

Université de Sherbrooke

**Implication de TAK1 dans la modulation des réponses du neutrophile humain au fMLP et au GM-CSF**

Par  
Stéphanie Sylvain-Prévost  
Programme gradué 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  
Octobre 2012

Membres du jury d'évaluation :  
Pr Patrick McDonald, programme d'immunologie  
Dr Gilles Dupuis, programme d'immunologie  
Pr Claude Asselin, programme d'anatomie et 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: 978-0-494-93301-5*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-93301-5*

#### NOTICE:

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

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

#### AVIS:

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

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

---

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

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

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

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

Canada

## **Résumé**

### **Implication de TAK1 dans la modulation des réponses du neutrophile humain au fMLP et au GM-CSF**

Par  
Stéphanie Sylvain-Prévost  
Programme gradué d'immunologie

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

#### **Résumé :**

Les neutrophiles sont d'une grande importance dans la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Ils participent activement par leurs actions antimicrobiennes, comme la phagocytose et la relâche de granules, mais influencent également la réponse immunitaire par les différentes cytokines et chimiokines qu'ils produisent. L'étude des différentes fonctions du neutrophile a permis d'établir les étapes clés de la signalisation intracellulaire qui mène à ces différentes fonctions. De plus, les études de signalisation, dans différents organismes, ont placé TAK1, une MAP3K, à l'avant-plan dans l'activation des sentiers MAP kinase et des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B. Nos efforts pour élucider les sentiers métaboliques du neutrophile nous ont fait nous pencher sur le rôle que TAK1 pouvait y jouer. Nous avons donc découvert que TAK1 était la kinase d'importance dans le contrôle des fonctions du neutrophile avec le LPS et le TNF $\alpha$ , deux stimuli activateurs de NF- $\kappa$ B.

Dans cette étude, nous nous sommes penchés sur le rôle de TAK1 chez le neutrophile avec des stimuli dont les réponses cellulaires ne passent pas par l'activation de NF- $\kappa$ B. C'est dans cette perspective que nous avons utilisé un chimioattractant, le fMLP, et un facteur de croissance, le GM-CSF. Ce sont deux stimuli physiologiques fréquemment retrouvés aux sites inflammatoires. Le fMLP et le GM-CSF activent rapidement TAK1 et celle-ci se retrouve en amont de la voie MEK/ERK, mais pas des voies p38 MAPK et PI3K/AKT. L'inhibition de TAK1 diminue l'expression et la sécrétion d'IL-8 et d'IL-1RA. L'inhibition de MEK/ERK et de PI3K/AKT a le même effet. De plus, l'inhibition de TAK1 empêche l'effet antiapoptotique du GM-CSF ainsi que diminue la production de leucotriènes par le fMLP.

En conclusion, les travaux présentés montrent que TAK1 est une MAP3K essentielle dans les réponses fonctionnelles du neutrophile au fMLP et au GM-CSF. Cette découverte ouvre la porte à de nouvelles cibles thérapeutiques, particulièrement dans le cas de maladies chroniques impliquant le GM-CSF

**Mots-clés :** neutrophiles humains, fMLP, GM-CSF, TAK1

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>CHAPITRE 1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 Le neutrophile humain .....	1
1.1.1 <i>La phagocytose</i> .....	2
1.1.2 <i>La dégranulation</i> .....	3
1.1.3 <i>La flambée oxydative</i> .....	6
1.1.4 <i>La production de NETs</i> .....	9
1.1.5 <i>La production de médiateurs lipidiques</i> .....	11
1.1.6 <i>La production de cytokines et chimiokines</i> .....	12
1.1.7 <i>L'apoptose et la résolution de l'inflammation</i> .....	16
1.2 : <i>La régulation de l'induction génique des cytokines et chimiokines</i> .....	17
1.2.1 <i>Les facteurs de transcription C/EBP</i> .....	17
1.2.2 <i>Les facteurs de transcription NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	18
1.2.3 <i>Les voies de signalisation MAPK</i> .....	19
1.3 <i>TAK1</i> .....	20
1.3.1 <i>TAK1 en tant que MAP3K</i> .....	20
1.3.2 <i>L'activation de TAK1</i> .....	21
1.3.3 <i>TAK1 chez le neutrophile</i> .....	24
1.4 <i>Le fMLP</i> .....	24
1.4.1 <i>Les peptides N-formylés</i> .....	24
1.4.2 <i>Le fMLP et le neutrophile</i> .....	25
1.4.3 <i>Le fMLP dans les pathologies</i> .....	26
1.4.4 <i>Le récepteur des peptides N-formylés</i> .....	27
1.4.5 <i>La signalisation induite par le fMLP</i> .....	28
1.5 <i>Le GM-CSF</i> .....	30
1.5.1 <i>Le facteur de croissance GM-CSF</i> .....	30
1.5.2 <i>Le GM-CSF et les neutrophiles</i> .....	31
1.5.3 <i>Le GM-CSF dans les pathologies</i> .....	32

1.5.4 Le récepteur du GM-CSF.....	33
1.5.5 La signalisation induite par le GM-CSF.....	34
1.6 Hypothèse de recherche et objectifs .....	36
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>37</b>
2.1 Les produits utilisés.....	37
2.2 Isolement des neutrophiles.....	38
2.3 Fractionnements cellulaires et immunobuvardages de type western .....	38
2.4 Immunoprécipitations et immunobuvardages de type western.....	39
2.5 Immunoprécipitation et essais kinases <i>in vitro</i> .....	39
2.6 Extraction d'ARN et analyse par PCR en temps réel.....	40
2.7 Analyse des protéines sécrétées par ELISA.....	41
2.8 Détermination de l'apoptose du neutrophile .....	41
2.9 Détermination de la production de leucotriènes .....	41
2.9 Analyse statistique .....	42
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS .....</b>	<b>43</b>
3.1 Activation de MAP3K par le fMLP et le GM-CSF chez le neutrophile humain.....	43
3.2 Impact de TAK1 sur la signalisation du fMLP et du GM-CSF chez le neutrophile humain .....	45
3.3 Effet de l'inhibition de TAK1 sur l'expression et la sécrétion de cytokines par le neutrophile humain.....	46
3.4 Effet de l'inhibition de TAK1 sur le retard de l'apoptose du neutrophile humain .....	49
3.5 Effet de l'inhibition de TAK1 sur la synthèse de médiateurs lipidiques par le neutrophile humain .....	50
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>52</b>
4.1 Discussion .....	52
4.2 Conclusion.....	55
4.3 Perspectives .....	56
<b>CHAPITRE 5 : REMERCIEMENTS .....</b>	<b>58</b>
<b>CHAPITRE 6 : RÉFÉRENCES .....</b>	<b>59</b>



## Liste des tableaux

Tableau 1 Nature des protéines contenues dans les granules du neutrophile humain (tiré de Faurichou et Borregaard, 2003).....	6
Tableau 2 Principaux éléments de la NADPH oxydase ainsi que leur fonction (Modifié de Clark, 1999) .....	8
Tableau 3 Cytokines et chimiokines exprimées et sécrétées par le neutrophile humain (mise à jour de Cassatella, 1999 et Scapini et al., 2000) .....	15
Tableau 4 Distribution cellulaire et tissulaire des récepteurs de peptides N-Formylés (tiré de Migeotte et al., 2006).....	28

## Liste des figures

Figure 1 Activation de la NADPH oxydase. ....	9
Figure 2 Activation de TAK1 et de la cascade NF- $\kappa$ B suite à l'activation du TNFR1, de l'IL1R et du TCR. ....	23
Figure 3 Voies de signalisation et réponses induites par la liaison d'un chimioattractant (fMLP) à son récepteur. ....	30
Figure 4 Voies de signalisation activées par la liaison du GM-CSF à son récepteur. ....	35
Figure 5 Activation de TAK1 et de MAP3K par le fMLP et le GM-CSF.....	44
Figure 6 Impact de l'inhibition de TAK1 sur la signalisation MAPK et PI3K.....	46
Figure 7 Effet de l'inhibition de TAK1 sur la sécrétion de cytokines par le neutrophile .....	47
Figure 8 Effet de l'inhibition de TAK1 sur l'expression de cytokines par le neutrophile humain .....	49
Figure 9 Impact de l'inhibition de TAK1 sur l'apoptose retardée du neutrophile humain .....	50
Figure 10 Effet de l'inhibition de TAK1 sur la synthèse de leucotriènes par le neutrophile humain.....	51

## Liste des abréviations

5-LO	5-lipoxygénase
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BCR	Récepteur des cellules B
BSA	Albumine bovine sérique
C5a	Protéine du complément 5a
CR1	Récepteur du complément 1
DAG	Diacylglycérol
EPO	Érythropoïétine
fMLP	Peptide Méthionine-Leucine-Phénylalanine N-Formylé
FPR	Récepteur des peptides formylés
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
IFN	Interféron
IKK	Kinase de I $\kappa$ B
IL	Interleukine
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotriène B4
LXA4	Lipoxine A4
MAPK	Protéines kinases activées par des mitogènes
MBP	Protéine basique de la myéline
MEKK	MAP ERK kinase kinase
MIP-1	Protéine inflammatoire agissant sur les macrophages
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire kappa B
NGAL	Lipocaline du neutrophile associée à la gélatinase
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PGE-2	Prostaglandine E2
PGI2	Prostaglandine I2
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SCF	Facteur de croissance des cellules souches
TAB	Protéine associée à TAK1
TAK1	Kinase activée par TGF- $\beta$
TCR	Récepteur des antigènes des cellules T
TLR	Récepteur de type Toll-like
TNF $\alpha$	Facteur de la nécrose tumorale- $\alpha$
TXA2	Thromboxane A2

## CHAPITRE 1. Introduction

### 1.1 Le neutrophile humain

Le neutrophile a longtemps été considéré seulement en tant que phagocyte professionnel. On sait maintenant que ces cellules jouent un rôle plus vaste dans l'immunité innée et acquise. Les neutrophiles sont de petites cellules qui proviennent de progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse, où ils atteignent leur stade final de différenciation par la présence d'un cytoplasme rempli de granules et d'un noyau polylobé (Smith, 1994; Zychlinsky *et al.*, 2003). Ces cellules composent 50% à 60% des leucocytes circulants totaux (Smith, 1994). Ils ont une courte demi-vie, qui a longtemps été estimée à 7 h à 12 h en circulation avant leur élimination par le processus d'apoptose spontanée. Récemment, un groupe a plutôt estimé leur durée de vie à environ 3,75 jours avant leur élimination (Pillay *et al.*, 2010). Cependant, ces résultats demeurent controversés puisque d'autres groupes (Li *et al.*, 2011; Tofts *et al.*, 2011) ont réanalysé leurs résultats avec d'autres modèles et ont obtenu une durée de vie de 7,5 heures en circulation, ce qui est la durée de vie établie par plusieurs modèles depuis longtemps (Dancey *et al.*, 1976). Pour contrer cette perte massive de neutrophiles par apoptose, le corps humain en produit environ  $10^{11}$  par jour. De plus, cette production peut être largement augmentée dans le cas d'infections (Smith, 1994).

Dans des conditions normales, les neutrophiles circulent dans les vaisseaux sanguins en roulant sur les cellules endothéliales grâce à des interactions de faible affinité modulées par les sélectines (Del Maschio *et al.*, 1996). Dans le cas d'une infection, les neutrophiles se retrouvent au site inflammatoire, où ils constituent souvent les premières cellules infiltrantes. Leur recrutement commence par une adhésion ferme aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, grâce aux intégrines, principalement les intégrines  $\beta 2$  avec ICAM-1 (Del Maschio *et al.*, 1996). Ensuite, le neutrophile traverse les cellules endothéliales de la paroi du vaisseau sanguin, soit par la route paracellulaire, c'est-à-dire le passage entre deux cellules endothéliales (Del Maschio *et al.*, 1996), soit par la route transcellulaire au travers d'une cellule endothéliale (Feng *et al.*, 1998). Le neutrophile continue ensuite sa route jusqu'au site inflammatoire en suivant un gradient chimiotactique. Arrivé au site inflammatoire, le neutrophile exerce diverses fonctions, soit la phagocytose, la flambée

oxydative, la dégranulation, la production de *neutrophil extracellular traps* (NETs) et la génération de plusieurs médiateurs lipidiques et peptidiques. Ces fonctions seront discutées plus en détail dans les sections suivantes.

### 1.1.1 La phagocytose

La phagocytose a d'abord été décrite comme un processus d'internalisation et de digestion. Elie Metchnikoff, qui fut le premier à observer le phénomène dans les années 1880, a d'ailleurs émis l'hypothèse selon laquelle la phagocytose par les globules blancs est un processus essentiel à la défense de l'organisme (Hampton *et al.*, 1998; Paul, 2003). La phagocytose procède en plusieurs étapes. D'abord, l'organisme étranger est reconnu par les phagocytes. Les cellules peuvent reconnaître des cibles opsonisées ou non. Les cibles non opsonisées sont reconnues grâce à des PAMPs, soit des motifs moléculaires associés à des pathogènes. Ces PAMPs sont reconnus par différents récepteurs, comme entre autres les TLR et les intégrines. L'opsonisation des cibles se fait avec soit des éléments du complément activé (ex. C3a) ou avec des anticorps. Les éléments opsonisés sont ensuite reconnus par des récepteurs, comme les FcR, qui reconnaissent la partie Fc des anticorps ou bien des récepteurs du complément (Paul, 2003). La seconde étape est l'activation de la cellule. Il y a activation de plusieurs voies de signalisation qui sont nécessaires au réarrangement de la membrane et du cytosquelette. Une étape clé de ce processus est la phosphorylation de la protéine Syc par la liaison d'une molécule à son récepteur (Kiefer *et al.*, 1998). L'activation de Syc entraîne l'activation de la PI3K et de la PLC (Botelho *et al.*, 2000). Ces enzymes activent les protéines WASP et Arp2/3, qui favorisent la polymérisation et la ramification de l'actine (Takenawa et Miki, 2001). Ceci permet l'extension des pseudopodes en suivant le corps de la particule phagocytée jusqu'à la fusion des deux extrémités, formant ainsi le phagosome (Silverstein *et al.*, 1977). La dernière étape est la maturation du phagosome accompagnée par la digestion de son contenu. Le phagosome fusionne avec les granules du neutrophile, principalement les granules azurophiles et secondaires (Hirsch et Cohn, 1960). Cette fusion des granules au phagosome est accompagnée par une élévation de la concentration de calcium cytoplasmique (Jaconi *et*

*al.*, 1990). Il y a également assemblage de la NADPH oxydase à la membrane du phagosome pour y produire des espèces réactives oxygénées (ROS) (Lee *et al.*, 2003). Le phagosome contient aussi la myéloperoxydase (MPO) qui provient des granules. Celle-ci produit des dérivés chlorés, comme le HOCl, à partir des ROS (Hampton *et al.*, 1998). Tous ces produits sont bactéricides et contribuent à l'élimination du contenu du phagosome. Finalement, la phagocytose mène à la dégranulation, la flambée oxydative ainsi qu'à la libération de médiateurs lipidiques et de cytokines et chimiokines.

### 1.1.2 La dégranulation

La phagocytose est un processus qui induit la relâche des granules du neutrophile dans le phagolysosome afin d'en digérer le contenu (Cohn et Hirsch, 1960). Dans certains cas, comme la présence d'un trop grand nombre d'organismes étrangers, la dégranulation se fait vers l'extérieur de la cellule, c'est-à-dire dans le milieu environnant, plutôt que dans les phagolysosomes. Les neutrophiles possèdent quatre types de granules, soit les granules azurophiles, les granules spécifiques, aussi appelées secondaires, les granules à gélatinase, aussi appelées tertiaires, ainsi que les vésicules sécrétoires (Tableau 1). Les granules sont formées pendant le développement des neutrophiles. Leur formation commence à la transition entre le stage myéloblaste et promyélocyte (Bainton et Farquhar, 1966; Bainton *et al.*, 1971). Les granules azurophiles sont les premières à être formées, suivies des granules spécifiques, à gélatinase et pour terminer, les vésicules sécrétoires (Bainton *et al.*, 1971). Contrairement à l'ordre de leur formation, les premières granules relâchées sont les vésicules sécrétoires, de façon très rapide suite à l'interaction du neutrophile avec les cellules endothéliales (Borregaard et Cowland, 1997). Ensuite, les granules à gélatinase sont relâchées, suivies des granules spécifiques et finalement des granules azurophiles (Bentwood et Henson, 1980; Borregaard et Cowland, 1997; Sengelov *et al.*, 1995).

Les granules ont été initialement classifiées selon leur contenu en myéloperoxydase (MPO) (Bainton et Farquhar, 1966), avec des granules peroxydase positives, ou granules azurophiles, et peroxydase négatives. Par la suite, les granules peroxydase négatives ont été divisées en granules spécifiques et à gélatinase selon leur contenu en lactoferrine ou en

haute concentration en gélatinase (Kjeldsen *et al.*, 1993; Kjeldsen *et al.*, 1994b). Cette division des granules spécifiques et à gélatinase est arbitraire puisque les granules sont formées de façon continue durant le développement des neutrophiles.

Les **granules azurophiles** contiennent principalement des protéines et peptides directement dirigés contre la destruction et la digestion des microorganismes (Borregaard et Cowland, 1997; Segal, 2005). Ce sont les seules granules à contenir la MPO (Baggiolini *et al.*, 1969) et elles contiennent trois protéases majeures, soit la cathepsine G, l'élastase et la protéinase 3 (Borregaard et Cowland, 1997). La MPO catalyse l'halogénéation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit suite à l'action de la NADPH oxydase pour former du HOCl (Babior, 2004). En plus de ces protéines, les granules azurophiles produisent les défensines (Rice *et al.*, 1987), de petites protéines antimicrobiennes qui perméabilisent les membranes cibles et permettent l'entrée de petites molécules ou enzymes (Ganz, 2003). Aussi, elles sont dotées d'environ le tiers de l'activité en lysozyme (Baggiolini *et al.*, 1969).

Les **granules spécifiques**, ou secondaires sont caractérisées par la présence de lactoferrine (Leffell et Spitznagel, 1972). Elles contiennent environ les deux tiers restants d'activité en lysozyme (Baggiolini *et al.*, 1969). On y retrouve également plusieurs protéines de la famille de la lipocaline (Xu *et al.*, 1994), dont la NGAL (Kjeldsen *et al.*, 1994a). La famille des lipocalines regroupe des protéines partageant une structure tertiaire qui possède un cœur central hydrophobe, permettant ainsi la liaison de petites protéines lipophiles (Kjeldsen *et al.*, 1994a). NGAL a été trouvée associée à la gélatinase, ce qui suggère un rôle régulateur dans l'activité de cette enzyme (Triebel *et al.*, 1992). Les granules secondaires renferment aussi une métalloprotéinase, la collagénase (Murphy *et al.*, 1977). Finalement, leur membrane renferme du cytochrome b558, la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase (Borregaard *et al.*, 1983).

Les **granules à gélatinase**, ou tertiaires, contiennent principalement des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire, les métalloprotéinases (Faurichou et Borregaard, 2003). Parmi celles-ci, il y a la leukolysine (Kang *et al.*, 2001), présente dans la membrane des granules, et la gélatinase (Kjeldsen *et al.*, 1992). L'exocytose de ces granules pendant l'extravasation du neutrophile libère ces enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire et facilitent le déplacement du neutrophile (Delclaux *et al.*, 1996).

Finally, the **secretory vesicles** have a membrane rich in receptors. The attachment of neutrophils to endothelial cells allows the release of secretory vesicles, thus increasing significantly the quantity of receptors expressed on the surface of cells (Borregaard *et al.*, 1994). Among these receptors, there are integrins such as Mac-1 (Sengelov *et al.*, 1993) and CD11b/CD18 (Calafat *et al.*, 1993), the CR1 (complement receptor 1) (Sengelov *et al.*, 1994), the fMLP receptor (FPR), and the co-receptor for LPS, CD14 (Fauschou and Borregaard, 2003). In addition to these receptors, the secretory vesicle contains cytochrome b558 (Calafat *et al.*, 1993). Finally, its matrix is composed of seric proteins, such as albumin (Borregaard *et al.*, 1992).

The neutrophil releases its granules either inside the phagolysosome, contributing thus to the elimination of phagocytosed species, or into the surrounding environment, which amplifies the antimicrobial and inflammatory response (Fauschou and Borregaard, 2003).

**Tableau 1 Nature des protéines contenues dans les granules du neutrophile humain (tiré de Faurschou et Borregaard, 2003)**

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
Presentin 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 $\alpha$ -subunit	SNAP-23, -25	CR1
	Laminin-R	uPA-R	C1q-R
	Leukolysin	VAMP-2	Cytochrome <i>b<sub>558</sub></i>
	SBI 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 $\beta$ -glycerophosphatase	$\beta_2$ -Microglobulin	Acetyltransferase	Plasma proteins
Acid mucopolysaccharide	Collagenase	$\beta_2$ -Microglobulin	
$\alpha_1$ -Antitrypsin	CRISP-3 (SGP-28)	CRISP-3	
$\alpha$ -Mannosidase	Gelatinase	Gelatinase	
Azuricidin	hCAP-18	Lysozyme	
BPI	Histaminase		
$\beta$ -Glycerophosphatase	Heparanase		
$\beta$ -Glucuronidase	Lactoferrin		
Cathepsins	Lysozyme		
Defensins	NGAL		
Elastase	uPA		
Lysozyme	Sialidase		
MPO	Transcobalamin-I		
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase			
Proteinase-3			
Sialidase			
Ubiquitin-protein			

### 1.1.3 La flambée oxydative

Lors de la phagocytose de microorganismes, le neutrophile augmente considérablement sa consommation en oxygène, phénomène appelé « respiratory burst », ou flambée oxydative. L'objectif de ce phénomène est de produire des composés capables de tuer les microorganismes (Babior, 2004). De plus, cette activité coïncide avec la

dégranulation du neutrophile (Segal, 2005). La flambée oxydative est orchestrée par la NADPH oxydase et mène à la production de plusieurs espèces réactives (et souvent toxiques) dérivées de l'oxygène, nommées ROS « reactive oxygen species ». Par l'action de la NADPH oxydase, il y a transfert d'un électron du NADPH vers l'oxygène, ce qui le réduit en anion superoxyde ( $O_2^-$ ) (Badwey *et al.*, 1979). L'anion superoxyde est rapidement transformé en d'autres espèces réactives, comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochlorique (HOCl), via la MPO, le radical hydroxyl ( $OH\cdot$ ), l'oxygène singulet ( $\cdot O_2$ ) ou l'ozone ( $O_3$ ) (Clark, 1999).

