

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**Signalisation en amont de la voie NF- $\kappa$ B et son impact sur la production de  
cytokines chez les neutrophiles humains**

Par  
Thornin Ear

Sous la direction du Dr. Patrick P. McDonald, Ph.D.

Programme d'Études Supérieures en Immunologie  
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
Université de Sherbrooke

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Immunologie

Décembre 2008



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: 978-0-494-52828-0*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-52828-0*

#### 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.

---

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.

#### 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.

---

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**

## AVANT-PROPOS

Avant de débiter ma thèse, il convient de mentionner que celle-ci ne fera état que d'une partie des travaux réalisés au cours de mon doctorat. La liste exhaustive de mes publications apparaît ci-dessous :

**Ear T**, Fortin C, McDonald PP. Involvement of TAK1 in the activation of nuclear IKK, NF- $\kappa$ B, and inflammatory cytokine generation in human neutrophils. 2008. Soumis prochainement.

**Ear T**, McDonald PP. Cytokine generation, promoter activation, and oxidant-independent NF-kappaB activation in a transfectable human neutrophilic cellular model. *BMC Immunol.* 2008 Apr 11; 9:14.

Tamassia N, Calzetti F, **Ear T**, Cloutier A, Gasperini S, Bazzoni F, McDonald PP, Cassatella MA. Molecular mechanisms underlying the synergistic induction of CXCL10 by LPS and IFN- $\gamma$  in human neutrophils. *Eur J Immunol.* 2007 Sep; 37 (9): 2627-34.

Tamassia N, Le Moigne V, Calzetti F, Donini M, Gasperini S, **Ear T**, Cloutier A, Martinez FO, Fabbri M, Locati M, Mantovani A, McDonald PP, Cassatella MA. The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J Immunol.* 2007 Jun 1; 178 (11): 7344-56.

Cloutier A, **Ear T**, Blais-Charron E, Dubois CM, McDonald PP. Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2007 Feb; 81(2): 567-77.

**Ear T**, Cloutier A, McDonald PP. Constitutive nuclear expression of the I kappa B kinase complex and its activation in human neutrophils. *J Immunol.* 2005 Aug 1; 175 (3): 1834-42.

Cassatella MA, Tamassia N, Crepaldi L, McDonald PP, **Ear T**, Calzetti F, Gasperini S, Zanderigo F, Bazzoni F. Lipopolysaccharide primes neutrophils for a rapid response to IL-10. *Eur J Immunol.* 2005 Jun; 35 (6): 1877-85.

Cloutier A, **Ear T**, Borissevitch O, Larivée P, McDonald PP. Inflammatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 signaling cascade in human neutrophils. *J Immunol.* 2003 Oct 1; 171 (7): 3751-61.

Les membres du jury, durant leur lecture, doivent cependant prendre en considération que les résultats que j'ai choisi de présenter dans cette thèse sont imputables à mon seul travail, et ne sont tirés que des publications où je suis le premier auteur (ou co-premier auteur).

## TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
RÉSUMÉ.....	
<b>CHAPITRE I- INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Généralités.....	1
1.2 Neutrophiles humains et leurs fonctions.....	3
1.2.1 Phagocytose.....	5
1.2.2 Dégranulation.....	6
1.2.3 Formation des espèces réactives oxygénées (ROS).....	12
1.2.4 Formation de NETs (neutrophil extracellular traps).....	14
1.2.5 Coopération « neutrophile-macrophage ».....	15
1.2.6 Cellules présentatrices d'antigènes (APCs).....	17
1.2.7 Production des médiateurs lipidiques.....	20
1.2.8 Production des médiateurs peptidiques.....	23
1.3 Régulation de l'expression des gènes des cytokines et des chimiokines.....	31
1.3.1 Activation de la transcription d'un gène.....	31
1.3.2 Régulation transcriptionnelle de quelques gènes de cytokines et de chimiokines dans des cellules autres que les neutrophiles.....	32
1.3.3 Régulation de la transcription chez les neutrophiles.....	35

1.4	Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et les composants de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B.....	39
1.4.1	La famille Rel/ NF- $\kappa$ B .....	39
1.4.1.1	Régulation de l'activité du NF- $\kappa$ B dépendante des I $\kappa$ Bs.....	42
1.4.1.2	Régulation de l'activité du NF- $\kappa$ B indépendante des I $\kappa$ Bs.....	42
1.4.2	La famille des protéines inhibitrices I $\kappa$ Bs.....	44
1.4.2.1	Dégradation des I $\kappa$ Bs.....	48
1.4.3	La famille IKK (I $\kappa$ B kinase).....	50
1.4.3.1	Kinases reliées à IKK (IKK-related kinases).....	54
1.4.3.2	Régulation de l'activation du complexe IKK.....	55
1.4.3.2.1	Régulation de l'activation du complexe IKK par des kinases en amont de celui-ci.....	56
1.4.3.2.2	TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1).....	57
1.4.3.2.3	Régulation de l'activation du complexe IKK par des ubiquitinylation.....	59
1.4.3.3	Rôle nucléaire du complexe IKK.....	62
1.4.3.3.1	Rôle nucléaire de IKK $\alpha$ .....	64
1.4.3.3.2	Rôle nucléaire de IKK $\beta$ .....	65
1.4.3.3.3	Rôle nucléaire de NEMO/IKK $\gamma$ .....	66
1.4.4	Espèces réactives oxygénées (ROS) et signalisation du NF- $\kappa$ B.....	67
1.4.4.1	Rôle controversé des ROS dans l'activation du NF- $\kappa$ B.....	69
	<b>Mise en contexte, hypothèse et objectifs de l'étude.....</b>	<b>72</b>

<b>CHAPITRE II- MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>75</b>
2.1 Produits utilisés.....	75
2.2 Techniques expérimentales.....	76
2.2.1 Isolement des neutrophiles.....	76
2.2.2 Culture des cellules PLB-985.....	77
2.2.3 Fractionnements cellulaires et immunobuvardages de type Western.....	78
2.2.4 Immunoprécipitations et immunobuvardages de type Western.....	79
2.2.5 Immunoprécipitations et essais kinase in vitro.....	80
2.2.6 Essais EMSA (Electrophoretic mobility shift assays).....	81
2.2.7 Extraction d'ARN et analyses par RPA (RNase Protection Assay) ou par RT-PCR en temps réel.....	81
2.2.8 Analyses par ELISA.....	83
2.2.9 Analyses de cytofluorimétrie.....	83
2.2.10 Transfections transitoires par électroporation ou par nucléofection.....	84
2.2.11 Essais de Luciférase.....	85
2.2.12 Mesures de l'activité NADPH oxidase.....	85
2.2.13 Essais d'apoptose.....	86
2.3 Analyses statistiques.....	87
<b>CHAPITRE III- RÉSULTATS.....</b>	<b>88</b>
<b>Section 1: Expression et activation nucléaire du complexe IKK chez les         neutrophiles humains.....</b>	<b>88</b>
3.1.1 Rôle du NF- $\kappa$ B dans l'induction de l'expression de certaines cytokines et chimiokines chez les neutrophiles humains.....	89

3.1.2	Expression et distribution des isoformes du complexe IKK chez les neutrophiles humains.....	94
3.1.3	Phosphorylation inductible des isoformes du complexe IKK et de RelA chez les neutrophiles humains.....	99
3.1.4	Navette entre le noyau et le cytoplasme des divers composants de la cascade IKK/I $\kappa$ B chez les neutrophiles humains.....	103
3.1.5	Des kinases en amont du complexe IKK chez les neutrophiles humains....	106
3.1.6	Association à la chromatine des isoformes du complexe IKK dans les neutrophiles activés.....	110

**Section 2: Implication de la kinase TAK1 dans l'activation du complexe IKK chez les neutrophiles humains.....**

3.2.1	Expression et distribution de la kinase TAK1 et de ses protéines associées (TAB1 et TAB2) chez les neutrophiles humains.....	115
3.2.2	Association de la kinase TAK1 avec les protéines TAB1 et TAB2 ou avec les kinases IKK $\alpha/\beta$ chez les neutrophiles humains.....	119
3.2.3	Activation et inhibition de la kinase TAK1 chez les neutrophiles humains.....	121
3.2.4	Impact de la kinase TAK1 sur la cascade d'activation IKK/NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles humains.....	125
3.2.5	Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur l'expression et la sécrétion de certaines cytokines et chimiokines chez les neutrophiles humains.....	128



3.2.6	Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur d'autres cascades de signalisation chez les neutrophiles humains.....	132
3.2.7	Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur le retardement de l'apoptose chez les neutrophiles humains.....	135

**Section 3: L'activité inductible du NF- $\kappa$ B n'est pas modulable par les ROS endogènes chez les neutrophiles humains.....**

3.3.1	Effet des ROS endogènes sur la cascade d'activation IKK/I $\kappa$ B chez les neutrophiles humains.....	138
3.3.2	Caractéristiques des cellules PLB-985 non-différenciées et différenciées... .....	140
3.3.3	Effet des ROS endogènes sur l'activation inductible du NF- $\kappa$ B chez les cellules PLB-985 de type neutrophilique.....	142
3.3.4	Effet des ROS endogènes sur l'activation inductible des gènes rapporteurs sous le contrôle du NF- $\kappa$ B chez les cellules PLB-985 de type neutrophilique.....	145

**CHAPITRE IV- DISCUSSION.....**

4.1	Expression et activation nucléaire du complexe IKK chez les neutrophiles humains.....	150
4.2	Implication de la kinase TAK1 dans l'activation du complexe IKK chez les neutrophiles humains.....	158
4.3	L'activité inductible du NF- $\kappa$ B n'est pas modulable par les ROS endogènes chez les neutrophiles humains.....	164

<b>CHAPITRE V- CONCLUSION.....</b>	<b>169</b>
<b>CHAPITRE VI- PERSPECTIVES.....</b>	<b>173</b>
REMERCIEMENTS.....	177
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	179

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### Chapitre 1 (introduction)

Figure 1.1	Défense immunitaire de neutrophiles .....	9
Tableau 1.1	Les protéines de granules des neutrophiles.....	10
Figure 1.2	Assemblage et activation de la NADPH oxydase .....	11
Tableau 1.2	Les cytokines et chimiokines produites par les neutrophiles.....	29
Figure 1.3	Neutrophiles et régulation de réponse immunitaire adaptative .....	30
Figure 1.4	Représentation schématique des protéines de la famille NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, et IKK.....	41
Figure 1.5	Voie classique et voie alternative du NF- $\kappa$ B.....	53
Figure 1.6	Modèle d'activation du complexe IKK induit par le TNF- $\alpha$ .....	61
Figure 1.7	Rôle nucléaire d'IKK $\alpha$ .....	63

### Chapitre 3 (résultats)

#### Section 1

Figure 3.1.1	Effet de divers inhibiteurs du NF- $\kappa$ B sur la liaison inductible du NF- $\kappa$ B à l'ADN dans les neutrophiles humains.....	91
Figure 3.1.2	Effet de inhibiteurs du NF- $\kappa$ B sur l'expression des gènes de cytokines et chimiokines inflammatoires chez les neutrophiles humains.....	92
Figure 3.1.3	Effet des inhibiteurs du NF- $\kappa$ B sur la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires chez les neutrophiles humains.....	93

Figure 3.1.4 Expression des isoformes du complexe IKK chez les neutrophiles humains et les PBMCs.....96

Figure 3.1.5 Expression des isoformes du complexe IKK chez les neutrophiles humains activés.....97

Figure 3.1.6 Phosphorylation inductible des isoformes du complexe IKK et de RelA chez les neutrophiles humains.....102

Figure 3.1.7 Navette entre le noyau et le cytoplasme des divers composants de la cascade IKK/IκB chez les neutrophiles humains .....105

Figure 3.1.8 Expression des kinases en amont du complexe IKK chez les neutrophiles humains au repos et activés.....108

Figure 3.1.9 Effet des inhibiteurs de différentes voies de signalisation sur l'activation de IKK et sur la phosphorylation de RelA chez les neutrophiles humains.....109

Figure 3.1.10 Association à la chromatine des isoformes du complexe IKK dans les neutrophiles humains activés.....112

**Section 2**

Figure 3.2.1 Expression, distribution et stabilité de la kinase TAK1 et des protéines TAB1 et TAB2 chez les neutrophiles humains et les PBMC.....117

Figure 3.2.2 Association de TAK1 avec TAB1, TAB2, et IKKα/β dans les neutrophiles humains.....120

Figure 3.2.3 Activation inductible de TAK1 et spécificité de l'inhibiteur de TAK1, 5z-7-oxozeaenol, chez les neutrophiles humains.....123

Figure 3.2.4	Impact de l'inhibition de la kinase TAK1 sur la cascade d'activation IKK/NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles humains.....	126
Figure 3.2.5	Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur la transcription et l'expression des gènes $\kappa$ B-dépendants chez les neutrophiles humains.....	129
Figure 3.2.6	Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur la sécrétion de cytokines inflammatoires chez les neutrophiles humains.....	131
Figure 3.2.7	Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur d'autres cascades de signalisation chez les neutrophiles humains.....	134
Figure 3.2.8	Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur le retardement de l'apoptose chez les neutrophiles humains.....	136

### Section 3

Figure 3.3.1	Effet de la N-acétyl-cystéine sur la cascade d'activation IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles humains.....	139
Figure 3.3.2	Caractéristiques des cellules PLB-985 non-différenciées et différenciées... .....	141
Figure 3.3.3	Production de superoxide par les cellules PLB-985 parentales et les cellules X-CGD PLB-985.....	143
Figure 3.3.4	Effet des ROS endogènes sur l'activation inductible du NF- $\kappa$ B chez les cellules PLB-985 de type neutrophilique.....	144
Figure 3.3.5	Surexpression de la protéine GFP chez les cellules PLB-985 de type neutrophilique.....	147

Figure 3.3.6 Effet des ROS endogènes sur l'activation inductible des gènes rapporteurs sous le contrôle du NF- $\kappa$ B chez les cellules PLB-985 de type neutrophilique.....	149
---	-----

**LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES**

5-LO :	5-lipoxygénase
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AP1 :	Protéine activatrice 1
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
BSA :	Albumine bovine sérique
C3a :	Protéine du complément 3a
C5a :	Protéine du complément 5a
C/EBP :	Protéine liant la séquence activatrice CCAAT
CBP :	Protéine liant CREB
COX :	Cyclooxygénase
CRE :	Élément de réponse à l'AMPc
CREB :	Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc
EGF :	Facteur de croissance épidermique
FLAP :	Protéine activatrice de la 5-lipoxygénase
FBS :	Sérum bovin foetal
fMLP :	Peptide Methionine-Leucine-Phénylalanine N-Formylé
GFP :	Protéine fluorescente verte
GM-CSF :	Facteur stimulateur des colonies de granulocytes et de macrophages
GPCR :	Récepteur couplé aux protéines G
IL :	Interleukine
IFN :	Interféron
I $\kappa$ B :	Protéine inhibitrice du NF- $\kappa$ B
IKK :	Kinase de I $\kappa$ B
LPS :	Lipopolysaccharide
LTB <sub>4</sub> :	Leucotriène B <sub>4</sub>
MAPK :	Protéines kinases activées par des mitogènes
MIP-1 :	Protéine inflammatoire agissant sur les macrophages
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate

NF- $\kappa$ B :	Facteur nucléaire kappa B
NES :	Séquence d'exportation nucléaire
NLS :	Séquence de localisation nucléaire
PAF :	Facteur activateur des plaquettes
PBMC :	Leucocytes mononucléaires du sang périphérique
PBS :	Tampon phosphate salin ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PDGF :	Facteur de croissance dérivé des plaquette
PGs :	Prostaglandines
PKA :	Protéine kinase A
PKC :	Protéine kinase C
PLA2 :	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC :	Phospholipase C
PMA :	Phorbol myristate acétate
TAB :	protéine associée à TAK1
TAD :	Domaine de transactivation
TAK :	Kinase activée par TGF- $\beta$
TLR :	Récepteur de type Toll-like
TNF- $\alpha$ :	Facteur de la nécrose tumorale- $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )



## RÉSUMÉ

Les neutrophiles constituent une des premières lignes de défense contre les micro-organismes, et produisent plusieurs médiateurs inflammatoires. La plupart de ces derniers sont encodés par des gènes précoces, qui sont généralement sous contrôle transcriptionnel. Dans ce contexte, les facteurs de transcription jouent un rôle prééminent, et l'activation de ces facteurs est elle-même régulée par diverses protéines kinases et leurs cascades de signalisation. Or, bien que ses diverses composantes, NF- $\kappa$ B/Rel et I $\kappa$ B- $\alpha$ , soient exprimées et activables chez les neutrophiles, un lien avec la production de cytokines et chimiokines inflammatoires reste à établir. Une propriété singulière des neutrophiles est qu'ils expriment de manière constitutive une quantité importante de protéines NF- $\kappa$ B/Rel et I $\kappa$ B- $\alpha$  dans le noyau en plus du cytoplasme, et en réponse au TNF- $\alpha$  ou au LPS, la protéine I $\kappa$ B- $\alpha$  est dégradée dans les deux compartiments cellulaires. Par ailleurs, selon le type cellulaire, l'activation du NF- $\kappa$ B par divers stimuli est modulée par des espèces réactives oxygénées (ROS) endogènes. Ceci nous a conduit à caractériser les composantes importantes dans la cascade de signalisation du NF- $\kappa$ B des neutrophiles, leur impact sur la production des cytokines/chimiokines, et à déterminer si l'activation du NF- $\kappa$ B est dépendante des ROS endogènes chez ces cellules.

En premier lieu, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques du NF- $\kappa$ B, nous avons constaté que l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B chez ces cellules diminue de beaucoup l'expression génique et la sécrétion de diverses cytokines et chimiokines (TNF- $\alpha$ , IL-8 ou CXCL8, Mip-1 $\alpha/\beta$ ) induites par des stimuli tels que TNF- $\alpha$  ou LPS. Nous montrons ensuite que le complexe IKK (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , et IKK $\gamma$ ) est aussi partiellement localisé dans le noyau, alors que les kinases reliées à IKK (IKK $\epsilon$  et TBK-1) sont cytoplasmiques; la kinase NIK, quant à elle, est strictement nucléaire. Suite à une activation des neutrophiles, IKK $\beta$  et IKK $\gamma$  deviennent transitoirement phosphorylées dans le cytoplasme et le noyau, alors qu'IKK $\alpha$  disparaît temporairement de ces deux compartiments cellulaires d'une manière qui semble dépendante de IKK $\beta$ . Ces réponses s'accompagnent, dans les deux compartiments, de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et de la phosphorylation du RelA sur la sérine 536. Bien que les deux protéines puissent être des substrats de IKK, l'inhibition de ce dernier empêche la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , tandis que le niveau de phosphorylation du RelA est essentiellement inchangé. Nous apportons enfin une preuve que des isoformes de IKK nucléaires s'associent à la chromatine suivant l'activation des neutrophiles, ce qui suggère un rôle potentiel dans la régulation de gènes.

Deuxièmement, nous rapportons que les neutrophiles expriment la MAP3K, TAK1, ainsi que ses partenaires associés, TAB1/2, dans le cytoplasme et le noyau. La kinase TAK1 est associée de façon constitutive aux protéines TAB1 et TAB2, ainsi qu'au complexe IKK $\alpha/\beta$  dans les neutrophiles au repos. Le niveau d'interaction de ces complexes demeure inchangé suite au traitement des neutrophiles avec le TNF- $\alpha$  ou le

LPS. La kinase TAK1 devient rapidement et transitoirement activée suite à une stimulation des cellules avec le TNF- $\alpha$  ou le LPS. L'inhibition de l'activité kinase de TAK1 avec un inhibiteur hautement sélectif (5z-7-oxozeaenol) a empêché la phosphorylation d'IKK $\alpha/\beta$ , de RelA, et la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires, ainsi que la liaison à l'ADN du NF- $\kappa$ B dans des neutrophiles activés. En conséquence, l'expression et la sécrétion de cytokines inflammatoires induites par le TNF- $\alpha$  ou le LPS ont été profondément altérées suivant une inhibition de TAK1. En revanche, la phosphorylation de IKK $\gamma$  induite par le LPS n'a pas été affectée par l'inhibition de TAK1.

Finalement, nos résultats indiquent que l'activation du NF- $\kappa$ B et les réponses cellulaires dépendantes du NF- $\kappa$ B sont indépendantes des ROS endogènes dans les neutrophiles humains primaires ou dans la lignée promyélocytaire PLB-985, qui peut être différenciée en granulocytes et se comporte comme les neutrophiles. Parallèlement, nous avons optimisé les conditions de transfection des PLB-985 différenciées, ce qui nous a permis de montrer pour la première fois l'activation de promoteurs  $\kappa$ B-dépendants chez des granulocytes humains. Ces travaux rendent par ailleurs possibles les études portant sur l'activation des promoteurs chez les granulocytes.

Dans leur ensemble, ces observations démontrent l'importance du NF- $\kappa$ B dans la génération inductible de cytokines et chimiokines par les neutrophiles. Il s'agit de la première étude qui montre la présence et l'activation (phosphorylation) du complexe IKK et la phosphorylation des protéines NF- $\kappa$ B/Rel dans les neutrophiles humains. Plus important encore, nos résultats dévoilent un mode d'activation de la cascade de signalisation IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B dans le noyau de cellules primaires. Nos données établissent également le rôle central de TAK1 dans le contrôle de la cascade de signalisation IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B cytoplasmique et nucléaire dans les neutrophiles primaires humains, ce qui pourrait représenter une cible prometteuse pour une intervention thérapeutique considérant le rôle critique des neutrophiles dans plusieurs conditions inflammatoires.

Mots clés : Neutrophiles humains  
Protéine kinase TAK1  
Cascade de signalisation IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B nucléaire  
Facteurs de transcription NF- $\kappa$ B  
Génération de cytokines et chimiokines

## CHAPITRE I- INTRODUCTION

### 1.1 Généralités

Le système immunitaire agit non seulement contre les agents agresseurs extérieurs (les bactéries, les virus, les champignons pathogènes et les parasites), mais aussi contre des cellules endogènes transformées, comme les cellules tumorales. Ce système de défense implique l'étroite collaboration de deux types de réponses: l'immunité naturelle (ou innée) et l'immunité adaptative (ou acquise). Les phagocytes (neutrophiles, macrophages) impliqués dans l'immunité naturelle constituent une première ligne de défense contre beaucoup de micro-organismes et sont essentiels pour le contrôle des infections bactériennes courantes (Kindt *et al.*, 2008). Cependant, ils ne parviennent pas toujours à éliminer les agents infectieux. Les lymphocytes, impliqués dans l'immunité adaptative, représentent alors un moyen de défense plus élaboré qui, en outre, apporte une protection accrue lors d'une réinfection ultérieure par un même pathogène (Kindt *et al.*, 2008). Les cellules de l'immunité naturelle jouent un rôle crucial dans l'initiation et le contrôle ultérieur de la réponse immunitaire adaptative. De plus, étant donné le délai de quatre à cinq jours avant que la réponse immunitaire adaptative ne commence à être efficace, la réponse immunitaire naturelle est essentielle pour contrôler les infections durant cette période (Kindt *et al.*, 2008).

Les neutrophiles et les macrophages utilisent généralement des outils efficaces comme la phagocytose pour éliminer les micro-organismes. De plus, lors de leur

activation, les phagocytes produisent plusieurs médiateurs inflammatoires comme les médiateurs lipidiques, les cytokines et les chimiokines. Ces molécules libérées exercent leurs effets sur les vaisseaux sanguins locaux et sur les cellules avoisinantes. L'augmentation de la perméabilité et la dilatation de ces vaisseaux entraînent un afflux sanguin et la fuite de liquide, ce qui provoque la chaleur, la rougeur et le gonflement (Celsus, 1478; Delves et Roitt, 2000; Tracy, 2006; Kindt *et al.*, 2008). Le changement de propriété adhésive de l'endothélium amène les leucocytes circulants à se coller sur les cellules endothéliales de la paroi vasculaire et à migrer à travers celle-ci pour atteindre le site d'infection vers lequel ils sont attirés par des chimiokines (IL-8, Gro- $\alpha$ , Nap2) ou des agents chimiotactiques (fMLP, LTB<sub>4</sub>, PAF, C5a). La migration des leucocytes/phagocytes dans les tissus lésés et leurs effets locaux sont responsables de la douleur (Celsus, 1478; Delves et Roitt, 2000; Tracy, 2006). L'ensemble de ces processus est globalement appelé inflammation. Les cellules les plus abondantes dans la phase initiale d'un site inflammatoire sont généralement les neutrophiles.

Les neutrophiles ont été historiquement considérés comme des phagocytes professionnels terminalement différenciés et se distinguant par leurs fonctions classiques (la migration transendothéliale, la chimiotaxie, la phagocytose, la dégranulation et l'explosion oxydative), donc incapables d'exercer une activité transcriptionnelle ou traductionnelle. Il est maintenant évident que les neutrophiles peuvent, en plus de se comporter dans certaines conditions particulières comme des cellules présentatrices d'antigène (Ashtekar AR et Saha B, 2003), synthétiser et sécréter plusieurs médiateurs inflammatoires pouvant agir sur les neutrophiles eux-mêmes, les monocytes, les

macrophages, les lymphocytes B et T, les plaquettes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les chondrocytes et d'autres types cellulaires (Lloyd et Oppenheim 1992; Cassatella, 1995 et 1999; Bennouna *et al.*, 2003; Wittamer *et al.*, 2005; Scapini *et al.*, 2005; van Gisbergen *et al.*, 2005; Nathan, 2006).

Tout bien considéré, les neutrophiles jouent un rôle non seulement dans la première ligne de défense faisant partie de l'immunité naturelle, mais ils sont également impliqués d'une façon active dans le déclenchement et l'établissement de la réponse immunitaire adaptative (Nathan, 2006); voire même dans plusieurs pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde et la goutte (Malech et Gallin, 1987; Weiss, 1989). En tenant compte de leurs rôles si importants, il est donc d'intérêt d'approfondir les études portant sur les mécanismes intracellulaires (cascades de signalisations, protéines kinases/phosphatases, régulateurs transcriptionnels etc.) impliqués non seulement dans les fonctions primaires, mais aussi dans la génération des médiateurs inflammatoires. **Dans le présent projet de recherche, nous avons mis l'accent principalement sur la cascade de signalisation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et son impact sur la production des cytokines/chimiokines par les neutrophiles humains.**

## 1.2 Neutrophiles humains et leurs fonctions

Les neutrophiles comme décrits pour la première fois par Paul Ehrlich (Ehrlich *et al.*, 1900; Wilkinson, 1974; Hallett, 1989) sont des cellules de 12 à 15  $\mu$ m de diamètre

dont le cytoplasme contient de nombreux granules et dont le noyau possède un aspect polylobé caractéristique de 3 à 5 lobes avec une chromatine dense. Comme les autres cellules du système immunitaire, les neutrophiles sont formés dans la moëlle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (Bainton, 1977; Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Zychlinsky *et al.*, 2003). Les facteurs de croissance hématopoïétiques comme le GM-CSF, le G-CSF et l'IL-3 sont essentiels pour le processus de différenciation et de maturation qui comportent différentes étapes: myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, cellules non segmentées, cellules segmentées et polynucléaires neutrophiles (Bainton, 1977; Skubitz, 2003; Theilgaard-Mönch *et al.*, 2005). Au cours de ces diverses étapes de différenciation, les neutrophiles acquièrent séquentiellement les organites, les constituants cytoplasmiques et les structures membranaires indispensables à leurs fonctions effectrices phagocytique et bactéricides. Les personnes présentant une neutropénie, congénitale ou acquise, souffrent de pathologies infectieuses récurrentes, ce qui témoigne bien du rôle primordial des neutrophiles dans la défense contre les micro-organismes pathogènes. Au terme de leur maturation, les neutrophiles sont libérés dans le sang et circulent pendant 7 à 12 heures avant de passer dans les tissus où ils meurent par apoptose spontanée (Savill, 1997; Akgul *et al.*, 2001). Cette élimination naturelle est compensée par un grand nombre de neutrophiles produits quotidiennement, soit environ  $10^{11}$  cellules (Dancey *et al.*, 1976). Les neutrophiles peuvent cependant survivre plus longtemps lors d'une inflammation pendant laquelle ils sont recrutés via différentes étapes comprenant généralement le roulement sur l'endothélium, l'activation et l'adhésion ferme aux cellules endothéliales et la transmigration à travers l'endothélium (Del Maschio *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1998; Theilgaard-Mönch *et al.*, 2006). Ils se

dirigent ensuite vers le site inflammé en remontant un gradient de concentration de chimioattractants tel que l'IL-8, le C5a, le LTB<sub>4</sub>, le PAF, ou le fMLP (Murphy, 1994; Crooks et Stockley, 1998). En arrivant de façon précoce et massive aux sites inflammatoires, les neutrophiles exercent leurs rôles (Figure 1.1) dans les réponses inflammatoires et immunitaires incluant la phagocytose, la dégranulation, l'explosion oxydative, la formation de NETs (neutrophil extracellular traps) (Brinkmann *et al.*, 2004, Urban *et al.*, 2006) et la production des médiateurs lipidiques et peptidiques. Dans certaines conditions particulières, les neutrophiles peuvent se comporter comme des cellules présentatrices d'antigènes. Ces fonctions sont décrites dans les paragraphes suivants.

