEBS Lett*, **408** : 292-296.

Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature*, **367** : 704-711.

Zhang, J., Zhou, B., Zheng, C.F., Zhang, Z.Y. (2003). A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J Biol Chem*, **278** : 29901-29912.

Zhang, Y., Edwards, J.P., Mosser, D.M. (2006). Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. *J Immunol*, **177** : 1282-1288.

Zhang, Y., Tuzova, M., Xiao, Z.-X.J., Cruikshank, W.W., Center, D.M. (2008). Pro-IL-16 recruits histone deacetylase 3 to the Skp2 core promoter through interaction with transcription factor GABP. *J Immunol*, **180** : 402-408.

Zhong, S.P., Ma, W.Y., Dong, Z. (2000). ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 on serine 10. *J Biol Chem*, **275** : 20980-20984.

Zhou, G., Bao, Z.Q., Dixon, J.E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, **270** : 12665-12669.

Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., Bishop, J.M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev*, **12** : 2997-3007.

Zlonik, A. et Yoshie, O. (2000). Chemokines : a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, **12** (2) : 121-127.

Zurier, R.B. (1976). Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*, **2** : 815-818.