La NADPH oxydase est une enzyme composée d'éléments membranaires et cytosoliques. L'élément membranaire est le cytochrome b558, une flavo-hémoprotéine. Il s'agit de la composante catalytique de l'enzyme. Le cytochrome b558 est composé de deux sous-unités, soit un peptide de 22 kDa, p22<sup>PHOX</sup> ainsi qu'une glycoprotéine de 91 kDa, gp91<sup>PHOX</sup> (Parkos *et al.*, 1987). La sous-unité gp91<sup>PHOX</sup> contient le noyau hème ainsi que les sites de liaison au NADPH et au FAD (Roos *et al.*, 2003). p22<sup>PHOX</sup>, quant à lui, sert de site de liaison à la membrane pour les composantes cytosoliques de la NADPH oxydase (Heyworth *et al.*, 1991). Ces deux sous-unités membranaires du cytochrome b558 sont présentes dans les membranes de granules spécifiques et des vésicules sécrétoires (Borregaard *et al.*, 1983). L'enzyme comporte plusieurs éléments cytosoliques, soit les protéines p47<sup>PHOX</sup>, p67<sup>PHOX</sup>, p40<sup>PHOX</sup> ainsi qu'une petite protéine G, Rac2. Les protéines p47<sup>PHOX</sup> et p67<sup>PHOX</sup> sont les éléments cytosoliques essentiels à l'activité enzymatique. p67<sup>PHOX</sup> possède un domaine SH3 (Leto *et al.*, 1990) et son rôle est le transfert initial d'électrons du NADPH au FAD (Cross et Curnutte, 1995). p47<sup>PHOX</sup>, de son côté, possède deux sites SH3 et lie le cytochrome b558, permettant ainsi un ancrage à la membrane des éléments cytosoliques (Heyworth *et al.*, 1991). De plus, elle est nécessaire au transfert d'électrons du FAD réduit au noyau hème du cytochrome b558, et ainsi à l'oxygène (Cross et Curnutte, 1995). La protéine p40<sup>PHOX</sup>, quant à elle, n'est pas essentielle à l'activité de la NADPH oxydase. Elle possède trois domaines SH3 (Wientjes *et al.*, 1993) et se comporterait plutôt comme une sous-unité inhibitrice en se liant à p67<sup>PHOX</sup> (Sathyamoorthy *et al.*, 1997). Un dernier élément cytosolique de la NADPH oxydase est Rac2 (Abo *et al.*, 1991). Il s'agit d'une protéine liant le GTP. Lorsque l'enzyme est inactive, Rac2 est liée à Rho-GDI, ce qui l'empêche de se dissocier du GDP et d'entrer dans sa forme active liant le

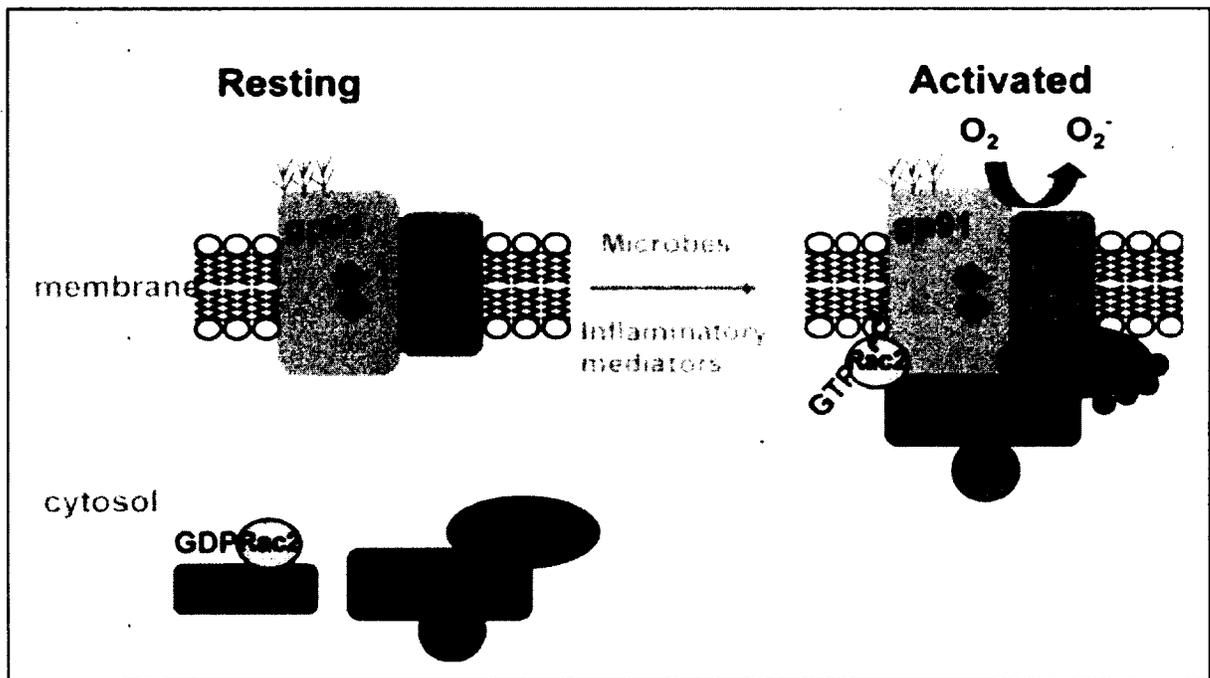
GTP (Abo *et al.*, 1994). Le tableau 2 est un résumé des protéines composant la NADPH oxydase.

**Tableau 2 Principaux éléments de la NADPH oxydase ainsi que leur fonction (Modifié de Clark, 1999)**

Élément	Structure	Interaction et rôle
gp91 <sup>PHOX</sup>	Sous-unité du cytochrome b558. Glycosylée, noyau hème, site de liaison NADPH et FAD.	Lie p47PHOX et le NADPH. Élément catalytique essentiel.
p22 <sup>PHOX</sup>	Sous-unité du cytochrome b558. 2 motifs riches en proline.	Lie p47PHOX. Élément catalytique essentiel.
p47 <sup>PHOX</sup>	Plusieurs sites de phosphorylation en sérine, 2 domaines SH3 et 3 motifs riches en proline.	Lie p67PHOX et p40PHOX. Élément essentiel.
p67 <sup>PHOX</sup>	2 domaines SH3 et un motif riche en proline.	Lie p47PHOX, Rac2 et le NADPH. Élément essentiel.
p40 <sup>PHOX</sup>	Un domaine SH3.	Lie p47PHOX et p67PHOX. Rôle régulateur.
Rac2	Homologue à la famille Rho.	Lié au Rho-GDI. Élément essentiel.

Plusieurs étapes clés sont nécessaires à l'activation de l'enzyme (figure 1). D'abord, une stimulation du neutrophile entraîne l'hyperphosphorylation de p47<sup>PHOX</sup>, assurant ainsi le recrutement des protéines cytosoliques au cytochrome b558 présent à la membrane (Babior, 1999). Parallèlement, il y a activation de Rac2, ce qui la libère de Rho-GDI et lui permet de se lier au GTP et finalement de lier la NADPH oxydase (Bokoch *et al.*, 1994; Kreck *et al.*, 1996). L'enzyme devient ainsi active et peut réduire l'oxygène.

La production d'anion superoxyde se fait principalement à l'intérieur des phagolysosomes, afin de contribuer à l'élimination des espèces phagocytées. Cependant, ce phénomène peut également se produire à l'extérieur de la cellule, projetant les espèces réactives dans le milieu environnant. Cet événement accompagne la dégranulation. Donc, lorsque la dégranulation se fait à l'extérieur de la cellule, les composants de la NADPH oxydase se retrouvant sur la membrane cellulaire, plutôt que sur la membrane du phagolysosome, y sont activés et les ROS sont libérés dans le milieu extracellulaire.



**Figure 1 Activation de la NADPH oxydase.**

Chez les neutrophiles au repos, les composants de la NADPH oxydase sont séparés dans la membrane et le cytosol. Suite à une stimulation, la protéine  $p27^{\text{PHOX}}$  devient phosphorylée et le complexe formé des protéines  $p47^{\text{PHOX}}$ ,  $p40^{\text{PHOX}}$  et  $p67^{\text{PHOX}}$  transloque à la membrane. Simultanément, il y a un échange GDP-GTP chez Rac2 ainsi que translocation à la membrane. Le complexe ainsi activé transfère des électrons à la molécule d'oxygène pour générer l'anion superoxyde (Naussef, 2007).

#### 1.1.4 La production de NETs

Il a longtemps été pensé que les neutrophiles tuaient les microorganismes seulement par phagocytose. Cependant, on sait maintenant que les neutrophiles utilisent également la dégranulation et la libération d'espèces réactives oxygénées dans l'environnement pour dégrader les microorganismes. De plus, il a récemment été démontré que les neutrophiles, suite à une stimulation, pouvaient libérer leur chromatine, accompagnée de protéines de granules, et que cet ensemble formait une sorte de filet extracellulaire ayant la capacité de tuer les bactéries et de restreindre leur propagation (Brinkmann *et al.*, 2004). Ces filets ont été appelés « neutrophil extracellular traps », ou NETs. Les NETs sont constitués d'un filet d'ADN fibreux dans lequel on retrouve des domaines de protéines formant des agrégats (Brinkmann *et al.*, 2004). Le constituant majeur de ces NETs est l'ADN et il est accompagné de plusieurs protéines provenant des granules azurophiles, comme l'élastase, la cathepsine G et la MPO, provenant des granules spécifiques et à gélatinase, comme la lactoferrine et la gélatinase. Les NETs contiennent également des histones provenant de l'ADN déroulé, soit les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4 (Brinkmann *et al.*, 2004).

Il a été montré que ces structures étaient induites chez le neutrophile par une multitude de stimuli, comme l'IL-8, le PMA, le LPS ainsi que plusieurs bactéries et organismes, dont *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp* et *E.coli* (Brinkmann *et al.*, 2004; Remijsen *et al.*, 2011). De plus, leur présence a été démontrée *in vivo* dans plusieurs pathologies, comme l'appendicite chez l'homme (Brinkmann *et al.*, 2004) et dans un modèle murin de pneumonie (Beiter *et al.*, 2006). Plusieurs résultats tendent à démontrer l'implication des espèces réactives oxygénées dans le processus de formation et de libération des NETs. D'abord, les patients atteints de CGD (*chronic granulomatous disease*), qui ne possèdent pas de NADPH oxydase fonctionnelle, ne peuvent produire de NETs. Aussi, une activité catalase bloque la formation des NETs et finalement, un inhibiteur pharmacologique de l'oxydase, qui empêche la flambée oxydative, bloque également la formation des NETs (Brinkmann et Zychlinsky, 2007).

Les NETs peuvent tuer plusieurs organismes, comme les bactéries Gram positives et négatives ainsi que les levures, comme *Candida albicans* (Brinkmann *et al.*, 2004; Urban *et al.*, 2006). En plus de leur capacité à directement détruire les bactéries, les NETs, par la présence d'élastase, peuvent dégrader les facteurs de virulence des ces organismes (Weinrauch *et al.*, 2002). En plus, les NETs ont la capacité de restreindre l'étendue d'une

infection à un site donné (Wartha *et al.*, 2007b). Aussi, ils restreignent la propagation des enzymes lytiques libérés par le neutrophile lors de la dégranulation, ce qui limite les dommages causés aux tissus de l'hôte.

Finalement, les microorganismes ont mis en œuvre des mécanismes d'évasion afin de résister aux NETs. Parmi ceux-ci, certaines bactéries Gram positives expriment une DNase à leur surface, ce qui leur permet de détruire la structure principale d'ADN, augmentant ainsi leur virulence et leur propagation (Beiter *et al.*, 2006; Buchanan *et al.*, 2006; Sumby *et al.*, 2005). D'autres bactéries, quant à elles, modifient leur surface afin de réduire l'affinité de la cellule avec les NETs. Une première modification est de s'entourer d'une capsule. Cette capsule augmente la résistance à la dégradation par les NETs, mais aussi à la phagocytose. Une autre modification est de changer la charge de la paroi cellulaire en introduisant de l'alanine, ce qui diminue la charge négative de la membrane et diminue l'affinité pour les NETs (Wartha *et al.*, 2007a).

### 1.1.5 La production de médiateurs lipidiques

Le neutrophile produit plusieurs médiateurs lipidiques, dont les principaux sont le leucotriène B4 (LTB4) (Borgeat et Samuelsson, 1979), la prostaglandine E2 (PGE2) (Tolone *et al.*, 1977; Zurier, 1976), le thromboxane A2 (TXA2) (Goldstein *et al.*, 1978) et du platelet-activating factor (PAF) (Betz et Henson, 1980; Sanchez-Crespo *et al.*, 1980).

Le LTB4 est un puissant agent chimiotactique pour le neutrophile (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980), mais aussi pour plusieurs autres cellules, comme les monocytes humains et les macrophages de rat (Smith *et al.*, 1980). Chez le neutrophile, il est également connu pour sa capacité à retarder l'apoptose spontanée et causer une dégranulation partielle (Goetzl et Pickett, 1980; Hebert *et al.*, 1996). De plus, il augmente la perméabilité vasculaire (Bray *et al.*, 1981; Ford-Hutchinson, 1981) et est présent dans plusieurs pathologies, comme l'asthme et les réactions allergiques (Yokomizo *et al.*, 2001).

La prostaglandine E2 (PGE2) stimule quatre récepteurs qui modulent différemment la réponse au stimulus. Le PGE2 est impliqué dans la formation de l'œdème pulmonaire par

une augmentation de la perméabilité vasculaire (Goggel *et al.*, 2002; Gulati *et al.*, 1983) ou une diminution de la perméabilité (Gillespie *et al.*, 1987; Leff *et al.*, 1994). La réponse du PGE2 cause une augmentation ou une diminution de l'AMPc selon le récepteur par lequel la réponse est induite, ce qui diminue ou augmente la perméabilité vasculaire (Uhlig *et al.*, 2005). De la même façon, le PGE2 joue un rôle dans l'induction ou la diminution de la fièvre (Lazarus, 2006). Le thromboxane A2, de son côté, est un agent d'agrégation plaquettaire (Hamberg *et al.*, 1975). Il joue un rôle dans la contraction des muscles lisses soit au niveau des vaisseaux sanguins (Yamamoto *et al.*, 1995), des bronches (Devillier et Bessard, 1997) ou des intestins (Schultheiss et Diener, 1999). De plus, il agit sur les cellules endothéliales afin d'augmenter l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 (Ishizuka *et al.*, 1998). De plus, le TXA2 est impliqué dans la production de métastases par les cellules cancéreuses (Nie *et al.*, 2000).

Finalement, le PAF cause l'activation de plusieurs cellules du système immunitaire, comme les monocytes, les macrophages, les éosinophiles, les neutrophiles, mais également les plaquettes (Uhlig *et al.*, 2005). C'est un agent impliqué dans la réaction d'anaphylaxie (Vadas *et al.*, 2008). Il agit rapidement sur les cellules afin d'augmenter la perméabilité vasculaire (Adamson *et al.*, 2003; Predescu *et al.*, 1996). Le PAF cause, à faibles doses, une vasodilatation, tandis qu'à plus fortes doses, il provoque une vasoconstriction et une bronchoconstriction (Falk *et al.*, 1999; Uhlig *et al.*, 1994). De plus, le PAF cause la relâche de TXA2 et de leucotriènes (Taylor *et al.*, 1991).

### **1.1.6 La production de cytokines et chimiokines**

En plus des médiateurs lipidiques, le neutrophile s'est avéré être une source de nombreuses cytokines et chimiokines. Les cytokines sont de petites protéines et glycoprotéines qui ont des effets sur plusieurs types cellulaires. Ces molécules peuvent agir soit de façon autocrine ou paracrine et jouent des rôles importants dans plusieurs processus cellulaires, comme l'hématopoïèse, la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire (Paul, 2003; Townsend et McKenzie, 2000). La caractéristique principale des cytokines, contrairement aux facteurs de croissance, est leur action locale sur les cellules et tissus

(Paul, 2003; Townsend et McKenzie, 2000). De leur côté, les chimiokines sont un groupe de cytokines ayant la capacité à recruter des sous-populations leucocytaires distinctes (Scapini *et al.*, 2000). Ce sont des protéines avec des structures et des séquences similaires, avec en commun la présence de quatre résidus cystéines conservées en N-terminal (Rollins, 1997). Les chimiokines sont réparties en différentes familles selon leur séquence en acides aminés et la position des premiers résidus cystéines. Les deux familles principales sont les chimiokines CXC, dont les deux premières cystéines sont séparées par un acide aminé, et les chimiokines CC, dont les deux premières cystéines sont adjacentes (Baggiolini *et al.*, 1997; Oppenheim *et al.*, 1991; Rollins, 1997).

Le neutrophile humain exprime et sécrète une panoplie de ces cytokines et chimiokines qui ont des effets divers sur le système immunitaire, en permettant un recrutement différentiel des sous-populations leucocytaires à un site inflammatoire et en modulant leurs réponses fonctionnelles. Un aperçu des cytokines et chimiokines exprimées et sécrétées par le neutrophile humain est présent dans le tableau 3.

L'IL-8 est la chimiokine la plus sécrétée par le neutrophile humain, mais est sécrétée également par plusieurs cellules, comme les lymphocytes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses (Oppenheim *et al.*, 1991). L'IL-8 a comme cible principale les neutrophiles, mais participe également au recrutement des cellules T (Oppenheim *et al.*, 1991). En plus de provoquer le chimiotactisme des neutrophiles et l'adhérence aux cellules épithéliales, l'IL-8 peut aussi provoquer une dégranulation partielle et la flambée oxydative (Oppenheim *et al.*, 1991). Cette chimiokine est produite par le neutrophile lors de la phagocytose (Bazzoni *et al.*, 1991), ou en réponse à une grande variété de stimuli, comme le LPS (Bazzoni *et al.*, 1991; Fujishima *et al.*, 1993), les chimioattractants fMLP, C5a et PAF (Cassatella *et al.*, 1992), le LTB4 (McCain *et al.*, 1994), le TNF $\alpha$  (Fujishima *et al.*, 1993; Hachicha *et al.*, 1995; Strieter *et al.*, 1992), l'IL-15 (McDonald *et al.*, 1998c), l'IL-18 (Fortin *et al.*, 2009) et finalement le facteur de croissance GM-CSF (Hachicha *et al.*, 1995; McCain *et al.*, 1993).

Les chimiokines GRO $\alpha$  et GRO $\beta$ , ou « Growth-related gene product », sont produites par le neutrophile principalement en réponse au LPS et au TNF $\alpha$  (Gasperini *et al.*, 1995). Ces chimiokines sont surtout des chimioattractants pour les neutrophiles, mais

provoquent aussi une dégranulation partielle et augmentent l'adhésion de ces cellules (Oppenheim *et al.*, 1991; Rollins, 1997).

Du côté des chimiokines de la famille CC, le neutrophile produit essentiellement les MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ , mais elles sont produites également par d'autres cellules, comme les cellules T, les cellules B, les monocytes, et les cellules dendritiques (Cassatella, 1999). Chez les neutrophiles, elles sont sécrétées en réponse au LPS (Kasama *et al.*, 1993) et au TNF $\alpha$  (Hachicha *et al.*, 1995). Ces chimiokines participent au recrutement des monocytes, des cellules T, en particulier les cellules CD8 activées (Taub *et al.*, 1993), et des éosinophiles (Cassatella, 1999). De plus, elles agissent sur les neutrophiles et les macrophages et provoquent la production de peroxyde d'hydrogène (Oppenheim *et al.*, 1991) ainsi que la relâche de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-6 (Cassatella, 1999).

Parmi les principales cytokines pro-inflammatoires produites par le neutrophile, il y a le TNF $\alpha$ . Il est produit principalement par les monocytes et macrophages, mais en réponse au LPS et à certains microorganismes comme *C.albicans* et *E.coli*, il est sécrété par les neutrophiles (Cassatella, 1999; Djeu *et al.*, 1990; Dubravec *et al.*, 1990; Tracey et Cerami, 1994). Le TNF $\alpha$  est impliqué dans plusieurs processus cellulaires comme la vasodilatation, la thrombose ainsi que le recrutement leucocytaire (Tracey et Cerami, 1994). Il agit sur différentes cellules, entre autres les monocytes, les macrophages, les lymphocytes, les éosinophiles et les neutrophiles (Tracey et Cerami, 1994). Il a plusieurs effets sur le neutrophile, comme augmenter l'adhérence à l'endothélium vasculaire, augmenter la phagocytose, provoquer la sécrétion de cytokines et chimiokines et moduler la réponse à un deuxième stimulus (Edwards et Hallett, 1997).

Une deuxième cytokine pro-inflammatoire produite par le neutrophile est l'interleukine-1 (IL-1). Elle est aussi produite par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes, les cellules NK, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les kératinocytes (Dinarello, 1997). Chez le neutrophile, des stimuli comme le GM-CSF (Lindemann *et al.*, 1988), le LPS (Goh *et al.*, 1989; Takeichi *et al.*, 1994) et le TNF $\alpha$  (Meda *et al.*, 1994) causent sa relâche. L'IL-1 a plusieurs effets sur le système hématopoïétique, dont entre autres, l'induction de la production de cytokines par les

monocytes et en étant un agent de costimulation de la prolifération des cellules T (Dinarello, 1997).

En contrepartie à cette production de cytokines pro-inflammatoire, le neutrophile produit des cytokines anti-inflammatoires, comme le TGF- $\beta$  (Cassatella, 1999). Il produit aussi d'autres médiateurs anti-inflammatoires, tel que l'IL-1RA. Il s'agit d'un antagoniste au récepteur de la cytokine IL-1, qui est également généré par les monocytes, les macrophages et les fibroblastes (Arend *et al.*, 1998). Ainsi, l'IL-1RA inhibe les effets pro-inflammatoires de l'IL-1 en se liant au récepteur, mais sans induire de transduction de signal ou provoquer d'activité biologique (Dripps *et al.*, 1991). Chez les neutrophiles, l'IL-1RA est produite en réponse au TNF $\alpha$ , au GM-CSF, au LPS et au fMLP (McColl *et al.*, 1992; McDonald *et al.*, 1998b; Ulich *et al.*, 1992).

**Tableau 3 Cytokines et chimiokines exprimées et sécrétées par le neutrophile humain (mise à jour de Cassatella, 1999 et Scapini *et al.*, 2000)**

Cytokines pro-inflammatoires	Cytokines anti-inflammatoires	Chimiokines CXC	Chimiokines CC	Superfamille du TNF
IL-1 $\alpha/\beta$	IL-1RA	GRO $\alpha/\beta/\gamma$ (CXCL1-2-3)	MCP-1 (CCL2)	TNF $\alpha$
IL-12	TGF- $\beta$	IL-8 (CXCL8)	MIP-1 $\alpha$ (CCL3)	Fas Ligand
IFN- $\alpha/\gamma$		MIG (CXCL9)	MIP-1 $\beta$ (CCL4)	CD30 Ligand
IL-6		IP-10 (CXCL10)	MIP-3 $\alpha$ (CCL20)	LIGHT
IL-17		I-TAC (CXCL11)	MIP-3 $\beta$ (CCL19)	TRAIL
IL-18		ENA-78 (CXCL5)		BLys
MIF		GCP-2 (CXCL6)		

### 1.1.7 L'apoptose et la résolution de l'inflammation

Toutes les fonctions précédemment décrites démontrent l'implication du neutrophile dans la protection de l'organisme contre les pathogènes. Cependant, dans son action, le neutrophile libère plusieurs médiateurs pro-inflammatoires qui, avec le recrutement des cellules du système immunitaire et la présence des granules et des espèces réactives oxygénées, créent un environnement inflammatoire. Afin d'éviter de causer de l'inflammation chronique, cette dernière doit être réduite, et le neutrophile participe aussi à ce processus, appelé résolution de l'inflammation.

D'abord, les neutrophiles sont des cellules avec une courte durée de vie. Ces cellules deviennent apoptotiques spontanément ou grâce à des signaux extérieurs. Plusieurs signaux peuvent retarder l'apoptose du neutrophile et ainsi prolonger sa capacité à détruire les pathogènes. Quelques exemples sont le LPS, le GM-CSF, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IFN $\gamma$ , l'IL-15 et le G-CSF (Girard *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1993; Pericle *et al.*, 1994). Après un moment passé dans un site infectieux, les neutrophiles ayant exercé leurs fonctions deviennent apoptotiques, ce qui amorce ainsi la résolution de l'inflammation. Les neutrophiles apoptotiques ont plusieurs effets qui aident à ce processus. En premier lieu, les neutrophiles apoptotiques n'ont plus la capacité d'exécuter leurs fonctions classiques, soit le chimiotactisme, la dégranulation, l'adhérence, la flambée oxydative et la phagocytose ainsi que la production de cytokines et de chimiokines (Haslett *et al.*, 1994). Cet arrêt des fonctions classiques diminue la relâche de médiateurs dans l'environnement et diminue les dommages qui peuvent ainsi être causés. De plus, les neutrophiles apoptotiques lient de façon importante le LPS, ce qui diminue la quantité de LPS libre dans le milieu qui serait disponible pour continuer l'activation des cellules (Fox *et al.*, 2010). De plus, il y a une diminution de l'expression de certains récepteurs à la surface des cellules, comme le CD16, CD31, CD50 et CD66 (Dransfield *et al.*, 1994), ce qui réduit la réactivité des cellules. Finalement, les cellules apoptotiques expriment à leur surface des molécules qui ne s'y retrouvent pas normalement, la phosphatidylsérine, qui les rend reconnaissables pour leur élimination par les macrophages (efférocytose) (Fadok *et al.*, 1992). La phagocytose de neutrophiles apoptotiques par les macrophages change le patron d'expression de cytokines

de ces cellules, le faisant passer d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype anti-inflammatoire avec l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , diminuant ainsi l'inflammation et favorisant la réparation tissulaire (Fadok *et al.*, 1998).