### 1.2.1 Phagocytose

La phagocytose a été décrite pour la première fois à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par le zoologiste Elie Metchnikoff comme étant le principal mécanisme de défense et d'élimination des agents pathogènes ou des corps apoptotiques de l'organisme (Metchnikoff, 1883 et 1891; Kaufmann, 2008). C'est un phénomène qui débute normalement par une étape d'adhésion, au cours de laquelle la membrane de la cellule phagocytaire adhère à la particule qu'elle va ingérer et une étape d'ingestion proprement dite, qui se produit par invagination de la membrane autour de la particule et la formation secondaire d'une vacuole de phagocytose ou phagosome (Vieira *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). La phagocytose effectuée par les neutrophiles implique deux classes de récepteurs, soit les récepteurs reconnaissant la partie Fc des immunoglobulines (FcγRIIa

ou CD32a, Fc $\gamma$ RIIIb ou CD16b) et les récepteurs des protéines clivées du complément (CR1 et CR3) (Aderem et Underhill, 1999; Cox et Greenberg, 2001; Lee *et al.*, 2003). Les micro-organismes ingérés sont initialement enserrés par des pseudopodes, qui lorsqu'ils se rejoignent, forment le phagosome, qui fusionne ensuite avec les granules cytoplasmiques pour former un phagolysosome dans lequel les microorganismes seront digérés par les enzymes de dégradation contenues dans les granules et par les radicaux libres oxygénés produits par la NADPH oxydase (Castellano *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). Lorsque les micro-organismes sont trop gros ou trop nombreux pour être phagocytés, la libération extracellulaire de dérivés oxygénés et du contenu granulaire se produit.

### **1.2.2 Dégranulation**

La dégranulation est l'action de libérer des enzymes lytiques, des peptides antimicrobiens et des médiateurs inflammatoires qui sont contenus dans les granules intracytoplasmiques. C'est un autre mécanisme de défense qui participe à l'activité antimicrobienne et pro-inflammatoire des neutrophiles lors d'une attaque externe (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). La dégranulation peut être également engendrée par la stimulation des neutrophiles par une multitude de stimuli comme l'IL-8 (Willems *et al.*, 1989), l'IL-1 $\alpha$  (Ferrante *et al.*, 1988), le PAF (O'Flaherty *et al.*, 1981) ou le LTB $_4$  (Feinmark *et al.*, 1981).

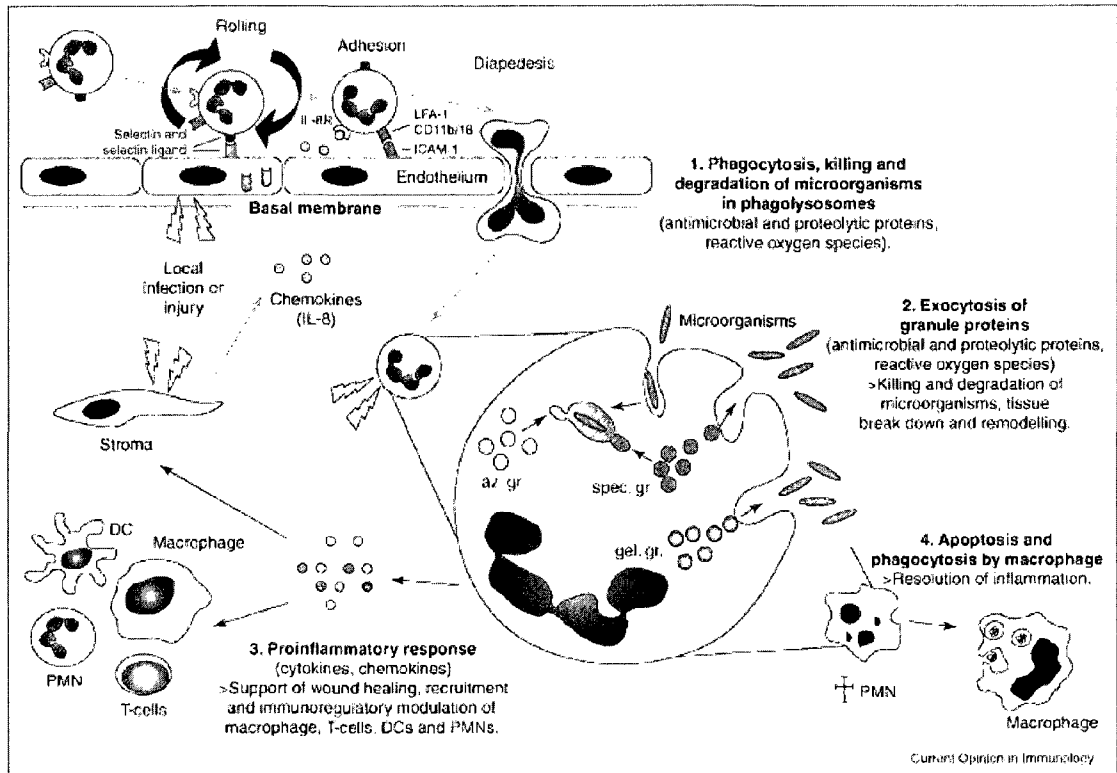


Selon leur contenu, les granules des neutrophiles sont divisés en différents types: azurophiles ou primaires, spécifiques ou secondaires, à gélatinases ou tertiaires, sécrétoires ou quaternaires (Tableau 1.1) (Borregaard *et al.*, 1993; Borregaard et Cowland, 1997; Gullberg *et al.*, 1997; Bainton, 1999; Faurschou et Borregaard, 2003; Lominadze *et al.*, 2005; Borregaard *et al.*, 2007). Les **granules azurophiles** ou **primaires** qui apparaissent lors du stade promyélocyte du neutrophile en maturation contiennent une grande variété d'enzymes et de protéines anti-microbiennes comme la myéloperoxydase, les hydrolases acides, le lysozyme, le BPI (bactericidal permeability increasing protein), l'élastase, l' $\alpha$ 1-antitrypsine, les cathepsines et les défensines. La myéloperoxydase peut transformer le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en acide hypochloreux (HOCl), qui a divers effets cytotoxiques comme la peroxydation des membranes bactériennes qui mène à la lyse de plusieurs microorganismes (Miller et Britigan, 1997; Babior, 2000). Les défensines sont des peptides cationiques qui peuvent former des pores multimériques menant à la lyse des micro-organismes (Wimley *et al.*, 1994).

Les **granules spécifiques** ou **secondaires** dépourvus de myéloperoxydase, contiennent du lysozyme, des metalloprotéases, de la  $\beta$ -hexosaminidase, de la  $\beta_2$ -microglobuline, de la lactoferrine, et expriment le récepteur du fMLP et du CD11b/CD18. Les métalloprotéinases (principalement la collagénase, la gélatinase et la leucolysine) sont nécessaires à l'extravasation et à la migration des neutrophiles dans les tissus. La lactoferrine est une substance bactériostatique qui séquestre les ions de fer et empêche la survie et la multiplication de plusieurs pathogènes (Yamauchi *et al.*, 1993).

Les **granules à gélatinase** ou **tertiaires** sont semblables aux granules spécifiques, mais sont dépourvues des substances bactéricides. Ces granules contiennent une grande quantité de gélatinase et de CD11b/CD18 (Kjeldsen *et al.*, 1992). La gélatinase est présente sous forme inactive à l'intérieur des granules et subit une activation protéolytique lors de l'exocytose de ces granules. La gélatinase peut dégrader les composantes de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine, la laminine et la gélatine. Les granules à gélatinases pourraient aider les neutrophiles à traverser l'endothélium et à migrer à travers les tissus, et sont donc impliqués dans la destruction tissulaire lors d'une agression inflammatoire.

Enfin, les **granules sécrétoires** ou **quarternaires** contiennent des récepteurs membranaires comme le récepteur pour le fMLP, les intégrines CD11b/CD18, le récepteur du complément CR1, le CD14 (Sengelov *et al.*, 1993 et 1994) et le récepteur FcγIIIb (Detmers *et al.*, 1995). Les granules sécrétoires pourraient fusionner avec la membrane plasmique pour permettre l'expression plus rapidement des récepteurs à la surface des neutrophiles lorsque ces cellules roulent sur l'endothélium durant les premières étapes de leur activation. Un autre marqueur des granules sécrétoires est la phosphatase alcaline qui se présente presque exclusivement à l'intérieur de ce type de granule.



(Extrait de Theilgaard-Mönch *et al.*, 2006)

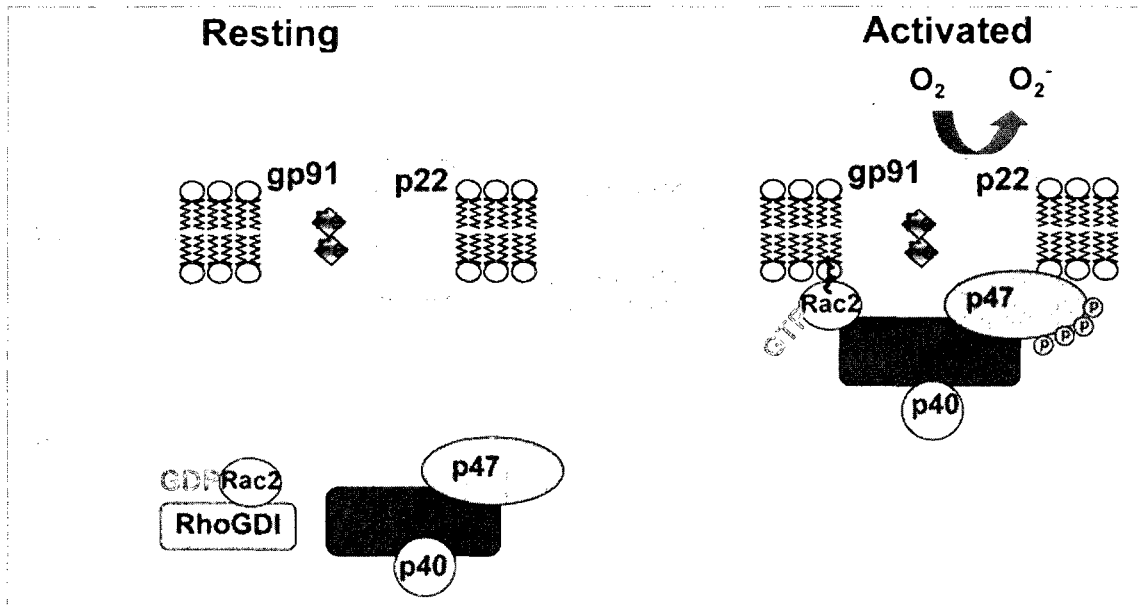
### Figure 1.1 Défense immunitaire de neutrophiles.

En réponse à une infection ou à une blessure, les neutrophiles s'attachent à l'endothélium activé par l'intermédiaire d'une série d'interactions entre les molécules d'adhésion et leurs récepteurs. L'attachement, en combinaison avec les chimiokines localement sécrétées, dirige la migration des neutrophiles vers le site d'infection ou de blessure où ils deviennent activés et exécutent une cascade de mécanismes de défense (annotations 1-3) afin de protéger l'hôte contre les infections. À la fin de la réponse inflammatoire normale, les neutrophiles entrent en apoptose entraînant ainsi leur phagocytose par des macrophages et la résolution de l'inflammation (annotation 4).

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

(Extrait de Faurschou et Borregaard, 2003)

**Tableau 1.1 Les protéines de granules des neutrophiles.**



(Extrait de Nauseef, 2007)

**Figure 1.2 Assemblage et activation de la NADPH oxydase.**

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

### 1.2.3 Formation des espèces réactives oxygénées (ROS)

Les neutrophiles contiennent un complexe enzymatique nommé NADPH oxydase, qui est composé de quatre facteurs cytosoliques (p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et la petite GTPase rac2) (phox est l'abréviation de "phagocyte oxydase") et de deux facteurs membranaires (gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup>) (Figure 1.2). Ces deux facteurs membranaires forment un hétérodimère membranaire appelé flavocytochrome b558 (Batot *et al.*, 1995; Gougerot-Pocidallo *et al.*, 2002; Roos *et al.*, 2003; Babior, 1999 et 2004; Segal, 2005; El-Benna *et al.*, 2005; Nauseef, 2007). La gp91<sup>phox</sup> est un élément essentiel de la NADPH oxydase, responsable du transfert d'électrons du NADPH à l'oxygène. Une déficience génétique de l'un des composants du complexe NADPH oxydase est à l'origine de la maladie granulomateuse chronique (CGD) caractérisée par des infections récurrentes, en raison de l'incapacité des granulocytes à produire des radicaux oxygénés (Roos *et al.*, 1996; Goldblatt et Thrasher, 2000; Lekstrom-Himes et Gallin, 2000; Roos *et al.*, 2003).

L'activation des neutrophiles (par des opsonines, par certains agents chimiotactiques ou par une infection) est accompagnée par une forte augmentation de leur consommation d'oxygène, ce qui est appelé l'explosion oxydative (Roos *et al.*, 2003). La NADPH oxydase activée utilise le NADPH cytosolique pour réduire l'oxygène et produire l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) selon la réaction :  $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^-$  (Ago *et al.*, 1999; Babior, 2004). L'anion superoxyde est un précurseur de plusieurs autres formes d'oxygène qui sont fortement réactives. L'anion

superoxyde étant très instable, il est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) par le superoxyde dismutase (Fridovich, 1975) selon la réaction :  $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$  (Babior, 1999 et 2004). Le peroxyde d'hydrogène sert de co-substrat à la myéloperoxydase contenue dans les granules primaires qui catalyse la formation d'acide hypochloreux (HOCl) en présence d'halogènes ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) (Weiss *et al.*, 1986; Gougerot-Pocidallo *et al.*, 2002; Roos *et al.*, 2003). La réaction  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HOCl}$  produit l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) (Steinbeck *et al.*, 1992 et 1993). En présence de métal ( $\text{Fe}^{2+}$ ), la NADPH oxydase génère le radical hydroxyl ( $\text{OH}\bullet$ ) à partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wink *et al.*, 1994).

Les espèces réactives oxygénées produites par les neutrophiles participent activement à la neutralisation et à la destruction des micro-organismes pathogènes ingérés durant la phagocytose (Lekstrom-Himes et Gallin, 2000; Roos *et al.*, 2003; Bylund *et al.*, 2003; Babior, 2004). Cependant, quand les ROS sont libérés de manière exagérée dans le milieu extracellulaire, ces produits peuvent avoir des effets néfastes (une déorganisation membranaire ou une altération de protéines et d'acides nucléiques) sur les cellules et tissus environnants (Henson et Johnston 1987; Weiss, 1989; Gougerot-Pocidallo *et al.*, 2002; Roos *et al.*, 2003).

Outre leur rôle dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux, les espèces réactives oxygénées agiraient comme des seconds messagers qui participeraient à la régulation de signaux intracellulaires en modulant l'activité de protéines kinases, de phosphatases et de facteurs de transcription (Finkel, 1998; Rhee *et al.*, 2005). À titre d'exemple, quoique l'effet des ROS varie en fonction de type cellulaire étudié, les ROS

peuvent affecter la production de certaines cytokines par les neutrophiles murins en modulant l'activation de la p38 MAPK, de ERK, de AKT et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Asehnoune *et al.*, 2004). Les ROS produits par d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales peuvent moduler différentes voies de signalisation et des kinases, qui, éventuellement, affectent plusieurs fonctions cellulaires telles que la survie, et la croissance (Dimmeler et Zeiher, 2000; Irani, 2000).

#### **1.2.4 Formation de NETs (neutrophil extracellular traps)**

En plus des mécanismes de destruction intracellulaire décrits plus haut, l'activation des neutrophiles, par l'IL-8, le LPS, des bactéries, des champignons ou des plaquettes activées, libère également des protéines granulaires et de la chromatine (Brinkmann *et al.*, 2004). Ensemble, ces éléments forment des réserves de fibres appelés NETs (neutrophil extracellular traps) (Brinkmann *et al.*, 2004, Urban *et al.*, 2006). Les NETs sont capables de lier et tuer les bactéries (Gram-positif et négatif) et les levures pathogènes (Brinkmann *et al.*, 2004, Urban *et al.*, 2006). Les principaux composants du NETs sont l'ADN et les histones associées (H1, H2A, H2B, H3 et H4). L'activité antimicrobienne *in vitro* des histones est bien établie (Hirsch, 1958; Rose *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2002; Patat *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007). En outre, les NETs contiennent des protéases provenant des granules azurophiles, spécifiques et à gélatinase. Les NETs peuvent éventuellement faciliter la destruction des microbes de deux façons: (i) concentrer l'arsenal antimicrobien au site de l'infection et (ii) prévenir la propagation des microbes hors du site de l'infection initiale.



Les NETs sont abondants aux sites inflammatoires, comme dans les cas d'appendicite et dans un modèle expérimental de shigellose. Les NETs sont considérés comme pertinents *in vivo* dans le cas de pré-éclampsie (Gupta *et al.*, 2005) et des infections à streptocoque (Beiter *et al.*, 2006; Buchanan *et al.*, 2006). Il semble plausible que la formation de NETs soit un mécanisme commun de l'immunité innée chez les vertébrés, comme cela a été observé chez l'homme (Brinkmann *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005), la souris (Buchanan *et al.*, 2006), le lapin (Brinkmann *et al.*, 2004), le cheval (Alghamdi et Foster, 2005), la vache (Lippolis *et al.*, 2006) et le poisson (Palic *et al.*, 2006).

### **1.2.5 Coopération « neutrophile-macrophage »**

L'immunité en réaction à l'infection est souvent considérée comme une dichotomie entre les infections aiguës causées par des microbes rapidement répliqués et contrôlés par les neutrophiles, et les infections chroniques causées par des agents pathogènes à croissance lente et qui sont contrôlés par les macrophages. Les neutrophiles meurent de façon constitutive par apoptose aux sites inflammatoires, et sont ingérés par les macrophages (Savill *et al.*, 1989). Bien que les neutrophiles soient beaucoup plus riches en molécules antimicrobiennes que les macrophages, leur courte durée de vie limite leur rôle potentiel dans le contrôle de certains agents pathogènes qui finissent par infecter les phagocytes mononucléés. Dans un contexte d'une réponse immune protectrice efficace, ces agents pathogènes sont contrôlés par des cellules à plus longue durée de vie. Cependant, la présence de deux types de phagocytes dans la même

lésion inflammatoire a soulevé la possibilité que les neutrophiles puissent léguer une partie de leur contenu aux macrophages, ce qui renforcerait leur activité antimicrobienne. Le transfert de molécules des neutrophiles aux macrophages lors d'une infection a été illustré par le transfert de la lactoferrine, un produit qui n'est pas synthétisé par les macrophages, au cours des infections expérimentales à mycobactéries (Silva *et al.*, 1989). Des études *in vitro* ont montré que l'ingestion de lysats des neutrophiles augmentait l'activité anti-mycobactérienne des macrophages (Silva *et al.*, 1989), favorisant ainsi cette notion de coopération entre les deux types phagocytaires dans le contrôle d'agent infectieux.

Tan et ses collègues ont étendu ce type d'analyse en montrant que les neutrophiles apoptotiques sont ingérés par les macrophages et peuvent transférer des molécules, telles que des peptides cationiques, qui colocalisent avec des mycobactéries dans les compartiments de l'endosome des macrophages infectés (Tan *et al.*, 2006). Des études *in vitro* montrent qu'en fournissant aux macrophages des neutrophiles apoptotiques entiers ou des granules purifiés des neutrophiles, l'activité bactériostatique contre *M. tuberculosis* des phagocytes mononucléés est renforcée (Tan *et al.*, 2006). L'interaction entre les neutrophiles vivants ou morts avec les macrophages régule aussi l'activité de défense contre l'infection par *Leishmania major* (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004, 2005 et 2007). Ces données appuient fortement l'hypothèse de la coopération entre ces deux lignées de cellules phagocytaires pour optimiser l'utilisation de molécules antimicrobiennes.

### 1.2.6 Cellules présentatrices d'antigènes (APCs)

Bien que les neutrophiles soient connus pour jouer un rôle majeur dans l'immunité innée, il est désormais évident que ceux-ci influencent également les réponses immunitaires spécifiques et peuvent même agir comme cellules présentatrices d'antigènes (APCs) (Ashtekar AR et Saha B, 2003). Cela semble peu probable pour la fonction de ces cellules, car elles n'expriment pas constitutivement les molécules de surface jugées nécessaires à la présentation antigénique ainsi que l'activation subséquente des cellules T, tel que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et les molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2). Plusieurs études ont cependant montré que suite à l'activation *in vitro* et/ou *in vivo* par les cytokines, les neutrophiles expriment ces molécules à leur surface (Gosselin *et al.*, 1993; Oehler *et al.*, 1998; Iking-Konert *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2003). De plus, des études fonctionnelles ont démontré que les neutrophiles dûment activés présentent des antigènes aux cellules T auxiliaires et peuvent initier une réponse véritable médiée par des cellules T (Fanger *et al.*, 1997; Radsak *et al.*, 2000).

Dans des conditions particulières de culture : avec du GM-CSF, de l'IL-4 et du TNF- $\alpha$ , les précurseurs tardifs des neutrophiles peuvent non seulement survivre plus longtemps (jusqu'à 10 jours); mais également présenter des modifications morphologiques (leur noyau devient rond plutôt que polylobé) et phénotypiques. En effet, ils expriment des molécules HLA-DR, HLA-DQ, le CD40, le CD54, le CD80 (B7-1) et le CD86 (B7-2) qui sont des récepteurs associés aux cellules présentatrices

d'antigène (Oehler *et al.*, 1998). La maturation des neutrophiles en présence du GM-CSF, de l'IL-4 et du TNF- $\alpha$  pour 7 jours, suivie d'une stimulation avec du CD40L, provoque l'expression de CD83 (un marqueur de cellules dendritiques) et induit l'apparition de longues dendrites (Oehler *et al.*, 1998; Iking-Konert *et al.*, 2001). Ces conditions favorisent la présentation antigénique par les neutrophiles, ce qui se traduit par une prolifération des lymphocytes T (Oehler *et al.*, 1998; Radsak *et al.*, 2000). En outre, les cellules dendritiques dérivées des neutrophiles sont au moins 10000 fois plus efficaces dans la présentation des antigènes solubles aux cellules T autologues par rapport aux monocytes fraîchement isolés (Oehler *et al.*, 1998). D'autres conditions de culture (le GM-CSF, l'IFN $\gamma$  et l'IL-3) ont aussi permis de faire apparaître des marqueurs de surface comme le CMH de classe II, le CD80, le CD86 et le CD83 dans les neutrophiles (Gosselin *et al.*, 1993; Fanger *et al.*, 1997; Radsak *et al.*, 2000; Iking-Konert *et al.*, 2001).

À l'appui de ces démonstrations, Sandilands *et al.*, 2003 et 2005 a observé, au niveau des ARNm et des protéines, que les neutrophiles normaux, au repos, dans le sang périphérique avaient déjà en réserve de ces molécules préformées emmagasinées spécifiquement dans les granules sécrétoires ou quarternaires. L'activation des neutrophiles *in vitro* par l'addition de Mac-1 induit l'expression rapide des molécules CD18, CD64, CD66, CD80, CD86 et, dans une moindre mesure, du CMH de classe II, ce qui montre la mobilisation cytoplasmique vers la surface des neutrophiles (Sandilands *et al.* 2005). Le niveau d'expression de CD80, CD86 et CMH de classe II trouvé à la surface des neutrophiles s'est révélé comparable, et dans certains cas, supérieur à celui

trouvé à la surface des monocytes, des cellules étant connues pour agir comme APCs (Sandilands *et al.*, 2005). Un phénomène semblable a été aussi rapporté suite à la stimulation des neutrophiles avec d'autres stimuli comme le LPS, le fMLP, ou le PMA, quoique la cinétique et le pourcentage d'expression soient différents pour chaque stimulus (Sandilands *et al.*, 2006).

Ces données *in vitro* ont été valisées par des études *in vivo* qui montrent que les neutrophiles de patients atteints de la granulomatose de Wegener (une destruction des vaisseaux sanguins accompagnée d'une infiltration de neutrophiles au niveau du nez, des poumons et des reins) ou de l'arthrite rhumatoïde, se caractérisent par l'expression de molécules de surface comme le CMH de classe II, le CD80 et le CD86, ainsi que la présentation d'antigènes aux lymphocytes T, d'une façon dépendant du CMH de classe II (Iking-Konert *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2003; Iking-Konert *et al.*, 2005; Sandilands *et al.*, 2006). Des infections bactériennes sévères peuvent également prolonger la survie des neutrophiles *in vivo* (Wagner JG et Roth RA, 2000) et favoriser l'expression de CD83 en surface (Iking-Konert *et al.*, 2002). Dans un modèle de souris injectées de façon intradermique avec le vaccin de *Mycobacterium bovis* BCG (bacille Calmette-Guérin), les neutrophiles capturent les bacilles et les transportent aux organes lymphoïdes (Abadie *et al.*, 2005).

### 1.2.7 Production des médiateurs lipidiques

Les principaux médiateurs lipidiques produits par les neutrophiles sont le leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980; Naccache et Sha'afi, 1983; Simmons *et al.*, 1983; McDonald *et al.*, 1993; Krump *et al.*, 1995), la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Zurier, 1976; Tolone *et al.*, 1977; Pouliot *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2003; St-Onge *et al.*, 2007), le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Goldstein *et al.*, 1978; Pouliot *et al.*, 1998), ainsi que le facteur d'activateur plaquettaire (PAF) (Ludwig *et al.*, 1985; Sisson *et al.*, 1987; Miwa *et al.*, 1992). Ces éicosanoïdes (le LT, la PG, le TX) proviennent du métabolisme de l'acide arachidonique catalysé par les enzymes 5-lipoxygénase (5-LO) ou les cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 et -2) (Nicosia *et al.*, 2001; Garavito et Mulichak, 2003; Simmons *et al.*, 2004; Norel et Brink, 2004). Il est à noter que le niveau d'expression d'enzymes (5-LO et COX-2) et de la FLAP (5-LO-activating protein), impliquées dans la formation de ces médiateurs lipidiques, est augmenté chez les neutrophiles activés (McDonald *et al.*, 1993; Pouliot *et al.*, 1994; Pouliot *et al.*, 1994 et 1998; Niuro *et al.*, 1997; Maloney *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2003).

La 5-lipoxygénase (Matsumoto *et al.*, 1988) catalyse la transformation de l'acide arachidonique en 5-HPETE (5S-hydroperoxy-6, 8-trans-11, 14-cis-eicosatétraénoïque) avec l'aide de la FLAP (Dixon *et al.*, 1990; Reid *et al.*, 1990) qui sera ensuite converti en LTA<sub>4</sub>, précurseur commun des leucotriènes, pour finalement former soit le LTB<sub>4</sub> via l'action de la LTA<sub>4</sub> hydrolase (Minami *et al.*, 1987), ou un des cysteinyl-leucotriènes (cysLTs) (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) via l'action de la LTC<sub>4</sub> synthétase. Le LTB<sub>4</sub> a plusieurs

effets physiologiques (recrutement et activation de cellules inflammatoires) et pathophysiologiques (Busse, 1998; Devillier *et al.*, 1999; Nicosia *et al.*, 2001; Yokomizo *et al.*, 2001). Il est un puissant agent chimiotactique pour les neutrophiles (Palmlblad *et al.*, 1981) ainsi que les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T (Smith *et al.*, 1980; de Jong *et al.*, 1992). Le LTB<sub>4</sub> active plusieurs cellules inflammatoires tels que les neutrophiles, les macrophages, et les éosinophiles (Yokomizo *et al.*, 2001). Le LTB<sub>4</sub> active, également, certaines cellules non-leucocytaires comme les cellules endothéliales, les ostéoclastes (Yokomizo *et al.*, 2001). Il induit chez les neutrophiles l'adhérence et la transmigration au travers de l'endothélium (Mackarel *et al.*, 2000), la dégranulation (Feinmark *et al.*, 1981), la génération d'espèces réactives oxygénées (Li *et al.*, 1996), l'augmentation de la capacité phagocytaire (Mancuso *et al.*, 2001) et le retardement de l'apoptose spontanée (Hébert *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 2001; Stankova *et al.*, 2002; Pétrin *et al.*, 2006). Le LTB<sub>4</sub> est impliqué dans plusieurs maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde (Ahmadzadeh *et al.*, 1991), l'asthme (Montuschi et Barnes, 2002), et la fibrose kystique (Carpagnano *et al.*, 2003).