Une deuxième implication du neutrophile dans la résolution est par la production de lipoxine et de résolvine. Dans le contexte de résolution de l'inflammation, il y a un changement du profil d'expression de leucotriènes et de prostaglandines au site inflammatoire afin de réduire ces derniers et de produire de la lipoxine A4 (LXA4) (Levy *et al.*, 2001). Le LXA4 est une molécule anti-inflammatoire avec des effets variés sur plusieurs types cellulaires. Chez le neutrophile, le LXA4 cause une diminution du recrutement des cellules, en bloquant l'adhésion aux cellules endothéliales et la transmigration (Serhan *et al.*, 1995). De plus, il réduit l'expression des intégrines CD11/CD18 (Fiore et Serhan, 1995). Les résolvines sont également des molécules importantes dans la résolution de l'inflammation avec d'autres effets sur plusieurs types cellulaires. Chez le neutrophile, la résolvine E1 empêche la transmigration des cellules endothéliales, diminuant ainsi leur recrutement au site inflammatoire (Serhan *et al.*, 2000).

Finalement, deux cytokines jouent des rôles importants dans la résolution de l'inflammation, l'IL-10 et l'IL-1RA. L'IL-10 est, entre autres, produite par les macrophages lors de leur ingestion de neutrophiles apoptotiques et par les monocytes en présence de neutrophiles apoptotiques (Byrne et Reen, 2002). Elle agit sur les neutrophiles en réduisant l'activation de gènes pro-inflammatoires induits par le LPS et en augmentant l'expression de gènes anti-inflammatoires en réponse à ce stimulus (Mosmann, 1994; Rossato *et al.*, 2007). De plus, l'IL-10 stimule la production d'IL-1RA en réponse au LPS chez le neutrophile (Cassatella *et al.*, 1994).

## **1.2 : La régulation de l'induction génique des cytokines et chimiokines**

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

Chez le neutrophile, plusieurs éléments contrôlent la production de cytokines et de chimiokines dans un contexte inflammatoire. Ces différents éléments ont fait l'objet de

recherches de la part de notre laboratoire. Un des éléments qui a été identifié dans le contrôle de la production de cytokines pro-inflammatoires concerne les facteurs de transcription C/EBP.

Les facteurs de transcription C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) sont une famille de six membres, soit  $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ,  $-\delta$ ,  $-\varepsilon$  et  $-\zeta$  (Ramji et Foka, 2002). Nous avons montré que le neutrophile humain exprime toutes les protéines C/EBP, sauf l'isoforme C/EBP- $\gamma$  (Cloutier *et al.*, 2009). De plus, chez ces cellules, un complexe composé de C/EBP- $\beta$  et  $-\varepsilon$  est constitutivement lié à l'ADN (Cloutier *et al.*, 2009). Les facteurs C/EBP ont été impliqués dans la régulation de plusieurs gènes, dont ceux du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$ , du MIP-1 $\beta$ , de l'IL-12 et de l'IL-8 (Grove et Plumb, 1993; Plevy *et al.*, 1997; Pope *et al.*, 1994; Shirakawa *et al.*, 1993).

Chez le neutrophile humain, nous avons établi que la protéine C/EBP- $\beta$  était phosphorylée suite à une stimulation au LPS et au TNF- $\alpha$  et que cette protéine phosphorylée était présente uniquement dans les complexes de liaison à l'ADN dans des cellules stimulées, ce qui correspond à une augmentation du potentiel d'activation du promoteur (Cloutier *et al.*, 2009). De plus, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que les protéines C/EBP- $\beta$  et  $-\varepsilon$  sont constitutivement liées au promoteur de l'IL-8, mais que l'association de C/EBP- $\beta$  phosphorylée au promoteur de l'IL-8 augmente de quatre à cinq fois suite à une stimulation au LPS (Cloutier *et al.*, 2009). Finalement, des expériences menées avec des variants des protéines C/EBP dans la lignée cellulaire PLB 985 différenciée en pseudo-neutrophile ont montré l'importance du résidu phosphorylé de C/EBP- $\beta$ , confirmant ainsi son implication dans la régulation de la production de cytokines (Cloutier *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B

La famille des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B est composée de cinq membres, p50/NF $\kappa$ B1, p52/NF $\kappa$ B2, p65/RelA, cRel et RelB qui, à l'exception de p52 et RelB, sont exprimés chez le neutrophile humain (McDonald *et al.*, 1997). De plus, Ear *et al.* ont

montré l'implication de ces facteurs dans l'induction génique des cytokines proinflammatoires dans ces cellules (Cloutier *et al.*, 2007; Ear et McDonald, 2008).

Dans la cellule, les protéines de NF- $\kappa$ B sont normalement retenues dans le cytoplasme par une association avec une protéine inhibitrice, I $\kappa$ B. L'activation de la cellule cause la phosphorylation et l'ubiquitination de I $\kappa$ B- $\alpha$ , causant sa dégradation par le protéasome. Cela se fait via l'activation du complexe IKK, I $\kappa$ B kinases, qui contient deux sous-unités kinases, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  ainsi qu'une sous-unité régulatrice, ou NEMO (Mercurio *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997).

Chez le neutrophile, Ear *et al.* ont montré que le complexe IKK est exprimé et activé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule (Ear *et al.*, 2005). Suite à l'activation de la cellule, IKK $\beta$  et IKK $\gamma$  sont phosphorylés à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, et il s'en suit la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  ainsi que la phosphorylation de RelA dans les deux compartiments (Ear *et al.*, 2005). De plus, Ils ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques à la voie NF- $\kappa$ B provoquait une diminution de la liaison à l'ADN de ces facteurs et diminuait la production de cytokines par le neutrophile, ce qui suggère un rôle important des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B dans la régulation de la production de cytokines par le neutrophile humain (Cloutier *et al.*, 2007).

### 1.2.3 Les voies de signalisation MAPK

Parallèlement à l'étude des facteurs de transcription et de leur impact sur la production de cytokines par le neutrophile humain, notre laboratoire s'est penché sur le rôle des voies de signalisation dans ce processus, dont les voies MAPK, qui sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires, comme la différenciation, l'apoptose ou la synthèse de protéines. Trois voies de signalisation MAPK principales sont présentes chez le neutrophile, la voie ERK (*mitogen-regulated extracellular signal-regulated kinase*), la voie p38 et la voie SAPK/JNK. Ces MAPK sont activées par des MAPK kinases, MEK ou MKK, tandis que ces dernières sont activées par des MAPK kinase kinases, MAP3K.

Notre laboratoire a étudié l'implication des voies de signalisation MAPK dans l'induction génique des cytokines pro-inflammatoires. Dans ce contexte, il a été montré que l'activation de JNK n'avait pas d'impact sur la production de cytokines, puisque la protéine c-Jun, un substrat de JNK membre de la famille des facteurs de transcription AP-1, n'est pas exprimée et que les inhibiteurs de JNK n'affectaient pas la synthèse de cytokines (Cloutier *et al.*, 2003). Au contraire de JNK, les voies p38 MAPK et MEK/ERK jouent un rôle important dans l'induction des cytokines pro-inflammatoires chez le neutrophile. En effet, des inhibiteurs de ces voies diminuent considérablement la production de cytokines, sans toutefois affecter l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (Cloutier *et al.*, 2007). Cependant, l'inhibition de la voie p38 MAPK interfère la liaison à l'ADN de TFIID, ce qui suggère un mécanisme d'action par lequel les voies MAPK contrôlent la production de cytokines (Cloutier *et al.*, 2007).

Finalement, plus récemment, notre laboratoire s'est penché sur la voie de signalisation PI3-K/AKT. Nous avons montré que l'inhibition de la PI3-K n'avait pas d'impact sur l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et C/EBP, mais que l'inhibition de cette voie diminuait la production de cytokines et de chimiokines par le neutrophile (Fortin *et al.*, 2011). En conclusion, plusieurs éléments sont importants dans la production de cytokines par le neutrophile humain, les facteurs de transcription, avec la participation de NF- $\kappa$ B et de C/EBP, et aussi les voies de signalisation, dont les voies MAPK p38 et MEK/ERK ainsi que la voie PI3-K/AKT.

### **1.3 TAK1**

Récemment, dans le laboratoire, nous avons également démontré l'importance de TAK1, une MAP3K, dans ce processus (Ear *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2011).

#### **1.3.1 TAK1 en tant que MAP3K**

Le premier groupe qui a travaillé avec TAK1 a découvert qu'elle était activée en réponse au TGF- $\beta$  et au BMP, qu'elle régulait l'activité de la p38 MAPK et qu'elle participait à la régulation de la transcription par le TGF- $\beta$  (Yamaguchi *et al.*, 1995). Ensuite, il a été démontré que TAK1 se situait en amont des voies p38 MAPK et JNK MAPK (Moriguchi *et al.*, 1996; Shirakabe *et al.*, 1997). Par la suite, plusieurs études ont démontré son rôle dans l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, via l'activation de IKK $\beta$  (Sakurai *et al.*, 1999; Takaesu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001). Finalement, d'autres études l'ont située en amont de la voie de signalisation PI3-K/AKT (Fortin *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2000). Tout cela lui confère un rôle crucial dans plusieurs processus cellulaires, comme la survie cellulaire, la différenciation et la réponse inflammatoire (Delaney et Mlodzik, 2006).

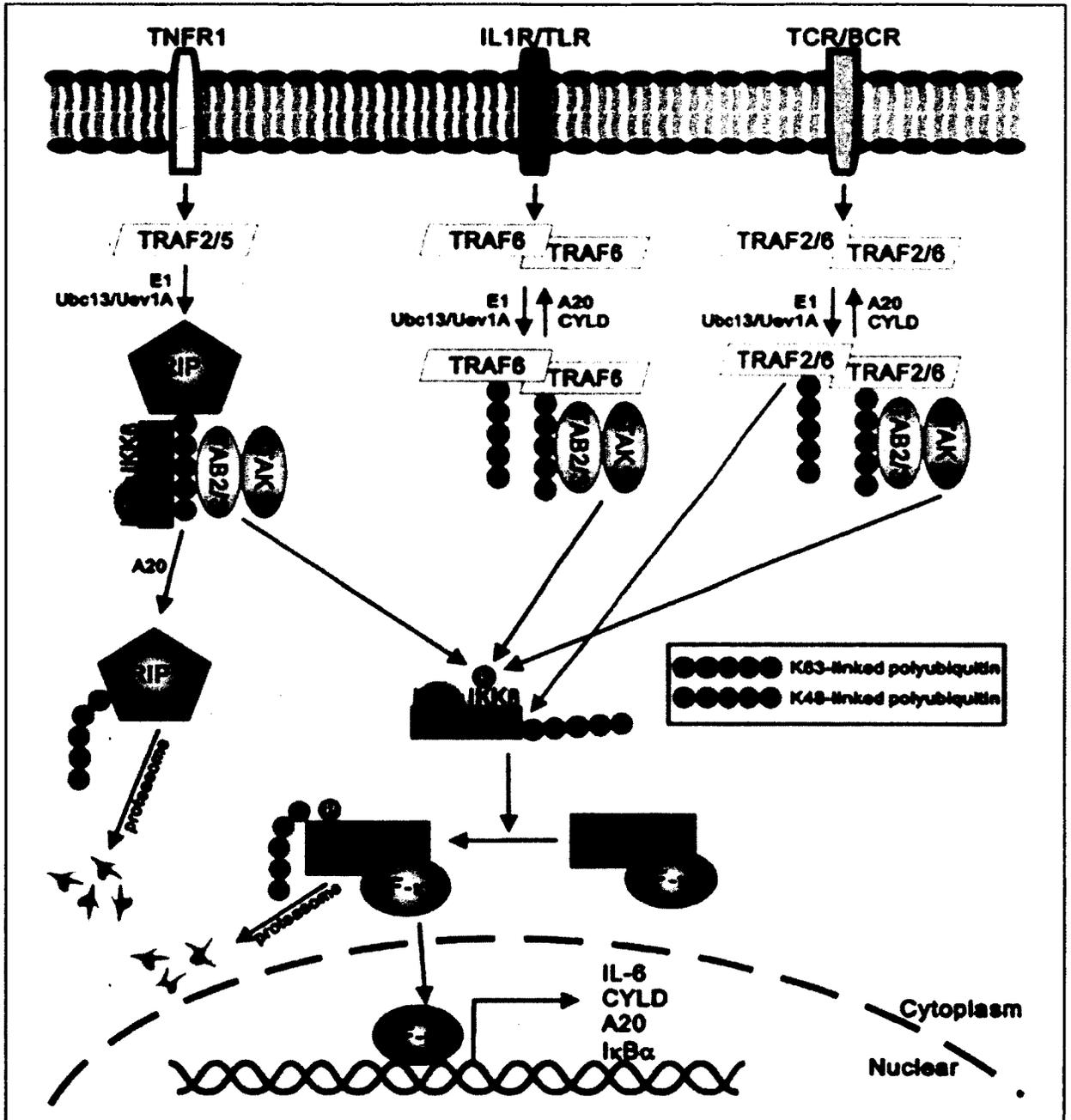
### 1.3.2 L'activation de TAK1

TAK1 est activée par une panoplie de ligands, dont plusieurs cytokines, comme le TGF- $\beta$ , la famille de l'IL-1 (IL-1 $\beta$  et IL-18), et la famille du TNF (TNF $\alpha$  et RANKL), mais aussi suite à la ligation du TCR, BCR et des TLR (Lee *et al.*, 2000; Mizukami *et al.*, 2002; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 2003; Schuman *et al.*, 2009; Wald *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 1995).

Dans la cellule, TAK1 est présente dans un complexe protéique avec ses sous-unités régulatrices, soit TAB1, TAB2 et TAB3 (Wang *et al.*, 2001). L'activité kinase de TAK1 dépend de la présence des ces protéines adaptatrices (Shibuya *et al.*, 1996; Takaesu *et al.*, 2000). TAB2 et TAB3 sont des protéines régulatrices qui servent de pont entre TRAF6 et TAK1 via l'ubiquitination de TRAF6 en Lys63 (Takaesu *et al.*, 2000), tandis que TAB1 est nécessaire à la transautophosphorylation de TAK1 et à son activité kinase (Kishimoto *et al.*, 2000; Sakurai *et al.*, 2000). TAK1 est activée à la fois par ubiquitination en lys63 et par autophosphorylation (Fan *et al.*, 2010; Sakurai *et al.*, 2000). L'autophosphorylation de TAK1 se fait en présence de TAB1 sur le résidu Ser-192 (Kishimoto *et al.*, 2000). De son côté, l'ubiquitination de TAK1 est nécessaire à l'activation de la voie IKK par TAK1 et

procède par un mécanisme décrit plus loin (Fan *et al.*, 2010). Une E2 ubiquitine ligase et une E3 ubiquitine ligase ont été identifiées dans l'ubiquitination de TAK1. La E2 ubiquitine ligase est un hétérodimère formé de Ubc13 et de Uev1A et cette enzyme catalyse la formation de chaînes liées en lysine 63 (Deng *et al.*, 2000). La E3 ubiquitine ligase impliquée dans ce processus serait TRAF2 ou TRAF6 (Deng *et al.*, 2000). Ces protéines possèdent un domaine RING qui est responsable de la formation de la chaîne d'ubiquitine en lysine 63 et est nécessaire à l'activation de NF- $\kappa$ B et de JNK (Baud *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 1996). Il a été montré que TRAF6 est essentiel à l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse à plusieurs stimuli, dont IL-1 $\beta$ , IL-18, CD40, RANKL ainsi que la plupart des TLR (Wu et Arron, 2003). De son côté, TRAF2 est nécessaire à l'activation des récepteurs de la famille du TNF (Lee *et al.*, 1997).

La figure 2 présente le processus d'activation de TAK1 et des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B. D'abord, l'activation du récepteur mène à la dimérisation des protéines TRAF. Dans le cas de l'IL-1 $\beta$ , l'activation du récepteur mène à la phosphorylation de la protéine IRAK, qui ensuite recrute et permet la dimérisation de TRAF6 (Jiang *et al.*, 2002). Les protéines TRAF ainsi dimérisées sont ubiquitinées en lysine 63, ce qui permet le recrutement du complexe de TAK1, via TAB2. TAK1 est ensuite activée par autophosphorylation et ubiquitination (Fan *et al.*, 2010). Par la suite, TAK1 active par phosphorylation IKK $\beta$ , provoquant l'activation du complexe de kinase, qui phosphoryle I $\kappa$ B, le ciblant pour ubiquitination en lysine 48, ce qui l'entraîne dans la dégradation par le protéasome. Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B peuvent ainsi transloquer au noyau et activer leurs gènes cibles (Adhikari *et al.*, 2007).



**Figure 2** Activation de TAK1 et de la cascade NF- $\kappa$ B suite à l'activation du TNFR1, de l'IL1R et du TCR.

L'activation du récepteur mène à la dimérisation des protéines TRAF. Ces dernières sont ensuite ubiquitinées en lysine 63, permettant le recrutement de TAK1, via TAB2. TAK1 active ensuite IKK $\beta$ , ce qui active le complexe IKK- $\alpha/\beta/\gamma$  qui va phosphoryler I $\kappa$ B, le ciblant ainsi pour ubiquitination en lysine 48. I $\kappa$ B sera conséquemment dégradé par le protéasome. Sa dégradation permet la translocation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B au noyau (Adhikari *et al.*, 2007).

### 1.3.3 TAK1 chez le neutrophile

Des études récentes dans notre laboratoire ont démontré l'importance de TAK1 dans les réponses du neutrophile face à des stimuli comme le LPS et le TNF $\alpha$ . Il a été montré que TAK1 était nécessaire à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, puisque l'inhibition de TAK1 empêche la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN ainsi que la phosphorylation de IKK $\beta$  et la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  (Ear *et al.*, 2010). De plus, il a été démontré que TAK1 joue un rôle essentiel dans les réponses fonctionnelles du neutrophile, comme l'expression et la sécrétion de cytokines et chimiokines ainsi que le retard de l'apoptose, en réponse au LPS et au TNF $\alpha$  (Ear *et al.*, 2010). L'implication de TAK1 dans ces réponses avait été observée dans d'autres types cellulaires en réponse à d'autres stimuli. Finalement, les études de notre laboratoire ont également démontré que TAK1 se situe en amont des voies de signalisation p38 MAPK et PI3-K/AKT et il s'agit d'une des premières études à montrer que TAK1 se situe également en amont de la voie MEK/ERK (Ear *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2011).

Les voies de signalisation activées par le LPS et le TNF $\alpha$  présentent plusieurs similitudes avec celles activées par des chimioattractants (ex. le fMLP) ou des facteurs de croissance (ex. le GM-CSF), notamment les voies p38 MAPK, MEK/ERK et PI3-K/AKT. Le fait que ces voies soient contrôlées par TAK1 avec les premiers stimuli nous a incité à étudier si ces derniers stimuli utilisent également TAK1 dans leur signalisation, malgré qu'ils soient de piètres activateurs des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, une cible classique de TAK1.

## 1.4 Le fMLP

### 1.4.1 Les peptides N-formylés

Le fMLP (N-formyl-méthionine-leucine-phénylalanine) est un tripeptide N-formylé dérivé des bactéries Gram négatifs, comme *E.coli* (Marasco *et al.*, 1984) ou de protéines

provenant des mitochondries (Carp, 1982). En plus de son rôle principal comme chimioattractant pour les leucocytes (Becker *et al.*, 1987), le fMLP a récemment été impliqué dans plusieurs processus cellulaires ou inflammatoires dans d'autres types cellulaires. Par exemple, le fMLP agit sur les hépatocytes et promeut la synthèse des protéines de la phase aiguë, comme la protéine C3 et la diminution de la synthèse d'albumine (McCoy *et al.*, 1995). De plus, le fMLP, via l'induction de la synthèse de TXA2 et de PGI2, agit sur les cellules musculaires lisses des artères coronaires et module la contraction des artères (Keitoku *et al.*, 1997). De plus, il a été récemment démontré que le récepteur du fMLP est exprimé sur les cellules souches du mésenchyme et qu'il agit sur celles-ci en favorisant leur adhésion et leur migration en réponse au fMLP (Viswanathan *et al.*, 2007). Finalement, il a été montré que le fMLP agit sur les cellules souches du mésenchyme en stimulant leur différenciation ostéoblastique ainsi que l'ostéogenèse, via les voies de signalisation PLC-CaMKII (Shin *et al.*, 2011).

#### **1.4.2 Le fMLP et le neutrophile**

Le fMLP a beaucoup été étudié pour ses effets sur les leucocytes. Chez le neutrophile, le fMLP entraîne plusieurs réponses. D'abord, il s'agit d'un puissant chimioattractant. La présence de fMLP provoque chez le neutrophile une polarisation cellulaire, c'est-à-dire qu'il y a une modification du cytosquelette d'actine par la synthèse de F-actine (Wallace *et al.*, 1984). Ce processus de polarisation cellulaire est accompagné d'une élévation de la concentration intracellulaire de calcium (Kuijpers *et al.*, 1992; Merritt *et al.*, 1991). De plus, le fMLP induit plusieurs des fonctions classiques du neutrophile, soit la dégranulation et la flambée oxydative (Hoffstein *et al.*, 1982; Kuijpers *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 1994; Waddell *et al.*, 1994). En plus de l'induction des fonctions classiques, le fMLP induit une hausse de l'expression de plusieurs récepteurs, dont les intégrines CD11a, CD11b et CD18, ce qui a une grande influence sur la motilité du neutrophile en réponse au stimulus (Derian *et al.*, 1995; Volz, 1993). Ensuite, le fMLP induit la production de plusieurs médiateurs, dont les médiateurs lipidiques, en causant le recrutement de la 5-lipoxygénase chez les cellules stimulées afin de métaboliser l'acide arachidonique et

produire du 5-HETE et du LTB<sub>4</sub> (Clancy *et al.*, 1983; Palmer et Salmon, 1983). Finalement, des médiateurs protéiques sont produits en réponse au fMLP, comme l'IL-8 et l'IL-1ra (Cassatella, 1999; Scapini *et al.*, 2000).

La réponse du neutrophile au fMLP est modulée par l'action d'un premier stimulus sur les cellules. Plusieurs cytokines modulent la réponse au fMLP. D'abord, le LPS est connu pour augmenter l'effet du fMLP sur la production d'anion superoxyde, la polymérisation de la F-actine, l'expression de différents récepteurs (comme le CD11b et le FPR) et d'augmenter la concentration intracellulaire de calcium (Yee et Christou, 1993). D'autres médiateurs ont un effet modulateur semblable. Parmi ceux-ci, le TNF entraîne une augmentation du chimiotactisme, de la dégranulation et de la production d'anion superoxyde (Bajaj *et al.*, 1992). De plus, le PAF et l'IFN- $\gamma$  augmentent tous deux la production d'anion superoxyde par le fMLP (Gay, 1990; Tennenberg *et al.*, 1993). Finalement, le GM-CSF est également un puissant agent de modulation de la réponse en augmentant le chimiotactisme, la dégranulation et la flambée oxydative en réponse au fMLP (DeNichilo *et al.*, 1991; Tyagi *et al.*, 1989; Weisbart *et al.*, 1987).

#### **1.4.3 Le fMLP dans les pathologies**

Le fMLP est présent dans plusieurs sites infectieux. Dans les poumons, il a été montré que la présence soutenue de fMLP cause une augmentation de l'inflammation bronchique (Peters *et al.*, 1991). Ainsi, sa présence contribue à l'inflammation bronchique lors d'une infection (Peters *et al.*, 1992). Finalement, le fMLP agit comme agent bronchoconstricteur lors des infections (Berend *et al.*, 1986). De plus, plusieurs pathologies entraînent un défaut de fonctionnement des neutrophiles. Par exemple, dans le cas de la périodontite juvénile, la réponse de neutrophile au fMLP est altérée. En effet, il y a une baisse importante du chimiotactisme du neutrophile accompagnée d'une diminution de la mobilisation de calcium intracellulaire (Agarwal *et al.*, 1989). Cette réduction du chimiotactisme est suivie d'une diminution de la capacité du neutrophile à phagocyter (Van Dyke *et al.*, 1986). Ces effets sont provoqués par une diminution de l'expression du récepteur au fMLP (Van Dyke *et al.*, 1990), mais également par une mutation dans une

boucle intracellulaire du récepteur, altérant la réponse du récepteur au fMLP (Gwinn *et al.*, 1999).

#### 1.4.4 Le récepteur des peptides N-formylés

Il existe trois récepteurs des peptides N-formylés chez l'humain, soit le FPR, ainsi que ses deux homologues, le FPRL1 et le FPRL2. Le récepteur FPR est un récepteur de haute affinité pour le fMLP, avec un  $K_d \leq 1\text{nM}$ , tandis que le FPRL1 est un récepteur de faible affinité pour le fMLP, avec un  $K_d > 1\ \mu\text{M}$ . Finalement, le FPRL2 ne lie pas le fMLP ou les peptides N-formylés, mais plutôt d'autres ligands non formylés du FPRL1 (Le *et al.*, 2002). Les trois récepteurs font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Comme beaucoup de récepteurs de chimioattractants, le récepteur est couplé à une sous-unité  $G\alpha_i$  qui est sensible à la toxine pertussique (Krause *et al.*, 1985). Les récepteurs des peptides N-formylés sont exprimés sur une grande variété de tissus et cellules, entre autres sur les monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques immatures, plaquettes, microglie, moelle osseuse, mais aussi sur des cellules qui ne font pas partie du système immunitaire, comme les fibroblastes, les hépatocytes, ou les astrocytes (tableau 4). Le FPRL1, quant à lui, est exprimé sur plusieurs cellules et tissus, comme les monocytes et macrophages, les neutrophiles, les cellules B et T, les cellules épithéliales et les fibroblastes (tableau 4). Finalement, le FPRL2 est exprimé sur les cellules dendritiques matures et immatures, ainsi que sur les monocytes et macrophages, mais son ARNm est détecté dans plusieurs tissus, comme la rate, les ganglions lymphatiques, les poumons et le foie (tableau 4) (Migeotte *et al.*, 2006). Seuls les récepteurs FPR et FPRL1 sont exprimés sur le neutrophile humain.

**Tableau 4 Distribution cellulaire et tissulaire des récepteurs de peptides N-Formylés (tiré de Migeotte et al., 2006)**

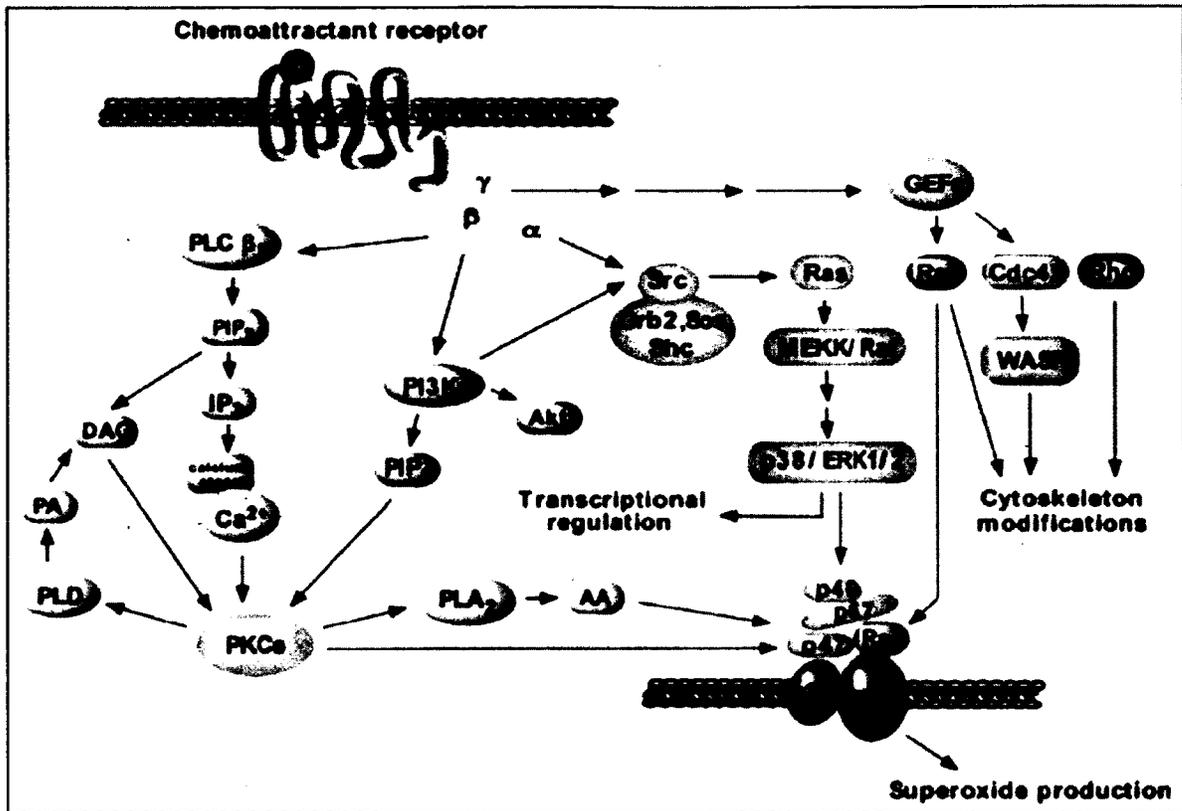
Récepteur	FPR	FPRL1	FPRL2
Distribution cellulaire	Monocyte/macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques immatures, cellules endothéliales, plaquettes, hépatocytes, astrocytes, microglie, fibroblastes, cellules musculaires lisses vasculaires, thyroïde, reins, système nerveux central et périphérique, foie, poumons, rate, cœur, utérus, moelle osseuse, estomac	Monocyte/macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques immatures, cellules B et T, cellules endothéliales, cellules épithéliales, microglie, astrocytes, fibroblastes, hépatocytes, placenta, cerveau, moelle osseuse, rate, poumons, testicules	Monocyte/macrophages, cellules dendritiques matures et immatures, foie, ganglions lymphatiques, trachée, foie, petit intestin, placenta

#### 1.4.5 La signalisation induite par le fMLP

L'activation du récepteur au fMLP, le FPR, mène à l'activation de plusieurs voies de signalisation (figure 3). D'abord, la liaison du fMLP à son récepteur active la protéine G et cause la dissociation des sous-unités pour obtenir la sous-unité  $\alpha$  liée au GTP d'un côté et les sous-unités  $\beta\gamma$  de l'autre (Le *et al.*, 2002). Les sous-unités  $\beta\gamma$  activent la PLC $\beta$ 2 et la PI3K (Le *et al.*, 2002). La PI3K a pour rôle de transformer le PIP2 en PIP3, mais aussi phosphoryle la kinase AKT. De son côté, la PLC $\beta$ 2 transforme le PIP2 en IP3 et DAG (Panaro *et al.*, 2006). Dans la cellule, l'IP3 provoque la relâche des réserves de calcium et provoque ainsi l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , nécessaire au processus de remaniement du cytosquelette d'actine (Rabiet *et al.*, 2007). De son côté, le DAG active certaines isoformes de la PKC. Cette dernière est impliquée dans l'activation et

la modulation de l'activité de la NADPH oxydase, via la phosphorylation de la sous-unité p47<sup>phox</sup> (Rabiet *et al.*, 2007).

La liaison du fMLP à son récepteur active aussi des sentiers MAPK, comme la voie ERK1/2 ainsi que la voie p38. Aussi, l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) par la PKC entraîne le métabolisme de l'acide arachidonique et la production de LTB4. Finalement, d'autres protéines qui sont activées dans la signalisation du fMLP sont les petites protéines G de la famille Rho ainsi que Rac1 et Cdc42 (Rabiet *et al.*, 2007). Ces dernières sont impliquées dans les réarrangements du cytosquelette d'actine impliqués dans le chimiotactisme (Le *et al.*, 2002; Migeotte *et al.*, 2006; Panaro *et al.*, 2006; Rabiet *et al.*, 2007).



**Figure 3** Voies de signalisation et réponses induites par la liaison d'un chimioattractant (fMLP) à son récepteur.

L'activation du récepteur du fMLP mène à l'activation de la PLCβ2 et de la PI3K, ce qui mène à l'activation de la PKC, impliquée dans l'activation de la NADPH oxydase. Il y a aussi activation des sentiers MAPK p38 et ERK1/2. De plus, la stimulation du récepteur du fMLP active la PLA2 et finalement des petites protéines G de la famille Rho, Rac1 et Cdc42 (tiré de Rabiet *et al.*, 2007).

## 1.5 Le GM-CSF

### 1.5.1 Le facteur de croissance GM-CSF

Le GM-CSF, ou « granulocyte macrophage colony stimulating factor », a d'abord été reconnu pour ses effets sur les précurseurs myéloïdes en stimulant leur différenciation et leur prolifération en granulocytes et macrophages *in vitro* (Metcalf *et al.*, 1980). Il fait partie de la famille des « colony stimulating factors », avec le G-CSF et le M-CSF qui stimulent la différenciation de cellules souches en granulocytes et macrophages,

respectivement. Il a été originellement décrit comme une cytokine pro-inflammatoire (Hamilton *et al.*, 1980). Le GM-CSF est un polypeptide glycosylé (Hamilton, 2008) produit par une variété de cellules, comme les macrophages, les cellules T, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Burgess et Metcalf, 1980; Martinez-Moczygemba et Huston, 2003). Sa production est induite par plusieurs facteurs, dont les endotoxines et autres produits bactériens, les infections virales ou par des protozoaires ainsi que par certaines cellules tumorales (Burgess et Metcalf, 1980).

Le GM-CSF agit de plusieurs façons sur les cellules du système immunitaire. D'abord, il agit sur les progéniteurs myéloïdes et est impliqué dans le développement de mégacaryocytes (Emerson *et al.*, 1988). Il agit également sur les monocytes et macrophages en augmentant leur adhérence aux cellules endothéliales, en induisant l'expression de molécules de CMH-II et en modulant la production de cytokines (Alvaro-Gracia *et al.*, 1989; Fischer *et al.*, 1988; Gamble *et al.*, 1989; Hart *et al.*, 1988). De plus, il agit sur les cellules présentatrices d'antigène, comme les macrophages et les cellules microgliales, pour augmenter leur capacité à phagocyter et à présenter les antigènes (Morrissey *et al.*, 1987). Finalement, le GM-CSF est utilisé en clinique afin d'augmenter le nombre de neutrophiles suite à une chimiothérapie ainsi que pour mobiliser des cellules souches myéloïdes dans le sang (Antman *et al.*, 1988).

### **1.5.2 Le GM-CSF et les neutrophiles**

En plus des différentes actions décrites ci-dessus sur le système immunitaire, plusieurs actions du GM-CSF ont été répertoriées chez le neutrophile, une des cibles principales de ce facteur de croissance. Il peut agir de deux façons sur les neutrophiles, soit en induisant des réponses directes ou en modulant les réponses à un deuxième stimulus, ce qui constitue le phénomène de « priming ».

Un effet direct majeur du GM-CSF majeur sur les neutrophiles est l'induction d'un retard de l'apoptose (Brach *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 2000). Cette action se fait selon un mécanisme impliquant à la fois la synthèse d'ARNm et la synthèse protéique, mais aussi en prévenant la fragmentation de l'ADN, qui est une étape clé dans le phénomène d'apoptose

(Brach *et al.*, 1992). Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le retard de l'apoptose, comme les voies PI3K/AKT et MEK/ERK (Klein *et al.*, 2000), et possiblement la voie JAK/STAT (Epling-Burnette *et al.*, 2001). Enfin, le GM-CSF induit non seulement l'expression de MCL-1 (Moulding *et al.*, 1998), une protéine antiapoptotique de la famille BCL-2, mais il augmente sa stabilité en prévenant sa dégradation par le protéasome (Derouet *et al.*, 2004), augmentant sa présence dans la cellule et soutenant son activité antiapoptotique. Un autre effet du GM-CSF est l'augmentation de l'expression de plusieurs récepteurs chez le neutrophile. Ceci inclut d'abord une augmentation de l'expression et de la sensibilité du récepteur du fMLP (Atkinson *et al.*, 1988). Il y a aussi une augmentation de l'expression du TLR2 et du corécepteur CD14, ce qui mène à une augmentation de la réponse des neutrophiles au LPS (Kurt-Jones *et al.*, 2002). De plus, il y a une augmentation de l'expression du récepteur de chimiokines CCR1, augmentant ainsi la réponse des neutrophiles aux chimiokines (Cheng *et al.*, 2001). Finalement, le GM-CSF agit directement sur les neutrophiles pour entraîner la sécrétion de cytokines et de chimiokines, comme l'IL-1, l'IL-1ra et l'IL-8 (Cassatella, 1999; Lindemann *et al.*, 1988; Scapini *et al.*, 2000; Schroder *et al.*, 2006).

Le GM-CSF amplifie les fonctions classiques du neutrophile comme la production d'anion superoxyde (Atkinson *et al.*, 1988; Nathan, 1989; Weisbart *et al.*, 1987), la phagocytose (Metcalf *et al.*, 1986), la mobilisation du calcium intracellulaire (Naccache *et al.*, 1988), l'activité de la PLD (Bourgoin *et al.*, 1990) et finalement la relâche d'acide arachidonique et de LTB4 (DiPersio *et al.*, 1988). De plus, le GM-CSF agit sur les neutrophiles pour augmenter leur capacité à réagir à la présence d'ADN bactérien (Fuxman Bass *et al.*, 2008).

### **1.5.3 Le GM-CSF dans les pathologies**

Puisque le GM-CSF agit sur beaucoup de cellules du système immunitaire et qu'il est produit par beaucoup de types cellulaires, il n'est pas surprenant qu'il soit impliqué dans plusieurs pathologies. La présence et l'effet du GM-CSF ont beaucoup été étudiés dans plusieurs maladies auto-immunes, entre autres, dans l'arthrite rhumatoïde. Il est connu

depuis longtemps que le GM-CSF est présent en grandes quantités dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Hamilton, 2008). Des études ont été faites afin d'établir son implication dans la pathologie. Il a été montré que l'administration de GM-CSF avait pour effet d'augmenter la sévérité des symptômes de la maladie (Bischof *et al.*, 2000). Au contraire, lorsque le GM-CSF est absent, comme dans des souris déficientes au GM-CSF, il n'y avait peu ou pas d'induction de la maladie et que le blocage du GM-CSF avec des anticorps neutralisants avait pour effet de diminuer la sévérité et la progression de la maladie (Campbell *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 2001). Cela démontre l'importance du GM-CSF dans le développement de l'arthrite rhumatoïde.

Aussi, le GM-CSF a été impliqué dans le modèle animal de la sclérose en plaques, le EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*). En effet, il a été montré que le GM-CSF stimule la prolifération et la fonction des cellules microgliales *in vitro* (Fischer *et al.*, 1993). Chez les souris atteintes, il a été montré que les symptômes sont augmentés lors de l'administration du facteur de croissance (Marusic *et al.*, 2002) et que ces symptômes étaient diminués avec le blocage du GM-CSF, avec un anticorps bloquant (McQualter *et al.*, 2001). Donc, cela suggère un rôle pour le GM-CSF dans l'induction de la sclérose en plaques.

Finalement, une autre maladie bien étudiée pour l'implication du GM-CSF est la colite expérimentale, soit le modèle animal des désordres inflammatoires de l'intestin. Dans ce modèle, l'administration de GM-CSF améliore les symptômes et l'état histologique des intestins (Sainathan *et al.*, 2008). Aussi, chez des patients atteints de la maladie de Crohn, l'administration de GM-CSF entraîne une amélioration des symptômes (Korzenik *et al.*, 2005). Donc, le GM-CSF joue un rôle important dans le développement de toutes ces pathologies.

#### **1.5.4 Le récepteur du GM-CSF**

Le récepteur du GM-CSF fait partie de la famille des récepteurs de cytokines de type I (Barreda *et al.*, 2004). C'est un hétérodimère composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une

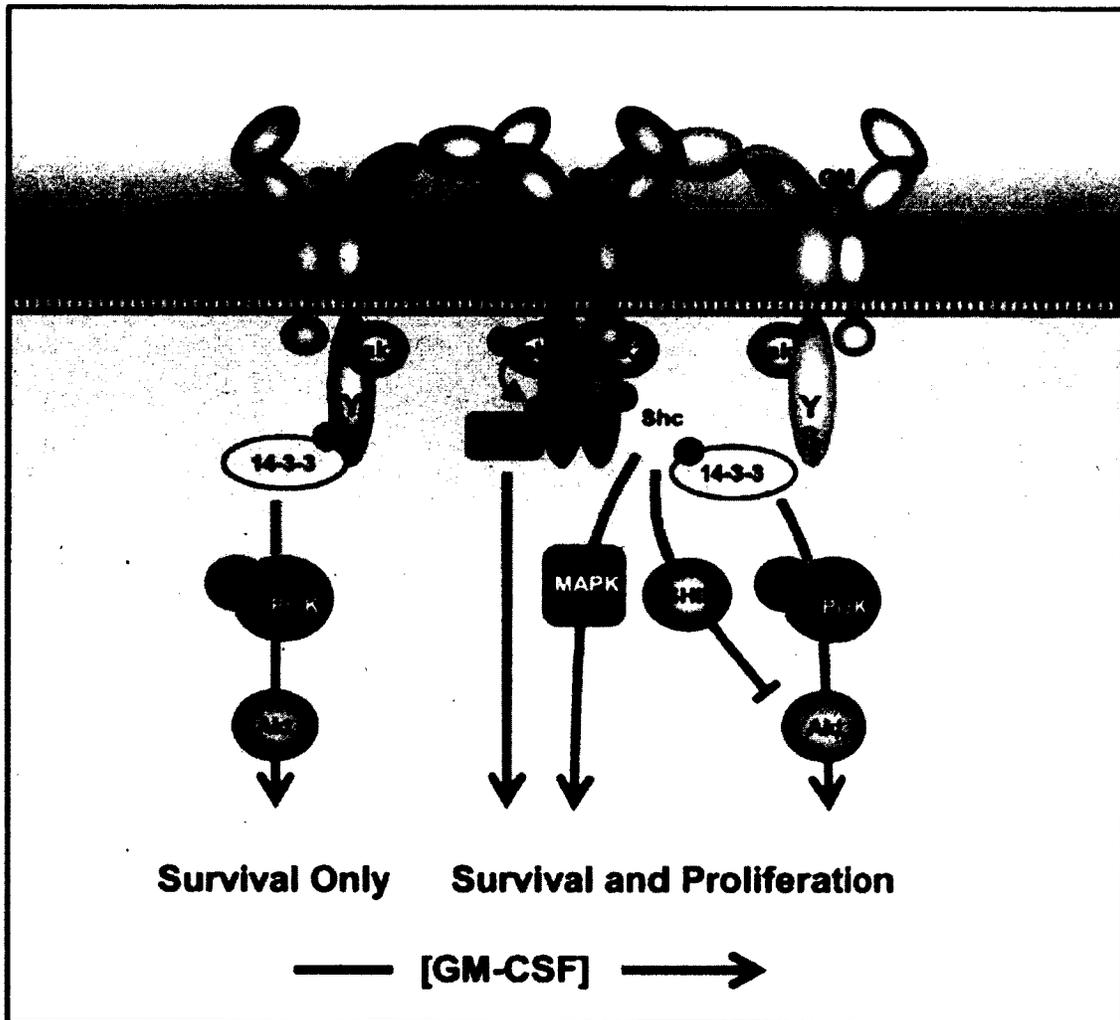
chaîne  $\beta c$  commune aux récepteurs de l'IL-3 et de l'IL-5 (Barreda *et al.*, 2004). La chaîne  $\alpha$  du récepteur (GMR $\alpha$ ) a une faible affinité pour le GM-CSF (Kd de l'ordre du nM) tandis que la chaîne  $\beta c$  a peu ou pas d'affinité pour le GM-CSF mais est nécessaire à la transmission du signal. L'assemblage de ces deux chaînes crée un récepteur de haute affinité (Kd de l'ordre de pM) (Gearing *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1992). Le récepteur est exprimé principalement sur les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles ainsi que leurs précurseurs, mais aussi sur les précurseurs érythropoïétiques et mégacaryocytes, les cellules B et T, les cellules endothéliales vasculaires et les fibroblastes (Barreda *et al.*, 2004). L'expression de la chaîne  $\beta c$  peut être augmentée par plusieurs facteurs, comme l'IFN $\gamma$ , le SCF, l'IL-3, l'EPO et le TNF $\alpha$  chez les cellules hématopoïétiques (Liboi *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1993).

À la surface des cellules, le récepteur est présent sous forme hexamérique comprenant deux molécules de GM-CSF, deux chaînes GMR $\alpha$  et deux chaînes  $\beta c$  pour former trois sites de liaison du GM-CSF. L'activation du récepteur entraîne la dimérisation de l'hexamère pour former un dodécamère, ce qui permet la transphosphorylation du récepteur par JAK2 (Hercus *et al.*, 2009).

### 1.5.5 La signalisation induite par le GM-CSF

Le récepteur du GM-CSF ne possède pas d'activité kinase intrinsèque; c'est plutôt son activation par JAK2 (Al-Shami *et al.*, 1998) qui permet la transduction du signal. La liaison de GM-CSF à son récepteur provoque l'activation de JAK2, ce qui entraîne la phosphorylation de la chaîne  $\beta c$ , menant au recrutement de protéines adaptatrices SH2 (Guthridge *et al.*, 1998; Hercus *et al.*, 2009). Les protéines possédant au moins un domaine SH2 servent de pont entre la cascade de signalisation et la chaîne  $\beta c$ , dont entre autres le recrutement de STAT5 au récepteur pour son activation par JAK2 (Guthridge *et al.*, 1998). À de faibles concentrations de GM-CSF, la phosphorylation de la chaîne  $\beta c$  s'insère dans une protéine adaptatrice de motif 14-3-3, qui fait le pont avec l'activation de la PI3K et de AKT (Hercus *et al.*, 2009). À de plus grandes concentrations de GM-CSF, la

phosphorylation en tyrosine de la chaîne  $\beta c$  mène au recrutement des protéines SH2 et conséquemment à l'activation de la voie PI3K-AKT. Plusieurs voies MAPK sont activées dans ce processus, dont les voies Ras-MAPK et Raf-MAPK, dont ERK1/2 et p38 (Guthridge *et al.*, 1998; Hercus *et al.*, 2009) (figure 4).



**Figure 4** Voies de signalisation activées par la liaison du GM-CSF à son récepteur.

L'activation du récepteur du GM-CSF se fait par la phosphorylation des chaînes  $\beta c$  par JAK2, ce qui recrute les protéines adaptatrices SH2 au récepteur. Cela mène à l'activation de la voie PI3K/AKT, mais aussi à l'activation de voies de signalisation MAPK (tiré de Hercus *et al.*, 2009).

## **1.6 Hypothèse de recherche et objectifs**

Dans ce mémoire, je soutiens l'hypothèse de recherche que TAK1 est située en amont des voies de signalisation induites par le fMLP et le GM-CSF chez le neutrophile humain et joue conséquemment un rôle essentiel dans les réponses cellulaires du neutrophile.

Objectifs :

- Déterminer le rôle de TAK1 dans la signalisation MAP kinase et PI3K.
- Évaluer l'impact de TAK1 sur les réponses fonctionnelles du neutrophile, dont l'expression et la production de cytokines et chimiokines, le retard l'apoptose ainsi que la production de leucotriènes.

## CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes

### 2.1 Les produits utilisés

Les anticorps dirigés contre TAK1, MEKK1, MEKK3, IKK $\alpha$ / $\beta$ , IKK $\gamma$  et I $\kappa$ B- $\alpha$  proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps anti-phosphoprotéines (STAT-1-3-5, p38, ERK1/2, MEK1/2, AKT, cPLA2) proviennent tous de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris conjugués à la peroxydase de raifort, ainsi que la trousse de luminescence ECL sont de chez Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, Qc), tandis que les anticorps secondaires anti-chèvre ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Le Ficoll-Paque, la T4 polynucléotide kinase, le Poly (dI-dC) et les billes de protéine G-Sépharose 4FF proviennent tous de GE HealthCare Biosciences Inc. (Baie d'Urfé, Qc). L'ATP- $\gamma$ P32 a été achetée chez NEN (Boston, MA). Le milieu de culture RPMI 1640 et le FCS sans endotoxine ont tous deux été achetés chez Wisent (St-Bruno, Qc). Les cytokines humaines recombinantes ainsi que les ensembles pour ELISA proviennent de R&D Systems (Minneapolis, MN). Le LPS ultrapure (*E. coli* O111 :B4) a été acheté chez InvivoGen (San Diego, CA). L'annexine V-FITC est de chez BD Biosciences (Mississauga, On). Le BSA, la cycloheximide, le diisopropyl fluorophosphate (DFP), le fMLP, la myelin basic protein (MBP), le phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) et le propidium iodid ont tous été achetés chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Le Leucotriène B4 (LTB<sub>4</sub>) et le platelet-activating factor (PAF) sont tous deux de chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Les inhibiteurs de protéases aprotinine, 4-(2-aminométhyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), leupeptine et pepstatine A proviennent de chez Roche (Laval, Qc). L'inhibiteur de TAK1, le 5z-7-oxozeanol a été gracieusement offert par Dr M. Tsuchiya et Dr K. Ono (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd, Shizuoka, Japon). Finalement, tous les inhibiteurs de voies de signalisation (SB202190, PD98059, LY294002, Wortmannin, MG132, BAY117082) proviennent de Calbiochem (San Diego, CA).

## 2.2 Isolement des neutrophiles

Les neutrophiles sont isolés à partir de sang périphérique de donneurs sains selon la méthode de Boyum (1968), avec la modification que toute la procédure est faite à température de la pièce. En résumé, le sang est prélevé et centrifugé à 200 X g pendant 10 minutes. Le plasma est ensuite retiré et remplacé par du PBS stérile. Après la sédimentation au dextran, les cellules sont centrifugées sur du Ficoll-Paque. Les PBMC sont retirés et les érythrocytes sont enlevés par lyse hypotonique dans l'eau pour 20 secondes. Les neutrophiles purifiés sont ensuite lavés au PBS et resuspendus dans du RPMI 1640 supplémenté au sérum autologue à une concentration de  $5 \times 10^6$  cellules, sauf lorsqu'il y a indication contraire. La suspension finale contient moins de 0,5% de monocytes et lymphocytes, tel que déterminé par la coloration de Wright/Giemsa ou par cytofluorimétrie. De plus, l'exclusion au bleu de Trypan démontre une viabilité des neutrophiles en culture supérieure à 98% après 4 heures.

## 2.3 Fractionnements cellulaires et immunobuvardages de type western

Les neutrophiles sont incubés à 37°C en présence ou absence d'inhibiteurs et/ou de stimuli tel que décrit dans les légendes des figures. Les stimulations sont arrêtées par l'ajout d'un volume équivalent de PBS froid contenant 2mM DFP et des inhibiteurs de phosphatases (10 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ). Les cellules sont ensuite centrifugées à 300 X g pendant 5 minutes et resuspendues dans le tampon de relaxation froid (10 mM PIPES pH 7,3, 10 mM NaCl, 3,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT) auquel les inhibiteurs de protéases (1 mM DFP, 1 mM PMSF, 1 mM AEBSF et 10 (M aprotinine, leupeptine et pepstatine A) et de phosphatases (10 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) sont ajoutés. La lyse par cavitation à l'azote est faite tel que décrite par McDonald *et al.* (McDonald *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1998a). Pour les lysats cellulaires totaux, le tampon d'échantillon 2X chaud (sample buffer) (50 mM Tris base pH 6,8, 4% SDS, 10% 2-ME, 20% glycérol) est directement ajouté aux culots de cellules, puis les échantillons sont placés dans un bain d'eau bouillante pendant 4 minutes. Ensuite, les lysats cellulaires sont soniqués pour fragmenter la chromatine. Les échantillons

ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 10-12% selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Le volume d'échantillon est ajusté en fonction de sa concentration protéique. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et ensuite analysées en immunobuvardage tel que décrit par McDonald *et al.* (McDonald *et al.*, 1997).

#### **2.4 Immunoprécipitations et immunobuvardages de type western**

Les neutrophiles ( $20 \times 10^6$  / 1500 $\mu$ L) sont incubés à 37°C en présence ou en absence d'inhibiteurs et/ou de stimuli. Les stimulations sont arrêtées par une brève centrifugation de 15 secondes à 12 000 X g. Les culots sont lysés dans 1 mL de tampon de lyse froid (20 mM Tris base pH 7,4, 1% NP-40, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl) contenant les inhibiteurs de protéases et de phosphatases décrits plus haut, puis centrifugés pendant 15 minutes à 15 000 rpm à 4°C. Les surnageants sont incubés pendant 90 minutes à 4°C avec 1,5 $\mu$ g d'anticorps (ex. anti-TAK1 de souris) suivi d'une incubation toute la nuit à 4°C avec les billes de protéines G-Sépharose 4FF. Ensuite, les billes sont lavées deux fois avec du tampon de lyse et deux fois avec du PBS pour finalement être placés dans l'eau bouillante avec 30 $\mu$ L de tampon d'échantillon 2X préchauffé dans l'eau bouillante. Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide de 10%. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et analysées en immunobuvardage (ex. anti-IKK $\alpha/\beta$  de type lapin).

#### **2.5 Immunoprécipitation et essais kinases *in vitro***

Les neutrophiles sont stimulés, lysés et immunoprécipités comme décrit plus haut en utilisant 1,5  $\mu$ g/mL d'anticorps anti-TAK1, anti-MEKK1 et anti-MEKK3. Les billes de protéines G-Sépharose sont lavées une fois avec le tampon de lyse, une fois avec le tampon de rinçage (20 mM Tris base pH7,4, 150 mM NaCl, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 25 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ g/mL aprotinine) et deux fois dans le tampon PAN (20 mM PIPES pH 7,0, 2  $\mu$ g/mL aprotinine, 100 mM NaCl). Les billes sont ensuite

resuspendues dans 30  $\mu\text{L}$  de tampon PAN auquel 20  $\mu\text{L}$  sont prélevés. 20  $\mu\text{L}$  de tampon kinase (20 mM PIPES pH 7,0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM DTT, 1  $\mu\text{g}$  MBP, 2  $\mu\text{M}$  ATP pour l'essai kinase TAK1) sont ajoutés 20  $\mu\text{L}$  prélevés précédemment. Pour l'essai kinase MEKK1, le 10 mM  $\text{MgCl}_2$  est remplacé par 10 mM  $\text{MnCl}_2$  et pour l'essai kinase MEKK3, il est remplacé par 5 mM  $\text{MgCl}_2$  et 5 mM  $\text{MnCl}_2$ . De plus, tous les tampons kinase contenaient 5  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}]$ . Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 minutes à 30°C avec agitation fréquente et les réactions sont terminées par l'ajout de tampon d'échantillon pré-chauffé à 95°C et par l'incubation du mélange dans un bassin d'eau bouillante pendant 4 minutes. Les échantillons sont séparés sur gel de polyacrylamide 18%, puis le gel est séché et analysé par autoradiographie. Les billes restantes dans le tampon PAN sont incubées dans un bain d'eau bouillante avec un volume équivalent de tampon d'échantillon, puis séparées sur gel de polyacrylamide 10%, transférées sur membrane de nitrocellulose et analysées en immunobuvardage avec des anticorps anti-TAK1, anti-MEKK1 et anti-MEKK3.

## 2.6 Extraction d'ARN et analyse par PCR en temps réel

Les neutrophiles ( $40 \times 10^6$ ) sont incubés en présence ou en absence d'inhibiteurs et/ou de stimuli pour les temps désirés comme indiqué dans les légendes des figures. L'ARN est extrait en utilisant le Trizol (Gibco, Burlington, VT) selon le protocole modifié de Chomczynski et Sacchi (1987). L'ARN extrait est soumis à la transcriptase inverse en utilisant des amorces aléatoires (Ambio, Austin, TX) et la Superscript II (Invitrogen, Burlington, On). L'ADN complémentaire est analysé par PCR en temps réel semi-quantitatif selon le protocole de Dussault et Pouliot (2006) dans un appareil Rotorgene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australie). Les amorces d'oligonucléotides sont: IL-8 (fw AGGAAGCTCACTGGTGGCTG; rev TAGGCACAATCCAGGTGGC); Mip-1a (fw AGCTGACTACTTTGAGACGAGCA; rev CGGCTTCGCTTGGTTAGGA); Mip-1b (fw CTGCTCTCCAGCGCTCTCA; rev GTAAGAAAAGCAGCAGGCGG); TNF $\alpha$  (fw TCTTCTCGAACCCCGAGTGA; rev CCTCTGATGGCACCACCAG); 18S (fw AGGAATTGACGGAAGGGCAC; rev GGACATCTAAGGGCATCACA). Les amorces pour les analyses des transcrits primaires (PT)-PCR étaient: IL-8 (fw

ATTGAGAGTGGACCACACTG; rev ACTACTGTAATCCTAACACCTG); Mip-1a (fw GTCAGTCCTTTCTTGGCTCTG; rev GATACCCACAACGAAACTCAGAC); Mip-1b (fw AAACCTCTTTGCCACCAATACC; rev AGGACTCTGCCTACACCTTGAC); TNF $\alpha$  (fw TCAGGATCATCTTCTCGAACC; rev GAGTCCTTCTCACATTGTCTC).

## **2.7 Analyse des protéines sécrétées par ELISA**

Les neutrophiles ( $3 \times 10^6$  cellules / 600  $\mu$ L) sont mis en culture dans des plaques 12 puits à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> en présence ou en absence d'inhibiteurs et/ou de stimuli pour les temps indiqués dans les légendes des figures. Les surnageants sont récupérés, congelés rapidement dans l'azote liquide et conservés à -70°C. La concentration en cytokines est déterminée par un essai ELISA de type sandwich en utilisant les paires d'anticorps de capture et de détection disponibles commercialement (R&D Systems, BD Biosciences) selon les instructions du manufacturier.

## **2.8 Détermination de l'apoptose du neutrophile**

Les neutrophiles ( $5 \times 10^5$  cellules) sont mis en culture dans des plaques 12 puits à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> en présence ou en absence d'inhibiteurs et/ou de stimuli pendant 24 heures. Les cellules sont récoltées et lavées deux fois avec du PBS froid, puis incubées pendant 30 minutes avec de l'annexine V-FITC. Les cellules marquées sont lavées et analysées (minimum de 10 000 cellules) sur un appareil FACScan (Becton Dickinson) en utilisant le programme CELLQuest.

## **2.9 Détermination de la production de leucotriènes**

Les neutrophiles ( $5 \times 10^6$  cellules / mL) sont mis en culture dans du milieu HBSS contenant 1,6 mM CaCl<sub>2</sub> puis incubés en présence de 0,1 U mL d'adénosine déaminase, de

700 pM de GM-CSF, de 1,5 nM de TNF $\alpha$  et de 10  $\mu$ M de cytochalasin B pendant 30 minutes. Ensuite, les cellules sont stimulées avec 300 nM de fMLP pendant 5 minutes. Les incubations sont arrêtées par l'ajout de 0,5 volume d'une solution d'arrêt (MeOH/MeCN 50/50, v/v) qui contient 12,5 ng de 19-OH-PGB2 et de PGB2 comme contrôles internes. Les échantillons sont ensuite analysés pour la production de produits de la 5-LO.

## **2.9 Analyse statistique**

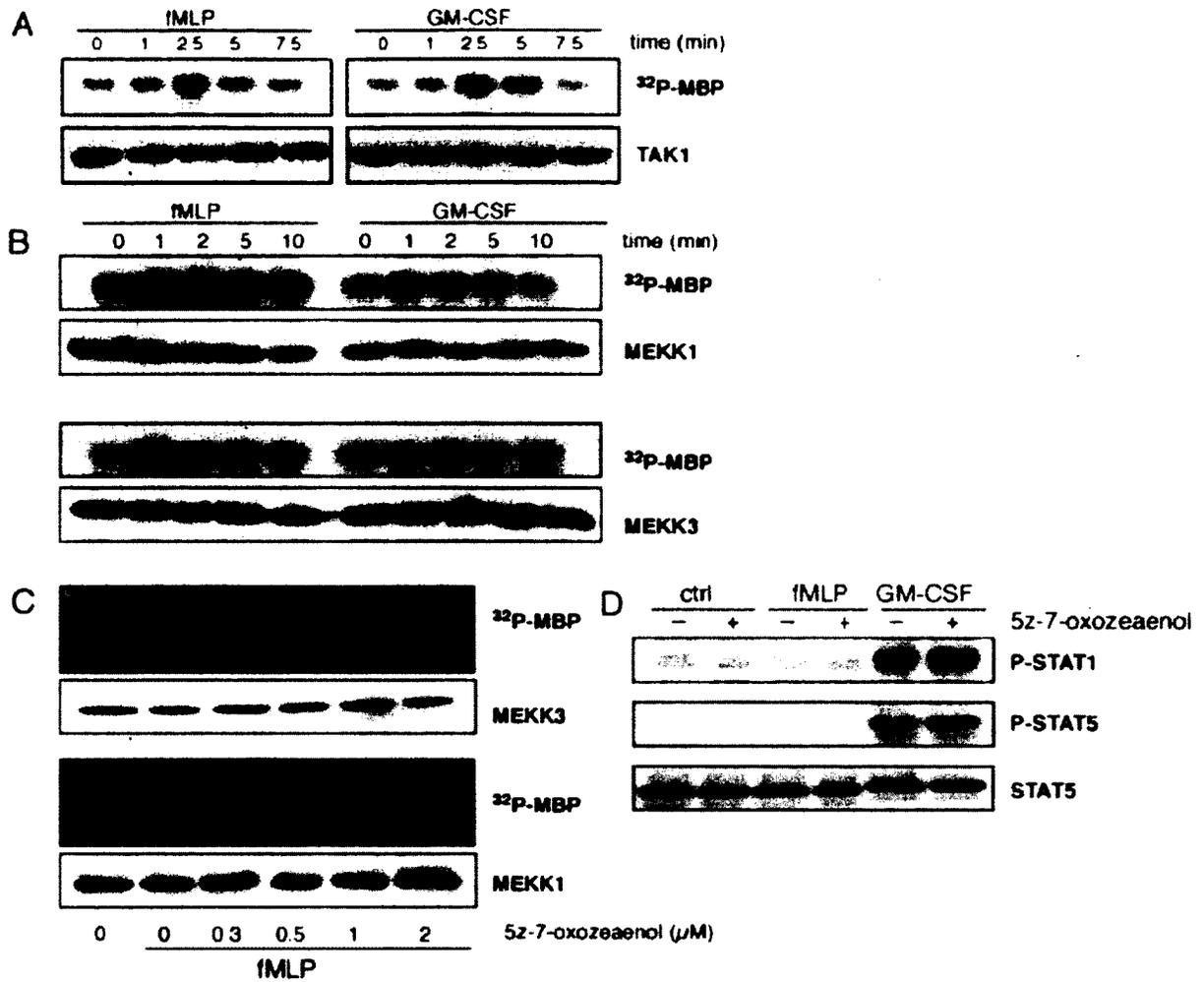
Les résultats sont présentés selon la moyenne des différentes expériences  $\pm$  SEM. L'analyse statistique est faite avec le test *t* de Student pour des échantillons non pairés avec un niveau de probabilité statistiquement significatif accepté  $p \leq 0,05$ .

## CHAPITRE 3 : Résultats

### 3.1 Activation de MAP3K par le fMLP et le GM-CSF chez le neutrophile humain

Les études précédemment faites par notre laboratoire ont montré que TAK1 était rapidement activée en réponse au LPS et au TNF $\alpha$  chez les neutrophiles humains et que cette activation était transitoire (Ear *et al.*, 2010). Afin de déterminer si cette MAP3K pouvait être activée par d'autres classes de stimuli, les neutrophiles ont été stimulés par le fMLP, un chimioattractant, et par le GM-CSF, un facteur de croissance, durant un court intervalle de temps. Ensuite, les lysats cellulaires ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps anti-TAK1 et l'activité kinase de TAK1 a été évaluée par un essai kinase radioactif *in vitro* en utilisant la protéine MBP comme substrat. Les résultats présentés dans la figure 5A montrent que le fMLP, comme le GM-CSF, induisent rapidement l'activité kinase de TAK1, avec son maximum à 5 minutes. De plus, cette activation est transitoire puisque le retour au niveau de base d'activité kinase de TAK1 se fait à 10 minutes. Enfin, la cinétique d'activation de TAK1 avec le fMLP et le GM-CSF est similaire à celle observée avec le LPS et le TNF $\alpha$  (Ear *et al.*, 2010).

Certains facteurs chimiotactiques (ex. PAF) sont connus pour leur capacité à activer MEKK1 chez le neutrophile (Nick *et al.*, 1997). Nous nous sommes donc penchés sur la capacité du fMLP et du GM-CSF à induire l'activité de différentes isoformes de MEKK chez le neutrophile humain. Comme le présente la figure 5B, seulement le fMLP active MEKK1 et MEKK3, selon des cinétiques différentes. À l'inverse, MEKK2 est faiblement exprimé chez le neutrophile humain et son activité kinase n'a pas été détectée en réponse au fMLP et au GM-CSF (données non montrées). Aussi, l'inhibiteur de TAK1, le 5z-7-oxozeanol, même à des concentrations supérieures à 1  $\mu$ M, n'a pas affecté l'activité kinase de MEKK1 (figure 5C), démontrant la spécificité de l'inhibiteur (Ear *et al.*, 2010; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 2003). Pour ce qui est de MEKK3, son activité kinase semble diminuée par la présence de l'inhibiteur de TAK1, ce qui peut proposer une dépendance à TAK1 (figure 5C). De plus, l'inhibiteur de TAK1 n'affecte pas la phosphorylation induite des protéines STAT par le GM-CSF, comme attendu d'une réponse indépendante de TAK1 (figure 5D).

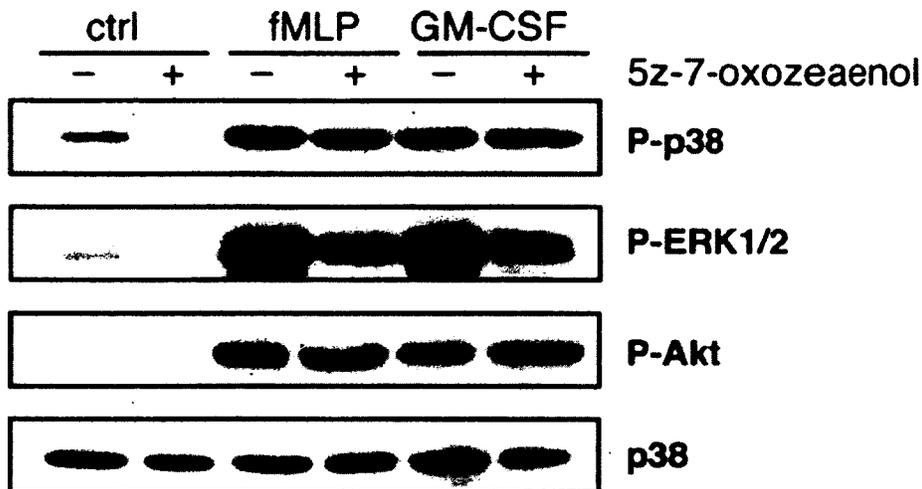


### Figure 5 Activation de TAK1 et de MAP3K par le fMLP et le GM-CSF

A. Les cellules sont stimulées avec 1 nM de GM-CSF ou 30 nM de fMLP pour les temps indiqués. Ensuite, les cellules ont été lysées et TAK1 a été immunoprécipitée. Une partie du précipité a servi pour l'essai kinase en utilisant MBP comme substrat et une deuxième partie a servi à l'analyse en immunobuvardage de la quantité de TAK1. B. Les conditions de stimulation sont les mêmes que A. L'immunoprécipitation de MEKK1 et de MEKK3 a été faite et analysée en essai kinase ou en immunobuvardage. C. Les neutrophiles ont été prétraités avec une concentration croissante de 5z-7-oxozeanol puis stimulés pendant 1 minute avec 30 nM de fMLP. Suite à la lyse, MEKK1 ou MEKK3 ont été immunoprécipités, suivi d'un essai kinase avec le substrat MBP ou d'une analyse en immunobuvardage. D. Les cellules ont été préincubées pendant 30 minutes avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeanol puis stimulées pendant 10 minutes avec 1 nM de GM-CSF ou 30 nM de fMLP. Les cellules ont ensuite été lysées puis analysées en immunobuvardage pour phospho-STAT1 et phospho-STAT5 ainsi que pour STAT5 en contrôle. La figure représente au moins 3 expériences indépendantes.

### **3.2 Impact de TAK1 sur la signalisation du fMLP et du GM-CSF chez le neutrophile humain**

Afin d'évaluer l'impact de TAK1 sur la signalisation des neutrophiles stimulés avec des chimioattractants et des facteurs de croissance, nous avons inhibé la kinase TAK1 avec le 5z-7-oxozeanol, un inhibiteur que plusieurs groupes ont montré comme étant hautement sélectif pour TAK1, par sa capacité à bloquer l'activité kinase de TAK1 sans affecter significativement l'activité des autres MAP3K ou des MAP kinases en aval (Ear *et al.*, 2010; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 2003). Dans ces expériences, les cellules ont été préincubées pendant 30 minutes avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeanol. Cette concentration a été établie comme optimale pour l'inhibition presque complète de l'activité kinase de TAK1 chez le neutrophile humain (Ear *et al.*, 2010). Ensuite, les cellules ont été stimulées avec soit le fMLP ou le GM-CSF et l'état de phosphorylation des différents éléments de la signalisation a été observé par immunobuvardage. Comme le présente la figure 6, le fMLP et le GM-CSF provoque la phosphorylation de p38 MAPK, de ERK1/2 et de AKT, comme attendu (McLeish *et al.*, 1998; Nick *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1999). À l'opposé, JNK n'est pas activée par ces stimuli (données non montrées). L'inhibition de TAK1 a réduit presque totalement la phosphorylation de ERK1/2, tout en ayant peu ou pas d'effet sur les autres kinases (figure 6). Donc, il semble que TAK1 se retrouve en amont de la cascade de signalisation MEK/ERK chez les neutrophiles humains stimulés au fMLP et au GM-CSF. Des résultats semblables ont été obtenus avec des stimulations sur LTB4 et au PAF (données non montrées).