La COX mène à la production de prostaglandine G<sub>2</sub> qui sera ensuite métabolisée en prostaglandine H<sub>2</sub> par la peroxydase pour finalement former les prostaglandines D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, et F<sub>2a</sub>, la prostacycline I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), et les thromboxanes (TXA) (Smith *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1996 et 2000; Vane et Botting, 1996; Garavito et DeWitt, 1999; Garavito *et al.*, 2002). Les prostaglandines sont impliquées dans plusieurs fonctions de l'organisme, dont le développement de la réaction inflammatoire, le système reproducteur, et les fonctions rénales. La PGE<sub>2</sub> joue un rôle dans la vasodilatation, l'inflammation, la fièvre

et la douleur. Tout dépendant des cellules qui sont ciblées, la PGE<sub>2</sub> peut avoir des effets pro-inflammatoires comme l'hyperalgésie, la vasodilatation et la contraction bronchique (Katori, 1989) et anti-inflammatoires comme l'inhibition de la chimiotaxie, de la production d'anions superoxydes et de la libération du LTB<sub>4</sub> par les neutrophiles (Zurier *et al.*, 1974; Lehmeyer et Johnston, 1978; Ham *et al.*, 1983; Pouliot *et al.*, 2002). Le TXA<sub>2</sub> a généralement des effets pro-inflammatoires comme l'activation et l'aggrégation des plaquettes, l'induction de l'adhérence des monocytes à la membrane de polycarbonate et de la synthèse de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  par le zymosan (Caughey *et al.*, 1997), et l'augmentation d'adhérence des leucocytes polymorphonucléaires à membrane de nylon (Spagnuolo *et al.*, 1980).

Pour sa part, le PAF est formé à partir du lyso-PAF via l'action de l'acétyl transférase en présence d'acétyl-CoA (Braquet *et al.*, 1987). Produit par plusieurs types cellulaires incluant les neutrophiles (Camussi *et al.*, 1981; Sisson *et al.*, 1987; Miwa *et al.*, 1992, McDonald *et al.*, 1993), le PAF est reconnu pour avoir de multiples actions physiologiques et pathologiques. Plus large que son rôle initial comme étant un activateur des plaquettes, le PAF est un médiateur phospholipidique qui cause la vasodilatation, la contraction des cellules du muscle lisse et l'activation des neutrophiles, macrophages et éosinophiles (Imaizumi *et al.*, 1995; Izumi et Shimizu, 1995). Il exerce un rôle important dans les réactions allergiques et inflammatoires, retrouvées dans certaines maladies comme l'asthme et l'ischémie du myocarde (Imaizumi *et al.*, 1995; Izumi et Shimizu, 1995). Le PAF affecte également les systèmes reproducteur (ovulation, ovoimplantation, embryogenèse, motilité des spermatozoïdes),



cardiovasculaire (hypotension, bradycardie, vasoconstriction coronarienne) et nerveux central (modulation de la transmission du signal synaptique, relâchement des neurotransmetteurs) (Hanahan, 1986; Braquet *et al.*, 1987; Braquet et Rola-Pleszczynski, 1987; Koltai *et al.*, 1991; Imaizumi *et al.*, 1995; Izumi et Shimizu, 1995). En fonction du type cellulaire, le PAF induit une variété de réponses cellulaires comme le chimiotactisme, le relâchement de granules, la génération des radicaux oxygénés toxiques, l'augmentation de la phagocytose, ainsi que la production de plusieurs cytokines (Ingraham *et al.*, 1982; Bonavida *et al.*, 1989; Rola-Pleszczynski et Stankova, 1992; Denault *et al.*, 1997).

Ainsi, le profil global des médiateurs lipidiques générés par les neutrophiles peut clairement influencer la manière dont ces cellules participent à l'orchestration de la réponse inflammatoire et, à ce titre, une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant la biosynthèse de ces médiateurs comporte sans aucun doute un intérêt clinique.

### **1.2.8 Production des médiateurs peptidiques (cytokines/chimiokines et facteurs de croissances)**

Les cytokines sont de petits peptides impliqués dans un grand nombre de fonctions au sein de l'organisme, et tout particulièrement dans la résistance naturelle ou acquise aux agents infectieux ou toxiques. Elles sont des messagers chimiques de la communication intercellulaire permettant l'échange d'informations entre les cellules

(Garofalo et Goldman, 1998; Townsend et McKenzie, 2000). Les cytokines possèdent deux caractéristiques particulières: la redondance (deux cytokines différentes peuvent avoir le même effet) et la pléiotropie (une seule cytokine peut exercer des effets multiples et variés sur divers types cellulaires), ce qui montre la complexité de leurs fonctions dans le processus inflammatoire (Garofalo et Goldman, 1998; Townsend et McKenzie, 2000; Goldsby RA. *et al.*, 2000; Nesin et Cunningham-Rundles, 2000; Shuai et Liu, 2003).

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques dont le poids moléculaire oscille entre 8 kDa et 14 kDa (Oppenheim *et al.*, 1991; Taub et Oppenheim, 1994). Elles attirent les leucocytes au site inflammatoire, contrôlent la migration directionnelle et l'emplacement des leucocytes dans les organes lymphoïdes secondaires et les tissus. Les chimiokines sont classifiées, selon la configuration des résidus cystéine situés près de la portion N-terminale, en 4 familles : C-, CC-, CXC-, et CX<sub>3</sub>C, où « X » correspond à un acide aminé autre que la cystéine (Rollins, 1997; Baggiolini, 1998; Luster, 1998; Kim et Broxmeyer, 1999; Murphy *et al.*, 2000; Zlotnik *et al.*, 2000). Globalement, les cytokines et les chimiokines jouent un rôle dans la régulation du trafic cellulaire, la dégranulation leucocytaire, l'angiogenèse, ainsi que dans la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Proost *et al.*, 1996; Rollins, 1997; Rossi et Zlotnik., 2000; Mackay, 2001).

Bien que les monocytes et les lymphocytes aient longtemps été considérés comme des sources majeures de cytokines parmi les cellules sanguines, il est maintenant

évident que les cytokines sont aussi produites par plusieurs autres types cellulaires, dont les neutrophiles (Lloyd et Oppenheim, 1992; Cassatella, 1995 et 1999, Cassatella *et al.*, 1997; Hachicha M. *et al.*, 1998; Scapini *et al.*, 2000; Lapinet *et al.*, 2000). Une liste de cytokines produites par les neutrophiles est présentée au tableau 1.2. En réponse à une stimulation appropriée, les neutrophiles produisent une vaste gamme de médiateurs peptidiques comprenant les cytokines pro-inflammatoires comme : l'IL-1 $\alpha/\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12; les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-1RA et le TGF- $\beta$ ; les chimiokines comme l'IL-8, le GRO- $\alpha$  et  $\beta$ , l'IP-10 (interferon-gamma-inducible protein-10), le MIG (monokine induced by IFN- $\gamma$ ), l'I-TAC (IFN-inducible T cell alpha chemoattractant), le MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$  et le MIP-3 $\alpha$  et  $\beta$ ; les facteurs de croissance comme le G-CSF, le GM-CSF, le VEGF et le HGF, ainsi que plusieurs autres (Tableau 1.2).

Étant donné que les neutrophiles sont généralement les premières cellules recrutées massivement au site inflammatoire (Woodman *et al.*, 1998; Chang, 1981; Abramson et Weissmann, 1981), ils pourraient, via la production et la sécrétion de cytokines et de chimiokines, orchestrer le recrutement sélectif de d'autres populations leucocytaires au site inflammatoire (Figure 1.3) (Lloyd et Oppenheim 1992; Cassatella, 1995 et 1999; Bennouna *et al.*, 2003; Wittamer *et al.*, 2005; van Gisbergen *et al.*, 2005; Nathan, 2006). Par exemple, l'afflux de différentes populations leucocytaires au site inflammatoire se reflète dans les chimiokines produites par les neutrophiles : l'IL-8 et GRO- $\alpha$  recrutent principalement les neutrophiles (Baggiolini et Clark-Lewis, 1992; Taub et Oppenheim, 1994; Cassatella, 1999). L'IP-10, le MIG ou l'I-TAC attirent

essentiellement les lymphocytes et les cellules NK, tandis que le MIP-1 $\alpha/\beta$  ou MIP-3 $\alpha/\beta$  recrutent les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques immatures et matures, les éosinophiles et les basophiles (Oppenheim *et al.*, 1991; Taub *et al.*, 1993; Taub et Oppenheim, 1994; Mantovani, 1997; Cassatella, 1999; Menten *et al.*, 2002; van Gisbergen *et al.*, 2005; Nathan, 2006). L'IL-12 induit les cellules NK et les lymphocytes T à produire de l'IFN- $\gamma$ , augmentant ainsi la cytotoxicité médiée par ces cellules et induit la polarisation des lymphocytes T vers le Th1 (Trinchieri, 1998; Gately *et al.*, 1998). Le BLyS (TNF-related ligand B-lymphocyte stimulator) contribue à la prolifération et maturation des lymphocytes B (Scapini *et al.*, 2005), alors que l'IFN- $\gamma$  participe à la différenciation des lymphocytes T et l'activation des macrophages (Ethuin *et al.*, 2004).

Les neutrophiles activés peuvent induire la maturation des cellules dendritiques, d'une part par la production de TNF- $\alpha$  et, d'autre part, grâce à l'interaction des molécules d'adhésion CD11b/CD18 des neutrophiles avec le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 Grabbing Nonintegrin) des cellules dendritiques. Cette interaction a été mise en évidence par l'augmentation de marqueurs de maturation, tel que le CD83, et par la production d'IL-12 lorsque les cellules dendritiques immatures sont en co-culture avec les neutrophiles activés (van Gisbergen *et al.*, 2005). Par ailleurs, la stimulation des cellules dendritiques par les neutrophiles activés augmente la capacité des cellules dendritiques à induire la prolifération des lymphocytes T, suggérant ainsi que les neutrophiles puissent instruire la maturation

fonctionnelle des cellules dendritiques et l'induction de réponses accrues des cellules T par les cellules dendritiques (van Gisbergen *et al.*, 2005).

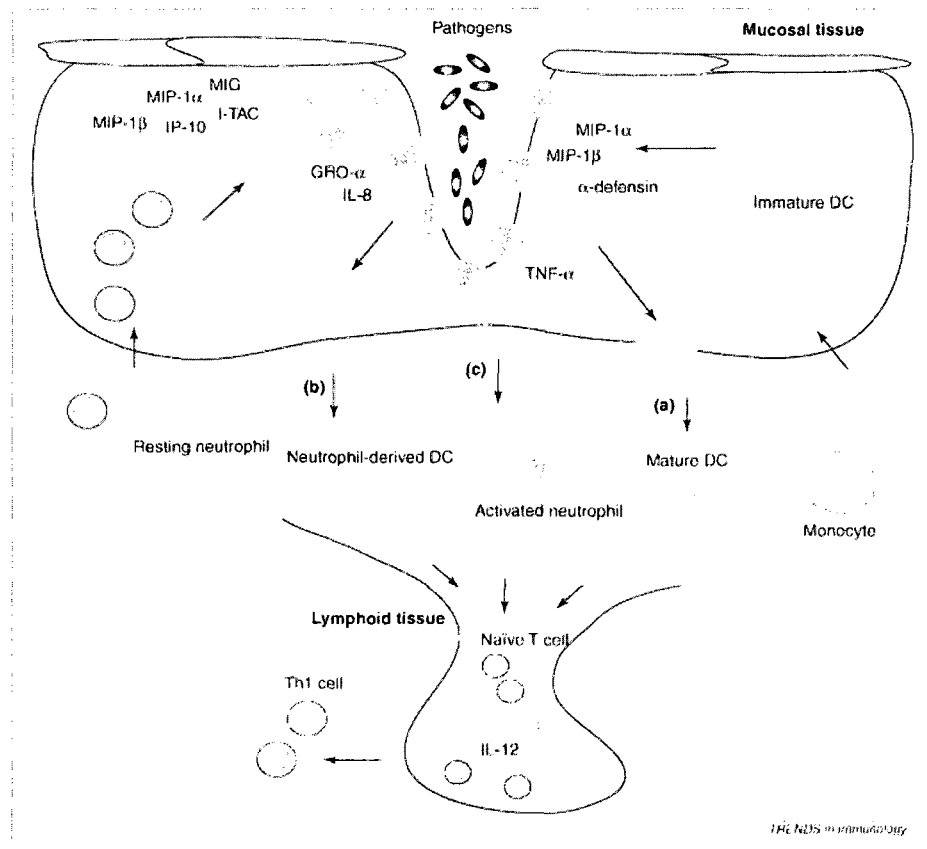
Comme nous venons de le voir, les neutrophiles interviennent dans la réponse immune innée (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2003; Mayer-Scholl *et al.*, 2004; Segal, 2005). Cependant, ils participent aussi activement à l'élaboration de la réponse immune adaptative (Figure 1.3) (Cassatella, 1995 et 1999; Ashtekar AR et Saha B, 2003; van Gisbergen *et al.*, 2005; Nathan, 2006; Appelberg, 2007). Premièrement, par leur capacité d'attirer les lymphocytes Th1 via la sécrétion de MIP-1 $\alpha/\beta$  et d'autres chimiokines (Scapini P *et al.*, 2000) et les cellules dendritiques via le MIP-1 $\alpha/\beta$  et la défensine- $\alpha$  (Kasama *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2000). Deuxièmement, les neutrophiles activés pourraient induire la maturation des cellules dendritiques et instruire ces dernières à induire la polarisation des lymphocytes T vers le phénotype Th1 par la sécrétion de l'IL-12 (Bennouna *et al.*, 2003; van Gisbergen *et al.*, 2005). Troisièmement, dans des conditions appropriées, ils pourraient non seulement survivre plus longtemps mais également être reprogrammés afin d'acquérir des caractéristiques phénotypiques de cellules présentatrices d'antigène (Oehler *et al.*, 1998; Yamashiro *et al.*, 2000; Iking-Konert *et al.*, 2001) ou, acquérir ce phénotype en mobilisant à leur membrane des marqueurs préformés (Sandilands *et al.*, 2003 et 2005). Quatrièmement, ils pourraient migrer vers les organes lymphoïdes pour présenter l'antigène aux lymphocytes T (Bliss *et al.*, 2000; Abadie *et al.*, 2005).

Finalemment, grâce à cette vaste gamme de médiateurs produits par les neutrophiles, ils peuvent non seulement influencer directement la réponse inflammatoire et la mise sur pied d'une réponse immune spécifique à divers agents pathogènes. Qui plus est, ils peuvent aussi influencer d'autres processus comme l'hématopoïèse, l'angiogénèse, la guérison des plaies et la résolution de l'inflammation (Lloyd et Oppenheim 1992; Cassatella, 1995 et 1999; Bennouna *et al.*, 2003; Wittamer *et al.*, 2005; van Gisbergen *et al.*, 2005; Nathan, 2006; Appelberg, 2007).

<p><b>Cytokines pro-inflammatoires:</b></p> <p>IL-1<math>\alpha</math>/<math>\beta</math>  IL-6  IL-12  IL-17  IL-18  IFN-<math>\alpha</math>/<math>\gamma</math>  MIF</p>	<p><b>Cytokines anti-inflammatoires:</b></p> <p>IL-1 RA  TGF-<math>\beta</math>1/<math>\beta</math>2</p>
<p><b>Chimiokines C-X-C:</b></p> <p>IL-8/CXCL8  GRO-<math>\alpha</math>/<math>\beta</math>/<math>\gamma</math> ou CXCL1/2/3  ENA-78/CXCL5  GCP-2/CXCL6  MIG/CXCL9  IP-10/CXCL10  I-TAC/CXCL11</p>	<p><b>Chimiokines C-C:</b></p> <p>MCP-1/CCL2  MIP-1<math>\alpha</math>/CCL3  MIP-1<math>\beta</math>/CCL4  MIP-3<math>\alpha</math>/CCL20  MIP-3<math>\beta</math>/CCL19</p>
<p><b>Superfamille du TNF:</b></p> <p>TNF-<math>\alpha</math>  Fas Ligand  CD30 Ligand  LIGHT  TRAIL  Blys</p>	<p><b>Facteurs de croissance:</b></p> <p>G-CSF  GM-CSF  VEGF  FGF-2  TGF-<math>\alpha</math>  HGF</p>

(Mise à jour de Cassatella, 1999 et de Scapini *et al.*, 2000)

**Tableau 1.2 Les cytokines et chimiokines produites par les neutrophiles.**



(Extrait de van Gisbergen KPJM *et al.*, 2005)

### Figure 1.3 Neutrophiles et régulation de réponse immunitaire adaptative.

Les neutrophiles sont parmi les premières cellules immunitaires à migrer vers les sites d'infection. Les neutrophiles recrutent d'autres cellules immunitaires, y compris d'autres neutrophiles, par l'intermédiaire de l'IL-8 et du GRO- $\alpha$ , les cellules Th1 par le biais de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIG, IP-10 et I-TAC, les cellules dendritiques (DCs) immatures par le biais de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et défensine- $\alpha$ . (a) les neutrophiles activés produisent du TNF- $\alpha$  et induit la maturation des DCs. Les DCs matures migrent vers les ganglions lymphatiques où ils produisent de l'IL-12 et favorisent l'induction de réponses des cellules T de type Th1. (b) Par ailleurs, les cytokines inflammatoires au site d'infection pourraient permettre la différenciation de précurseurs immatures des neutrophiles en DCs qui migreraient aux ganglions lymphatiques afin d'induire la prolifération des cellules T. (c) Les neutrophiles rencontrent des agents pathogènes et pourraient migrer vers les ganglions lymphatiques, où ils pourraient jouer un rôle dans la régulation immunitaire et induire la polarisation vers le phénotype Th1 par la production de l'IL-12.



### 1.3 Régulation de l'expression des gènes des cytokines et des chimiokines

#### 1.3.1 Activation de la transcription d'un gène

Pour activer un gène donné, divers stimuli entraînent la liaison d'un certain nombre de facteurs de transcription spécifiques à des séquences d'ADN régulatrices situées sur le promoteur d'un gène cible (Felsenfeld *et al.*, 1996; Courey, 2001). Ces facteurs favorisent le recrutement de co-activateurs et provoquent le remodelage de la chromatine, ce qui permet à la machinerie basale de transcription (les facteurs généraux de transcription et l'ARN polymérase II) de se lier aux séquences d'ADN régulatrices sur le promoteur, qui étaient auparavant inaccessibles, et d'initier la transcription (Grunstein, 1997; Courey, 2001; Merika et Thanos, 2001; Eberharter et Becker, 2002).

L'expression inductible d'un gène en réponse à un stimulus est régulée à différents niveaux : le signal reçu pourra, selon les besoins de la cellule, être amplifié ou atténué lors de sa transmission au noyau (Benes *et al.*, 1999; Freeman et Gurdon, 2002). La quantité de facteurs de transcription recrutée au site d'initiation de la transcription (SIT) est critique pour initier la transcription, comme c'est le cas pour les gènes qui nécessitent la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Siebenlist *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 1998; Wang et Baldwin, 1998). Les membres d'une même famille de facteurs de transcription peuvent aussi moduler différent type de gènes (par exemple, le dimère RelA/p50 ou RelA/RelA régule le promoteur du gène de l'IL-8, tandis que le complexe RelA/c-Rel cible plutôt celui du MCP-1) (Kunsch et Rosen, 1993; Ueda *et al.*, 1997; Chen, 2004). Certains facteurs nécessitent un cofacteur ou une modification post-

traductionnelle pour être actifs comme c'est le cas pour ATF-2 (activating transcription factor 2) qui doit être phosphorylé pour s'attacher à l'ADN (Gupta et al., 1995; Livingstone et al., 1995; Curthoys et Gstraunthaler, 2001). Différentes modifications post-traductionnelles (phosphorylation ou ubiquitinylation) maintiennent enfin la protéine repliée correctement, et/ou active plus ou moins longtemps dans la cellule (Ashcroft et Voudsen, 1999; Ashcroft *et al.*, 2000; Gottifredi *et al.*, 2001; Pierrat *et al.*, 2007).

Ceci dit, la régulation de l'expression des gènes précoces, tels que ceux qui encodent des cytokines et chimiokines, dépend avant tout de la transcription, qui est représentée aussi l'étape limitante (Escoubet-Lozach *et al.*, 2002).

### **1.3.2 Régulation transcriptionnelle de quelques gènes de cytokines et de chimiokines dans des cellules autres que les neutrophiles**

Plusieurs facteurs de transcription incluant les facteurs NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT, NF-IL6 (ou C/EBP $\beta$ ) et d'autres sont impliqués dans l'expression de plusieurs gènes de cytokines et de chimiokines (Agarwal et Rao, 1998; Lavender *et al.*, 2000; Smale et Fisher, 2002; Holloway *et al.*, 2002; Nikolajczyk, 2006; Meyer et Vinkemeier, 2007).

De nombreux agents exogènes et des stimuli pro-inflammatoires, tels que les endotoxines, les lectines, l'hypoxie, les virus, les bactéries, l'IL-1, et le TNF- $\alpha$ , stimulent la production d'IL-8 dans une grande variété de types cellulaires (Taub et

Oppenheim, 1994) soit par la stabilisation de l'ARNm de l'IL-8 (Matsushima *et al.*, 1988) ou par l'activation de la transcription du gène de l'IL-8 (Taub et Oppenheim, 1994). La séquence génomique de l'IL-8 contient des sites de liaison putatifs pour plusieurs facteurs de transcription, comme pour le NF- $\kappa$ B, le NF-IL6 (C/EBP $\beta$ ), l'AP-1, les récepteurs des glucocorticoïdes, le HNF-1 (hepatocyte nuclear factor-1) et l'IRF-1 (interferon regulatory factor-1) (Mukaida *et al.*, 1989; Stein et Baldwin, 1993). L'analyse du promoteur de l'IL-8 montre qu'une séquence entre les positions -91 et -71 contient un site de liaison pour le NF- $\kappa$ B et le NF-IL6 (C/EBP $\beta$ ). Ces deux sites sont suffisants pour l'induction de la transcription du gène de l'IL-8 par le LPS, l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , le PMA ou la protéine X du virus de l'hépatite B. Des études effectuées chez les cellules Jurkat et HeLa ont montré que le gène de l'IL-8 est régulé par une liaison coopérative du NF-IL6 et de RelA à l'ADN (Stein et Baldwin, 1993; Kunsch *et al.*, 1994). Ces facteurs nucléaires forment un complexe tertiaire avec le promoteur de l'IL-8, ce qui amène un effet de synergie sur l'expression de l'IL-8 (Kunsch *et al.*, 1994). Une surexpression de la protéine I $\kappa$ B, l'inhibiteur du NF- $\kappa$ B, abolit cet effet synergique dépendant de RelA et de NF-IL6 (Kunsch *et al.*, 1994). Toutefois, la transcription du gène de l'IL-8 semble être régulée différemment dans divers types de cellules, selon la coopération au niveau des sites de liaison pour l'AP-1, le NF-IL-6, et le NF- $\kappa$ B, possiblement en raison de la disponibilité et de l'activation de différents facteurs nucléaires. Dans les lignées de cellules cancéreuses gastriques et les lignées monocytaires, seul le site NF-IL6 est indispensable pour l'expression du gène de l'IL-8 (c'est-à-dire soit AP-1 + NF-IL6 ou NF- $\kappa$ B + NF-IL6 puissent induire son expression). D'autre part, dans les cellules de glioblastome humain, le NF- $\kappa$ B est requis pour

l'expression du gène de l'IL-8 (soit AP-1 + NF- $\kappa$ B ou NF-IL6 + NF- $\kappa$ B) (Mukaida *et al.*, 1990; Mahe *et al.*, 1991; Yasumoto *et al.*, 1992).

Les glucocorticoïdes comme la dexaméthasone sont des agents immunomodulateurs anti-inflammatoires puissants qui ont un effet d'inhibition sur la transcription génique de plusieurs cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-8. Un site GRE (Glucocorticoid-responsive element), présent entre les positions -330 et -325 dans le promoteur de l'IL-8, joue un rôle dans l'inhibition de l'expression de l'IL-8 observée avec la dexaméthasone dans un certain nombre de types cellulaires (Mukaida *et al.*, 1989). Toutefois, la dexaméthasone supprime également la production de l'IL-8 induite par l'IL-1 via le site du NF- $\kappa$ B (Mukaida *et al.*, 1994).

D'autres gènes de chimiokines à motif C-X-C semblent être sous un contrôle semblable. L'IL-1 et le TNF stimulent l'expression d'un grand nombre de chimiokines C-X-C incluant GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , et GRO $\gamma$  dans les monocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales mammaires par le biais des sites du NF- $\kappa$ B dans leurs promoteurs (Haskill *et al.*, 1990).

Bien que la régulation de l'expression des gènes des chimiokines C-C soit moins bien connue que celle de l'IL-8 (CXCL8), des sites de liaison potentiels pour NF- $\kappa$ B, NF-IL6, AP-1 et AP-2 ont été identifiés dans les régions régulatrices du gène MCP-1 murin (Timmers *et al.*, 1990). Des sites pour NF-IL6, NF- $\kappa$ B, et c-Ets ont été également identifiés dans le promoteur de MIP-1 $\alpha$  humain (Grove et Plumb, 1993).

### 1.3.3 Régulation de la transcription chez les neutrophiles

Les neutrophiles peuvent transcrire un large éventail de gènes, et synthétiser les protéines correspondantes (Marucha *et al.*, 1991; Lloyd et Oppenheim, 1992; Cassatella, 1995 et 1999, Cassatella *et al.*, 1997; Hachicha M. *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1998; Scapini *et al.*, 2000; Lapinet *et al.*, 2000). Un certain nombre de facteurs de transcription a été identifié et partiellement caractérisé dans les neutrophiles. Il s'agit des membres de la famille STAT, NF- $\kappa$ B/Rel, Ets, C/EBP et AP-1 (Cloutier et McDonald, 2003; McDonald, 2004). Parmi ces familles de facteur de transcription, les STAT et NF- $\kappa$ B/Rel sont relativement mieux documentés. Au moins 4 membres de la famille STAT (STAT1, STAT2, STAT3 et STAT5) sont exprimés et activés par divers stimuli incluant le G-CSF (STAT1 et 3) (Bovolenta *et al.*, 1996; Chakraborty et Tweardy, 1998; Kuroki et O'Flaherty, 1999), le GM-CSF (STAT1, 3 et 5) (Brizzi *et al.*, 1996; McDonald *et al.*, 1998; Al-Shami *et al.*, 1998; Kuroki et O'Flaherty, 1999; Caldenhoven *et al.*, 1999), l'IFN- $\gamma$  (STAT1 et 3) (McDonald *et al.*, 1998; Bovolenta *et al.*, 1998; Caldenhoven *et al.*, 1999), l'IL-10 (STAT1 et 3) (Crepaldi *et al.*, 2001). En ce qui concerne la famille de NF- $\kappa$ B/Rel, les protéines RelA ou p65, c-Rel, p50 et son précurseur p105 sont exprimées par les neutrophiles (Druker *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1997). Contrairement à la majorité de types cellulaires qui expriment les protéines NF- $\kappa$ B/Rel dans le cytoplasme des cellules au repos, les protéines NF- $\kappa$ B/Rel (et ses protéines inhibitrices, I $\kappa$ Bs) sont distribuées de façon égale dans les deux compartiments cellulaires, cytoplasmique et nucléaire, des neutrophiles au repos (McDonald *et al.*, 1997; Vancurova *et al.*, 2001; nos données dans cette présente thèse). Les protéines NF-

$\kappa$ B/Rel sont activées chez les neutrophiles par plusieurs stimuli comprenant le TNF- $\alpha$  (McDonald *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 1999; Vancurova *et al.*, 2001; Miskolci *et al.*, 2003), le LPS (McDonald *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1998; Sugita *et al.*, 1998; Vollebregt *et al.*, 1998), l'IL-1 $\beta$  (McDonald *et al.*, 1997), IL-15 (McDonald *et al.*, 1998), les particules phagocytaires (McDonald et Cassatella, 1997; Vollebregt *et al.*, 1998), le PAF (McDonald *et al.*, 1997), le LTB<sub>4</sub> (McDonald *et al.*, 1997). En ce qui concerne l'AP-1, malgré la présence de plusieurs protéines de cette famille, la formation d'un complexe authentique AP-1 n'est observée en aucun cas (Cloutier *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'inhibition de la voie JNK n'affecte pas la production d'IL-8, de MIP-1 $\alpha$  et de MIP-1 $\beta$  induite par le LPS ou le TNF- $\alpha$  (Cloutier *et al.*, 2003).

Bien que la présence et l'activation de plusieurs facteurs de transcription soient documentées chez les neutrophiles, il y a en ce moment très peu de données qui démontrent l'impact de l'activation de ces facteurs de transcription sur l'expression d'un grand nombre de gènes qui sont induits par divers stimuli dans ces cellules. En particulier, dans l'induction de l'expression des gènes des cytokines et des chimiokines (Cloutier et McDonald, 2003; McDonald, 2004). L'absence de ces informations peut être en partie attribuable au fait que les neutrophiles ne sont pas transfectables et qu'ils ne survivent pas longtemps en culture, empêchant ainsi la réalisation d'études de promoteurs telles qu'on en fait dans d'autres types de cellules. Par conséquent, le développement d'un modèle cellulaire 'granulocytaire' transfectable permettant d'introduire diverses constructions, i.e. promoteur-rapporteurs, protéines surexprimées,

permettrait l'étude de l'aspect transcriptionnel dans ces cellules. À ce propos, quelques lignées de type granulocytaire sont décrites dans la littérature. Il s'agit des lignées cellulaires HL-60 (Langer et Pestka, 1985), PL-21 (Kubonishi *et al.*, 1986) et PLB-985 (Tucker *et al.*, 1987) différenciées en neutrophile avec l'ajout d'un agent de différenciation comme la vitamine D3, l'acide rétinoïde ou le diméthylsulfoxyde. Cependant, les diverses techniques de transfection utilisées dans la littérature demeurent encore peu efficaces, surtout pour la transfection transitoire. **Dans le cadre du présente projet, nous avons utilisé les cellules PLB-985 différenciées en neutrophiles là où certains essais ne sont pas réalisables dans les neutrophiles primaires.**

D'une part, la régulation de l'expression d'un gène est très complexe et reste encore mal comprise. Par exemple, pourquoi un facteur de transcription particulier régule-t-il la transcription d'un gène et non celle d'un autre alors que les promoteurs des deux gènes contiennent tous deux la même séquence d'ADN pouvant se lier à ce facteur? D'autre part, la signalisation intracellulaire menant à l'activation de l'expression d'un gène est vaste puisque plusieurs voies différentes peuvent interagir entre elles et puisque la réponse à un stimulus particulier peut varier selon le type cellulaire et selon le niveau de différenciation et l'état des cellules. C'est pourquoi, **dans la présente thèse, nous nous sommes concentrés sur le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et les composants faisant partie de sa cascade de signalisation, ainsi que l'impact de son activation sur l'expression et la sécrétion inductible de quelques cytokines et de chimiokines par les neutrophiles humains.** En conséquence, le NF- $\kappa$ B

et les composants faisant partie de la cascade menant à son activation seront approfondis dans la section suivante.



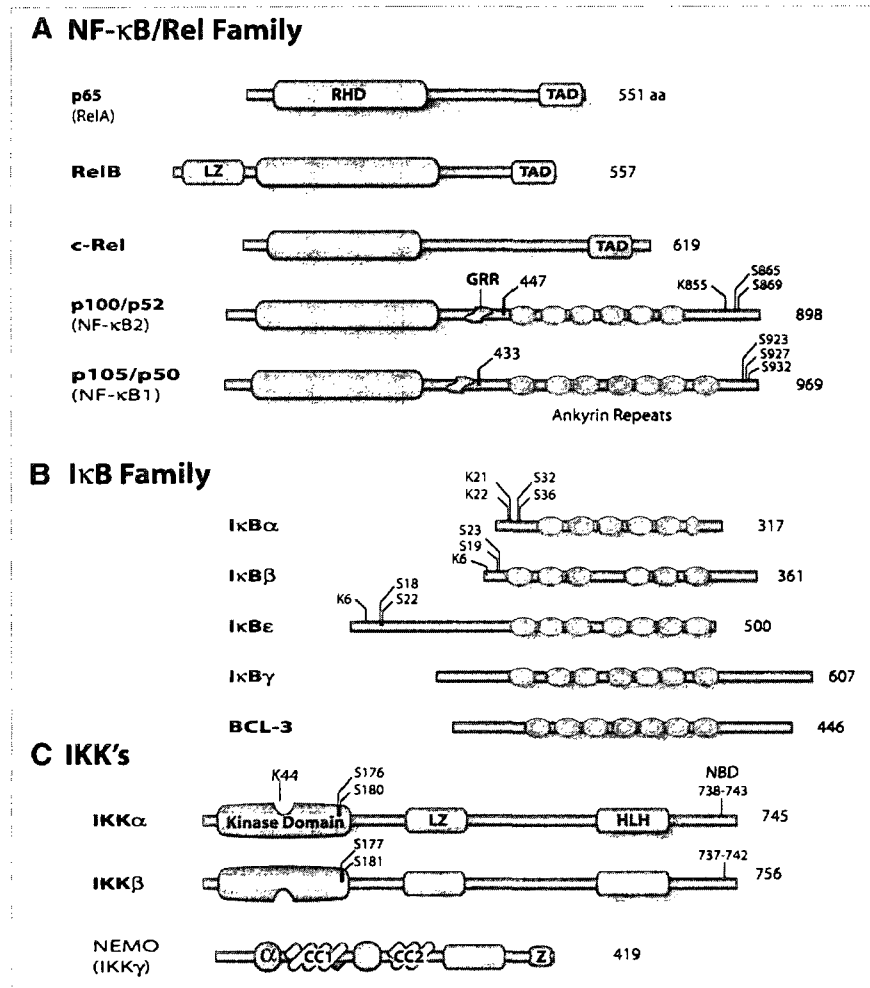
## **1.4 Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et les composants de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B**

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor *kappa* B) a été initialement décrit comme un facteur nucléaire nécessaire à la transcription de la chaîne légère  $\kappa$  des immunoglobulines dans les lymphocytes B (Sen et Baltimore, 1986). Depuis, on sait qu'il se retrouve chez à peu près tous les types cellulaires et qu'il joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques et cellulaires comme l'inflammation, les réponses immunitaires innées et adaptatives (Bonizzi et Karin, 2004), la prolifération et la survie des cellules (Siebenlist *et al.*, 2005; Papa *et al.*, 2006), le développement des organes (Weih et Caamano, 2003). La dérégulation de ce facteur de transcription, par exemple, son activation constitutive peut mener aux maladies inflammatoires et autoimmunes, ainsi qu'à certains cancers (Yamamoto et Gaynor, 2001; Karin *et al.*, 2002).

### **1.4.1 La famille Rel/ NF- $\kappa$ B**

La famille des protéines Rel/NF- $\kappa$ B se compose, chez les mammifères, des protéines p65 (ou RelA), RelB, c-Rel, p50 (ou NF- $\kappa$ B1) et p52 (ou NF- $\kappa$ B2) (Figure 1.4). Les protéines p50 et p52 sont respectivement formées à partir de précurseurs, p105 et p100 (Ghosh *et al.*, 1998; Silverman et Maniatis, 2001; Ghosh et Karin, 2002; Hayden et Ghosh, 2004). Chaque membre contient en position N-terminale une séquence conservée RHD (Rel homology domain) d'environ 300 acides aminés

impliquée dans la liaison à l'ADN, dans la dimérisation et dans l'interaction avec des protéines inhibitrices appelées I $\kappa$ Bs (inhibitors of NF- $\kappa$ B). La partie C-terminale du RHD contient un groupe très conservé d'acides aminés positivement chargés fonctionnant à titre de séquence de localisation nucléaire (NLS) (Ghosh *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1995). Les protéines RelA, RelB et c-Rel contiennent, de plus, à leur extrémité C-terminale les domaines TADs (transactivation domains) qui sont importants dans l'activation de l'expression génique. Les TADs interagissent avec différents composants de la machinerie transcriptionnelle de base comme le TBP (TATA-binding protein) et le TFIIB (transcription factor IIB) (Xu *et al.*, 1993; Blair *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 1995) et avec les coactivateurs transcriptionnels, comme le p300 et le CBP (CREB-binding protein) (Perkins *et al.*, 1997; Sheppard *et al.*, 1999). Les protéines p50 et p52 ne possèdent pas un tel domaine, ce qui en fait des modulateurs ou répresseurs de la transcription (Ghosh *et al.*, 1998). Chaque membre de la famille Rel/NF- $\kappa$ B peut participer à la formation d'homo- ou hétérodimères. La forme dimérique la plus courante est composée des sous-unités p50 et p65 (Siebenlist *et al.*, 1994). Les différents dimères possibles présentent des affinités différentes selon les sites consensus et des potentialités transactivatrices variables, augmentant ainsi les possibilités et la spécificité de régulation de l'expression des gènes dépendants du NF- $\kappa$ B (Baldwin, 1996; Udalova *et al.*, 2002; Sacconi *et al.*, 2002; Chen, 2004).



(Extrait de Hayden et Ghosh , 2004)

**Figure 1.4 Représentation schématique des protéines de la famille NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, et IKK.**

Les différents membres de la famille NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, et IKK sont montrés. Le nombre d'acides aminés de chaque protéine est indiqué à droite. Les sites de clivage présumés pour la p100 (acide aminé 447) et la p105 (acide aminé 433) sont montrés. Les sites de phosphorylation et de l' ubiquitinylation sur la p100, la p105, et l'I $\kappa$ B sont indiqués. (RHD) Rel homology domain; (TAD) transactivation domain; (LZ) leucine zipper domain; (GRR) glycine-rich region; (HLH) helix-loop-helix domain; (Z) zinc finger domain; (CC1/2) coiled-coil domains; (NBD) NEMO-binding domain; ( $\alpha$ )  $\alpha$ -helical domain.

#### 1.4.1.1 Régulation de l'activité du NF- $\kappa$ B dépendante des I $\kappa$ Bs

Dans une cellule au repos, le complexe NF- $\kappa$ B est généralement séquestré dans le cytoplasme par les protéines I $\kappa$ Bs qui masquent les sites NLS inhibant ainsi leur translocation au noyau (Baldwin, 1996). L'activation de la cellule par divers stimuli, comme le TNF- $\alpha$  ou le LPS, induit la phosphorylation et l'activation d'un groupe de kinases nommées IKKs (I $\kappa$ B kinases) qui phosphorylent les I $\kappa$ Bs, notamment I $\kappa$ B $\alpha$ . La phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  entraîne son ubiquitinylation et par conséquent sa dégradation par le protéasome. Il en résulte la libération de NF- $\kappa$ B, permettant sa translocation au noyau. Une fois dans le noyau, NF- $\kappa$ B se lie à des sites promoteurs particuliers, au niveau de séquences consensus spécifiques de type 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' (Siebenlist *et al.*, 1994), situées dans les promoteurs des gènes cibles. C'est ainsi que le NF- $\kappa$ B induit la transcription de cytokines et de chimiokines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , CM-CSF, IL-8, Mip-1, IP-10), de molécules d'adhésion (ICAM, VCAM, E-sélectine), d'enzymes effectrices inductibles (iNOS, COX-2), de facteurs de transcription (RelB, p50, c-Myc) ainsi que de ses propres inhibiteurs (I $\kappa$ B $\alpha$ ) (Baeuerle, 1998; Ghosh *et al.*, 1998; Kopp et Medzhitov, 1999; Pahl, 1999; Abraham, 2000; Lim *et al.*, 2001; Karin et Lin, 2002; Aktan *et al.*, 2004; Bonizzi et Karin, 2004; Hayden et Ghosh, 2004).

#### 1.4.1.2 Régulation de l'activité du NF- $\kappa$ B indépendante des I $\kappa$ Bs

L'activité transcriptionnelle du NF- $\kappa$ B est régulée non seulement via la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et la translocation nucléaire en résultant, mais aussi par plusieurs

modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation et/ou l'acétylation, ce qui module le potentiel de transactivation du NF- $\kappa$ B (Schmitz *et al.*, 2001; Chen et Greene, 2004; Viatour *et al.*, 2005; Perkins, 2006). Plusieurs protéines kinases sont connues pour être impliqués dans ce processus de modification comme la PKA (protein kinase A) (Zhong *et al.*, 1998), la CKII (casein kinase II) (Wang *et al.*, 2000) et les IKKs (Sakurai *et al.*, 1999; Buss *et al.*, 2004).

La sous-unité p65 du NF- $\kappa$ B est la principale cible connue de phosphorylation par différentes kinases. Ces kinases fonctionnent à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, et sont induites de façon différentielle par divers stimuli comme le LPS et le TNF- $\alpha$ . Le domaine RHD et le domaine de transactivation de p65 contiennent des sites de phosphorylation clés qui sont spécifiquement visés par diverses kinases. Les sites de phosphorylation inductible le plus souvent rapportés pour p65 sont la sérine 536, la sérine 529 et la sérine 276. La sérine 536 est phosphorylée par le complexe IKK (Sakurai *et al.*, 1999), tandis que la sérine 529 est phosphorylée par la CKII (Wang *et al.*, 2000). La phosphorylation de la sérine 276 est faite par la sous-unité catalytique de la protéine kinase A (PKAc) ou par la kinase MSK1 (mitogen- and stress-activated protein kinase 1) (Zhong *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003). D'autres sites de phosphorylation de p65 ont aussi été décrits. Leur signification fonctionnelle reste cependant incertaine (Chen et Greene, 2004; Chen *et al.*, 2005; Viatour *et al.*, 2005; Perkins, 2006).

L'acétylation est une modification importante dans la régulation de la fonction nucléaire du NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2002, 2005; Kiernan *et al.*, 2003; Hoberg *et al.*, 2006).

Le p65 endogène devient acétylé sur plusieurs sites après l'activation des cellules, par exemple les cellules HeLa, par le TNF- $\alpha$  ou avec d'autres stimuli. De plus, le p300 et le CBP semblent jouer un rôle majeur dans l'acétylation du p65, de par leur activité enzymatique histone acétyltransférase (HAT), qui régule aussi en partie l'expression génétique par acétylation de la queue N-terminale des histones (Ogryzko *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 2002). L'acétylation du NF- $\kappa$ B conduit à la modification de son activité de liaison à l'ADN et de son activité transcriptionnelle (Ogryzko *et al.*, 1996; Kouzarides, 2000; Chen *et al.*, 2002 et 2004). Trois principaux sites d'acétylation ont été identifiés au sein du p65, soit les lysines 218, 221 et 310 (Chen *et al.*, 2002 et 2004). L'acétylation de la lysine 221 accroît l'affinité de fixation à l'ADN du p65 sur le site  $\kappa$ B et diminue son assemblage avec la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ , alors que l'acétylation de la lysine 310 du p65 est nécessaire pour une pleine transactivation du complexe NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2002 et 2004). Un lien entre la phosphorylation et l'acétylation du p65 a été également rapporté, en ce sens que l'acétylation du p65 serait surtout régulée par la phosphorylation préalable des sérines 276 et 536 (Chen *et al.*, 2005; Hoberg *et al.*, 2006). La forme phosphorylée et acétylée de p65 possède une activité transcriptionnelle accrue.

#### **1.4.2 La famille des protéines inhibitrices I $\kappa$ Bs**

La famille I $\kappa$ B est composée de plusieurs protéines incluant I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , et Bcl-3 (Figure 1.4) (Siebenlist *et al.*, 1994; Baldwin, 1996; Silverman et Maniatis, 2001; Ghosh et Karin, 2002; Hayden et Ghosh, 2004). Tous les membres de la famille I $\kappa$ B contiennent un domaine fortement conservé présentant un nombre variable

de motifs ankyrines. La fonction essentielle de ces motifs est d'interagir avec le RHD de la famille NF- $\kappa$ B et d'inhiber la translocation des dimères NF- $\kappa$ B en masquant la séquence NLS et les sites de liaison à l'ADN (Beg *et al.*, 1992; Ganchi *et al.*, 1992). Chaque membre présente une spécificité donnée à différents dimères NF- $\kappa$ B. Par exemple, les protéines I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , et I $\kappa$ B $\epsilon$  se lient préférentiellement aux complexes contenant RelA ou c-Rel (Thompson *et al.*, 1995; Whiteside *et al.*, 1997), tandis que Bcl-3 lie préférentiellement les homodimères p50 et p52 (Franzoso *et al.*, 1992; Wulczyn *et al.*, 1992; Naumann *et al.*, 1993).

La protéine **I $\kappa$ B $\alpha$**  (37 kDa) est le membre le plus étudié de cette famille, du fait qu'elle a été la première à être clonée (Davis *et al.*, 1991; Haskill *et al.*, 1991). Cette protéine contient, en position C-terminale, un domaine riche en proline, glutamate, aspartate, sérine et thréonine appelé "PEST domain". Ce domaine est impliqué dans la demi-vie d'I $\kappa$ B $\alpha$  et présente un site de phosphorylation pour la kinase CKII (Verma *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996; McElhinny *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 1996). La structure cristallographique d'I $\kappa$ B $\alpha$  lorsque liée au dimère p65/p50 montre que la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  masque seulement la séquence NLS du p65, tandis que celle du p50 demeure accessible, ce qui peut moduler l'import nucléaire du complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  (Huxford *et al.*, 1998; Jacobs et Harrison, 1998). D'ailleurs, l'I $\kappa$ B $\alpha$  possède, en position N-terminale, une séquence NES (Nuclear Export Sequence). Ceci rend le complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  capable de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau, quoique la localisation habituelle d'I $\kappa$ B $\alpha$  est cytoplasmique (Johnson *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000, Tam, 2000). Physiologiquement, I $\kappa$ B $\alpha$  régule l'induction rapide,

mais transitoire, de l'activité du NF- $\kappa$ B. En effet, la stimulation du NF- $\kappa$ B induit une augmentation de l'expression du répresseur I $\kappa$ B $\alpha$  dont le promoteur du gène possède des sites  $\kappa$ B (Sun *et al.*, 1993; Chiao *et al.*, 1994). Le répresseur I $\kappa$ B $\alpha$  néo-synthétisé est alors capable de lier les dimères NF- $\kappa$ B directement dans le noyau (Zabel et Baeuerle, 1990; Brown *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1993; Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995). Ce mécanisme semble nécessaire à la restauration de l'inhibition lorsque la stimulation prend fin, et assurerait une réponse transitoire. À ce propos, Beg *et al.*, 1995 a montré que les cellules fibroblastiques qui sont déficientes en I $\kappa$ B $\alpha$  n'arrivent pas à débarrasser le NF- $\kappa$ B du noyau après une stimulation avec le TNF- $\alpha$ .

La protéine **I $\kappa$ B $\beta$**  (43-45 kDa) est analogue à I $\kappa$ B $\alpha$  d'un point de vue structural. Cette protéine inhibe préférentiellement les dimères NF- $\kappa$ B contenant RelA ou c-Rel (Thompson, 1995; Baldwin, 1996). À la différence d'I $\kappa$ B $\alpha$ , la protéine I $\kappa$ B $\beta$  est dégradée seulement quand les cellules sont stimulées avec un certain type de stimulus, tels que le LPS ou l'IL-1, qui cause une activation prolongée du NF- $\kappa$ B. La cinétique de dégradation d'I $\kappa$ B $\beta$  est relativement plus longue (Thompson *et al.*, 1995; Suyang *et al.*, 1996; Tran K *et al.*, 1997). La protéine I $\kappa$ B $\beta$  nouvellement synthétisée s'accumule sous forme de protéine non-phosphorylée qui peut former un complexe stable avec le NF- $\kappa$ B et empêche ce dernier de se lier avec la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  néo-synthétisée. La protéine I $\kappa$ B $\beta$  non-phosphorylée peut lier le NF- $\kappa$ B, mais les séquences NLS et TAD de ce dernier ne sont pas masquées. Le complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\beta$  peut alors entrer dans le noyau et exercer son activité transcriptionnelle. Ce phénomène a été proposé comme un mécanisme



responsable de l'activation prolongée du NF- $\kappa$ B (Thompson *et al.*, 1995; Attar *et al.*, 1998; DeLuca *et al.*, 1999; Suyang *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996).

La protéine **I $\kappa$ B $\epsilon$**  (45–51 kDa) est presque exclusivement associée au dimère RelA/RelA ou RelA/c-Rel (Whiteside *et al.*, 1997; Li et Nabel, 1997). Il semblerait qu'elle régule l'expression de certains gènes spécifiques (ex IL-8) dont les promoteurs se lient préférentiellement au complexe RelA et c-Rel (Kunsch *et al.*, 1993). À la différence d'I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\beta$ , la protéine I $\kappa$ B $\epsilon$  ne contient pas le domaine PEST. Dans les cellules au repos, la protéine I $\kappa$ B $\epsilon$  présente plusieurs formes phosphorylées et est dégradée en réponse aux inducteurs du NF- $\kappa$ B avec une cinétique plus lente que celle d'I $\kappa$ B $\alpha$ , mais néo-synthétisée peu de temps après (Whiteside *et al.*, 1997). Bien que moins active qu'I $\kappa$ B $\alpha$ , la protéine I $\kappa$ B $\epsilon$  présente quand même une activité de type « aller-retour » entre le cytoplasme et le noyau (Lee et Hannink, 2002).

La protéine **Bcl-3** (60 kDa), quant à elle, présente des caractéristiques différentes d'I $\kappa$ B $\alpha$  et  $\beta$ . Il s'agit d'une protéine nucléaire qui interagit avec les homodimères p50 et p52 et les déplace du site  $\kappa$ B, ce qui enlève les effets répressifs des dimères dépourvus de domaine TADs (Hatada *et al.*, 1992; Kerr *et al.*, 1992; Wulczyn *et al.*, 1992; Franzoso *et al.*, 1993; Naumann *et al.*, 1993). D'autres données suggèrent que la protéine Bcl-3 puisse former des complexes transcriptionnellement actifs avec les homodimères p50 et p52 (Bours *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1993; Dechend *et al.*, 1999). Par contre, certaines études montrent que la protéine Bcl-3 réprime la transcription (Richard *et al.*, 1999; Wessells *et al.*, 2004).

La protéine **IκBγ** est une protéine 70 kDa dont la distribution cellulaire est limitée presque exclusivement aux lymphocytes (Ghosh *et al.*, 1990; Inoue *et al.*, 1992). Sa séquence est identique à la région C-terminale de la protéine p105, un précurseur de la protéine p50 de la famille Rel/NF-κB (Inoue *et al.*, 1992; Gerondakis *et al.*, 1993). Certaines données suggèrent que la protéine IκBγ fonctionne comme les autres IκBs, alors que d'autres données montrent qu'elle joue un rôle plus limité, probablement dans l'inhibition des homodimères p50 ou p52 (Liou *et al.*, 1992).

Finalement, une protéine portant le nom **IκBζ** (aussi appelée MAIL : molecule possessing ankyrin-repeats induced by LPS) ou INAP (IL-1-inducible nuclear ankyrin-repeat protein) est également connue. Cette protéine (79-82 kDa) est nucléaire et faiblement exprimée dans les cellules au repos. Cependant, son expression est fortement induite par une stimulation avec l'IL-1 ou le LPS (Kitamura *et al.*, 2000; Haruta *et al.*, 2001; Yamazaki *et al.*, 2001; Eto *et al.*, 2003; Muta *et al.*, 2003). La protéine IκBζ lie préférentiellement p50, plutôt que RelA, et peut former un complexe qui active la transcription de certains promoteurs, dont celui de l'IL-6 (Yamazaki *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2004).

#### **1.4.2.1 Dégradation des IκBs**

L'activation du facteur NF-κB coïncide temporellement avec la dégradation protéolytique des répresseurs IκB (Henkel *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1993). Quoique les protéines IκBs possèdent des caractéristiques et des fonctions relativement distinctes,

leur dégradation semble procéder de façon semblable, en trois étapes : phosphorylation, ubiquitinylation et dégradation. La phosphorylation est nécessaire au processus d'ubiquitination qui permet la protéolyse. La première étape du processus aboutissant à la dégradation d'I $\kappa$ B passe par la phosphorylation de résidus sérine N-terminaux situés respectivement en position 32 et 36 pour I $\kappa$ B $\alpha$  et 19 et 23 pour I $\kappa$ B $\beta$  (Traenckner *et al.*, 1995; Verma *et al.*, 1995). La phosphorylation d'I $\kappa$ B semble donc régulée de manière complexe et pourrait constituer le point de convergence de toutes les stimulations conduisant à la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\beta$ . Toutefois, la phosphorylation des résidus sérine est nécessaire mais non suffisante au processus de dégradation. En effet, la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  doit d'abord être ubiquitinylée. L'ubiquitinylation implique deux résidus lysine (principalement Lys 21 et Lys 22 pour I $\kappa$ B $\alpha$ ) qui sont démasqués suite à la phosphorylation des sérines 32 et 36 (Scherer *et al.*, 1995; Baldi *et al.*, 1996). La protéine I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitinylée est alors dégradée par le protéasome 26S (Palombella *et al.*, 1994).

L'identification des protéines kinases impliquées dans la phosphorylation des résidus sérines d'I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\beta$  a été mise en évidence dans des modèles d'activation par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1. La phosphorylation en sérine des protéines I $\kappa$ B ne semble pas mettre en jeu les protéines kinases C, ni Raf-1 (Janosch *et al.*, 1996) mais est plutôt liée à l'activité sérine kinase d'un complexe nommé IKK (I $\kappa$ B kinase), mis en évidence dans les cellules HeLa (Mercurio *et al.*, 1997) et composé de deux protéines, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  (Mercurio *et al.*, 1997; Woronicz *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997). L'activité catalytique

d'IKK vis-à-vis d'IκBα est directe, et nécessite que le répresseur soit complexé à un dimère NF-κB (Zandi *et al.*, 1998).

### 1.4.3 La famille IKK (IκB Kinase)

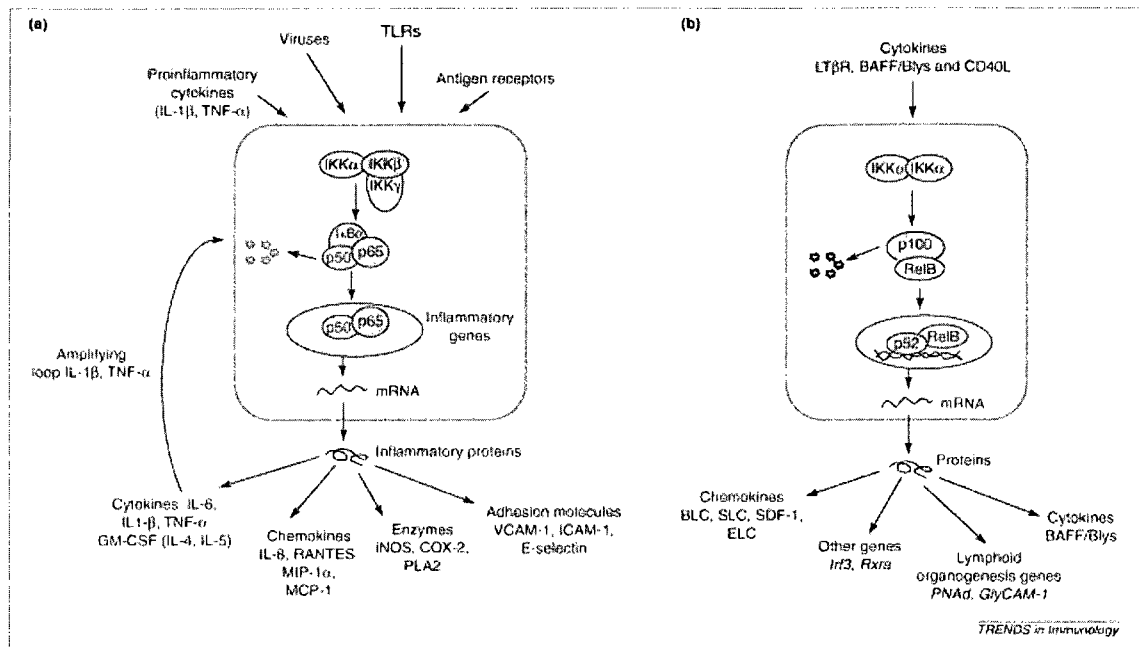
Le complexe IKK est composé de trois protéines majeures comprenant IKKα, IKKβ et IKKγ (ou NEMO) qui forment un complexe de 700 à 900 kDa avec, probablement, d'autres protéines (Bonizzi et Karin, 2004; Hayden et Ghosh, 2004). IKKα et IKKβ sont responsables de l'activité catalytique alors qu'IKKγ est une sous-unité régulatrice (Chen *et al.*, 1996; Zandi *et al.*, 1997; Didonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997p860; Woronicz *et al.*, 1997, Rothwarf *et al.*, 1998; Rothwarf et Karin, 1999). IKKα et IKKβ présentent une forte homologie structurale et sont constituées toutes les deux d'un domaine kinase du côté N-terminal, d'un domaine leucine zipper qui participe à leur homo- ou hétéro-dimérisation; d'un domaine hélice-boucle-hélice qui est requis pour une activité complète et aussi impliqué dans la régulation à la baisse de l'activité kinase (Delhase *et al.*, 1999); et, à l'extrémité C-terminale, d'un motif NBD (NEMO binding domain) qui est impliqué dans l'interaction avec NEMO. Récemment, une séquence NLS a été identifiée dans le domaine kinase d'IKKα (Sil *et al.*, 2004). Ces deux kinases sont capables de phosphoryler les différents membres de la famille IκB, notamment IκBα sur la Ser32 et la Ser36 et IκBβ sur la Ser19 et la Ser23 (DiDonato *et al.*, 1996). Elles peuvent aussi phosphoryler d'autres substrats, notamment RelA (Sakurai *et al.*, 1999; Buss *et al.*, 2004). IKKα et IKKβ sont des kinases qui phosphorylent préférentiellement IκBα, ce qui explique une cinétique de dégradation

retardée de  $\text{I}\kappa\text{B}\beta$  en réponse au  $\text{TNF-}\alpha$  (Wu et Ghosh, 2003).  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  lié au  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  est un meilleur substrat pour  $\text{IKK}\beta$  que  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ou  $\beta$  libre. Pour sa part,  $\text{NEMO/IKK}\gamma$  est une sous-unité régulatrice qui contient deux domaines  $\alpha$ -hélices, deux domaines « coiled-coil », un domaine leucine zipper, et un domaine ZF (zinc finger-like domain).  $\text{NEMO/IKK}\gamma$  interagit avec  $\text{IKK}\alpha$  et  $\text{IKK}\beta$  via le domaine NBD, qui est composé d'une séquence hexa-peptidique (Leu-Asp-Trp-Ser-Trp-Leu) (May *et al.*, 2002). Cette association avec  $\text{NEMO/IKK}\gamma$  est requise pour l'activité inductible du complexe kinase  $\text{IKK}$ . La structure stœchiométrique des sous-unités du complexe  $\text{IKK}$  semble être un hétérodimère de  $\text{IKK}\alpha$  et  $\text{IKK}\beta$  associé à deux molécules  $\text{NEMO/IKK}\gamma$  (Miller *et al.*, 2001).