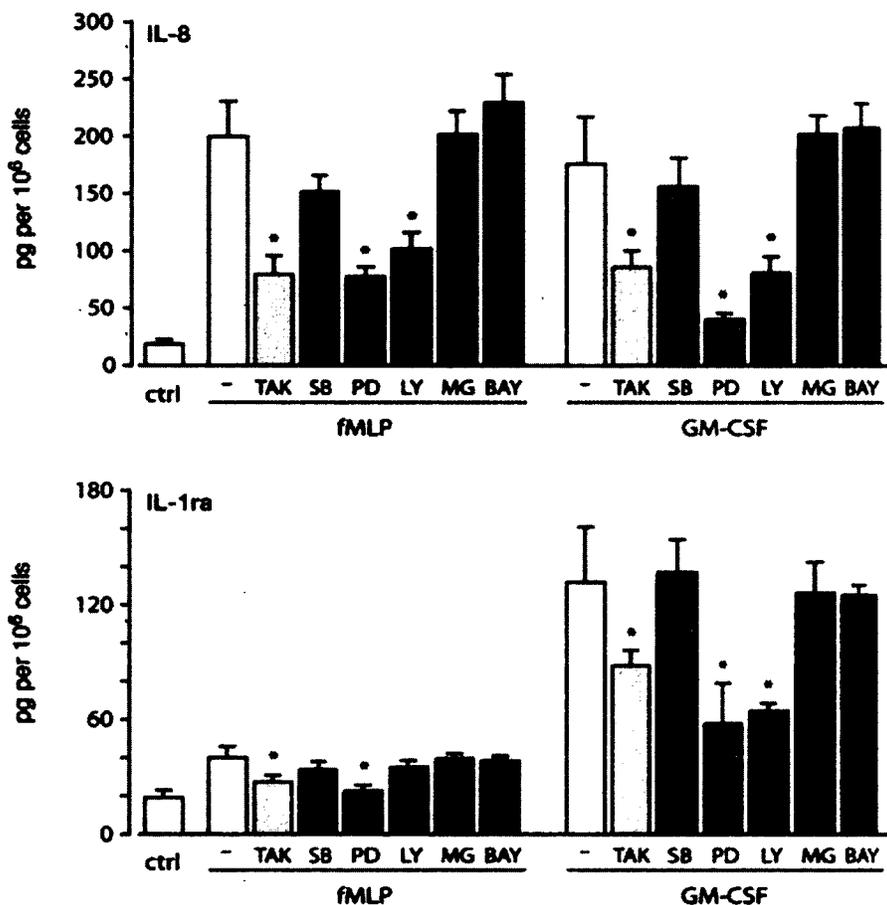
**Figure 6 Impact de l'inhibition de TAK1 sur la signalisation MAPK et PI3K**

Les neutrophiles ont été préincubées pendant 30 minutes avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeanol puis stimulées pendant 10 minutes avec 1 nM de GM-CSF ou 30 nM de fMLP. Les lysats totaux ont été analysés en immunobuvardages pour différentes phospho-protéines de la signalisation et pour p38 MAPK comme contrôle. La figure représente au moins 3 expériences indépendantes.

### 3.3 Effet de l'inhibition de TAK1 sur l'expression et la sécrétion de cytokines par le neutrophile humain

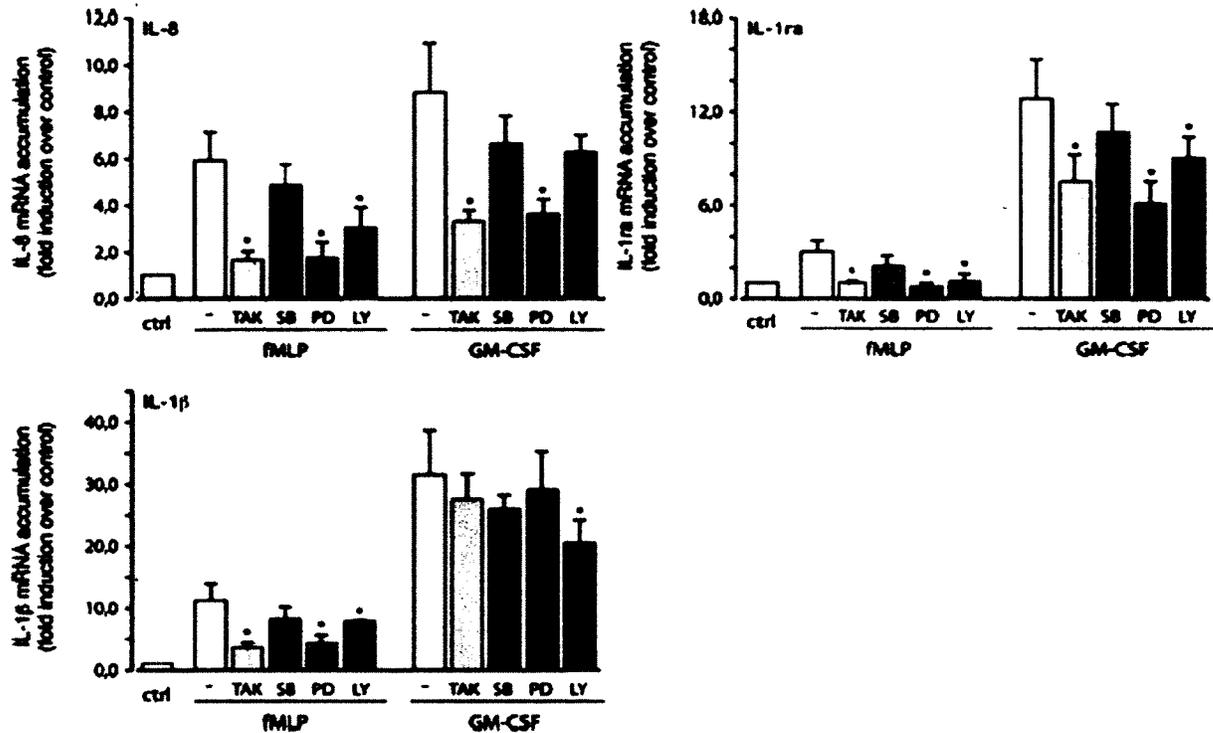
Notre laboratoire a déjà montré que plusieurs des cytokines exprimées par le neutrophile en réponse au LPS et au TNF $\alpha$  étaient sous le contrôle des voies de signalisation IKK/NF- $\kappa$ B et MAP kinase (Cloutier *et al.*, 2007). Plus récemment, nous avons également montré l'implication de la voie PI3K/AKT dans ce processus (Fortin *et al.*, 2011). Dans la présente étude, nous nous sommes penchés sur les conséquences de l'inhibition de TAK1 sur la sécrétion de médiateurs inflammatoires par le neutrophile. Pour cela, les neutrophiles ont été préincubés avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeanol puis stimulés au fMLP ou au GM-CSF. La quantité de cytokine relâchée a ensuite été mesurée. La figure 7 montre que l'inhibition de TAK1 réduit considérablement la sécrétion d'IL-8 et d'IL-1RA en réponse au fMLP et au GM-CSF. De plus, nous avons trouvé que l'inhibition des voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/AKT réduisait grandement la capacité des neutrophiles à sécréter ces médiateurs, tandis que l'inhibition de la voie p38 MAPK n'avait pas d'effet

significatif sur cette réponse (figure 7). Ce résultat est en accord avec les précédents voulant que l'activation de la voie MEK/ERK soit dépendante de TAK1 et indique que la voie PI3K/AKT régule la sécrétion de médiateurs inflammatoires indépendamment de TAK1. Finalement, les résultats de la figure 7 montrent que les inhibiteurs de NF- $\kappa$ B n'affectent pas la production d'IL-8 et d'IL-1RA en réponse au fMLP et au GM-CSF, ce qui est cohérent avec le fait que le GM-CSF n'active pas la voie NF- $\kappa$ B chez le neutrophile humain et que le fMLP ne l'active que faiblement et tardivement (McDonald *et al.*, 1997).



**Figure 7 Effet de l'inhibition de TAK1 sur la sécrétion de cytokines par le neutrophile**  
 Les neutrophiles ont été prétraités pendant 30 minutes avec ou sans (« - ») 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeanol (« TAK »), un inhibiteur de p38 (1  $\mu$ M SB 202190 « SB »), un inhibiteur de MEK/ERK (20  $\mu$ M PD 98059 « PD »), un inhibiteur de PI3K (10  $\mu$ M LY 294002 « LY ») ou des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (15  $\mu$ M MG-132 « MG », ou 5  $\mu$ M BAY 11-7082 « BAY »). Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 2 heures avec 30 nM de fMLP ou 1 nM de GM-CSF. Les surnageants ont été récoltés et analysés en ELISA. Les résultats représentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes.

Puisque la sécrétion d'IL-8 et d'IL-1RA est généralement précédée d'une accumulation du transcrite d'ARNm, nous nous sommes interrogés sur les effets de l'inhibition des différentes voies de signalisation sur l'accumulation d'ARNm. En plus des gènes de l'IL-8 et de l'IL-1RA, nous avons étudié ces effets sur le gène de l'IL-1 $\beta$ , puisque ce dernier est induit par le fMLP et le GM-CSF, bien que cette induction ne provoque pas de relâche d'IL-1 $\beta$  (Malyak *et al.*, 1994). Les résultats de la figure 8 montrent que l'inhibition de TAK1 et des voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/AKT diminue fortement l'induction de l'expression des gènes de l'IL-8, de l'IL-1RA et de l'IL-1 $\beta$  en réponse au fMLP et au GM-CSF. Inversement, l'inhibition de la voie p38 MAPK n'affecte pas significativement l'expression génique d'IL-8, d'IL-1RA et d'IL-1 $\beta$  (figure 8). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour la sécrétion de cytokines et ensemble, ils montrent qu'en réponse à des facteurs chimiotactiques et des facteurs de croissance, les voies de signalisation TAK1/MEK/ERK et PI3K/AKT sont d'importants régulateurs de l'expression et de la sécrétion de cytokines chez le neutrophile humain.



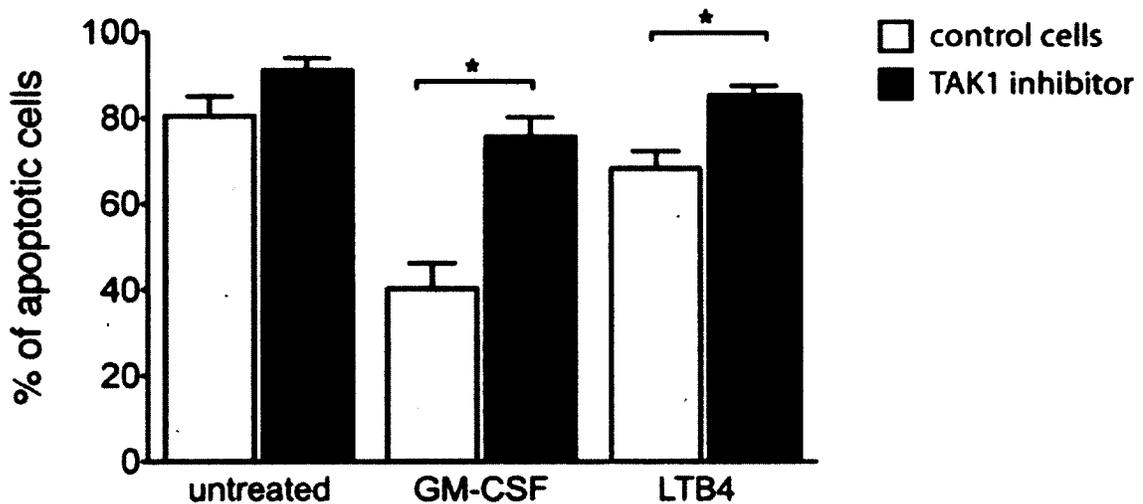
**Figure 8 Effet de l'inhibition de TAK1 sur l'expression de cytokines par le neutrophile humain**

Les neutrophiles ont été prétraités pendant 30 minutes avec ou sans (« - ») 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeanol (« TAK »), un inhibiteur de p38 (1  $\mu$ M SB 202190 « SB »), un inhibiteur de MEK/ERK (20  $\mu$ M PD 98059 « PD ») ou un inhibiteur de PI3K (10  $\mu$ M LY 294002 « LY »). Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 30 minutes avec 30 nM de fMLP ou 1 nM de GM-CSF. L'ARN total a été isolé, soumis à la transcription inverse et analysé par PCR en temps réel pour l'expression de cytokines. Les résultats représentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes.

### 3.4 Effet de l'inhibition de TAK1 sur le retard de l'apoptose du neutrophile humain

Les neutrophiles deviennent apoptotiques rapidement lorsqu'ils sont mis en culture et ce phénomène peut être ralenti par différents stimuli. Pour des stimuli tels que des chimioattractants (ex. LTB<sub>4</sub>, PAF, C5a) ainsi que pour le GM-CSF, il est connu que ce retard de l'apoptose implique la voie de signalisation MEK/ERK (Khreiss *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1993). Il a également été établi que le fMLP n'affecte pas l'apoptose du neutrophile (Klein *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1993). Puisque nos résultats précédents avec les chimioattractants montraient TAK1 en amont de la voie MEK/ERK,

nous avons étudié les effets de l'inhibition de TAK1 sur le retard de l'apoptose avec le LTB4 et le GM-CSF. Les résultats de la figure 9 montrent que l'inhibiteur de TAK1 seul n'a pas d'effet sur l'apoptose constitutive du neutrophile. De plus, le LTB4 et le GM-CSF induisent un retard de l'apoptose du neutrophile et la présence du 5z-7-oxozeanol enlève cet effet (figure 9). Donc, TAK1 semble être un intermédiaire important dans la modulation de l'apoptose du neutrophile en réponse à des chimioattractants et des facteurs de croissance.



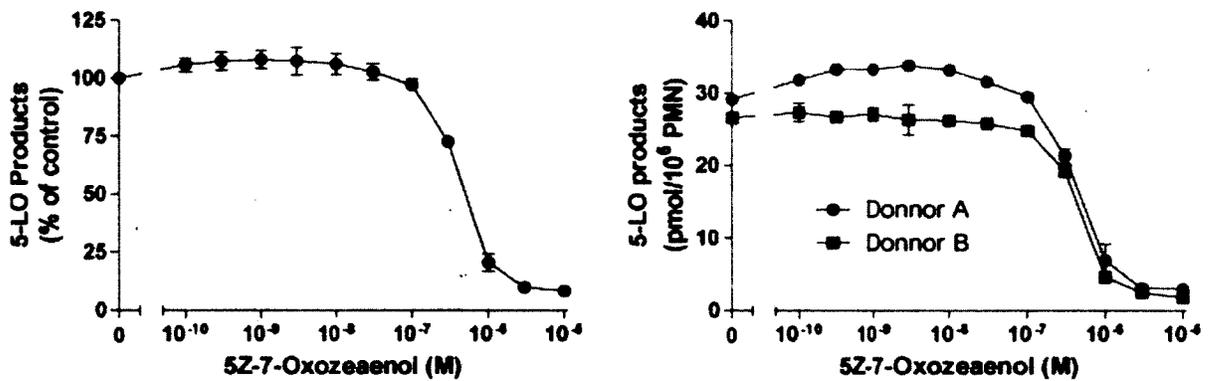
**Figure 9 Impact de l'inhibition de TAK1 sur l'apoptose retardée du neutrophile humain**

Les neutrophiles ont été préincubés pendant 30 minutes avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeanol puis stimulés avec 1 nM de GM-CSF ou 100 nM de LTB4 et mis en culture pour 24 heures. Les cellules ont ensuite été analysées par FACS scan pour la liaison de l'annexine V, pour un minimum de 10 000 cellules. Le graphique représente les données compilées d'au moins 3 expériences indépendantes.

### 3.5 Effet de l'inhibition de TAK1 sur la synthèse de médiateurs lipidiques par le neutrophile humain

Dans certaines conditions, les neutrophiles peuvent produire des médiateurs lipidiques, dont le LTB4 (DiPersio *et al.*, 1988). De plus, il a été démontré que ce processus

était dépendant de la voie de signalisation MEK/ERK (Gibbs et Grabbe, 1999; Milella *et al.*, 1997; Miura *et al.*, 1999). Puisque nos résultats indiquent que TAK1 est en amont de la voie MEK/ERK, nous nous sommes questionnés sur son rôle dans la production de leucotriènes par le fMLP chez le neutrophile humain. La figure 10 montre qu'une concentration croissante de 5z-7-oxozeanol diminue la production de leucotriènes par les neutrophiles. Donc, il semble que TAK1 soit également un facteur clé dans la production de leucotriènes par les neutrophiles humains en réponse au fMLP.



**Figure 10 Effet de l'inhibition de TAK1 sur la synthèse de leucotriènes par le neutrophile humain**

Les neutrophiles ont été pré-traités avec 0,1 U/ mL d'adénosine déaminase, 700 pM de GM-CSF, 1,5 nM de TNF $\alpha$  et 10  $\mu$ M de cytochalasin B pour 30 minutes puis stimulés avec 300 nM de fMLP pour 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été analysés pour la synthèse de produits de la 5-LO. Les résultats sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

## CHAPITRE 4 : Discussion et conclusion

### 4.1 Discussion

Dans ce mémoire, nous avons étudié l'implication de TAK1 dans la signalisation et les réponses fonctionnelles du neutrophile humain en réponse à des chimioattractants (fMLP) et facteurs de croissance (GM-CSF). Les travaux antérieurs du laboratoire avaient démontré qu'en réponse à des cytokines ou des ligands des TLR, TAK1 se situe en amont des voies de signalisation p38 MAPK, MEK/ERK, JNK, IKK/NF- $\kappa$ B et PI3-K/AKT (Ear *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2011). De plus, ces travaux ont démontré l'implication essentielle de TAK1 dans des réponses fonctionnelles du neutrophile, comme l'expression et la sécrétion de cytokines ainsi que l'induction du retard de l'apoptose (Ear *et al.*, 2010). Ces travaux, comme la plupart des études faites sur TAK1, ont été effectués en réponse à de puissants activateurs de NF- $\kappa$ B, soit le LPS et le TNF $\alpha$ . Or, on ne connaissait pas si TAK1 pouvait participer aux effets d'autres stimuli, qu'on retrouve fréquemment aux sites inflammatoires et infectieux, mais qui n'activent pas NF- $\kappa$ B. Dans ce mémoire, nous rapportons que TAK1 est importante pour plusieurs réponses du neutrophile aux chimioattractants et facteurs de croissance, soit l'expression et la sécrétion de cytokines et de chimiokines, l'induction du retard de l'apoptose et la production de leucotriènes. Nous rapportons également que, au contraire de la réponse au LPS et au TNF $\alpha$ , l'implication de TAK1 dans la signalisation du fMLP et du GM-CSF n'affecte que la voie de signalisation MEK/ERK, malgré l'activation des voies p38 MAPK et PI3-K par ces stimuli. Nous montrons également l'implication des voies ERK et PI3-K dans la sécrétion de cytokines et de chimiokines par le fMLP et le GM-CSF. Ces résultats sont la première démonstration de l'implication de TAK1 dans les réponses cellulaires de facteurs de croissance et de chimioattractants.

Nous avons d'abord pu confirmer que TAK1 pouvait être activée par d'autres classes de stimuli que des activateurs NF- $\kappa$ B. Puisque TAK1 semble se situer uniquement en amont de la voie MEK/ERK en réponse aux facteurs de croissance et aux chimioattractants, il est possible de se questionner sur les kinases agissant en amont des autres voies de signalisation. Nous avons montré que seulement le fMLP active les MAP3K MEKK1 et MEKK3, ce qui soulève la possibilité d'une implication potentielle en amont de

la voie p38. Dans le cas du GM-CSF, puisque l'activation des MAP3K autres que TAK1 n'a pu être démontrée, nous pouvons seulement exclure MEKK1 et MEKK3. Nous savons également que la MAP3K ASK1 n'est pas exprimée chez le neutrophile (données non publiées). Plusieurs groupes ont proposé une coopération entre TAK1 et MEKK3 dans l'activation du NF- $\kappa$ B (Blonska *et al.*, 2005; Di *et al.*, 2008; Yamazaki *et al.*, 2009). À ce sujet, nos résultats montrent que l'activité kinase de MEKK3 est dépendante de l'activité kinase de TAK1 dans des neutrophiles stimulés au fMLP, ce qui semble s'accorder avec la littérature (Blonska *et al.*, 2005; Di *et al.*, 2008; Yamazaki *et al.*, 2009). Au contraire de MEKK3, nos résultats montrent que MEKK1 est indépendante de l'activité kinase de TAK1. Aucune démonstration d'une association entre TAK1 et MEKK1 n'a encore été faite dans la littérature.

Plusieurs réponses du neutrophile sont dépendantes de l'activation des MAPK. Notre laboratoire a montré l'implication des voies p38 MAPK, ERK et PI3-K/AKT dans la production de cytokines et de chimiokines chez le neutrophile humain stimulé avec du LPS ou du TNF $\alpha$  (Cloutier *et al.*, 2007; Fortin *et al.*, 2011). Nous montrons ici qu'en réponse au fMLP et au GM-CSF, seules les voies ERK et PI3-K/AKT sont impliquées dans la génération de cytokines et de chimiokines. En effet, l'inhibition de l'une ou l'autre de ces voies provoque une diminution importante de l'expression et la sécrétion d'IL-8 et d'IL-1RA. L'expression génique d'IL-1 $\beta$  était également diminuée par ces inhibiteurs (SSP, données non montrées). La hiérarchie de ERK en aval de TAK1 est cohérente avec les résultats obtenus avec l'inhibiteur de la voie MEK/ERK, puisque l'inhibition de TAK1 a permis d'obtenir des résultats semblables. À l'inverse, l'inhibition de la voie p38 MAPK n'a pas significativement diminué l'expression ou la sécrétion d'IL-8 et d'IL-1RA. L'expression d'IL-1 $\beta$  n'a pas non plus été affectée (SSP, données non montrées). Enfin, l'utilisation de divers inhibiteurs de NF- $\kappa$ B n'a pas affecté la production d'IL-8 et d'IL-1RA, ce qui est cohérent avec le fait que le fMLP et le GM-CSF n'activent pas ce facteur de transcription chez les neutrophiles (McDonald, 2004; McDonald *et al.*, 1997). Puisque notre étude exclut la participation de NF- $\kappa$ B à la production de cytokines et de chimiokines en réponse au fMLP et au GM-CSF, nous avons commencé à nous pencher sur l'implication d'autres facteurs de transcription dans ce processus. Nous avons pu observer que les facteurs CREB et C/EBP sont phosphorylés par les deux stimuli (SSP, données non

montrées). Ces résultats sont potentiellement importants, puisque l'implication des facteurs C/EBP dans la production de cytokines en réponse au LPS et au TNF $\alpha$  chez le neutrophile a été démontrée (Cloutier *et al.*, 2009). Leur activation laisse présager leur implication dans les réponses du fMLP et du GM-CSF. Ces facteurs de transcription, ainsi que l'implication de TAK1 dans ce processus sont en cours d'étude.

Nous avons confirmé que le GM-CSF et le LTB4 induisaient un retard de l'apoptose du neutrophile et montré que ce processus était dépendant de TAK1. Ces deux stimuli sont connus pour leurs effets anti-apoptotiques (Brach *et al.*, 1992; Hebert *et al.*, 1996). Pour cette partie de l'étude, nous avons utilisé le LTB4 à la place du fMLP puisque ce dernier n'affecte pas l'apoptose spontanée du neutrophile (Brach *et al.*, 1992). Par ailleurs, nos résultats montrent que TAK1 est impliquée dans la signalisation induite par le LTB4 d'une façon semblable à ce que nous avons observé avec le fMLP. Plusieurs voies de signalisation sont connues pour leur rôle dans la survie cellulaire. Des études ont montré que le phénomène de retard de l'apoptose utilise les voies de signalisation PI3-K/AKT, p38 et MEK/ERK en réponse à plusieurs stimuli (Khreiss *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2000; Petrin *et al.*, 2006). Aussi, une étude a suggéré que la protéine antiapoptotique impliquée est MCL-1 (Derouet *et al.*, 2004). Donc, puisque l'inhibition de TAK1 empêche le retard de l'apoptose et que nous avons démontré que TAK1 agit en amont de ERK, cela suggère que l'effet de TAK1 sur le retard de l'apoptose en réponse au LTB4 et au GM-CSF procède par la voie MEK/ERK. À l'inverse, nos résultats indiquent que la participation de la voie PI3-K/AKT au retard de l'apoptose est indépendante de TAK1, comme ce qui a été observé pour la production de cytokines et de chimiokines. Finalement, nous avons observé que l'expression de MCL-1 semble dépendante de MEK/ERK et de PI3-K/AKT (SSP, données non montrées), laissant présumer l'implication de TAK1, qui se trouve en amont de la voie MEK/ERK.