Du fait de cette forte homologie structurale, nous avons longtemps considéré que  $\text{IKK}\alpha$  et  $\text{IKK}\beta$  ne jouent qu'un rôle catalytique quelque peu redondant. Des données subséquentes montrent toutefois que chacune d'entre elles accomplit une tâche distincte. En effet, l'inactivation des gènes  $\text{IKK}\alpha$  et  $\text{IKK}\beta$  chez la souris entraîne deux phénotypes distincts. Les souris déficientes en  $\text{IKK}\beta$  ne survivent pas au-delà du stade embryonnaire (à 14,5 jour de gestation) en raison d'une apoptose massive au niveau du foie (Li *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Ce phénotype est également observé avec des souris déficientes en  $\text{NEMO/IKK}\gamma$ . De plus, on observe un défaut sévère de l'activation du  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  en réponse aux cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 ou le  $\text{TNF-}\alpha$ , ce qui suggère qu' $\text{IKK}\beta$  joue un rôle crucial dans l'activation de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . En effet, en absence d' $\text{IKK}\beta$  et malgré son association avec  $\text{NEMO/IKK}\gamma$ ,  $\text{IKK}\alpha$  ne répond pas aux activateurs des  $\text{IKKs}$  en termes de la phosphorylation d' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ .

Les souris déficientes en *IKK $\alpha$* , quant à elles, présentent un phénotype tout à fait différent. Elles survivent jusqu'à la naissance, mais souffrent d'une altération majeure au niveau de l'épiderme. Une hyperprolifération incontrôlée des kératinocytes donne aux souris un aspect engoncé, et c'est à peine si l'on peut distinguer leurs membres tant la peau est épaisse. Par contre, le NF- $\kappa$ B est normalement activé en réponse aux cytokines pro-inflammatoires (Hu *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999).

Tout dépendant du type de stimuli, des composants du complexe IKK impliqués et des sous-unités de NF- $\kappa$ B ciblées, on distingue deux principales voies d'activation de NF- $\kappa$ B: la voie classique et la voie alternative (Figure 1.5). La première est activée par tous les inducteurs de NF- $\kappa$ B, incluant les cytokines inflammatoires, les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) et les récepteurs antigéniques, et implique la dégradation d'I $\kappa$ Bs dépendante d'IKK $\beta$  et d'IKK $\gamma$ , et la translocation nucléaire du dimère de NF- $\kappa$ B contenant fréquemment le RelA (Silverman et Maniatis, 2001; Ghosh et Karin, 2002). La voie alternative est indépendante d'IKK $\beta$  et d'IKK $\gamma$ . Elle est activée par un nombre limité de stimuli (comme la lymphotoxine  $\beta$ , le BAF (B cell-activating factor) et le CD40L). Cette voie requiert l'activation sélective d'IKK $\alpha$  par la protéine kinase NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) (Hayden et Ghosh 2004). Le p100 est alors clivé pour donner la sous-unité effectrice p52, qui forme alors un dimère avec RelB. Ce complexe peut alors activer un groupe de gènes cibles impliqué dans le développement et le maintien des organes lymphoïdes secondaires (Senftleben *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Dejardin *et al.*, 2002; Hayden et Ghosh 2004).



(Extrait de Bonizzi et Karin 2004)

### Figure 1.5 Voie classique et voie alternative du NF-κB.

(a) La voie classique du NF-κB est activée par une variété de signaux inflammatoires, aboutissant en expression d'une multitude de gènes inflammatoires et possédant un rôle dans la réponse immunitaire. Les cytokines proinflammatoires comme l'IL-1β et le TNF-α activent le NF-κB et leur expression est induite en réponse à l'activation du NF-κB, formant ainsi une boucle d'amplification. (b) La voie alternative du NF-κB menant à la translocation nucléaire de dimères p52-RelB est strictement dépendante des homodimères IKK et est activée par LTβR, BAFF et CD40L. De nombreuses données suggèrent fortement que la voie alternative joue un rôle central dans l'expression des gènes impliqués dans le développement et le maintien des organes lymphoïdes secondaires.

Abréviations: BAFF, B-cell-activating factor belonging to the TNF family; BLC, B-lymphocyte chemoattractant; CD40L, CD40 ligand; COX-2, cyclooxygenase 2; ELC, Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand CC chemokine; GM-CSF, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IKK, IκB kinase; IL-1β, interleukin-1β; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LT, lymphotoxin; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; MIP-1, macrophage inflammatory protein-1; NIK, NF-κB-inducing kinase; PLA2, phospholipase 2; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; SLC, secondary lymphoid tissue chemokine;

### 1.4.3.1 Kinases reliées à IKK (IKK-related kinases)

Sur la base d'une homologie de séquence et de la capacité à activer le NF- $\kappa$ B, la famille de IKK s'est élargie avec la découverte de deux autres kinases reliées à IKK: IKK $\epsilon$  ou IKKi (Peters *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 1999) et TBK-1 (Tank Binding Kinase 1) ou NAK (NF- $\kappa$ B activating kinase) ou T2K (TRAF2-associated kinase) (Pomerantz *et al.*, 1999; Tojima *et al.*, 2000; Bonnard *et al.*, 2000). TBK1 et IKK $\epsilon$  présentent une forte homologie structurale et fonctionnelle, mais leur patron d'expression est distinct. L'expression de TBK-1 est ubiquitaire et constitutive dans une grande variété de cellules, tandis que celle de IKK $\epsilon$  est généralement restreinte aux cellules du compartiment immun, mais est inductible dans les cellules non-hématopoïétiques en réponse au TNF, au LPS, au PMA, ou en réponse à une infection virale (Shimada *et al.*, 1999; Peters et Maniatis, 2001; Aupperle *et al.*, 2001; Kravchenko *et al.*, 2003; Hemmi *et al.*, 2004). Tout comme IKK $\alpha$  et  $\beta$ , TBK-1 et IKK $\epsilon$  contiennent un domaine kinase, un domaine leucine zipper et un domaine hélice-boucle-hélice (Pomerantz et Baltimore, 1999; Shimada *et al.*, 1999; Tojima *et al.*, 2000; Peters et Maniatis, 2001). *In vitro*, TBK-1 et IKK $\epsilon$  sont capables de phosphoryler seulement un des deux résidus critiques de I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser36), suggérant que I $\kappa$ B $\alpha$  n'est pas un substrat physiologique pour ces deux kinases (Shimada *et al.*, 1999; Bonnard *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2000). Cependant, les souris déficientes en *TBK-1* meurent au stade embryonnaire (à 14,5 jour de gestation) en raison d'une apoptose massive des hépatocytes (Bonnard *et al.*, 2000), un phénotype très semblable au celui des souris déficientes en *IKK $\beta$* , *IKK $\gamma$* , et *RelA* (Beg *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1999; Rudolph *et al.*, 2000). Cela suggère que TBK-1 et



IKK $\epsilon$  ne sont pas redondantes dans la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B, mais représentent possiblement des composants en amont du complexe IKK classique (IKK $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Bonnard *et al.*, 2000; Maniatis *et al.*, 2001). De nouvelles études montrent que TBK-1 et IKK $\epsilon$  peuvent phosphoryler des facteurs de transcription incluant RelA et c-Rel, ce qui module leur localisation intracellulaire et leur potentiel de transactivation (Harris *et al.*, 2006; Mattioli *et al.*, 2006), et les IRF-3 et IRF-7, qui sont importants dans la réponse antivirale (Hemmi *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 2004; Tenover *et al.*, 2007).

#### 1.4.3.2 Régulation de l'activation du complexe IKK

L'activation du complexe IKK est dépendante de leur phosphorylation. Une incubation avec une phosphatase du complexe IKK purifié à partir des cellules activées peut en effet réduire l'activation d'IKK (DiDonato *et al.*, 1997; Prajapati *et al.*, 2004). La plupart des recherches ont porté sur les événements amenant la phosphorylation d'IKK $\beta$ . Cette kinase est phosphorylée sur les résidus sérines 177 et 181 trouvés dans son domaine kinase (Delhase *et al.*, 1999). IKK $\beta$  est aussi phosphorylée hors de son domaine kinase sur plusieurs résidus sérines qui se trouvent en position C-terminale du motif HLH, probablement par le biais d'une autophosphorylation suite à son activation (Delhase *et al.*, 1999). Les mutants de délétion qui n'ont pas de segment riche en sérines en position C-terminale sont normalement activés en réponse au TNF- $\alpha$ , mais restent actifs plus longtemps, ce qui indique que l'autophosphorylation ou la trans-autophosphorylation de IKK $\beta$  est un mécanisme de régulation négatif (Delhase *et al.*, 1999). La dégradation d'I $\kappa$ B peut permettre à IKK de se phosphoryler elle-même sur des

résidus sérines en position C-terminale, en raison d'une diminution de la compétition des substrats. Cette phosphorylation en position C-terminale pourrait recruter une phosphatase, comme la phosphatase-2C $\beta$ , qui peut déphosphoryler les sérines du domaine kinase (Prajapati *et al.*, 2004).

Le mécanisme moléculaire par lequel le complexe IKK est activé n'est pas encore totalement élucidé. Quelques possibilités sont décrites dans ce qui suit.

#### **1.4.3.2.1 Régulation de l'activation du complexe IKK par des kinases en amont de celui-ci**

Parmi les mécanismes d'activation du complexe IKK, des kinases en amont peuvent phosphoryler IKK $\alpha$  (Ser176 et Ser180) et IKK $\beta$  (Ser177 et Ser181). Autrement, ces IKKs pourraient subir une trans-autophosphorylation (Zandi *et al.*, 1998; Miller et Zandi, 2001; Hayden et Ghosh, 2004). Plusieurs MAP3K (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase), dont NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) (Malinin *et al.*, 1997; Woronicz *et al.*, 1997), NAK (NF- $\kappa$ B-activating kinase)/TBK1 (Tojima *et al.*, 2000), MEKK1 (Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 1) (Lee *et al.*, 1997 et 1998), MEKK 2 (Zhao *et al.*, 1999), MEKK3 (Zhao *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001) et TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase) (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Takaesu *et al.*, 2003) sont capables de phosphoryler le complexe IKK et d'induire l'activation de NF- $\kappa$ B dans des conditions de surexpression ou des essais *in vitro*. D'autres kinases, comme la Cot/Tlp-2 (Lin *et al.*,

1999) et certaines PKC (isoformes  $\theta$ ,  $\zeta$ , ou  $\lambda$ ) (Lallena *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 2000; Ghosh et Karin, 2002; Hayden et Ghosh, 2004) ont également été proposées comme agissant en amont des IKKs. L'implication de quelques-unes de celles-ci dans la phosphorylation des IKKs a été vérifiée par des études d'inactivation génique. Les cellules MEF (mouse embryonic fibroblast) isolées de souris déficientes en NIK et en MEKK1 présentent une activation normale de NF- $\kappa$ B en réponse au TNF (Xia *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2001; Yujiri *et al.*, 2000). Par contre, les cellules déficientes en MEKK3 présentent une diminution du degré d'activation du complexe IKK et de NF- $\kappa$ B en réponse au TNF- $\alpha$  (Yang *et al.*, 2001). Quant à TAK1, son inactivation réduit considérablement l'activation des IKKs par plusieurs stimuli comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et les ligands de TLR-3 et -4 (Sato *et al.*, 2005; Shim *et al.*, 2005).

#### 1.4.3.2.2 TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1)

Initialement, la kinase TAK1 fut identifiée comme une kinase activée par le TGF $\beta$  (Yamaguchi *et al.*, 1995). Elle est maintenant reconnue comme une kinase importante dans l'activation de la voie de NF- $\kappa$ B induite par l'IL-1 $\beta$  [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001), le TNF- $\alpha$  (Sakurai *et al.*, 1999; Takaesu *et al.*, 2003; Shim *et al.*, 2005), le LPS (Irie *et al.*, 2000; Shim *et al.*, 2005), le TCR (T cell receptor), et le BCR (B cell receptor) (Sun *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Shinohara *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005). En tant que membre de la famille des MAP3K, TAK1 est unique en ce sens que son activité requiert des protéines associées nommées TAB1 (TAK1 associated protein 1), TAB2 ou TAB3 (Shibuya *et al.*, 1996; Takaesu *et al.*, 2000; Ishitani *et al.*, 2003;

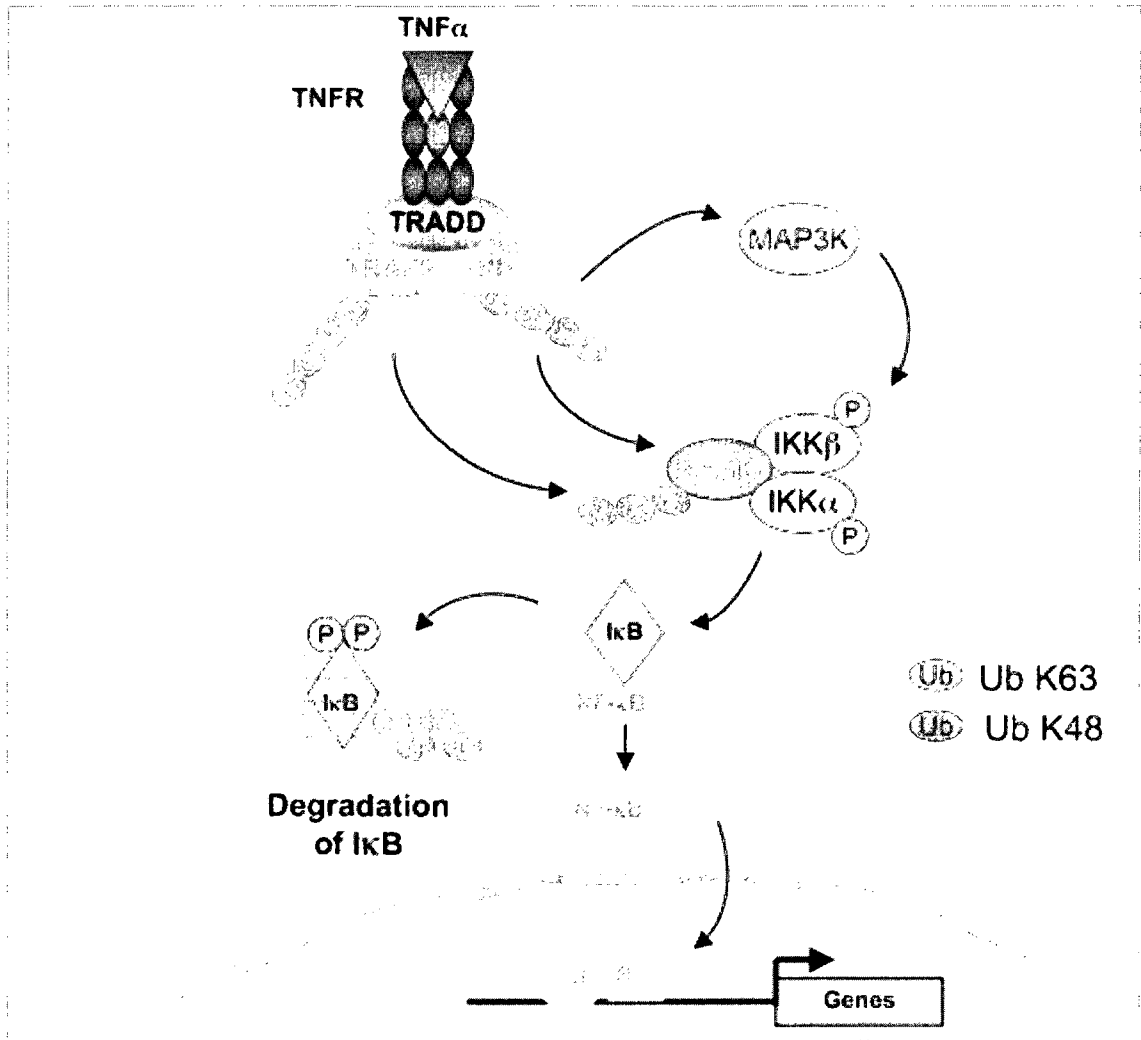
Cheung *et al.*, 2004; Kanayama *et al.*, 2004). Bien que TAB1 puisse activer directement la kinase TAK1 *in vitro*, le complexe TAK1 endogène contenant la protéine TAB1 est inactif dans des cellules au repos. Bien qu'on n'en connaisse pas encore la raison, certaines phosphatases, comme la PP2C $\beta$ , pourrait lier et inhiber TAK1 dans ces conditions (Hanada *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003; Kajino *et al.*, 2006). Les protéines TAB2 et TAB3 activent également la TAK1 lorsqu'elles sont surexprimées. Cependant, contrairement à TAB1, les protéines TAB2 et TAB3 ne peuvent pas activer directement la TAK1 *in vitro*. En revanche, l'activation du complexe TAK1/TAB2 (ou TAB3) exige une réaction d'ubiquitinylation catalysée par E1 (une enzyme d'activation d'ubiquitine), Ubc13/Uev1A (E2 : une enzyme de conjugaison d'ubiquitine) et TRAF6 (E3 : une ligase d'ubiquitine) (Wang *et al.*, 2001). Le complexe TAK1/TAB2 (ou TAB3), qui est activé par ubiquitinylation, phosphoryle IKK $\beta$  sur les Ser177 et Ser181 dans une boucle d'activation conduisant à l'activation d'IKK. Le complexe TAK1 activé peut également phosphoryler certains membres de la famille MKK (mitogen-activated protein kinase kinase), comme MKK3/6 et MKK4, ce qui mène à une activation des voies p38 MAPK et JNK (Moriguchi *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001). Fait intéressant, le complexe TAK1/TAB1, qui peut aussi phosphoryler MKKs et activer p38 MAPK et JNK, n'est pas suffisant pour activer le complexe IKK (Wang *et al.*, 2001). Ainsi, la protéine TAB2/3, mais pas la TAB1, est requise pour l'activation des IKKs par TRAF6 *in vitro*. Ces données suggèrent que l'ubiquitinylation faite par TRAF6 est non seulement nécessaire à l'activation du complexe TAK1, mais aussi requise pour l'activation d'IKK par TAK1.

Compte tenu des caractéristiques de son activation, la kinase TAK1 pourrait représenter une cible thérapeutique pour certaines maladies associées à une inflammation et à une destruction des tissus, comme le polyarthrite rhumatoïde et les maladies intestinales inflammatoires, ainsi que des processus cellulaires tels que la réponse au stress, l'apoptose, la prolifération et la différenciation (Garrington et Johnson, 1999). Le rôle de TAK1 dans l'inflammation est étayé par la découverte d'un inhibiteur puissant de TAK1 nommé 5Z-7-oxozeaenol (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 2003). Cet inhibiteur est très sélectif pour TAK1, et permet de réduire l'inflammation dans un modèle murin d'épaississement de l'oreille induite par le chlorure de picryle (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 2003).

#### **1.4.3.2.3 Régulation de l'activation du complexe IKK par ubiquitinylation**

L'ubiquitinylation joue plusieurs rôles dans la régulation des voies de signalisation en amont de l'activation de NF- $\kappa$ B, ainsi que dans de nombreux processus biologiques. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés qui est hautement conservée entre différentes espèces, et qui est attachée de façon covalente aux résidus lysine des protéines cibles (Haglund et Dikic, 2005; Chen, 2005). L'ubiquitinylation est une modification réversible qui est catalysée en trois étapes (Pickart 2004p181; Haglund 2005p3353). Premièrement, l'ubiquitine est activée dans une réaction nécessitant de l'ATP par une enzyme d'activation d'ubiquitine (E1). Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée à une enzyme de conjugaison d'ubiquitine (E2), formant un thioester E2-Ub.

En temps voulu, cette ubiquitine est rattachée à une protéine cible par l'intermédiaire d'un lien isopeptidique entre la portion C-terminale de l'ubiquitine et le groupe amino de la lysine d'une protéine cible en présence d'une ligase d'ubiquitine (E3) (Chen, 2005). L'ubiquitine elle-même contient plusieurs résidus lysine comme la Lys48 (K48) ou la Lys63 (K63), ce qui lui permet d'être reliée à une autre ubiquitine pour former une chaîne de polyubiquitine sur une protéine cible. *In vivo*, la chaîne de polyubiquitine reliée par la Lys48 (K48-linked polyubiquitin chains) conduit à la reconnaissance et à la dégradation des protéines par le protéasome (Chau *et al.*, 1989). En revanche, la polyubiquitinylation reliée par la Lys63 ne déclenche pas la dégradation par le protéasome, mais est impliquée dans d'autres processus biologiques comme la réparation de l'ADN et l'activation des protéines kinases (Peng *et al.*, 2003; Sun et Chen, 2004; Chen, 2005). Les deux formes de polyubiquitinylation jouent un rôle important dans l'activation du NF- $\kappa$ B. La protéine I $\kappa$ B est ubiquitinylée par l'intermédiaire d'une polyubiquitinylation en K48 et est dégradée par le protéasome, alors que la polyubiquitinylation en K63 est impliquée dans une modification des protéines TRAF2, TRAF6, RIP, TAB2, TAB3 et NEMO, qui jouent un rôle important dans l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B (Deng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Shi et Kehrl, 2003; Tang *et al.*, 2003; Wertz *et al.*, 2004; Kanayama *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Ea *et al.*, 2006; Sebban *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Shambharkar *et al.*, 2007).



(Extrait de Li et Lin , 2008)

**Figure 1.6** Modèle d'activation du complexe IKK induit par le TNF- $\alpha$ . Le recrutement de TRAF2 et RIP au complexe récepteur du TNF (TNF-R1) induit l'ubiquitinylation de ces molécules. L'ubiquitinylation de RIP recrute ensuite des MAP3Ks comme TAK1 et/ou MEKK3 qui, à leur tour, phosphorylent IKK $\alpha/\beta$ . D'autre part, les protéines RIP et TRAF2 ubiquitinylées recrutent IKK $\gamma$  au récepteur TNF-R1, où IKK $\gamma$  peut être ubiquitinylée par TRAF2. La phosphorylation et l'ubiquitinylation du complexe IKK activent son activité kinase.

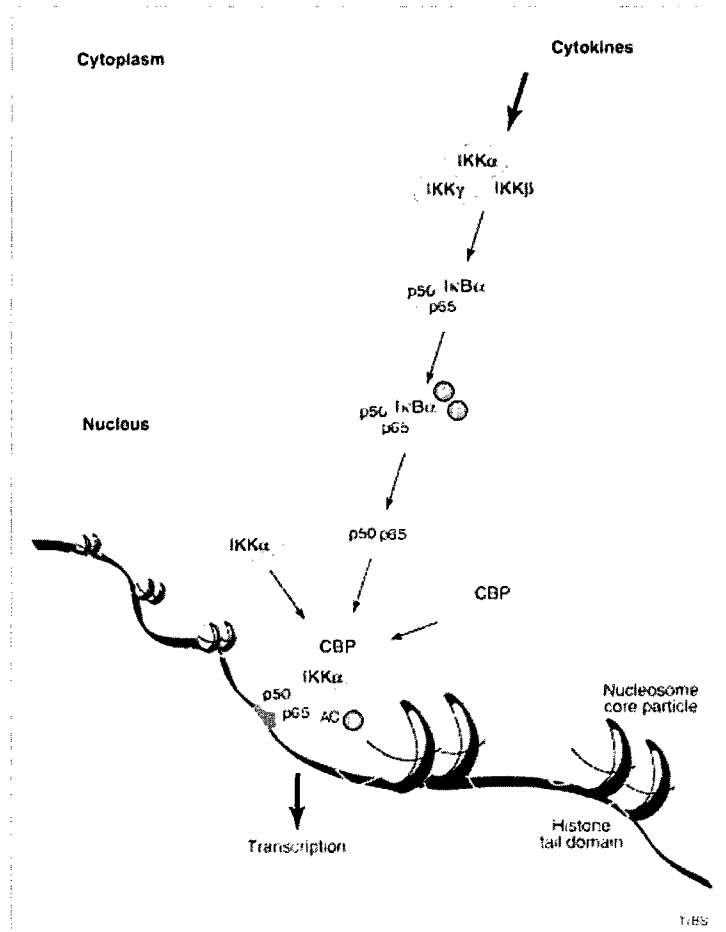
En somme, la littérature à ce sujet a proposé le modèle d'activation du complexe IKK suivant : lors d'une liaison d'un ligand (par exemple, le TNF- $\alpha$ ) à son récepteur, il y a recrutement des protéines adaptatrices TRAF2 et RIP au récepteur, ce qui induit leur ubiquitinylation. L'ubiquitinylation de RIP recrute ensuite des MAP3Ks comme TAK1 et/ou MEKK3 qui, à leur tour, phosphorylent IKK $\alpha/\beta$ . D'autre part, les protéines RIP et TRAF2 ubiquitinylées recrutent IKK $\gamma$ /NEMO au récepteur où IKK $\gamma$ /NEMO peut être ubiquitinylée par TRAF2. Ensemble, la phosphorylation de IKK $\alpha/\beta$  et l'ubiquitinylation de IKK $\gamma$ /NEMO activent l'activité kinase du complexe IKK (Figure 1.6).

#### 1.4.3.3 Rôle nucléaire du complexe IKK

Certaines évidences indiquent que diverses sous-unités du complexe IKK, en plus d'exercer des activités dans le cytoplasme, peuvent migrer au noyau pour réguler de nombreux aspects de l'expression des gènes qui sont dépendants ou indépendants du NF- $\kappa$ B (Birbach *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003; Anest *et al.*, 2003; Massa *et al.*, 2005). Par exemple, IKK $\alpha$  peut se déplacer au noyau pour réguler la fonction des histones (Figure 1.7). Les protéines d'histone H1, H2, H3 et H4, qui forment des nucléosomes associés à l'ADN, sont des composantes fondamentales de la chromatine (Grunstein, 1997; Cheung *et al.*, 2000). La structure de la chromatine est un élément important qui régule l'expression génique en limitant l'accessibilité des protéines liant l'ADN à la région promotrice des gènes précoces, comme les gènes dépendants du NF- $\kappa$ B (Kornberg et Lorch, 1999). En réponse aux stimuli, le remodelage de la structure de la chromatine est déclenché par une modification des histones, ce qui rend possible



l'interaction de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, de coactivateurs, et de composants de la machinerie transcriptionnelle avec la région promotrice (Tse *et al.*, 1998; Strahl et Allis, 2000).



(Extrait de Yamamoto, 2004)

**Figure 1.7 Rôle nucléaire d'IKK $\alpha$ .** IKK $\alpha$  joue un rôle important dans la régulation de l'activation transcriptionnelle du NF- $\kappa$ B dans le noyau. En réponse à des cytokines comme le TNF- $\alpha$ , IKK $\alpha$  est recruté aux régions promotrices des gènes dépendant du NF- $\kappa$ B et forme un complexe sur le promoteur avec le p65 et le CBP (CREB-binding protein). La formation de ce complexe facilite la phosphorylation (P) de l'histone H3 sur Ser10 et ensuite conduit à l'acétylation (AC) par le CBP pour induire l'expression de gènes dépendant du NF- $\kappa$ B.

#### 1.4.3.3.1 Rôle nucléaire de IKK $\alpha$

Au moyen d'essais d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP assays) chez des fibroblastes embryonnaires murins, Anest *et al.* et Yamamoto *et al.* ont montré pour la première fois que IKK $\alpha$  est une kinase de l'histone H3, activant ainsi des gènes dépendants du NF- $\kappa$ B (Anest *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003). En réponse au TNF- $\alpha$ , IKK $\alpha$  est recrutée conjointement avec RelA et CBP aux régions promotrices des gènes contrôlés par NF- $\kappa$ B (comme I $\kappa$ B $\alpha$ , IL-8, et IL-6) et induit une phosphorylation de l'histone H3 (Ser10). Cette phosphorylation est complètement abolie dans les cellules déficientes en IKK $\alpha$ , ce qui suggère que IKK $\alpha$  est indispensable pour ce processus (Yamamoto *et al.*, 2003; Anest *et al.*, 2003). Le rôle nucléaire de IKK $\alpha$  est appuyé par la distribution des différentes sous-unités du complexe IKK dans les cellules. Dans les cellules HeLa, IKK $\alpha$  est localisée dans le cytoplasme et le noyau, alors que IKK $\beta$  est principalement localisée dans le cytoplasme (Yamamoto *et al.*, 2003). En outre, l'inhibition de l'exportation nucléaire par un traitement avec la leptomycine B induit une accumulation nucléaire de IKK $\alpha$ , mais pas de IKK $\beta$ , ce qui indique que IKK $\alpha$  peut transiter entre le cytoplasme et le noyau (Birbach *et al.*, 2002).

On a aussi mis en évidence le recrutement d'IKK $\alpha$  aux promoteurs de plusieurs gènes pro-inflammatoires (COX-2, RANTES, MnSOD) dépendants du NF- $\kappa$ B dans les macrophages murins (Raw 264.7) traités avec le LPS (Park *et al.*, 2006). La phosphorylation de l'histone H3 médiée par IKK $\alpha$  est accrue par la kinase NIK, qui

semble elle aussi se déplacer dans le noyau lors d'une stimulation avec le LPS (Park *et al.*, 2006).

Une influence de IKK $\alpha$  nucléaire sur des gènes indépendants du NF- $\kappa$ B a été également rapportée. Par exemple, en réponse au EGF (epidermal growth factor), IKK $\alpha$  phosphoryle l'histone H3 liée au promoteur de c-fos (Anest *et al.*, 2004). IKK $\alpha$  lie également le promoteur de la cycline D1 et de c-myc, et active leur transcription en formant un complexe avec le récepteur d'oestrogène ER $\alpha$  et le coactivateur AIB1 (amplified in breast cancer-1) ou SRC-3 (steroid receptor coactivator-3) (Park *et al.*, 2005).

#### 1.4.3.3.2 Rôle nucléaire de IKK $\beta$

D'ordinaire, IKK $\beta$  est une protéine cytoplasmique (Birbach *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2004). Toutefois, elle peut être recrutée aux promoteurs de gènes dépendants du NF- $\kappa$ B, tel que démontré par Anest et ses collègues (Anest *et al.*, 2003). IKK $\beta$  est également requise pour activer un certain nombre de gènes stimulés par l'interféron  $\gamma$  comme l'IP-10, GBP-2 (guanylate binding protein 2), LMP-7 (low molecular mass protein), SOCS-2 (Suppressor of cytokine signaling 2), (Sizemore *et al.*, 2004) et est recrutée au promoteur de *hes1* (hairy and enhancer of split 1), un gène sous le contrôle de Notch (Aguilera *et al.*, 2004). Dans ce cas, IKK $\beta$  induit la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  qui est associé au promoteur de *hes1* ou il agit comme un corépresseur de la

transcription du gène *hes1*, causant ainsi sa dégradation, ce qui induit la transcription génique (Aguilera *et al.*, 2004).

#### 1.4.3.3.3 Rôle nucléaire de NEMO/IKK $\gamma$

NEMO/IKK $\gamma$  peut faire la navette entre le cytoplasme et le noyau de façon CRM-1-dépendante (Birbach *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2004). Elle est en compétition avec IKK $\alpha$  et RelA pour se lier au coactivateur nucléaire CBP *in vitro*, réprimant ainsi l'expression des gènes dépendants de NF- $\kappa$ B (Verma *et al.*, 2004). NEMO/IKK $\gamma$  interagit aussi avec le facteur HIF-2a (hypoxia-inducible factor-2a) et accroît son activité via le recrutement du coactivateur p300 (Bracken *et al.*, 2005). Une autre fonction importante de NEMO/IKK $\gamma$  a été décrite dans l'activation du complexe IKK en réponse aux dommages d'ADN causés par l'irradiation ou par des drogues qui causent l'inhibition de la topoisomérase (Wu *et al.*, 2006; Bartek et Lukas, 2006). Le défi à relever à ce sujet est de trouver quel est le lien moléculaire entre les dommages à l'ADN dans le noyau et l'activation du complexe IKK dans le cytoplasme. À ce sujet, la littérature propose le mécanisme suivant : en réponse aux dommages à l'ADN, NEMO/IKK $\gamma$  subit une série de modifications dans le noyau. D'abord, NEMO/IKK $\gamma$  est sumoylée sur les résidus Lys277 et Lys309. Cette sumoylation est augmentée par PIDD (p53-inducible death-domain-containing protein), une protéine impliquée dans l'arrestation du cycle cellulaire et l'apoptose en aval de protéine p53, qui forme un complexe avec NEMO/IKK $\gamma$  et RIP1 dans le noyau (Lin *et al.*, 2000; Janssens *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005). Cette sumoylation semble retenir NEMO/IKK $\gamma$  dans le noyau,

où elle est par la suite désumoylée et ubiquitinylée sur les mêmes résidus (Huang *et al.*, 2003; Hay, 2004). Cette ubiquitinylation requiert une phosphorylation préalable sur la sérine 85 de NEMO/IKK $\gamma$  par la kinase ATM (Ataxia telangiectasia mutated), un régulateur du cycle cellulaire et de réponses aux dommages à l'ADN (Wu *et al.*, 2006). L'ubiquitinylation de NEMO/IKK $\gamma$  est indispensable pour son exportation nucléaire, conjointement avec l'ATM, et pour son interaction avec le complexe IKK dans le cytoplasme via ELKS, une protéine adaptatrice associée au complexe IKK. Ce processus induit éventuellement une activation du complexe IKK, la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B, et la transcription des gènes anti-apoptotiques (Wu *et al.*, 2006; Bartek et Lukas, 2006).

#### **1.4.4 Espèces réactives oxygénées (ROS) et signalisation du NF- $\kappa$ B**

Dans des conditions inflammatoires ou pathologiques, l'oxygène est souvent transformée en formes très réactives, appelées espèces réactives oxygénées (ROS), dont l'anion superoxyde (O $_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène (H $_2$ O $_2$ ) ou le radical hydroxyle (OH $\bullet$ ) (Adler *et al.*, 1999; Haddad, 2002). Les ROS sont générés par de multiples sources dans la cellule : la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie, les radiations ionisantes (Ogawa *et al.*, 2003; Genova *et al.*, 2004), et par le biais de complexes enzymatiques tels que les NADPH oxydases phagocytaires et non-phagocytaires (Babior, 1999; Griendling et Harrison, 1999; Van Heerebeek *et al.*, 2002), les lipoxgénases (Kuhn et Thiele, 1999) et les cyclooxygénases (Kuehl et Egan, 1980). Les neutrophiles, les macrophages, les éosinophiles, les cellules épithéliales et d'autres

peuvent produire des ROS (Macnee W 2001p195; Bokoch et Knaus, 2003; Lambeth, 2004). Étant donné que les ROS sont cytotoxiques, les cellules développent une défense antioxydante comme les enzymes qui dismutent l' $O_2^-$  en  $H_2O_2$  (SOD-1, -2 et -3) ou qui dégradent l' $H_2O_2$  (catalase, glutathion peroxidase et peroxiredoxine) (Engelhardt, 1999; Rhee *et al.*, 2003).

Quand la production des ROS submerge le pouvoir antioxydant de la cellule, un état de stress oxydatif est atteint, qui mène à des lésions cellulaires graves et contribue à la pathogenèse de plusieurs maladies. Néanmoins, s'ils ne sont pas générés en trop forte concentration, les ROS agissent à titre de seconds messagers dans la transduction du signal et la régulation des gènes chez plusieurs types cellulaires (Lander, 1997; Hensley *et al.*, 2000). Il est bien établi que l' $H_2O_2$  est un des principaux ROS qui a un rôle dans la signalisation cellulaire en raison de sa capacité d'inhiber les tyrosine phosphatases via l'oxydation des résidus cystéine dans leur domaine catalytique, ce qui active des tyrosine kinases et la signalisation en aval (Aslan et Ozben, 2003; Tonks, 2005). Selon le niveau de ROS, différents facteurs de transcription sensibles à l'équilibre redox sont activés et coordonnent des réponses biologiques distinctes. Un niveau intermédiaire de ROS déclenche une réaction inflammatoire grâce à l'activation de NF- $\kappa$ B et d'AP-1 (Halliwell et Gutteridge, 1999). Le NF- $\kappa$ B est en fait le premier facteur de transcription qu'on a décrit comme étant régulé par les ROS (Legrand-Poels *et al.*, 1990; Schreck *et al.*, 1991).

#### 1.4.4.1 Rôles controversé des ROS dans l'activation du NF- $\kappa$ B

Un défi des études sur le NF- $\kappa$ B a été d'expliquer la capacité de ce facteur de transcription à répondre à une vaste gamme de stimuli. Un modèle qui a fait école a été proposé dès le début par Baeuerle et ses collègues. Ce modèle postule que tous les stimuli d'activation du NF- $\kappa$ B ont la capacité d'induire la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et que cette molécule agirait ensuite comme un second messenger pour l'activation du NF- $\kappa$ B (Schreck *et al.*, 1991; Baeuerle et Henkel, 1994; Flohe *et al.*, 1997; Michiels *et al.*, 2002). Plusieurs données plaident d'ailleurs en faveur de ce modèle. Le traitement avec des agents antioxydants comme la N-acétyl-L-cystéine (NAC) et le pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) bloquent l'activation du NF- $\kappa$ B par une série de stimuli, notamment le TNF, l'IL-1, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), le LPS, l'ARN double brin et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans plusieurs types cellulaires (Schreck *et al.*, 1991; Bowie et O'Neill, 2000; Schoonbroodt et Piette, 2000; Gloire *et al.*, 2006). Ces résultats sont appuyés par l'utilisation d'autres antioxydants, comme la vitamine C, les dérivés de la vitamine E, l'acide lipoïque ( $\alpha$ -lipoic acid), le butyl hydroxyanisole (butylated hydroxyanisole (BHA)) et un chélateur du fer, la déféroxamine (DFO) (Bowie et O'Neill, 2000; Garg et Aggarwal, 2002). De surcroît, l'induction de NF- $\kappa$ B est abrogée par la surexpression de « ROS-scavenging enzymes » comme la catalase, la thioredoxin peroxydase et la superoxyde dismutase Mn<sup>2+</sup> (Mn-SOD) (Bowie et O'Neill, 2000; Gloire *et al.*, 2006) qui ont une activité antioxydante hautement spécifique (Manna *et al.*, 1998; Bowie et O'Neill, 2000). En fin, la plupart des agents d'activation de NF- $\kappa$ B peuvent induire la formation des ROS (Schreck *et al.*, 1992a; Schmidt *et al.*, 1995; Bowie et

O'Neill, 2000; Gloire *et al.*, 2006), et l'exposition directe au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou à d'autres oxydants induit une translocation nucléaire du NF-κB dans certains types de cellules (Bowie et O'Neill, 2000; Gloire *et al.*, 2006).

Cependant, de nombreuses études ont contesté ce modèle (Brennan et O'Neill, 1995; Li et Karin, 1999; Bowie et O'Neill, 2000; Gloire *et al.*, 2006). Il a été montré que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était incapable d'induire une activation de NF-κB dans certaines cellules, et que les effets des agents antioxydants sur l'activation du NF-κB étaient dépendants du stimulus utilisé et du type cellulaire (Bonizzi *et al.*, 1996; Bowie *et al.*, 1997; Li et Karin, 1999; Bowie et O'Neill, 2000; Schoonbroodt et Piette, 2000). Par exemple, les antioxydants inhibent l'activation de NF-κB induite par les cytokines dans des cellules lymphoïdes et monocytaires, mais pas chez les cellules épithéliales (Bonizzi *et al.*, 1996; Gloire *et al.*, 2006). D'autres études ont confirmé que l'induction de NF-κB par ces cytokines était réfractaire à l'effet répressif du NAC, du PDTC et d'autres antioxydants dans différents tissus (Moynagh *et al.*, 1994; Brennan et O'Neill, 1995; Bonizzi *et al.*, 1996; Bowie *et al.*, 1997; Shrivastava et Aggarwal, 1999; Bowie et O'Neill, 2000; Garg et Aggarwal, 2002; Hayakawa *et al.*, 2003). Ainsi, il apparaît que la formation des ROS n'est pas obligatoire pour l'activation de NF-κB. Il s'avère donc que la participation des ROS dans la signalisation de NF-κB serait tissu et stimulus dépendant (Gloire *et al.*, 2006).

D'autres faits plaident également contre un rôle universel des ROS dans la signalisation par le facteur NF-κB. Par exemple, l'activation de NF-κB par l'exposition



au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est lente (elle prend généralement des heures), alors que pour d'autres stimuli, comme les cytokines, elle est typiquement détectée en quelques minutes (Bonizzi *et al.*, 1996; Li et Karin, 1999; Bowie et O'Neill, 2000; Gloire *et al.*, 2006). De plus, il a été rapporté que tous les inducteurs de NF-κB n'ont pas la capacité d'induire la formation des ROS (Royall *et al.*, 1992; O'Donnell *et al.*, 1995; Bonizzi *et al.*, 1996; Bowie *et al.*, 1997; Bowie et O'Neill, 2000; Gloire *et al.*, 2006). En somme, si les ROS jouent un rôle physiologique dans les voies de signalisation menant à une activation de NF-κB en réponse à certains stimuli, l'importance biologique de ce phénomène reste incertaine pour d'autres voies d'activation de NF-κB.

### **Mise en contexte, hypothèse et objectifs de l'étude**

En réponse à une stimulation appropriée, les neutrophiles sont capables de produire plusieurs cytokines et chimiokines. La régulation de la transcription des gènes de cytokines et de chimiokines varie souvent selon le type cellulaire. Cette régulation implique principalement les facteurs de transcription et les voies de signalisation menant à leur activation. Le facteur NF- $\kappa$ B est impliqué dans l'expression de cytokines et de chimiokines dans plusieurs types cellulaires. La plupart des stimuli comme le TNF- $\alpha$  ou le LPS, connus pour induire la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires par les neutrophiles, activent également le NF- $\kappa$ B dans ces cellules. Ce qui suggère fortement que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et sa voie d'activation représentent des éléments clés pour l'expression de certaines cytokines et chimiokines inflammatoires par les neutrophiles. Cependant, les données sur ce sujet étaient encore fragmentaires lorsque que nos travaux de recherche ont débuté. L'activation de NF- $\kappa$ B est régulée d'une part via la phosphorylation/dégradation des I $\kappa$ Bs, qui est principalement dépendante de l'activité du complexe kinase IKKs; et d'autre part, via la phosphorylation de différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B, qui est effectuée par la kinase IKK $\alpha/\beta$  ou d'autres kinases dans la majorité des types cellulaires. Bien que les protéines constituantes du NF- $\kappa$ B soient exprimées dans les neutrophiles humains, d'autres éléments importants de cette voie de signalisation, comme le complexe kinase IKKs, les kinases en amont des IKKs (TAK1, MEKK1, MEKK3), ou la phosphorylation du NF- $\kappa$ B ne sont pas encore documentés pour ces cellules.

Ceci dit, le système NF- $\kappa$ B des neutrophiles comporte des singularités notables qui justifient qu'on s'y intéresse plus en détail. Vancurova *et al.*, 2001 et nous-mêmes avons observé que les protéines de la famille NF- $\kappa$ B/Rel et la protéine inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  étaient exprimées aussi bien dans le cytoplasme et le noyau des neutrophiles humains au repos. De plus, I $\kappa$ B $\alpha$  est dégradée simultanément dans ces deux compartiments cellulaires en réponse à des stimuli comme le TNF- $\alpha$  ou le LPS. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse que **d'autres éléments de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B pourraient également être localisés et activés simultanément dans le cytoplasme et le noyau des neutrophiles humains**. Nous avons vérifié cette hypothèse en poursuivant les objectifs suivants:

1. Déterminer le rôle de NF- $\kappa$ B dans l'induction de l'expression de certains cytokines et de chimiokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-8, Mip-1 $\alpha$  et Mip-1 $\beta$ ) chez les neutrophiles humains au repos et activés par le TNF- $\alpha$  ou le LPS.

2. Caractériser l'expression, la distribution, et la phosphorylation (l'activation) du complexe IKK et de la protéine RelA/p65 chez les neutrophiles humains.

3. Déterminer quelle kinase (s) en amont du complexe IKK est impliquée dans sa phosphorylation et son activation.

4. Déterminer si l'activation de NF- $\kappa$ B est dépendante des ROS endogènes dans les neutrophiles humains.

Les résultats de ces objectifs seront présentés dans les trois sections du chapitre 3 de la présente thèse.

La section 1 intitulée « **Expression et activation nucléaire du complexe IKK chez les neutrophiles humains** » contient des résultats pour les objectif 1 et 2.

La section 2 intitulée « **Implication de la kinase TAK1 dans l'activation du complexe IKK chez les neutrophiles humains** » renferme des résultats pour l'objectif 3.

La section 3 intitulée « **L'activité inductible du NF- $\kappa$ B n'est pas modulable par les ROS endogènes chez les neutrophiles humains** » contient des résultats pour l'objectif 4.

## CHAPITRE II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Produits utilisés

Les anticorps polyclonaux reconnaissant les protéines I $\kappa$ B $\alpha$ , RelA, IKK $\alpha$ , IKK $\gamma$ , IKKi, TBK, NIK, TAK1, TAB1, MEKK1, MEKK3, l'histone H3 et l'actine provenaient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Les anticorps anti-phospho-IKK $\alpha/\beta$ , anti-phospho-IKK $\gamma$ , anti-phospho RelA, anti-phospho-p38, anti-phospho-ERK1/2, et anti-TAB2 ont été achetés chez Cell Signaling (Danvers, MA, USA), alors que les antiséras dirigés contre la leucotriène A<sub>4</sub> hydrolase (LTAH) et la FLAP ont été généreusement donnés par le Dr. J. Evans (Merck Frosst, Pointe-Claire, Québec, Canada). L'anticorps anti-lactate déshydrogénase (LDH) provenait de Fitzgerald (Concord, MA, USA). Les anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin conjugués à la peroxydase de raifort, ainsi que la trousse de chemiluminescence ECL ont été achetés d'Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada). L'anticorps monoclonal de souris anti-CD11b et l'anticorps de chèvre anti-souris conjugués à la fluorescéine isothiocyanate provenaient de BD Biosciences (Mississauga, Canada). Le Ficoll-Paque, la T4 polynucléotide kinase, poly (dI-dC) et la protéine G-sepharose 4FF ont été achetés chez Amersham-Pharmacia (Baie d'Urfé, QC, Canada). L'[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP et L'[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP provenaient de NEN (Boston, MA, USA). Le RPMI 1640 et le FCS sans endotoxines (<2pg/ml) ont été achetés respectivement chez Sigma (St-Louis, MO, USA) et Wisent (St-Bruno, Qc, Canada). Les cytokines recombinantes et le LPS (*Escherichia coli* 0111:B4) provenaient de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) et de List Biological

Laboratories (Campbell, CA), respectivement. L'acétyl-BSA, la cycloheximide, le diisopropyl fluorophosphate (DFP), le diméthyl formamide (DMF), le diméthyl sulfoxide (DMSO), le N-formyl-methionyl-phenylalanine (fMLP) et le phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) et le MBP (myelin basic protein) ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO, USA). L'aprotinine, la leupeptine, la pepstatine A, le 4-(2-aminométhyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), et le Nutridoma-SP provenaient de Roche (Laval, Qc, Canada). Les inhibiteurs des différentes voies de signalisation (SB 203580, PD 98059, SP-600125, Wortmannin, LY- 294202, H89, MG-132 et MG-262, BAY 117082) et l'inhibiteur d'exportation nucléaire (Leptomycin B) ont été achetés chez Calbiochem (San Diego, CA, USA). L'inhibiteur de TAK1 (5z-7-oxozeaenol) a été généreusement donné par les Drs M. Tsuchiya et K. Ono (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd, Shizuoka, Japan). Les  $PGA_1$ ,  $PGE_2$ , et 15-deoxy-PGJ<sub>2</sub> étaient de Cayman Chemical. Le vecteur pcDNA3.1 provenait d'Invitrogen (Carlsbad, CA). L'ADNc codant pour le GFP (GFP/pcDNA3.1) a été fournis par le Dr. Gilles Dupuis (Université de Sherbrooke). Le plasmide contenant un gène rapporteur luciférase sous le contrôle du NF- $\kappa$ B (pNF- $\kappa$ B-Luc) provenait de Stratagene (La Jolla, CA, USA), alors que le plasmide contenant un gène rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur de l'IL-8 (pIL8-Luc) a été été généreusement donné par le Dr. Allan R. Brasier (University of Texas Medical Branch).

## **2.2 Techniques expérimentales**

### **2.2.1 Isolement des neutrophiles**

Les neutrophiles ont été isolés à partir du sang périphérique des donneurs sains selon la méthode de Boyum (1968) à l'exception que toute la procédure a été faite à la température ambiante. Brièvement, le sang a été prélevé et centrifugé à 200 x g pendant 10 min. Le plasma a été enlevé et remplacé par du PBS. Après la sédimentation au dextran, les cellules ont été centrifugées sur du Ficoll-Paque; l'anneau de cellules PBMC a été soigneusement recueilli, et les érythrocytes ont été lysés dans l'eau distillée pendant 20s. Les neutrophiles ont été lavés une fois avec du PBS avant d'être resuspendus à une concentration finale de  $5 \times 10^6$  cellules/ml (à moins d'avis contraire) dans le milieu RPMI 1640 supplémenté de 5% de sérum autologue inactivé à la chaleur. Les neutrophiles obtenus contenaient invariablement moins de 0.5% de cellules PMBC, tel que déterminé par coloration Wright/Giemsa ou par cytofluorimétrie. La viabilité des neutrophiles dépassait 98% après 4 h de culture, tel que déterminé par l'exclusion du bleu de trypan.

### **2.2.2 Culture des cellules PLB-985**

La lignée promyélocytaire humaine PLB-985 a été achetée à la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany). Les cellules X-CGD PLB-985 qui sont déficientes en gp91phox (Zhen L. *et al.*, 1993) ont été généreusement fournies par le Dr. Mary Dinauer (Indiana University, Indianapolis, IN). Ces cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère de 95% air-5% CO<sub>2</sub> dans du RPMI 1460 supplémenté de 10% FBS inactivé à la chaleur, de 2 mM L-glutamine, de 100 U/ml pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine (milieu RPMI

complet). Pour induire une différenciation granulocytaire, 1.25% DMSO a été ajouté au milieu RPMI complet et les cellules ont été cultivées pendant 5 jours en changeant le milieu tous les deux jours. Alternativement, la différenciation granulocytaire a été effectuée dans le milieu RPMI complet contenant 0.5% DMF, 1% Nutridoma SP, et/ou 0.5% FBS, comme décrit par Pedruzzi *et al.* (2002).

### **2.2.3 Fractionnements cellulaires et immunobuvardages de type western**

Les cellules ont été incubées à 37°C en présence ou en absence de stimuli ou d'inhibiteurs, tel qu'indiqué dans les figures appropriées. Les incubations ont été arrêtées en ajoutant un volume équivalent de PBS froid contenant 2 mM de DFP, et des inhibiteurs de phosphatases (10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, et 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Après une centrifugation de 5 min à 300 x g, les cellules ont été resuspendues et incubées dans le tampon de relaxation froid composé d'un mélange (mM) de Pipes 10 (pH 7.30), NaCl 10, MgCl<sub>2</sub> 3,5, EDTA 0,5, EGTA 0,5 et DTT 1, supplémenté d'inhibiteurs de protéases (1 mM DFP, 1 mM PMSF, 1 mM, 1 mM AEBSF et 10 µg/ml d'aprotinine, de leupeptine et de pepstatine A) et de phosphatases (10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, et 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Les cellules ont été lysées par une méthode de cavitation à l'azote comme décrit par McDonald *et al.* (1997 et 1998) et par Ear *et al.* (2005). Pour les échantillons cellulaires totaux (whole-cell samples), un petit aliquot de chaque échantillon a été prélevé du cavitat pour une détermination de la concentration protéique, et le reste du cavitat a été bouilli pendant 5 min suite à l'addition d'un volume équivalent de tampon d'échantillon (sample buffer) préchauffé 2x contenant 50 mM Tris base (pH 6.8), 4%



SDS, 10% 2-ME, et 20% glycérol, suivi par une sonication pour défaire la chromatine. Les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été préparées comme décrit par McDonald *et al.* (1997 et 1998) et par Ear *et al.* (2005). Les divers échantillons ont été séparés par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide de 10-12% (à moins d'indications contraires) contenant du SDS (SDS-PAGE) selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Les antigènes ont été révélés par immunobuvardage de type western comme décrit par Ear *et al.* (2005).

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

Les neutrophiles ont été lysés dans 1 ml du tampon de lyse froid contenant 20 mM Tris (pH 7.4), 1% NP-40, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases tel que décrit précédemment. Les lysats cellulaires clarifiés ont été incubés toute la nuit avec 1.5 µg/ml d'anticorps anti-TAK1 et avec 30 µl de protéine G-sepharose 4FF immobilisée sur des billes d'agarose (Amersham-Pharmacia). Le lendemain, les échantillons ont été lavés deux fois avec du tampon de lyse, et deux fois avec du PBS. Les billes ont été resuspendues et chauffées pendant 5 min dans 30 µl de tampon d'échantillon. Les produits d'immunoprécipitation ont été séparés par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide de 10%, transférés sur des membranes de nitrocellulose, et ensuite analysés par immunobuvardage de type western.

### 2.2.5 Immunoprécipitations et essais kinase *in vitro*

Les neutrophiles ont été lysés dans 0.5 ml du tampon de lyse, tel que décrit précédemment. Les lysats cellulaires clarifiés ont été incubés avec 2 µg/ml d'anticorps anti-TAK1, anti-MEKK1, ou anti-MEKK3 pendant 90 min à 4°C avec rotation, suivi d'une incubation avec rotation pendant 60 min à 4°C avec 30 µl de protéine G-sepharose 4FF immobilisée sur des billes d'agarose. Les échantillons ont été lavés une fois avec du tampon de lyse, une fois avec du tampon de lavage (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et 2 µg/ml aprotinine) et deux fois avec du tampon PAN (10 mM Pipes (pH 7.0), 100 mM NaCl, 2 µg/ml aprotinine). Les billes ont été resuspendues dans 30 µl de tampon PAN. À cet étape, les produits d'immunoprécipitation ont été divisés en deux parts (20 µl et 10 µl, utilisés respectivement pour des essais de kinases et les immunobuvardages de type western). Des billes resuspendues (20 µl) a été ajouté dans 20 µl d'un mélange du tampon d'essai de kinase *in vitro* contenant 20 mM Pipes (pH 7.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 µg MBP, 20 µM ATP et 5 µCi [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (pour un essai kinase TAK1), ou 20 mM Pipes (pH 7.0), 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 µg MBP, 20 µM ATP et 5 µCi [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (pour un essai kinase MEKK1), ou 20 mM Pipes (pH 7.0), 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 µg MBP, 20 µM ATP et 5 µCi [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (pour un essai kinase MEKK3). Les réactions ont été effectuées à 30°C pendant 30 min et ensuite arrêtées par ajout de 40 µl du tampon d'échantillon. Les produits des essais kinases *in vitro* ont été séparés par électrophorèse sur des gels de SDS-PAGE de 18%. Les gels ont été séchés et les protéines MBP phosphorylées ont été détectées par autoradiogramme. L'autre 10 µl des

produits d'immunoprécipitation ont été séparés par électrophorèse sur des gels de SDS-PAGE de 10%, transférés sur les membranes nitrocelluloses, et ensuite analysées par immunobuvardage de type western.

### **2.2.6 Essais EMSA (Electrophoretic mobility shift assays)**

Les cellules ont été incubées à 37°C en présence ou en absence de stimuli ou d'inhibiteurs. Les incubations ont été arrêtées en ajoutant un volume équivalent de PBS froid contenant 2 mM DFP, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, et 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Après une centrifugation de 5 min à 300 x g, les cellules ont été resuspendues et incubées dans le tampon de relaxation froid tel que décrit à la section 2.2.3. Les cellules ont été lysées par cavitation à l'azote et les extraits nucléaires ont été préparés et analysés par EMSA comme décrit par McDonald *et al.* (1997 et 1998).