En dernier lieu, puisque nous avons démontré l'implication de TAK1 dans la signalisation du fMLP et du GM-CSF et puisque les neutrophiles sont connus pour produire du LTB4 en réponse au fMLP suite à une préstimulation au GM-CSF (DiPersio *et al.*, 1988), nous nous sommes penchés sur une autre fonction du neutrophile, soit la production de leucotriènes. Nous avons précédemment observé que TAK1 était impliquée dans plusieurs réponses du neutrophile. Cette réponse dépend ultimement d'une activation de la

cPLA2, nécessaire à la libération d'acide arachidonique (AA). Il a été démontré que ce processus est dépendant de la voie de signalisation MEK/ERK (Milella *et al.*, 1997; Miura *et al.*, 1999). Dans notre étude, nous montrons que la production de leucotriènes par du fMLP combiné au GM-CSF est dépendante de l'activité de TAK1. En effet, l'inhibition de TAK1 bloque la production de dérivés de la 5-LO. Notre démonstration que TAK1 agit en amont de ERK, de concert avec la littérature, indique que les effets de TAK1 sur la production de leucotriènes passent probablement par la voie MEK/ERK. Ainsi, il s'avère que dans les différentes réponses du neutrophile que nous avons étudiées avec le fMLP et le GM-CSF, l'axe de signalisation TAK1/MEK/ERK est un élément central.

## 4.2 Conclusion

En conclusion, le neutrophile est une composante essentielle de l'immunité en étant la première cellule recrutée à un site inflammatoire. À ce site, les neutrophiles rencontrent plusieurs stimuli qui provoquent plusieurs réponses cellulaires, dont la sécrétion de cytokines, chimiokines et médiateurs lipidiques, comme les leucotriènes, ainsi que le retard de l'apoptose. Parmi les stimuli qui se retrouvent dans un site inflammatoire, il y a des chimioattractants produits par les bactéries, comme le fMLP, et des facteurs de croissance produits par les macrophages et par d'autres cellules, comme le GM-CSF. Les travaux rapportés dans ce mémoire montrent que :

- Le fMLP et le GM-CSF activent la MAP3K, TAK1.
- L'activation des voies de signalisation p38 MAPK, MEK/ERK et PI3-K/AKT par le fMLP et le GM-CSF impliquent TAK1 dans le cas de la voie MEK/ERK.
- Les voies TAK1/MEK/ERK et PI3-K/AKT sont responsables de la production de cytokines et de chimiokines, de l'induction du retard de l'apoptose ainsi que de la production de leucotriènes en réponse au fMLP et au GM-CSF.

Ces résultats sont d'une grande importance puisqu'il s'agit de la première démonstration de l'activation de TAK1 par des chimioattractants et des facteurs de croissance. Puisque ces molécules se retrouvent fréquemment dans les sites inflammatoires

et infectieux, cela peut nous permettre de mieux comprendre les mécanismes qui régulent les fonctions du neutrophile dans un contexte physiopathologique.

### 4.3 Perspectives

Dans le cadre de notre étude sur les effets des chimioattractants et des facteurs de croissance sur les neutrophiles humains, plusieurs avenues restent à explorer. D'abord, nous avons montré que TAK1 agit en amont de seulement la voie MEK/ERK avec le fMLP et le GM-CSF, contrairement à ce qui a été observé dans la littérature, où les voies de signalisation p38 et PI3-K/AKT sont elles aussi sous le contrôle de TAK1 (Ear *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2000; Moriguchi *et al.*, 1996; Shirakabe *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1995). De plus, dans le cas du fMLP, nous avons montré l'activation de d'autres MAP3K, soit MEKK1 et MEKK3. Il serait donc intéressant de se pencher sur leur rôle potentiel dans l'activation des voies de signalisation p38 et PI3K/AKT. Une façon de vérifier cette hypothèse serait d'utiliser notre modèle cellulaire, les PLB-985 différenciés en neutrophiles, afin d'exprimer des dominants négatifs de l'une ou l'autre de ces kinases. Une deuxième option serait l'utilisation de siRNA (small interfering RNAs) spécifiques aux kinases, directement chez le neutrophile et d'observer l'activation des différentes voies de signalisation. Cependant, il faudrait d'abord s'assurer que ces protéines ont un taux de renouvellement assez rapide, ce qui permettrait d'obtenir rapidement une absence de ces kinases.

Finalement, dans cette étude, nous avons commencé à nous intéresser aux phénomènes transcriptionnels impliqués dans la production de cytokines et de chimiokines en réponse au fMLP et au GM-CSF. Nous avons pu établir que ces derniers phosphorylent les facteurs de transcription CREB et C/EBP, mais il reste à déterminer si cela a un impact sur la production de cytokines. Notre modèle cellulaire, les PLB 985, pourraient contribuer à le déterminer. En effet, dans ces cellules, nous pouvons utiliser des vecteurs luciférase pour déterminer l'impact de ces facteurs dans l'activité transcriptionnelle de certains gènes, comme l'IL-8, le MIP-1 ou le TNF. Par la suite, nous pourrions utiliser des dominants

**négatifs ou des surexpressions des facteurs de transcription CREB ou C/EBP et ainsi voir les effets sur la production de cytokines par les cellules.**

## **CHAPITRE 5 : Remerciements**

Je voudrais remercier mes parents, Louise et Alain, ainsi que mon frère, Philippe, pour leur soutien pendant toutes ces années d'études universitaires. Je voudrais remercier spécialement mon copain, Philippe Michel, qui m'a soutenue, encouragée, motivée, amenée à persévérer à travers toutes les épreuves et tous les découragements afin de mener à bien mon projet.

Aussi, je voudrais remercier mes collègues du laboratoire, Carl, Thornin, François, Rim et Thomas, pour leur aide dans mes expériences, pour leur présence dans le laboratoire où on se sent moins seul en groupe et pour le plaisir et les repas partagés avec eux. Je laisse ici une mention spéciale à François qui voulait bien faire mes essais kinase pour moi et à Thomas, à qui j'ai tout appris. Merci à Nicolas Flamand, un ami de Pat, qui a exécuté les expériences de leucotriènes. Merci également à Geneviève, qui a bien voulu répondre à mes multiples questions. Je voudrais aussi remercier mes collègues du laboratoire de Claire Dubois qui ont partagé mes diners pendant ces deux années.

Finalement, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Patrick McDonald, qui m'a donné la chance de participer à ces travaux de recherche, qui m'a fait confiance dans son laboratoire. Merci de m'avoir permis de vivre toutes ces expériences, de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès scientifiques enrichissants, de m'avoir fait adorer les sciences.

## CHAPITRE 6 : Références

- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C.G., Segal, A.W. (1991). Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353, 668-670.
- Abo, A., Webb, M.R., Grogan, A., Segal, A.W. (1994). Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* 298 Pt 3, 585-591.
- Adamson, R.H., Zeng, M., Adamson, G.N., Lenz, J.F., Curry, F.E. (2003). PAF- and bradykinin-induced hyperpermeability of rat venules is independent of actin-myosin contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H406-417.
- Adhikari, A., Xu, M., Chen, Z.J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26, 3214-3226.
- Agarwal, S., Reynolds, M.A., Duckett, L.D., Suzuki, J.B. (1989). Altered free cytosolic calcium changes and neutrophil chemotaxis in patients with juvenile periodontitis. *J Periodontal Res* 24, 149-154.
- Al-Shami, A., Mahanna, W., Naccache, P.H. (1998). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b. *J Biol Chem* 273, 1058-1063.
- Alvaro-Gracia, J.M., Zvaifler, N.J., Firestein, G.S. (1989). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. IV. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-mediated induction of class II MHC antigen on human monocytes: a possible role in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 170, 865-875.
- Antman, K.S., Griffin, J.D., Elias, A., Socinski, M.A., Ryan, L., Cannistra, S.A., Oette, D., Whitley, M., Frei, E., 3rd, Schnipper, L.E. (1988). Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *N Engl J Med* 319, 593-598.
- Arend, W.P., Malyak, M., Guthridge, C.J., Gabay, C. (1998). Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 16, 27-55.
- Atkinson, Y.H., Lopez, A.F., Marasco, W.A., Lucas, C.M., Wong, G.G., Burns, G.F., Vadas, M.A. (1988). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rH GM-CSF) regulates f Met-Leu-Phe receptors on human neutrophils. *Immunology* 64, 519-525.
- Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.

- Babior, B.M. (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16, 42-47.
- Badwey, J.A., Curnutte, J.T., Karnovsky, M.L. (1979). The enzyme of granulocytes that produces superoxide and peroxide. An elusive Pimpernel. *N Engl J Med* 300, 1157-1160.
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15, 675-705.
- Baggiolini, M., Hirsch, J.G., De Duve, C. (1969). Resolution of granules from rabbit heterophil leukocytes into distinct populations by zonal sedimentation. *J Cell Biol* 40, 529-541.
- Bainton, D.F., Farquhar, M.G. (1966). Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *J Cell Biol* 28, 277-301.
- Bainton, D.F., Ulliyot, J.L., Farquhar, M.G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134, 907-934.
- Bajaj, M.S., Kew, R.R., Webster, R.O., Hyers, T.M. (1992). Priming of human neutrophil functions by tumor necrosis factor: enhancement of superoxide anion generation, degranulation, and chemotaxis to chemoattractants C5a and F-Met-Leu-Phe. *Inflammation* 16, 241-250.
- Barreda, D.R., Hanington, P.C., Belosevic, M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 28, 509-554.
- Baud, V., Liu, Z.G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y., Karin, M. (1999). Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* 13, 1297-1308.
- 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.
- Becker, E.L., Kanaho, Y., Kermode, J.C. (1987). Nature and functioning of the pertussis toxin-sensitive G protein of neutrophils. *Biomed Pharmacother* 41, 289-297.
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., Henriques-Normark, B. (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16, 401-407.

- Bentwood, B.J., Henson, P.M. (1980). The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J Immunol* 124, 855-862.
- Berend, N., Armour, C.L., Black, J.L. (1986). Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine causes bronchoconstriction in rabbits. *Agents Actions* 17, 466-471.
- Betz, S.J., Henson, P.M. (1980). Production and release of platelet-activating factor (PAF); dissociation from degranulation and superoxide production in the human neutrophil. *J Immunol* 125, 2756-2763.
- Bischof, R.J., Zafiroopoulos, D., Hamilton, J.A., Campbell, I.K. (2000). Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation. *Clin Exp Immunol* 119, 361-367.
- Blonska, M., Shambharkar, P.B., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B., Lin, X. (2005). TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 280, 43056-43063.
- Bokoch, G.M., Bohl, B.P., Chuang, T.H. (1994). Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 269, 31674-31679.
- Borgeat, P., Samuelsson, B. (1979). Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid. *J Biol Chem* 254, 2643-2646.
- Borregaard, N., Cowland, J.B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503-3521.
- Borregaard, N., Heiple, J.M., Simons, E.R., Clark, R.A. (1983). Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol* 97, 52-61.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Rygaard, K., Bastholm, L., Nielsen, M.H., Sengelov, H., Bjerrum, O.W., Johnsen, A.H. (1992). Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *J Clin Invest* 90, 86-96.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Diamond, M.S., Springer, T.A., Anderson, H.C., Kishimoto, T.K., Bainton, D.F. (1994). Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 56, 80-87.

- Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T., Grinstein, S. (2000). Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 151, 1353-1368.
- Bourgoin, S., Plante, E., Gaudry, M., Naccache, P.H., Borgeat, P., Poubelle, P.E. (1990). Involvement of a phospholipase D in the mechanism of action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): priming of human neutrophils in vitro with GM-CSF is associated with accumulation of phosphatidic acid and diradylglycerol. *J Exp Med* 172, 767-777.
- Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 77-89.
- Brach, M.A., deVos, S., Gruss, H.J., Herrmann, F. (1992). Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 80, 2920-2924.
- Bray, M.A., Cunningham, F.M., Ford-Hutchinson, A.W., Smith, M.J. (1981). Leukotriene B<sub>4</sub>: a mediator of vascular permeability. *Br J Pharmacol* 72, 483-486.
- 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.
- Buchanan, J.T., Simpson, A.J., Aziz, R.K., Liu, G.Y., Kristian, S.A., Kotb, M., Feramisco, J., Nizet, V. (2006). DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16, 396-400.
- Burgess, A.W., Metcalf, D. (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56, 947-958.
- Byrne, A., Reen, D.J. (2002). Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 168, 1968-1977.
- Calafat, J., Kuijpers, T.W., Janssen, H., Borregaard, N., Verhoeven, A.J., Roos, D. (1993). Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b558 and the adhesion molecule CD11b/CD18. *Blood* 81, 3122-3129.
- Campbell, I.K., Rich, M.J., Bischof, R.J., Dunn, A.R., Grail, D., Hamilton, J.A. (1998). Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol* 161, 3639-3644.

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., Goeddel, D.V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443-446.

Carp, H. (1982). Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J Exp Med* **155**, 264-275.

Cassatella, M.A. (1999). Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* **73**, 369-509.

Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M., Berton, G. (1992). IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol* **148**, 3216-3220.

Cassatella, M.A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F., Bonora, S. (1994). Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med* **179**, 1695-1699.

Cheng, S.S., Lai, J.J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. (2001). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils. *J Immunol* **166**, 1178-1184.

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

Clancy, R.M., Dahinden, C.A., Hugli, T.E. (1983). Arachidonate metabolism by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by N-formyl-Met-Leu-Phe or complement component C5a is independent of phospholipase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 7200-7204.

Clark, R.A. (1999). Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* **179 Suppl 2**, S309-317.

Cloutier, A., Ear, T., Blais-Charron, E., Dubois, C.M., McDonald, P.P. (2007). Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils. *J Leukoc Biol* **81**, 567-577.

Cloutier, A., Ear, T., Borissevitch, O., Larivee, P., McDonald, P.P. (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., 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.

- Cohn, Z.A., Hirsch, J.G. (1960). The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 112, 1015-1022.
- Cook, A.D., Braine, E.L., Campbell, I.K., Rich, M.J., Hamilton, J.A. (2001). Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res* 3, 293-298.
- Cross, A.R., Curnutte, J.T. (1995). The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J Biol Chem* 270, 6543-6548.
- Dancey, J.T., Deubelbeiss, K.A., Harker, L.A., Finch, C.A. (1976). Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 58, 705-715.
- Del Maschio, A., Zanetti, A., Corada, M., Rival, Y., Ruco, L., Lampugnani, M.G., Dejana, E. (1996). Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135, 497-510.
- Delaney, J.R., Mlodzik, M. (2006). TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity. *Cell Cycle* 5, 2852-2855.
- Delclaux, C., Delacourt, C., D'Ortho, M.P., Boyer, V., Lafuma, C., Harf, A. (1996). Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 288-295.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., Chen, Z.J. (2000). Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361.
- DeNichilo, M.O., Stewart, A.G., Vadas, M.A., Lopez, A.F. (1991). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a stimulant of platelet-activating factor and superoxide anion generation by human neutrophils. *J Biol Chem* 266, 4896-4902.
- Derian, C.K., Santulli, R.J., Rao, P.E., Solomon, H.F., Barrett, J.A. (1995). Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. *J Immunol* 154, 308-317.
- Derouet, M., Thomas, L., Cross, A., Moots, R.J., Edwards, S.W. (2004). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem* 279, 26915-26921.

Devillier, P., Bessard, G. (1997). Thromboxane A2 and related prostaglandins in airways. *Fundam Clin Pharmacol* 11, 2-18.

Di, Y., Li, S., Wang, L., Zhang, Y., Dorf, M.E. (2008). Homeostatic interactions between MEKK3 and TAK1 involved in NF-kappaB signaling. *Cell Signal* 20, 705-713.

Dinarello, C.A. (1997). Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 253-265.

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

Djeu, J.Y., Serbousek, D., Blanchard, D.K. (1990). Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 76, 1405-1409.

Dransfield, I., Buckle, A.M., Savill, J.S., McDowall, A., Haslett, C., Hogg, N. (1994). Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol* 153, 1254-1263.

Dripps, D.J., Brandhuber, B.J., Thompson, R.C., Eisenberg, S.P. (1991). Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J Biol Chem* 266, 10331-10336.

Dubravec, D.B., Spriggs, D.R., Mannick, J.A., Rodrick, M.L. (1990). Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6758-6761.

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 human neutrophils. *J Immunol* 175, 1834-1842.

Ear, T., Fortin, C.F., Simard, F.A., McDonald, P.P. (2010). Constitutive association of TGF-beta-activated kinase 1 with the I kappa B kinase complex in the nucleus and cytoplasm of human neutrophils and its impact on downstream processes. *J Immunol* 184, 3897-3906.

Ear, T., McDonald, P.P. (2008). Cytokine generation, promoter activation, and oxidant-independent NF-kappaB activation in a transfectable human neutrophilic cellular model. *BMC Immunol* 9, 14.

Edwards, S.W., Hallett, M.B. (1997). Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 18, 320-324.

- Emerson, S.G., Yang, Y.C., Clark, S.C., Long, M.W. (1988). Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 have overlapping but distinct hematopoietic activities. *J Clin Invest* *82*, 1282-1287.
- Epling-Burnette, P.K., Zhong, B., Bai, F., Jiang, K., Bailey, R.D., Garcia, R., Jove, R., Djeu, J.Y., Loughran, T.P., Jr., Wei, S. (2001). Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* *166*, 7486-7495.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* *101*, 890-898.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* *148*, 2207-2216.
- Falk, S., Goggel, R., Heydasch, U., Brasch, F., Muller, K.M., Wendel, A., Uhlig, S. (1999). Quinolines attenuate PAF-induced pulmonary pressor responses and edema formation. *Am J Respir Crit Care Med* *160*, 1734-1742.
- Fan, Y., Yu, Y., Shi, Y., Sun, W., Xie, M., Ge, N., Mao, R., Chang, A., Xu, G., Schneider, M.D., Zhang, H., Fu, S., Qin, J., Yang, J. (2010). Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *J Biol Chem* *285*, 5347-5360.
- Faurschou, M., Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* *5*, 1317-1327.
- Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M. (1998). Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* *187*, 903-915.
- Fiore, S., Serhan, C.N. (1995). Lipoxin A4 receptor activation is distinct from that of the formyl peptide receptor in myeloid cells: inhibition of CD11/18 expression by lipoxin A4-lipoxin A4 receptor interaction. *Biochemistry* *34*, 16678-16686.
- Fischer, H.G., Bielinsky, A.K., Nitzgen, B., Daubener, W., Hadding, U. (1993). Functional dichotomy of mouse microglia developed in vitro: differential effects of macrophage and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity. *J Neuroimmunol* *45*, 193-201.

- Fischer, H.G., Frosch, S., Reske, K., Reske-Kunz, A.B. (1988). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol* *141*, 3882-3888.
- Ford-Hutchinson, A.W. (1981). Leukotriene B4 and neutrophil function: a review. *J R Soc Med* *74*, 831-833.
- Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, 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.
- Fortin, C.F., Cloutier, A., Ear, T., Sylvain-Prevost, S., Mayer, T.Z., Bouchelaghem, R., McDonald, P.P. (2011). A class IA PI3K controls inflammatory cytokine production in human neutrophils. *Eur J Immunol* *41*, 1709-1719.
- Fortin, C.F., Ear, T., McDonald, P.P. (2009). Autocrine role of endogenous interleukin-18 on inflammatory cytokine generation by human neutrophils. *FASEB J* *23*, 194-203.
- Fox, S., Leitch, A.E., Duffin, R., Haslett, C., Rossi, A.G. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* *2*, 216-227.
- Fujishima, S., Hoffman, A.R., Vu, T., Kim, K.J., Zheng, H., Daniel, D., Kim, Y., Wallace, E.F., Larrick, J.W., Raffin, T.A. (1993). Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. *J Cell Physiol* *154*, 478-485.
- Fuxman Bass, J.I., Alvarez, M.E., Gabelloni, M.L., Vermeulen, M.E., Amaral, M.M., Geffner, J.R., Trevani, A.S. (2008). GM-CSF enhances a CpG-independent pathway of neutrophil activation triggered by bacterial DNA. *Mol Immunol* *46*, 37-44.
- Gamble, J.R., Elliott, M.J., Jaipargas, E., Lopez, A.F., Vadas, M.A. (1989). Regulation of human monocyte adherence by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 7169-7173.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* *3*, 710-720.
- Gasperini, S., Calzetti, F., Russo, M.P., De Gironcoli, M., Cassatella, M.A. (1995). Regulation of GRO alpha production in human granulocytes. *J Inflamm* *45*, 143-151.
- Gay, J.C. (1990). Priming of neutrophil oxidative responses by platelet-activating factor. *J Lipid Mediat* *2 Suppl*, S161-175.

- Gearing, D.P., King, J.A., Gough, N.M., Nicola, N.A. (1989). Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J* 8, 3667-3676.
- Gibbs, B.F., Grabbe, J. (1999). Inhibitors of PI 3-kinase and MEK kinase differentially affect mediator secretion from immunologically activated human basophils. *J Leukoc Biol* 65, 883-890.
- Gillespie, M.N., Moore, C.G., Wright, C.E., O'Connor, W.N. (1987). Salutary effects of prostaglandin E1 in perfused rat lungs injured with hydrogen peroxide. *J Pharmacol Exp Ther* 241, 1-5.
- Girard, D., Paquin, R., Beaulieu, A.D. (1997). Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 325 ( Pt 1), 147-153.
- Goetzl, E.J., Pickett, W.C. (1980). The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol* 125, 1789-1791.
- Goggel, R., Hoffman, S., Nusing, R., Narumiya, S., Uhlig, S. (2002). Platelet-activating factor-induced pulmonary edema is partly mediated by prostaglandin E(2), E-prostanoid 3-receptors, and potassium channels. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 657-662.
- Goh, K., Furusawa, S., Kawa, Y., Negishi-Okitsu, S., Mizoguchi, M. (1989). Production of interleukin-1-alpha and -beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88, 297-303.
- Goldstein, I.M., Malmsten, C.L., Kindahl, H., Kaplan, H.B., Radmark, O., Samuelsson, B., Weissmann, G. (1978). Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 148, 787-792.
- Grove, M., Plumb, M. (1993). C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 13, 5276-5289.
- Gulati, O.P., Malmsten, C., Ponard, G., Gulati, N. (1983). The local edemogenic effects of leukotriene C4 and prostaglandin E2 in rats. *Prostaglandins Leukot Med* 10, 11-17.
- Guthridge, M.A., Stomski, F.C., Thomas, D., Woodcock, J.M., Bagley, C.J., Berndt, M.C., Lopez, A.F. (1998). Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 16, 301-313.
- Gwinn, M.R., Sharma, A., De Nardin, E. (1999). Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 70, 1194-1201.

- Hachicha, M., Naccache, P.H., McColl, S.R. (1995). Inflammatory microcrystals differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by human neutrophils: a possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis. *J Exp Med* 182, 2019-2025.
- Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2994-2998.
- Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8, 533-544.
- Hamilton, J.A., Stanley, E.R., Burgess, A.W., Shadduck, R.K. (1980). Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *J Cell Physiol* 103, 435-445.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92, 3007-3017.
- Hart, P.H., Whitty, G.A., Piccoli, D.S., Hamilton, J.A. (1988). Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity. *J Immunol* 141, 1516-1521.
- Haslett, C., Savill, J.S., Whyte, M.K., Stern, M., Dransfield, I., Meagher, L.C. (1994). Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345, 327-333.
- Hebert, M.J., Takano, T., Holthofer, H., Brady, H.R. (1996). Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol* 157, 3105-3115.
- Hercus, T.R., Thomas, D., Guthridge, M.A., Ekert, P.G., King-Scott, J., Parker, M.W., Lopez, A.F. (2009). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood* 114, 1289-1298.
- Heyworth, P.G., Curnutte, J.T., Nauseef, W.M., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Rosen, H., Clark, R.A. (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J Clin Invest* 87, 352-356.
- Hirsch, J.G., Cohn, Z.A. (1960). Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagocytosis of microorganisms. *J Exp Med* 112, 1005-1014.

Hoffstein, S.T., Friedman, R.S., Weissmann, G. (1982). Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils. *J Cell Biol* 95, 234-241.