### **2.2.7 Extraction d'ARN et analyses par RPA (RNase Protection Assay) ou par RT-PCR en temps réel**

Les cellules (40 x 10<sup>6</sup> cellules/condition) ont été incubées à 37°C en présence ou en absence de stimuli ou d'inhibiteurs, tel qu'indiqué dans les figures. L'ARN total a été isolé en utilisant le Trizol suivant le protocole du manufacturier (Gibco, Burlington, VT, USA). Le niveau d'expression de l'ARNm a été analysé par RPA tel que décrit par McDonald *et al.* (1999) en utilisant les sondes hCK3 ou hCK5 provenant de BD Pharmingen (Mississauga, Ontario, Canada). Le niveau d'expression de l'ARNm a

aussi été déterminé par l'analyse semi-quantitative par PCR en temps réel. À cet effet, l'ARN total a été d'abord traité avec 10 U de DNase I (Amersham Biosciences) et 20 U de RNasin (Fisher Scientific) pendant 15 min à 37°C, qui ont été ensuite inactivées à 70°C pendant 10 min. 1 µg de l'ARN total a été ensuite utilisé pour la synthèse de cDNA dans une réaction de transcription inverse en utilisant 7,5 µM de « random decamers » (Ambion, Austin, TX, USA) et 1U de SuperScript II (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) dans un volume total de 20 µl. Le cDNA a été amplifié par PCR en temps réel par un appareil RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) dans un volume final de 20 µl contenant 1 µg cDNA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM d'amorces, 0.1U Taq Polymérase et du SYBR Green (Molecular Probes, Eugene, OR) dilué à 1/33 000. Les réactions se faisaient pendant 35 cycles avec les paramètres suivants: dénaturation à 95°C pendant 15 s, hybridation à 60°C pendant 20 s, et élongation à 72°C pendant 25 s. Les amorces utilisées étaient les suivantes: 18S (fw AGGAATTGACGGAAGGGCAC; rev GGACATCTAAGGGCATCACA), IL-8 (fw AGGAAGCTCACTGGTGGCTG; rev TAGGCACAATCCAGGTGGC), TNF-α (fw TCTTCTCGAACCCCGAGTGA; rev CCTCTGATGGCACCACCAG), Mip-1a (fw CGGCTTCGCTTGGTTAGGA; rev CGGCTTCGCTTGGTTAGGA), Mip-1b (fw CTGCTCTCCAGCGCTCTCA; rev GTAAGAAAAGCAGCAGGCGG), GAPDH (fw GATGACATCAAGAAGGTGGTGAA; rev GTCTTACTCCTTGGAGGCCATGT). Pour les analyses par « real-time primary transcript (PT)-PCR », les amorces suivantes ont été utilisées: IL-8 (fw ATTGAGAGTGGACCACACTG; rev ACTACTGTAATCCTAACACCTG); Mip-1α (fw GTCAGTCCTTTCTTGGCTCTG; rev GATACCCACAACGAAACTCAGAC); Mip-

1 $\beta$  (fwAAACCTCTTTGCCACCAATACC; rev AGGACTCTGCCTACACCTTGAC);  
TNF $\alpha$  (fw TCAGGATCATCTTCTCGAACC; rev GAGTCCTTCTCACATTGTCTC).  
L'analyse semi-quantitative a été faite suivant la procédure de Dussault et Pouliot (2006) qui permet de mesurer l'abondance des transcrits en les relativisant a un transcrit dont l'abondance ne varie pas selon les stimulations, soit le GAPDH ou l'ARNr 18S.

### **2.2.8 Analyses par ELISA**

Les cellules ( $3 \times 10^6$  cellules/600  $\mu$ l) ont été cultivées dans des plaques de 24 puits à 37°C en présence ou en absence de stimuli ou d'inhibiteurs, tel qu'indiqué dans les figures. Les surnageants ont été récoltés et congelés dans de l'azote liquide et entreposés à -80°C. Les concentrations de cytokines et de chimiokines ont été déterminées par la technique d'ELISA en sandwich grâce à des paires d'anticorps selon les instructions des manufacturiers (R&D Systems ou BD-PharMingen).

### **2.2.9 Analyses de cytofluorimétrie**

Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid, puis incubées ( $5 \times 10^5$  cellules/par échantillon) avec 50  $\mu$ l d'un anticorps de souris anti-CD11b (0.5  $\mu$ g/ml final, dilué dans du PBS) pendant 30 min à 4°C. Les cellules ont été ensuite lavées 2 fois avec du PBS froid et incubées pendant 30 min (à 4°C et à l'obscurité) avec 50  $\mu$ l d'un anticorps secondaire conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (0.5  $\mu$ g/ml final, dilué dans du PBS). Les cellules ont été finalement lavées à 2 reprises avec du PBS froid. La

fluorescence a été analysée dans un cytofluorimètre FACScan (Becton-Dickinson, San José, CA) en utilisant le logiciel CELLQuest. Un minimum de 10 000 cellules ont été analysées dans chaque expérience.

### **2.2.10 Transfections transitoires par électroporation ou par nucléofection**

Les cellules PLB-985 différenciées 5 jours à l'aide de 1,25% DMSO ( $5 \times 10^6$  cellules/condition) ont été lavées deux fois avec du PBS. Les cellules ont été resuspendues dans 400  $\mu$ l d'un tampon d'électroporation standard composé d'un mélange d'HEPES 20 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> heptahydrate 0,7 mM, D-glucose 6 mM, ajusté à pH 7,05 (Ear *et al.*, 2001). Le plasmide voulu (5  $\mu$ g d'ADNc) dans du tampon d'électroporation (10  $\mu$ l) a été mélangé avec les cellules et l'incubation poursuivie pendant 5 min à température ambiante. La suspension de cellules a été placée dans une cuvette d'électroporation dont les électrodes étaient séparées de 4 mm (BTX, San Diego, CA, USA). Les cellules ont été électroporées (270 V, 960  $\mu$ F) en utilisant un appareil Gene Pulser (Bio-Rad, Richmond, CA). Quand la technique de nucléofection a été utilisée, les cellules ont été resuspendues ( $5 \times 10^6$  cellules/100  $\mu$ l) dans la solution de Nucleofection (trousse pour les cellules dendritiques) (Amata Biosystems, Köln, Germany) contenant 5  $\mu$ g de plasmide d'intérêt. Les cellules ont été incubées pendant 5 min à température de la pièce, transférées dans une cuvette de nucléofection dont les électrodes étaient séparées de 2 mm (Amata Biosystems, Köln, Germany). Les cellules ont été nucléofectées avec un instrument « nucleofector » en utilisant le paramètre pré-configuré Q-01 (Amata Biosystems, Köln, Germany). Les cellules électroporées ou

nucléofectées ont été lavées une fois avec du milieu RPMI 1640 contenant 10% FBS à température ambiante et ensuite mises en culture à 37°C dans une atmosphère de 95% air-5% CO<sub>2</sub>. Pour déterminer l'efficacité de transfection, le vecteur pcDNA3.1 contenant le gène de GFP (pcDNA3.1/GFP) a été utilisé. Le pourcentage des cellules fluorescentes a été analysé avec le cytofluorimètre FACScan.

### **2.2.11 Essais de Luciférase**

Les cellules PLB-985 différenciées en granulocytes ont été nucléofectées avec un plasmide contenant un gène rapporteur luciférase sous le contrôle du NF-κB (pNF-κB-Luc) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) ou sous le contrôle du promoteur de l'IL-8 (pIL8-Luc) (Dr. Allan R. Brasier, University of Texas Medical Branch), et incubées pendant 6 heures en présence ou en absence de stimuli. Les cellules ont été ensuite lavées deux fois avec du PBS et lysées pendant 15 min dans 100 µl de tampon de lyse (Reporter Lysis Buffer) provenant de Promega Corp (Madison, WI, USA). Le lysat cellulaire a subi une étape de gel-dégel à l'azote liquide, a été centrifugé pendant 10 min à 12000 x g, et le surnageant (20 µl) a été utilisé dans un essai de luciférase selon les instructions du fabricant (Promega). L'activité de luciférase a été mesurée en duplicata dans un luminomètre Sirius (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Germany).

### **2.2.12 Mesures de la production de superoxide**

La production de superoxide par les cellules PLB-985 granulocytaires a été mesurée par un essai de réduction du cytochrome c. Brièvement, les cellules ( $1 \times 10^6$

cellules/ml) ont été pré-incubées dans du PBS supplémenté de 5% FBS et de 100  $\mu$ M de cytochrome c, puisensemencées dans une plaque à 96 puits ( $2 \times 10^5$  cellules/puit), et ensuite incubées à 37°C pour différents temps en présence ou en absence de stimuli. La production de superoxide a été déterminée comme décrit par Yu *et al.*, (1999) et par Boulven *et al.* (2006).

### 2.2.13 Essais d'apoptose

Les neutrophiles ont été mis en culture ( $2,5 \times 10^6$  cellules par ml de RPMI + 5% sérum autologue) en présence ou en absence des stimuli indiqués sur les figures. Après 24 h d'incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), les cellules sont récoltées. Le protocole et les solutions pour la mesure de l'annexine V à la surface de la cellule sont fournis par Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Les neutrophiles sont lavés une fois avec du PBS froid et une fois avec du tampon de marquage. Le culot cellulaire est ensuite dissous dans 250  $\mu$ l de tampon de marquage et maintenu sur glace. Pour le marquage proprement dit,  $2,5 \times 10^5$  cellules (25  $\mu$ l de la suspension) sont déposés dans un nouveau tube sur glace. Par la suite, 75  $\mu$ l de tampon de marquage contenant 2  $\mu$ l du stock d'annexine V et 5  $\mu$ l du stock d'iodure de propidium (PI) sont ajoutés à chaque tube. Le marquage se fait sur glace pendant 15 min dans le noirceur. La liaison de l'annexine V est arrêtée par l'ajout de 100  $\mu$ l de PBS froid et, la détection se fait par FACScalibur en utilisant FL1 pour la l'annexine V-FITC et FL2 pour le PI.



### **2.3 Analyses statistiques**

Les résultats représentent la moyenne des différentes expériences  $\pm$  SEM. L'analyse statistique a été faite à l'aide du test *t* non-pairé. Le niveau de probabilité accepté comme statistiquement significatif était de  $p < 0.05$ .

## **CHAPITRE III- RÉSULTATS**

### **SECTION 1**

#### **EXPRESSION ET ACTIVATION NUCLÉAIRE DU COMPLEXE IKK CHEZ LES NEUTROPHILES HUMAINS**

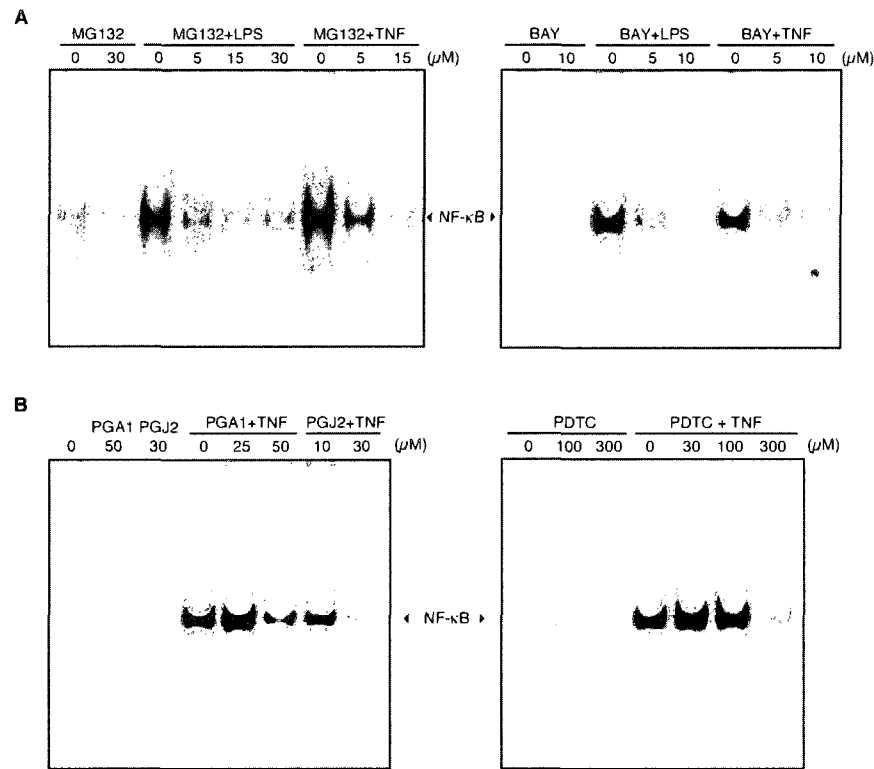
Cette section présente nos travaux dans le cadre de l'expression constitutive et nucléaire du complexe IKK et du RelA, et de leur activation (état de phosphorylation) en réponse aux deux stimuli (le TNF $\alpha$  ou le LPS). Ainsi que le rôle du NF- $\kappa$ B dans la génération inductible de certaines cytokines et chimiokines inflammatoires (le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, le Mip-1 $\alpha$  et le Mip-1 $\beta$ ) chez les neutrophiles humains.

### **3.1.1 Rôle du NF- $\kappa$ B dans l'induction de l'expression de certaines cytokines et chimiokines chez les neutrophiles humains**

Les études effectuées chez plusieurs types cellulaires (épithéliales, monocytaires) ont montré que l'expression inductible de plusieurs chimiokines, comme l'IL-8, le Mip-1 $\beta$ , l'IP-10 et le MIG, dépendait en grande partie de l'activation des facteurs de transcription appartenant à la famille de NF- $\kappa$ B/Rel (Mukaida *et al.*, 1990; Mahe *et al.*, 1991; Yasumoto *et al.*, 1992; Stein et Baldwin, 1993; Kunsch *et al.*, 1994; Mukaida *et al.*, 1994; Breton et Chabot-Fletcher, 1997; Kim *et al.*, 2001; Richmond, 2002; Nemeth *et al.*, 2002). Bien que la présence et l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B/Rel soient bien documentées chez les neutrophiles humains, l'impact de l'activation de ce facteur de transcription sur l'expression d'un grand nombre de gènes qui sont induits par divers stimuli dans ces cellules demeurent encore fragmentaires; en particulier, dans l'induction de l'expression des gènes de cytokines et chimiokines (Cloutier et McDonald, 2003; McDonald, 2004). Nous avons alors voulu déterminer le rôle de ce facteur de transcription dans l'expression inductible de certaines cytokines et chimiokines chez les neutrophiles humains en utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques du NF- $\kappa$ B. Nous avons entrepris une série d'expériences pour déterminer la concentration optimale des inhibiteurs du NF- $\kappa$ B à utiliser dans les neutrophiles humains. À cet égard, les neutrophiles ont été stimulés avec du LPS ou le TNF- $\alpha$  après avoir été pré-incubés avec des inhibiteurs du protéasome, MG-132 et MG-262, qui empêchent la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Palombella *et al.*, 1994; Zavrski *et al.*, 2005), avec le BAY 117082, qui inhibe la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Pierce *et al.*, 1997),

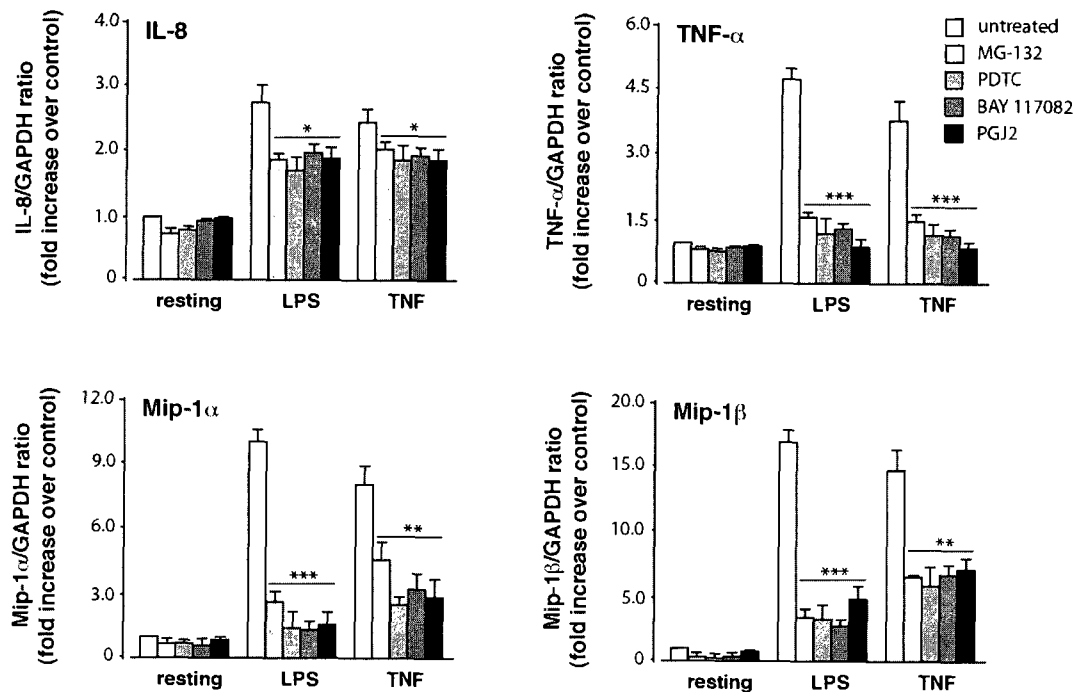
avec les prostanoides cyclopentenones  $\text{PGA}_1$  et le 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub>, qui inhibent spécifiquement la kinase IKK $\beta$  (Rossi *et al.*, 2000), ou avec le PDTC, un antioxydant qui inhibe l'activation du NF- $\kappa$ B dans plusieurs lignées cellulaires (Schreck *et al.*, 1992). Des extraits nucléaires ont été ensuite analysés par EMSA pour déterminer l'activité de liaison du NF- $\kappa$ B à l'ADN. Nous avons constaté que ces inhibiteurs ont empêché l'activation du NF- $\kappa$ B de façon concentration-dépendante (Figure 3.1.1 et données non présentées). En se basant sur ces résultats, nous avons choisi ces concentrations optimales pour les expériences ultérieures: 10  $\mu\text{M}$  pour le MG-132; 1  $\mu\text{M}$  pour le MG-262; 5  $\mu\text{M}$  pour le BAY 117082; 30  $\mu\text{M}$  pour le 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub>. Dans le cas du PDTC, une bonne inhibition exigeait que les cellules soient exposées à au moins 300  $\mu\text{M}$  (Figure 3.1.1B, panneau droit). Avec cette concentration de PDTC, cependant, la viabilité des neutrophiles était diminuée d'environ 15% après 2 heures en culture (résultats non montrés). Par la suite, nous avons examiné la conséquence de l'inhibition de l'activation du NF- $\kappa$ B sur la capacité des neutrophiles à produire des cytokines et chimiokines. À cette fin, les cellules ont été prétraitées pendant 30 min avec différents inhibiteurs du NF- $\kappa$ B avant la stimulation avec le LPS ou le TNF- $\alpha$ , et l'analyse subséquente de l'accumulation d'ARNm de certaines cytokines et chimiokines (TNF $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) a été effectuée par RPA (ribonuclease protection assay). Nous avons constaté que l'inhibition du NF- $\kappa$ B réprimait fortement l'expression inductible des gènes examinés, excepté que cette inhibition était toujours moins prononcée dans le cas de l'expression génique de l'IL-8 (Figure 3.1.2). De la même façon, la sécrétion de ces cytokines et chimiokines par les neutrophiles, stimulés avec le TNF- $\alpha$  ou le LPS, a été fortement réduite par les inhibiteurs du NF- $\kappa$ B (Figure 3.1.3). Ces résultats montrent

que le NF- $\kappa$ B est requis dans la production de plusieurs cytokines et chimiokines par les neutrophiles.



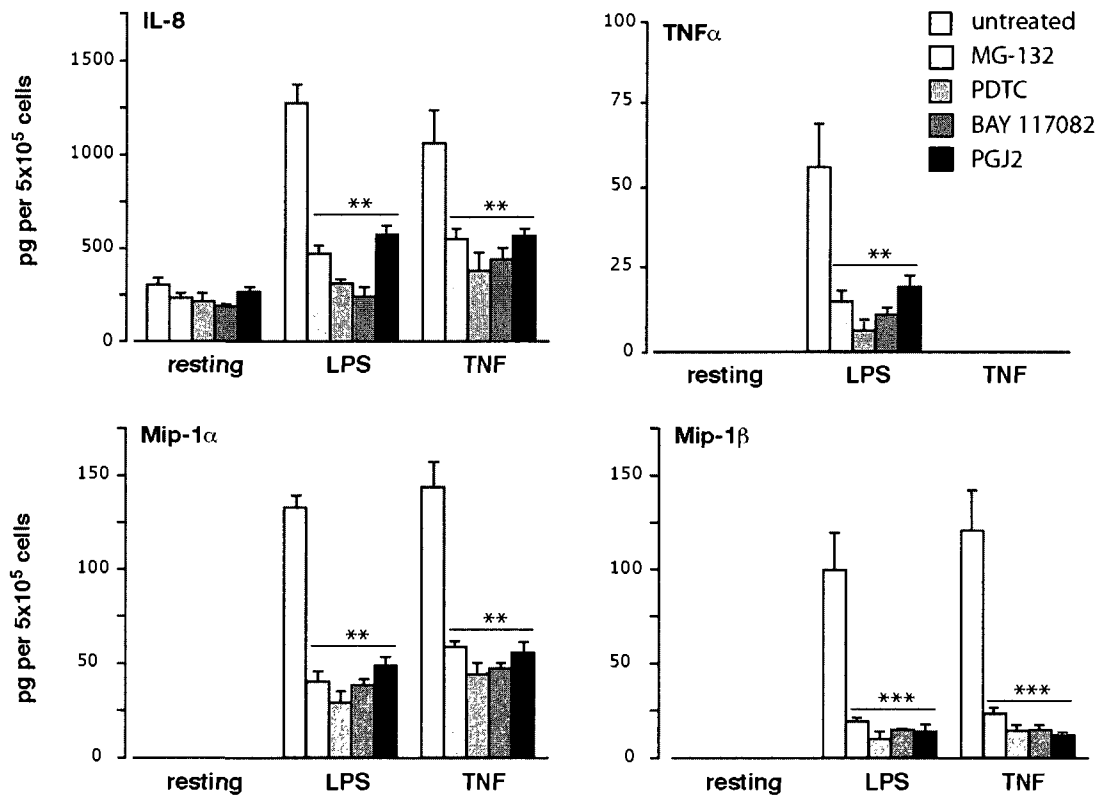
**Figure 3.1.1 Effet de divers inhibiteurs du NF- $\kappa$ B sur la liaison inductible du NF- $\kappa$ B à l'ADN dans les neutrophiles humains.**

Les cellules ont été stimulées pendant 15 min avec le LPS (100 ng/ml), le TNF- $\alpha$  (100 U/ml) ou le diluant à la suite d'un prétraitement de 30 min avec les concentrations indiquées de MG-132 ou de BAY 117082 (**A**) ou un prétraitement plus long (60 min) avec les concentrations indiquées de PGA1, 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub>, ou de PDTC (**B**). Les extraits nucléaires ont ensuite été préparés et analysés par EMSA en utilisant un oligonucléotide contenant la séquence consensus NF- $\kappa$ B. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.



**Figure 3.1.2 Effet de inhibiteurs du NF- $\kappa$ B sur l'expression des gènes de cytokines et chimiokines inflammatoires chez les neutrophiles humains.**

Les neutrophiles ont été prétraités pendant 30 min avec différents inhibiteurs du NF- $\kappa$ B (10  $\mu$ M de MG-132, 5  $\mu$ M de BAY 117082, 300  $\mu$ M de PDTC ou 30  $\mu$ M de 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub>) avant la stimulation de 60 min avec le LPS (100 ng/ml), le TNF- $\alpha$  (100 U/ml), ou le diluant. L'ARN total a ensuite été extrait et analysé par le RPA (ribonuclease protection assay). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test t non-pairé (\* =  $p < 0.05$  par rapport au stimulus; \*\* =  $p < 0.01$  par rapport au stimulus; \*\*\* =  $p < 0.001$  par rapport au stimulus).



**Figure 3.1.3 Effet des inhibiteurs du NF- $\kappa$ B sur la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires chez les neutrophiles humains.**

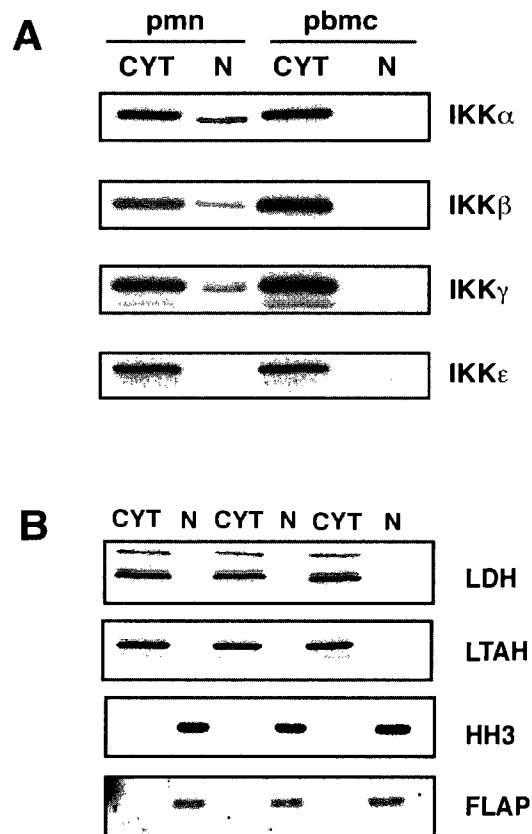
Les neutrophiles ont été prétraités pendant 30 min avec différents inhibiteurs du NF- $\kappa$ B (10  $\mu$ M MG-132, 5  $\mu$ M BAY 117082, 300  $\mu$ M PDTC ou 30  $\mu$ M 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub>) avant une stimulation de 5 h avec le LPS (100 ng/ml), le TNF- $\alpha$  (100 U/ml), ou le diluant. Les surnageants ont ensuite été recueillis et analysés par ELISA. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de cinq expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test t non-pairé (\*\* =  $p < 0.01$  par rapport au stimulus; \*\*\* =  $p < 0.001$  par rapport au stimulus).