Ishizuka, T., Kawakami, M., Hidaka, T., Matsuki, Y., Takamizawa, M., Suzuki, K., Kurita, A., Nakamura, H. (1998). Stimulation with thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 112, 464-470.

Jaconi, M.E., Lew, D.P., Carpentier, J.L., Magnusson, K.E., Sjogren, M., Stendahl, O. (1990). Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J Cell Biol* 110, 1555-1564.

Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K., Li, X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol* 22, 7158-7167.

Kang, T., Yi, J., Guo, A., Wang, X., Overall, C.M., Jiang, W., Elde, R., Borregaard, N., Pei, D. (2001). Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem* 276, 21960-21968.

Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Kunkel, S.L. (1993). Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med* 178, 63-72.

Keitoku, M., Kohzuki, M., Katoh, H., Funakoshi, M., Suzuki, S., Takeuchi, M., Karibe, A., Horiguchi, S., Watanabe, J., Satoh, S., Nose, M., Abe, K., Okayama, H., Shirato, K. (1997). FMLP actions and its binding sites in isolated human coronary arteries. *J Mol Cell Cardiol* 29, 881-894.

Khreiss, T., Jozsef, L., Chan, J.S., Filep, J.G. (2004). Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal* 16, 801-810.

Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S., Pawson, T. (1998). The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 18, 4209-4220.

Kishimoto, K., Matsumoto, K., Ninomiya-Tsuji, J. (2000). TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem* 275, 7359-7364.

Kjeldsen, L., Bainton, D.F., Sengelov, 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.

Kjeldsen, L., Bainton, D.F., Sengelov, H., Borregaard, N. (1994a). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood* 83, 799-807.

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 ( Pt 2), 603-610.

Kjeldsen, L., Sengelov, H., Lollike, K., Nielsen, M.H., Borregaard, N. (1994b). Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood* 83, 1640-1649.

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.

Klein, J.B., Rane, M.J., Scherzer, J.A., Coxon, P.Y., Kettritz, R., Mathiesen, J.M., Buridi, A., McLeish, K.R. (2000). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol* 164, 4286-4291.

Korzenik, J.R., Dieckgraefe, B.K., Valentine, J.F., Hausman, D.F., Gilbert, M.J. (2005). Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 352, 2193-2201.

Krause, K.H., Schlegel, W., Wollheim, C.B., Andersson, T., Waldvogel, F.A., Lew, P.D. (1985). Chemotactic peptide activation of human neutrophils and HL-60 cells. Pertussis toxin reveals correlation between inositol trisphosphate generation, calcium ion transients, and cellular activation. *J Clin Invest* 76, 1348-1354.

Kreck, M.L., Freeman, J.L., Abo, A., Lambeth, J.D. (1996). Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry* 35, 15683-15692.

Kuijpers, T.W., Hoogerwerf, M., Roos, D. (1992). Neutrophil migration across monolayers of resting or cytokine-activated endothelial cells. Role of intracellular calcium changes and fusion of specific granules with the plasma membrane. *J Immunol* 148, 72-77.

Kurt-Jones, E.A., Mandell, L., Whitney, C., Padgett, A., Gosselin, K., Newburger, P.E., Finberg, R.W. (2002). Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 100, 1860-1868.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lazarus, M. (2006). The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mol Nutr Food Res* 50, 451-455.
- Le, Y., Murphy, P.M., Wang, J.M. (2002). Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol* 23, 541-548.
- Lee, A., Whyte, M.K., Haslett, C. (1993). Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 54, 283-288.
- Lee, J., Mira-Arbibe, L., Ulevitch, R.J. (2000). TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 68, 909-915.
- Lee, S.Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C., Choi, Y. (1997). TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7, 703-713.
- Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* 5, 1299-1306.
- Leff, J.A., Baer, J.W., Kirkman, J.M., Bodman, M.E., Shanley, P.F., Cho, O.J., Ostro, M.J., Repine, J.E. (1994). Liposome-entrapped PGE1 posttreatment decreases IL-1 alpha-induced neutrophil accumulation and lung leak in rats. *J Appl Physiol* 76, 151-157.
- Leffell, M.S., Spitznagel, J.K. (1972). Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 6, 761-765.
- Leto, T.L., Lomax, K.J., Volpp, B.D., Nuno, H., Sechler, J.M., Nauseef, W.M., Clark, R.A., Gallin, J.I., Malech, H.L. (1990). Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science* 248, 727-730.
- Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., Serhan, C.N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2, 612-619.
- Li, K.W., Turner, S.M., Emson, C.L., Hellerstein, M.K., Dale, D.C. (2011). Deuterium and neutrophil kinetics. *Blood* 117, 6052-6053; author reply 6053-6054.
- Liboi, E., Jubinsky, P., Andrews, N.C., Nathan, D.G., Mathey-Prevo, B. (1992). Enhanced expression of interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor subunits in murine hematopoietic cells stimulated with hematopoietic growth factors. *Blood* 80, 1183-1189.

- Lindemann, A., Riedel, D., Oster, W., Meuer, S.C., Blohm, D., Mertelsmann, R.H., Herrmann, F. (1988). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor induces interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* *140*, 837-839.
- Malyak, M., Smith, M.F., Jr., Abel, A.A., Arend, W.P. (1994). Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol* *14*, 20-30.
- Marasco, W.A., Phan, S.H., Krutzsch, H., Showell, H.J., Feltner, D.E., Nairn, R., Becker, E.L., Ward, P.A. (1984). Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* *259*, 5430-5439.
- Martinez-Moczygemba, M., Huston, D.P. (2003). Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* *112*, 653-665; quiz 666.
- Marusic, S., Miyashiro, J.S., Douhan, J., 3rd, Konz, R.F., Xuan, D., Pelker, J.W., Ling, V., Leonard, J.P., Jacobs, K.A. (2002). Local delivery of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by retrovirally transduced antigen-specific T cells leads to severe, chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neurosci Lett* *332*, 185-189.
- McCain, R.W., Dessypris, E.N., Christman, J.W. (1993). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* *8*, 28-34.
- McCain, R.W., Holden, E.P., Blackwell, T.R., Christman, J.W. (1994). Leukotriene B<sub>4</sub> stimulates human polymorphonuclear leukocytes to synthesize and release interleukin-8 in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* *10*, 651-657.
- McColl, S.R., Paquin, R., Menard, C., Beaulieu, A.D. (1992). Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* *176*, 593-598.
- McCoy, R., Haviland, D.L., Molmenti, E.P., Ziambaras, T., Wetsel, R.A., Perlmutter, D.H. (1995). N-formylpeptide and complement C5a receptors are expressed in liver cells and mediate hepatic acute phase gene regulation. *J Exp Med* *182*, 207-217.
- McDonald, P.P. (2004). Transcriptional regulation in neutrophils: teaching old cells new tricks. *Adv Immunol* *82*, 1-48.
- 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.

- McDonald, P.P., Bovolenta, C., Cassatella, M.A. (1998a). Activation of distinct transcription factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon-gamma, and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases. *Biochemistry* 37, 13165-13173.
- McDonald, P.P., Gasperini, S., Calzetti, F., Cassatella, M.A. (1998b). Modulation by interferon-gamma of the production and gene expression of IL-1 receptor antagonist in human neutrophils. *Cell Immunol* 184, 45-50.
- McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S., Cassatella, M.A. (1998c). Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* 92, 4828-4835.
- McLeish, K.R., Knall, C., Ward, R.A., Gerwins, P., Coxon, P.Y., Klein, J.B., Johnson, G.L. (1998). Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *J Leukoc Biol* 64, 537-545.
- McQualter, J.L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T.W., Hamilton, J.A., Reid, H.H., Bernard, C.C. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194, 873-882.
- Meda, L., Gasperini, S., Ceska, M., Cassatella, M.A. (1994). Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon. *Cell Immunol* 157, 448-461.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860-866.
- Merritt, J.E., Greener, M., Hallam, T.J., Swayne, G.T. (1991). The involvement of calcium and protein kinase C in modulating agonist-stimulated chemotaxis of human neutrophils. *Cell Signal* 3, 73-77.
- Metcalf, D., Begley, C.G., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Vadas, M.A., Lopez, A.F., Williamson, D.J., Wong, G.G., Clark, S.C., Wang, E.A. (1986). Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 67, 37-45.
- Metcalf, D., Johnson, G.R., Burgess, A.W. (1980). Direct stimulation by purified GM-CSF of the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells. *Blood* 55, 138-147.
- Migeotte, I., Communi, D., Parmentier, M. (2006). Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 501-519.

Milella, M., Gismondi, A., Roncaioli, P., Bisogno, L., Palmieri, G., Frati, L., Cifone, M.G., Santoni, A. (1997). CD16 cross-linking induces both secretory and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent cytosolic phospholipase A2 (PLA2) activity in human natural killer cells: involvement of ERK, but not PLA2, in CD16-triggered granule exocytosis. *J Immunol* 158, 3148-3154.

Miura, K., Schroeder, J.T., Hubbard, W.C., MacGlashan, D.W., Jr. (1999). Extracellular signal-regulated kinases regulate leukotriene C4 generation, but not histamine release or IL-4 production from human basophils. *J Immunol* 162, 4198-4206.

Mizukami, J., Takaesu, G., Akatsuka, H., Sakurai, H., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Sakurai, N. (2002). Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol* 22, 992-1000.

Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., Hagiwara, M. (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* 271, 13675-13679.

Morrissey, P.J., Bressler, L., Park, L.S., Alpert, A., Gillis, S. (1987). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells. *J Immunol* 139, 1113-1119.

Mosmann, T.R. (1994). Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 56, 1-26.

Moulding, D.A., Quayle, J.A., Hart, C.A., Edwards, S.W. (1998). Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* 92, 2495-2502.

Murphy, G., Reynolds, J.J., Bretz, U., Baggiolini, M. (1977). Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem J* 162, 195-197.

Naccache, P.H., Faucher, N., Borgeat, P., Gasson, J.C., DiPersio, J.F. (1988). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the excitation-response coupling sequence in human neutrophils. *J Immunol* 140, 3541-3546.

Nathan, C.F. (1989). Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood* 73, 301-306.

Nick, J.A., Avdi, N.J., Young, S.K., Knall, C., Gerwins, P., Johnson, G.L., Worthen, G.S. (1997). Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest* 99, 975-986.

- Nie, D., Lamberti, M., Zacharek, A., Li, L., Szekeres, K., Tang, K., Chen, Y., Honn, K.V. (2000). Thromboxane A(2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 245-251.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kajino, T., Ono, K., Ohtomo, T., Matsumoto, M., Shiina, M., Mihara, M., Tsuchiya, M., Matsumoto, K. (2003). A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase. *J Biol Chem* 278, 18485-18490.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.
- Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N., Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9, 617-648.
- Palmer, R.M., Salmon, J.A. (1983). Release of leukotriene B4 from human neutrophils and its relationship to degranulation induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, serum-treated zymosan and the ionophore A23187. *Immunology* 50, 65-73.
- Panaro, M.A., Acquafredda, A., Sisto, M., Lisi, S., Maffione, A.B., Mitolo, V. (2006). Biological role of the N-formyl peptide receptors. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 28, 103-127.
- Park, L.S., Martin, U., Sorensen, R., Luhr, S., Morrissey, P.J., Cosman, D., Larsen, A. (1992). Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4295-4299.
- Parkos, C.A., Allen, R.A., Cochrane, C.G., Jesaitis, A.J. (1987). Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 80, 732-742.
- Paul, W.E. (2003). *Fundamental Immunology*, 5e edition edn (Lippincott Williams & Wilkins).
- Pericle, F., Liu, J.H., Diaz, J.I., Blanchard, D.K., Wei, S., Forni, G., Djeu, J.Y. (1994). Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol* 24, 440-444.
- Peters, M.J., Breslin, A.B., Kemp, A.S., Chu, J., Berend, N. (1992). Haematological effects of inhalation of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in man. *Thorax* 47, 284-287.

- Peters, M.J., Panaretto, K., Breslin, A.B., Berend, N. (1991). Effects of prolonged inhalation of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in rabbits. *J Appl Physiol* *70*, 2448-2454.
- Petrin, D., Turcotte, S., Gilbert, A.K., Rola-Pleszczynski, M., Stankova, 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.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A., Tesselaar, K., Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* *116*, 625-627.
- Plevy, S.E., Gemberling, J.H., Hsu, S., Dorner, A.J., Smale, S.T. (1997). Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* *17*, 4572-4588.
- Pope, R.M., Leutz, A., Ness, S.A. (1994). C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene. *J Clin Invest* *94*, 1449-1455.
- Predescu, D., Ihida, K., Predescu, S., Palade, G.E. (1996). The vascular distribution of the platelet-activating factor receptor. *Eur J Cell Biol* *69*, 86-98.
- Rabiet, M.J., Huet, E., Boulay, F. (2007). The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. *Biochimie* *89*, 1089-1106.
- Ramji, D.P., Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* *365*, 561-575.
- Remijnsen, Q., Kuijpers, T.W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T. (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* *18*, 581-588.
- Rice, W.G., Ganz, T., Kinkade, J.M., Jr., Selsted, M.E., Lehrer, R.I., Parmley, R.T. (1987). Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* *70*, 757-765.
- Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* *90*, 909-928.
- Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* *5*, 1307-1315.
- Rossato, M., Cencig, S., Gasperini, S., Cassatella, M.A., Bazzoni, F. (2007). IL-10 modulates cytokine gene transcription by protein synthesis-independent and dependent mechanisms in lipopolysaccharide-treated neutrophils. *Eur J Immunol* *37*, 3176-3189.

Sainathan, S.K., Hanna, E.M., Gong, Q., Bishnupuri, K.S., Luo, Q., Colonna, M., White, F.V., Croze, E., Houchen, C., Anant, S., Dieckgraefe, B.K. (2008). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 14, 88-99.

Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J., Sugita, T. (2000). Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* 474, 141-145.

Sakurai, H., Miyoshi, H., Toriumi, W., Sugita, T. (1999). Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 274, 10641-10648.

Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., Doi, T., Saiki, I. (2003). Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 278, 36916-36923.

Sanchez-Crespo, M., Alonso, F., Egido, J. (1980). Platelet-activating factor in anaphylaxis and phagocytosis. I. Release from human peripheral polymorphonuclears and monocytes during the stimulation by ionophore A23187 and phagocytosis but not from degranulating basophils. *Immunology* 40, 645-655.

Sathyamoorthy, M., de Mendez, I., Adams, A.G., Leto, T.L. (1997). p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem* 272, 9141-9146.

Sato, N., Caux, C., Kitamura, T., Watanabe, Y., Arai, K., Banchereau, J., Miyajima, A. (1993). Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood* 82, 752-761.

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.

Schroder, A.K., von der Ohe, M., Kolling, U., Altstaedt, J., Uciechowski, P., Fleischer, D., Dalhoff, K., Ju, X., Zenke, M., Heussen, N., Rink, L. (2006). Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology* 119, 317-327.

Schultheiss, G., Diener, M. (1999). Inhibition of spontaneous smooth muscle contractions in rat and rabbit intestine by blockers of the thromboxane A2 pathway. *Zentralbl Veterinarmed A* 46, 123-131.

- Schuman, J., Chen, Y., Podd, A., Yu, M., Liu, H.H., Wen, R., Chen, Z.J., Wang, D. (2009). A critical role of TAK1 in B-cell receptor-mediated nuclear factor kappaB activation. *Blood* 113, 4566-4574.
- Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23, 197-223.
- Sengelov, 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.
- Sengelov, H., Kjeldsen, L., Diamond, M.S., Springer, T.A., Borregaard, N. (1993). Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest* 92, 1467-1476.
- Sengelov, H., Kjeldsen, L., Kroeze, W., Berger, M., Borregaard, N. (1994). Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J Immunol* 153, 804-810.
- Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N., Gronert, K. (2000). Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 192, 1197-1204.
- Serhan, C.N., Maddox, J.F., Petasis, N.A., Akritopoulou-Zanze, I., Papayianni, A., Brady, H.R., Colgan, S.P., Madara, J.L. (1995). Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* 34, 14609-14615.
- Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E., Matsumoto, K. (1996). TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272, 1179-1182.
- Shin, M.K., Jang, Y.H., Yoo, H.J., Kang, D.W., Park, M.H., Kim, M.K., Song, J.H., Kim, S.D., Min, G., You, H.K., Choi, K.Y., Bae, Y.S., Min do, S. (2011). N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) promotes osteoblast differentiation via the N-formyl peptide receptor 1-mediated signaling pathway in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 286, 17133-17143.
- Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Nishida, E. (1997). TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 272, 8141-8144.
- Shirakawa, F., Saito, K., Bonagura, C.A., Galson, D.L., Fenton, M.J., Webb, A.C., Auron, P.E. (1993). The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol Cell Biol* 13, 1332-1344.

- Silverstein, S.C., Steinman, R.M., Cohn, Z.A. (1977). Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 46, 669-722.
- Smith, J.A. (1994). Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56, 672-686.
- Smith, M.J., Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A. (1980). Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J Pharm Pharmacol* 32, 517-518.
- Strieter, R.M., Kasahara, K., Allen, R.M., Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Becker, F.S., Chensue, S.W., Kunkel, S.L. (1992). Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am J Pathol* 141, 397-407.
- Sumby, P., Barbian, K.D., Gardner, D.J., Whitney, A.R., Welty, D.M., Long, R.D., Bailey, J.R., Parnell, M.J., Hoe, N.P., Adams, G.G., Deleo, F.R., Musser, J.M. (2005). Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1679-1684.
- Suzuki, K., Hino, M., Hato, F., Tatsumi, N., Kitagawa, S. (1999). Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 93, 341-349.
- Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. (2000). TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5, 649-658.
- Takaesu, G., Surabhi, R.M., Park, K.J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Gaynor, R.B. (2003). TAK1 is critical for I $\kappa$ B kinase-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J Mol Biol* 326, 105-115.
- Takeichi, O., Saito, I., Tsurumachi, T., Saito, T., Moro, I. (1994). Human polymorphonuclear leukocytes derived from chronically inflamed tissue express inflammatory cytokines in vivo. *Cell Immunol* 156, 296-309.
- Takenawa, T., Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114, 1801-1809.
- Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., Kelvin, D.J. (1993). Preferential migration of activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260, 355-358.

- Taylor, I.K., Ward, P.S., Taylor, G.W., Dollery, C.T., Fuller, R.W. (1991). Inhaled PAF stimulates leukotriene and thromboxane A<sub>2</sub> production in humans. *J Appl Physiol* 71, 1396-1402.
- Tennenberg, S.D., Fey, D.E., Lieser, M.J. (1993). Oxidative priming of neutrophils by interferon-gamma. *J Leukoc Biol* 53, 301-308.
- Tofts, P.S., Chevassut, T., Cutajar, M., Dowell, N.G., Peters, A.M. (2011). Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 117, 6050-6052; author reply 6053-6054.
- Tolone, G., Bonasera, L., Brai, M., Tolone, C. (1977). Prostaglandin production by human polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis in vitro. *Experientia* 33, 961-962.
- Townsend, M.J., McKenzie, A.N. (2000). Unravelling the net ? cytokines and diseases. *J Cell Sci* 113 (Pt 20), 3549-3550.
- Tracey, K.J., Cerami, A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45, 491-503.
- Triebel, S., Blaser, J., Reinke, H., Tschesche, H. (1992). A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 314, 386-388.
- Turner, N.C., Wood, L.J., Foster, M., Gueremy, T. (1994). Effects of PAF, FMLP and opsonized zymosan on the release of ECP, elastase and superoxide from human granulocytes. *Eur Respir J* 7, 934-940.
- Tyagi, S.R., Winton, E.F., Lambeth, J.D. (1989). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes human neutrophils for increased diacylglycerol generation in response to chemoattractant. *FEBS Lett* 257, 188-190.
- Uhlig, S., Goggel, R., Engel, S. (2005). Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacol Rep* 57 Suppl, 206-221.
- Uhlig, S., Wollin, L., Wendel, A. (1994). Contributions of thromboxane and leukotrienes to PAF-induced impairment of lung function in the rat. *J Appl Physiol* 77, 262-269.
- Ulich, T.R., Guo, K., Yin, S., del Castillo, J., Yi, E.S., Thompson, R.C., Eisenberg, S.P. (1992). Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. IV. Expression of interleukin-1 alpha/beta and interleukin-1 receptor antagonist mRNA during endotoxemia and during endotoxin-initiated local acute inflammation. *Am J Pathol* 141, 61-68.

- Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8, 668-676.
- Vadas, P., Gold, M., Perelman, B., Liss, G.M., Lack, G., Blyth, T., Simons, F.E., Simons, K.J., Cass, D., Yeung, J. (2008). Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* 358, 28-35.
- Van Dyke, T.E., Warbington, M., Gardner, M., Offenbacher, S. (1990). Neutrophil surface protein markers as indicators of defective chemotaxis in LJP. *J Periodontol* 61, 180-184.
- Van Dyke, T.E., Zinney, W., Winkel, K., Taufiq, A., Offenbacher, S., Arnold, R.R. (1986). Neutrophil function in localized juvenile periodontitis. Phagocytosis, superoxide production and specific granule release. *J Periodontol* 57, 703-708.
- Viswanathan, A., Painter, R.G., Lanson, N.A., Jr., Wang, G. (2007). Functional expression of N-formyl peptide receptors in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25, 1263-1269.
- Volz, A. (1993). Regulation of CD18 expression in human neutrophils as related to shape changes. *J Cell Sci* 106 ( Pt 2), 493-501.
- Waddell, T.K., Fialkow, L., Chan, C.K., Kishimoto, T.K., Downey, G.P. (1994). Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin. *J Biol Chem* 269, 18485-18491.
- Wald, D., Commane, M., Stark, G.R., Li, X. (2001). IRAK and TAK1 are required for IL-18-mediated signaling. *Eur J Immunol* 31, 3747-3754.
- Wallace, P.J., Wersto, R.P., Packman, C.H., Lichtman, M.A. (1984). Chemotactic peptide-induced changes in neutrophil actin conformation. *J Cell Biol* 99, 1060-1065.
- Wan, Y.Y., Chi, H., Xie, M., Schneider, M.D., Flavell, R.A. (2006). The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat Immunol* 7, 851-858.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.
- Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2007a). Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol* 9, 1162-1171.

- Wartha, F., Beiter, K., Normark, S., Henriques-Normark, B. (2007b). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 10, 52-56.
- Weinrauch, Y., Drujan, D., Shapiro, S.D., Weiss, J., Zychlinsky, A. (2002). Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417, 91-94.
- Weisbart, R.H., Kwan, L., Golde, D.W., Gasson, J.C. (1987). Human GM-CSF primes neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to the major physiological chemoattractants. *Blood* 69, 18-21.
- Wientjes, F.B., Hsuan, J.J., Totty, N.F., Segal, A.W. (1993). p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296 ( Pt 3), 557-561.
- Wu, H., Arron, J.R. (2003). TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. *Bioessays* 25, 1096-1105.
- Xu, S.Y., Carlson, M., Engstrom, A., Garcia, R., Peterson, C.G., Venge, P. (1994). Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest* 54, 365-376.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., Matsumoto, K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- Yamamoto, K., Ebina, S., Nakanishi, H., Nakahata, N. (1995). Thromboxane A2 receptor-mediated signal transduction in rabbit aortic smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 26, 1489-1498.
- Yamazaki, K., Gohda, J., Kanayama, A., Miyamoto, Y., Sakurai, H., Yamamoto, M., Akira, S., Hayashi, H., Su, B., Inoue, J. (2009). Two mechanistically and temporally distinct NF-kappaB activation pathways in IL-1 signaling. *Sci Signal* 2, ra66.
- Yee, J., Christou, N.V. (1993). Neutrophil priming by lipopolysaccharide involves heterogeneity in calcium-mediated signal transduction. Studies using fluo-3 and flow cytometry. *J Immunol* 150, 1988-1997.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Shimizu, T. (2001). Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 385, 231-241.
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., Karin, M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91, 243-252.
- Zurier, R.B. (1976). Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 2, 815-818.

Zychlinsky, A., Weinrauch, Y., Weiss, J. (2003). Introduction: Forum in immunology on neutrophils. *Microbes Infect* 5, 1289-1291.