### 3.1.2 Expression et distribution des isoformes du complexe IKK chez les neutrophiles humains

L'activation de cellules (autre que les neutrophiles humains) par divers stimuli, comme le TNF- $\alpha$  ou le LPS, semble induire la phosphorylation et l'activation d'un groupe de kinases nommées IKKs (I $\kappa$ B kinases) qui phosphorylent les I $\kappa$ Bs, notamment I $\kappa$ B $\alpha$ . En effet, une stimulation des neutrophiles entraîne une phosphorylation et une dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  (McDonald *et al.*, 1997 et 1998). Or, cette dégradation inductible d'I $\kappa$ B $\alpha$  a lieu à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des neutrophiles (Vancurova *et al.*, 2001; Castro-Alcaraz *et al.*, 2002 et nos données non publiées). C'est pourquoi nous avons examiné si des composants en amont d'I $\kappa$ B $\alpha$  sont localisés dans ces deux compartiments cellulaires. Dans ce dessein, des fractions cytoplasmiques et nucléaires de neutrophiles au repos ont été préparées par la méthode de cavitation à l'azote. Cette procédure permet d'obtenir des fractions nucléaires et cytoplasmiques exemptes de contamination croisée et de mieux préserver les protéines qui sont facilement dégradées par une lyse avec détergent (McDonald *et al.* 1997 et 1998). Les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques contre les différents isoformes de IKK. À titre de comparaison, des fractions des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMCs) autologues ont été également préparées et analysées en parallèle. La figure 3.1.4A montre que, dans les neutrophiles, les trois sous-unités du complexe IKK (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , et IKK $\gamma$ ) se retrouvent à la fois dans les compartiments cytoplasmique et nucléaire, alors que ces trois isoformes sont strictement cytoplasmiques dans les PBMCs autologues. Les neutrophiles expriment aussi une

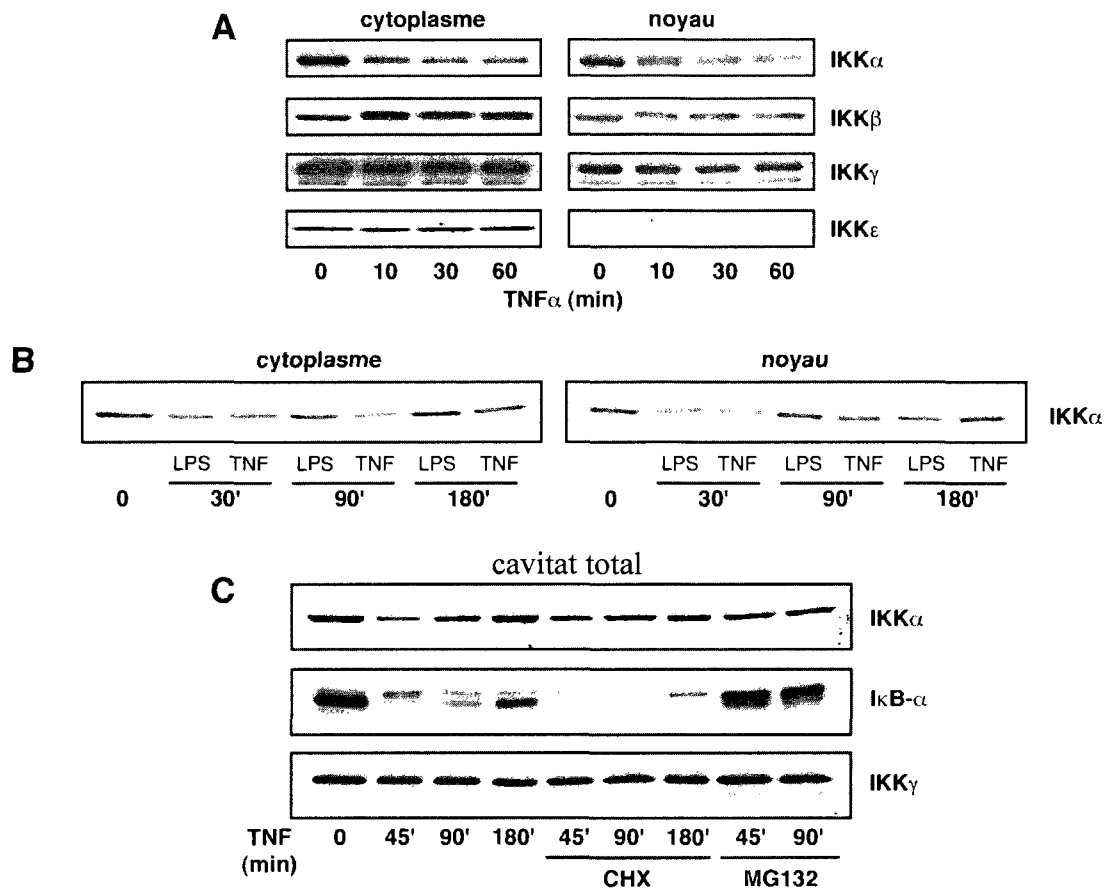


kinase apparentée à IKK, appelée IKK $\epsilon$  ou IKK $\iota$ , cependant cette dernière ne se retrouve que dans les fractions cytoplasmiques (Figure 3.1.4A). La détection inattendue de plusieurs isoformes de IKK dans le noyau des neutrophiles nous a incité à nous assurer de la pureté de nos fractions subcellulaires. Nous avons donc analysé ces fractions pour la présence de marqueurs nucléaires et cytoplasmiques. Tel qu'illustré dans la figure 3.1.4B, des protéines étant connues pour se retrouver uniquement dans le cytosol, telles que la lactate déshydrogénase (LDH) et la leucotriène A<sub>4</sub> hydrolase (LTAH) (Rådmark *et al.*, 1984), ont été en effet détectées exclusivement dans ces fractions. Inversement, la protéine activatrice de la 5-lipoxygénase (FLAP), qui se trouve dans l'enveloppe nucléaire des neutrophiles (Woods *et al.*, 1993), est présente uniquement dans les fractions nucléaires (Figure 3.1.4B). De la même façon, la protéine histone H3 est exclusivement nucléaire (Figure 3.1.4B). Ainsi, nos fractions nucléaires et cytoplasmiques sont raisonnablement exemptes de la contamination croisée. Ceci est en accord avec des études précédentes qui ont utilisé des procédures de fractionnement cellulaire semblables (Pouliot *et al.*, 1996; McDonald *et al.* 1997).



**Figure 3.1.4** Expression des isoformes du complexe IKK chez les neutrophiles humains et les PBMCs.

**A**, les neutrophiles (pmn) fraîchement isolés et les PBMCs autologues ont été lysés par cavitation à l'azote et les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été analysées par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques contre les différents isoformes des IKKs. Un volume équivalent à  $0,5 \times 10^6$  cellules a été chargé par piste sur le gel. **B**, les fractions subcellulaires des neutrophiles de trois différents donneurs ont été analysées pour la présence de marqueurs cytoplasmiques, la lactate déshydrogénase (LDH) et la leucotriène A<sub>4</sub> hydrolase (LTAH), ou de marqueurs nucléaires, la protéine activatrice de la 5-lipoxygénase (FLAP) et la protéine histone H3 (HH3). Les résultats sont représentatifs de quatre expériences indépendantes.



**Figure 3.1.5 Expression des isoformes du complexe IKK chez les neutrophiles humains activés.**

A et B, les neutrophiles ont été stimulés jusqu'à 180 min avec le TNF- $\alpha$  (100 U/ml) ou le LPS (100 ng/ml) avant le fractionnement et, l'analyse des fractions cytoplasmiques et nucléaires a été faite par immunobuvardage de type western (17  $\mu$ g/piste pour des fractions cytoplasmique, ce qui représente  $0,5 \times 10^6$  équivalents de cellules, et 24  $\mu$ g/piste pour les fractions nucléaires, représentant  $1 \times 10^6$  équivalents de cellules). C, les neutrophiles ont été prétraités pendant 30 min avec 20  $\mu$ g/ml de cycloheximide (CHX), 15  $\mu$ M de MG-132, ou leur diluant (DMSO, 0,2% v/v concentration finale) avant la stimulation avec le TNF- $\alpha$  (100 U/ml) pour différents temps. Les cellules ont ensuite été lysées par la méthode de cavitation à l'azote et les cavitats ont été analysés par immunobuvardage de type western (25  $\mu$ g/piste, représentant  $0,4 \times 10^6$  équivalents de cellules). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La stimulation des neutrophiles avec des inducteurs du NF- $\kappa$ B comme le TNF- $\alpha$  ou le LPS n'a pas d'incidence sur la répartition subcellulaire de divers isoformes de IKK (Figure 3.1.5A, et données non présentées). À notre surprise, le niveau d'expression cytoplasmique et nucléaire de IKK $\alpha$  diminue considérablement suite à une stimulation des neutrophiles avec le TNF- $\alpha$  ou avec le LPS (Figure 3.1.5A, et données non présentées). Ce phénomène est généralement détectable en 10 min (Figure 3.1.5A), et encore plus marqué entre 30 et 90 min (Figure 3.1.5, A et B). Ce phénomène est transitoire parce que le niveau d'expression de IKK $\alpha$  revient généralement à l'état basal après 2 ou 3 heures de stimulation (Figure 3.1.5B, et données non présentées). Afin de déterminer si la perte de IKK $\alpha$  était due à la dégradation protéolytique, les neutrophiles ont été prétraités avec un inhibiteur du protéasome (le MG-132) avant la stimulation; alternativement, les cellules ont été prétraitées avec la cycloheximide pour déterminer si la réapparition de IKK $\alpha$  reflète la synthèse protéique *de novo*. Tel que montré à la figure 3.1.5C, le MG-132 empêche partiellement la perte d'IKK $\alpha$  à 45 min post-stimulation (piste 2 vs l'avant-dernière), mais cet effet n'est plus évident au moment où la protéine IKK $\alpha$  réapparaît (c'est-à-dire, en 90 min dans une expérience représentative). Une inhibition partielle de la perte de IKK $\alpha$  par le MG-132 a également été observée dans les neutrophiles stimulés pendant 30 min (données non présentées). Par comparaison, le MG-132 a totalement empêché la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$ , un processus connu pour être fait par le protéasome, à tous les temps examinés (Figure 3.1.5C). Ainsi, l'inhibition partielle de la disparition d'IKK $\alpha$  par le MG-132 n'est pas imputable à une inhibition incomplète du protéasome, et indique en outre qu'en plus du protéasome, d'autres mécanismes sont impliqués dans la perte inductible de IKK $\alpha$ . Des résultats semblables

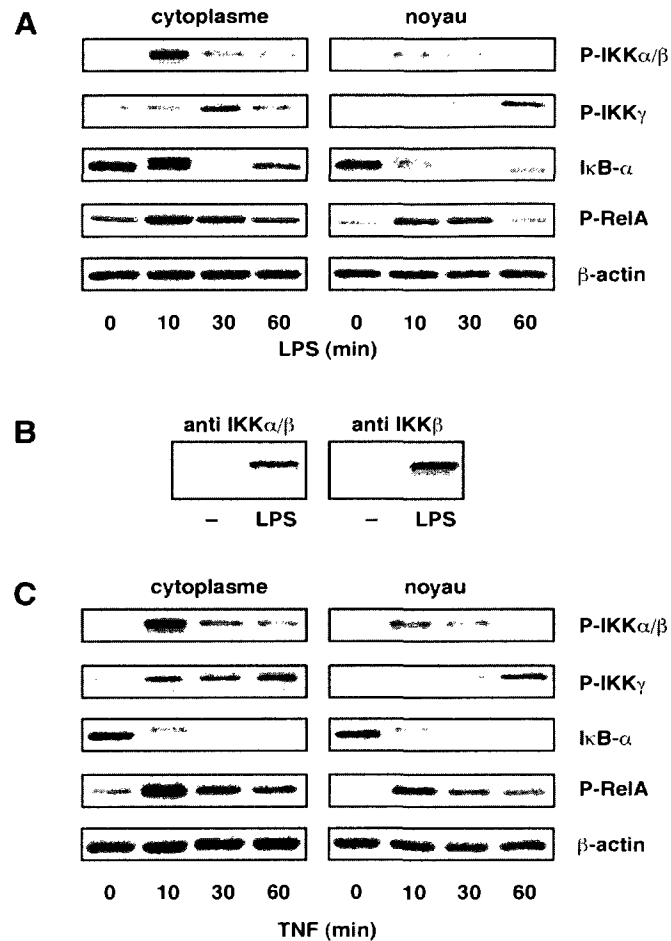
ont été obtenus en utilisant un autre inhibiteur du protéasome, le MG-262 (données non présentées). La figure 3.1.5C montre également que la cycloheximide a entravé la réexpression de IKK $\alpha$  à plus longue durée, alors qu'elle empêche presque complètement celle d'I $\kappa$ B $\alpha$ , ce qui indique un rôle potentiel de la synthèse protéique *de novo* dans ce processus. Contrairement à IKK $\alpha$ , le niveau d'expression de IKK $\beta$  ou IKK $\gamma$  n'est pas affecté par la cycloheximide même jusqu'à 4 heures de stimulation, que ce soit dans des cellules au repos ou activées, ce qui indique une longue demi-vie pour ces deux isoformes (Figure 3.1.5C, et données non présentées). Dans les neutrophiles au repos, le niveau d'expression d'IKK $\alpha$  était également inchangé par la cycloheximide, même jusqu'à 4 heures d'incubation (données non présentées), ce qui suggère également une longue demi-vie pour IKK $\alpha$  (à condition que les cellules ne soient pas activées).

### **3.1.3 Phosphorylation inductible des isoformes du complexe IKK et de RelA chez les neutrophiles humains**

Bien que les bases moléculaires de l'activation du complexe IKK ne soient pas encore totalement élucidées, l'activation de ce complexe est dépendante de sa phosphorylation parce qu'un traitement à la phosphatase d'un complexe IKK, purifiée à partir des cellules activées, réduit son activité (DiDonato *et al.*, 1997; Prajapati *et al.*, 2004). Nous avons donc cherché à savoir si le complexe IKK est activé suite à la stimulation des neutrophiles. À cette fin, nous avons examiné l'état de phosphorylation des sous-unités individuelles de IKK, ainsi que la phosphorylation et la dégradation du substrat principal d'IKK, c'est-à-dire la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ . Nous avons également examiné

si un autre substrat d'IKK, comme la protéine RelA (Sakurai *et al.*, 1999), est phosphorylé suite à l'activation cellulaire. Pour ce faire, les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps reconnaissant la forme phosphorylée d'IKK $\alpha/\beta$  ou de RelA (Ser536). Tel qu'illustré à la figure 3.1.6A, l'exposition des neutrophiles au LPS entraîne une phosphorylation rapide et transitoire de ce qui semble être les deux kinases IKK $\alpha$  (bande inférieure) et IKK $\beta$  (bande supérieure), à la fois dans le cytoplasme et le noyau. Cette phosphorylation atteint son maximum en 10 min et diminue ensuite progressivement, avec un retour au niveau basal en 90 min (Figure 3.1.6A, et données non présentées). La phosphorylation de la bande supérieure a toujours été beaucoup plus forte que celle de la bande inférieure, ce qui a initialement suggéré que la kinase IKK $\beta$  était beaucoup plus phosphorylée que la kinase IKK $\alpha$ . Toutefois, bien que l'anticorps utilisé reconnaisse les deux isoformes d'IKK, et quoique le patron des bandes corresponde au profil attendu d'IKK $\alpha$  et d'IKK $\beta$  phosphorylées, l'immunodéplétion de IKK $\alpha$  des extraits protéiques n'a pas affecté la détection de ces deux bandes (données non présentées). Ceci suggère que les deux bandes de protéines reconnues par notre anticorps à double spécificité (anti-pIKK $\alpha/\beta$ ) doivent principalement représenter la kinase IKK $\beta$ . Par la suite, la disponibilité d'un anticorps spécifique pour la forme phosphorylée d'IKK $\beta$  a révélé le même patron de bandes (que ce soit ce dernier anticorps ou si celui qui est à double spécificité est utilisé) (Figure 3.1.6B). Ainsi, il semble que le LPS induit fortement la phosphorylation d'IKK $\beta$ , mais pas celle d'IKK $\alpha$ . La figure 3.1.6A montre également que LPS induit la phosphorylation d'IKK $\gamma$ , d'I $\kappa$ B $\alpha$ , et de RelA; là encore, ces deux phénomènes ont lieu à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Lorsque les neutrophiles ont été stimulés avec le

TNF- $\alpha$ , au lieu du LPS, un patron très similaire a été observé (Figure 3.1.6C), ce qui est en accord avec le fait que ces deux stimuli affectent la cascade NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B de la même façon dans les neutrophiles (McDonald *et al.*, 1997 et 1998).



**Figure 3.1.6 Phosphorylation inducible des isoformes du complexe IKK et de RelA chez les neutrophiles humains.**

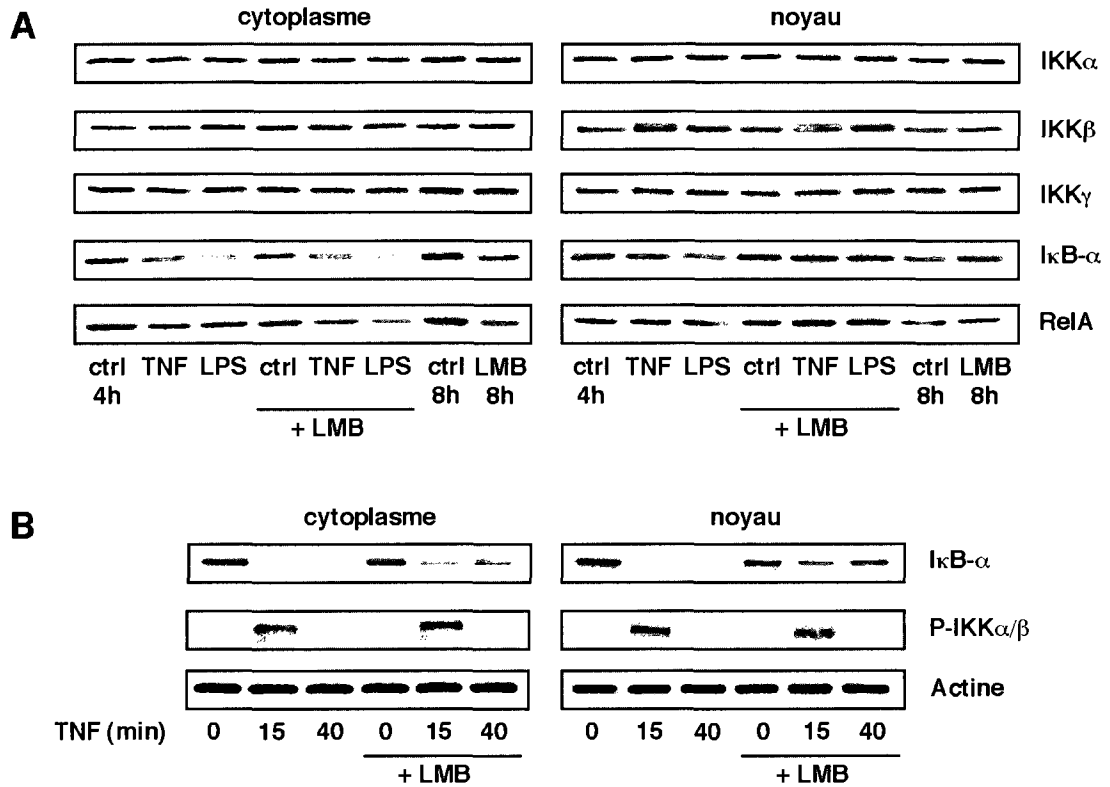
**A** et **C**, les neutrophiles ont été stimulés jusqu'à 60 min avec le LPS (100 ng/ml) ou le TNF- $\alpha$  (100 U/ml) avant le fractionnement et l'analyse des fractions cytoplasmiques et nucléaires par immunobuvardage de type western (24  $\mu$ g/piste pour des fractions cytoplasmique, ce qui représente  $0,7 \times 10^6$  équivalents de cellules, et 30  $\mu$ g/piste pour les fractions nucléaires, représentant  $1,2 \times 10^6$  équivalents de cellules). **B**, les neutrophiles ont été stimulés pendant 15 min avec le LPS (100 ng/ml) ou son diluant (RPMI 1640) avant d'être lysés par la méthode de cavitation à l'azote. Les fractions cytoplasmiques ont été migrées en duplicata sur le même gel (20  $\mu$ g/piste), et ensuite analysées par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps anti-phospho IKK $\alpha/\beta$  ou anti-phospho IKK $\beta$ . Les résultats sont représentatifs de trois expériences (**A** et **C**) ou de deux expériences (**B**).



### **3.1.4 Navette entre le noyau et le cytoplasme des divers composants de la cascade IKK/ $\kappa$ B chez les neutrophiles humains**

La présence des isoformes de IKK, de RelA et de  $\kappa$ B $\alpha$  à la fois dans le noyau et le cytoplasme des neutrophiles nous a conduit à examiner si certaines de ces protéines font la navette entre ces deux compartiments cellulaires, tel que rapporté dans la littérature pour d'autres types cellulaires (Rodriguez *et al.*, 1999; Carlotti *et al.*, 2000; Birbach *et al.*, 2002). Les neutrophiles ont donc été incubés en présence ou en absence de la leptomycine B (un inhibiteur des exportations nucléaires), avant d'être stimulés pendant 4 h avec le LPS ou le TNF- $\alpha$ . La leptomycine B est un anti-fongique qui lie la protéine Crm1 et interfère dans l'association de cette dernière avec les protéines ayant la séquence d'exportation nucléaire (NES), ce qui bloque leur exportation (Kudo, 1998). Les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été analysées par immunobuvardage de type western pour examiner tout changement de localisation de divers composants de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B. Tel qu'illustré à la figure 3.1.7A, une préincubation en présence de leptomycine B n'a pas affecté la distribution cellulaire des trois principaux isoformes de IKK au repos ou lorsque les cellules sont activées, ce qui indique qu'ils ne font pas la navette entre le noyau et le cytoplasme. En revanche, la leptomycine B a entraîné une accumulation modérée de  $\kappa$ B $\alpha$  et de RelA dans le noyau des neutrophiles stimulés avec le LPS ou le TNF- $\alpha$  pendant 4 heures (Figure 3.1.7A). Dans les cellules au repos, un changement semblable de la distribution de  $\kappa$ B $\alpha$  et de RelA n'a pas été observé au bout de 4 heures de culture en présence de la leptomycine B, mais ce changement était détectable après 8 heures d'incubation (Figure 3.1.7A), ce qui indique

un très faible mouvement des protéines  $I\kappa B\alpha$  et RelA dans les neutrophiles non-stimulés. Afin de déterminer si la leptomycine B peut causer une accumulation des protéines  $I\kappa B\alpha$  et RelA dans le noyau de neutrophiles activés par des mécanismes autres que des interférences avec l'exportation nucléaire, nous avons effectué des expériences à des temps de stimulation plus courts, c'est-à-dire dans des conditions où la navette n'est pas détectable. Comme montrée dans la figure 3.1.7B, la leptomycine B a retardé (ou plutôt partiellement empêchée) la dégradation inductible à la fois nucléaire et cytoplasmique d' $I\kappa B\alpha$ . Cela reflète probablement un effet sur la protéolyse d' $I\kappa B\alpha$ , car la phosphorylation inductible de IKK $\beta$  ou de  $I\kappa B\alpha$  elle-même n'a pas été affectée par le traitement avec la leptomycine B (Figure 3.1.7B, et résultats non montrés). Ainsi, la leptomycine B semble affecter la cascade de NF- $\kappa$ B en agissant sur bien plus que l'inhibition de l'exportation nucléaire.



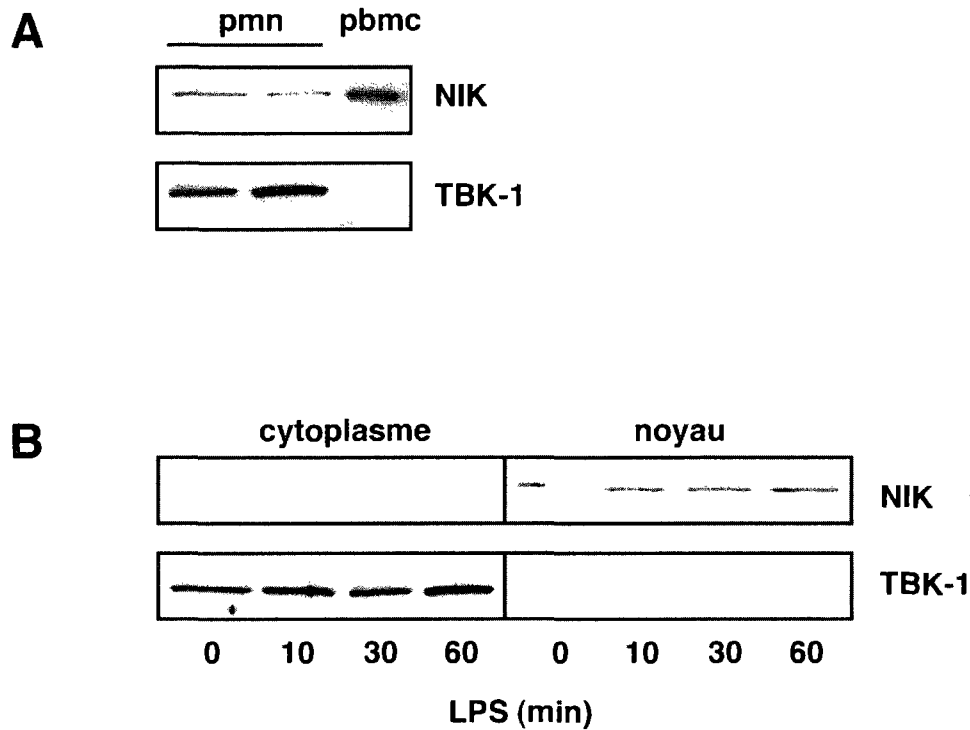
**Figure 3.1.7 Navette entre le noyau et le cytoplasme des divers composants de la cascade IKK/I $\kappa$ B chez les neutrophiles humains.**

Les neutrophiles ont été prétraités pendant 60 min avec 20 nM de leptomycine B (LMB) ou son diluant (DMSO, 0,2% v/v concentration finale) et ensuite cultivés jusqu'à 8 h en présence ou en absence de LPS (100 ng/ml) ou de TNF- $\alpha$  (100 U/ml). Les cellules ont ensuite été lysées par la méthode de cavitation à l'azote et les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été analysées par immunobuvardage de type western (22  $\mu$ g/piste pour des fractions cytoplasmiques, ce qui représente  $0,6 \times 10^6$  équivalents de cellules, et 30  $\mu$ g/piste pour les fractions nucléaires, représentant  $1,2 \times 10^6$  équivalents de cellules). Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

### 3.1.5 Des kinases en amont du complexe IKK chez les neutrophiles humains

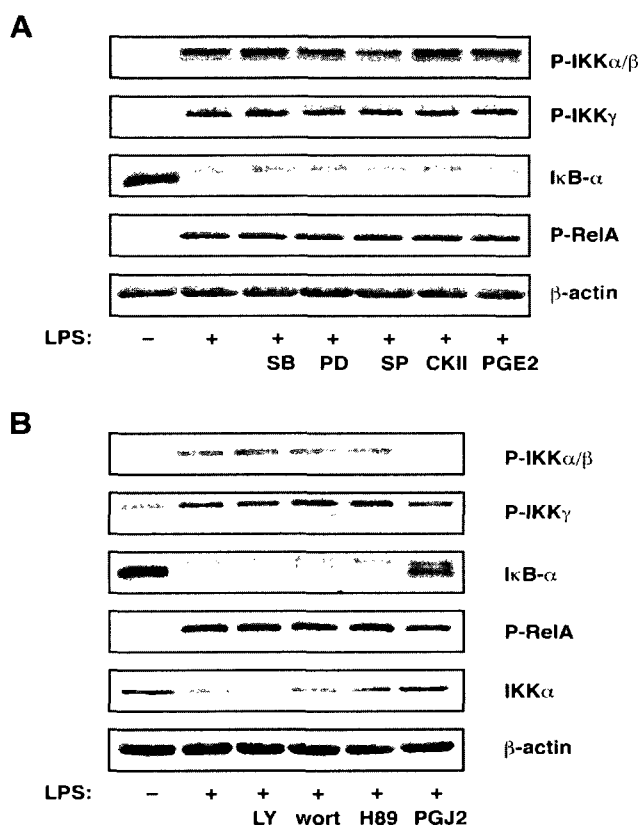
Il a été rapporté que les kinases NIK et TBK-1 (ou NAK) peuvent exercer leur activité en amont du complexe IKK (Malinin *et al.*, 1997; Woronicz *et al.*, 1997; Tojima *et al.*, 2000). Nous avons donc voulu déterminer si ces deux kinases sont exprimées dans les neutrophiles humains. À cet effet, des lysats de neutrophiles ont été analysés par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps anti-NIK et anti-TBK-1. En comparaison avec les PBMCs autologues, les neutrophiles expriment faiblement la kinase NIK mais beaucoup plus la kinase TBK-1 (Figure 3.1.8A). La kinase NIK se trouve strictement dans le noyau des neutrophiles au repos, alors que la TBK-1 est plutôt cytoplasmique (Figure 3.1.8B). Nous avons également constaté que la distribution cellulaire de ces deux kinases demeure inchangée suite à la stimulation des neutrophiles avec le LPS ou le TNF- $\alpha$  (Figure 3.1.8B, et résultats non montrés). Afin de dévoiler l'identité d'autre(s) kinase (s) ou voie(s) de signalisation impliquée(s) dans l'activation du complexe IKK, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques ont été utilisés. Les neutrophiles ont été prétraités avec des inhibiteurs de p38 MAPK (SB 203580), de MEK/ERK (PD 98059), de JNK (SP-600125), de caséine kinase II (CKII), de PI3K (LY 294202 ou Wortmanin), de PKA (H89), ou avec des prostaglandines contenant un groupement cyclopentenone étant connus pour inhiber l'activité de IKK (15-désoxy-PGJ<sub>2</sub>), avant la stimulation avec le LPS ou le TNF- $\alpha$  pendant 15 min. Les lysats totaux par cavitation à l'azote ont été ensuite analysés par immunobuvardage de type Western. Dans la figure 3.1.9 pour les cellules traitées avec le LPS, aucun inhibiteur, sauf la 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub>, n'a altéré significativement le niveau de phosphorylation des diverses

sous-unité de IKK, de RelA, ou de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . En effet, la 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub> (à la différence de PGE<sub>2</sub>) empêche en grande partie la phosphorylation de IKK $\beta$  et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , alors que la phosphorylation de RelA et de IKK $\gamma$  est légèrement affectée (Figure 3.1.9 et données non montrées). Fait intéressant, nous avons également constaté que la 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub> a considérablement entravé la perte inductible d'IKK $\alpha$  (Figure 3.1.9B), indiquant un rôle de l'activation de IKK $\beta$  dans ce processus. Des résultats presque identiques ont été obtenus quand les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été examinées, ou lorsque le TNF $\alpha$  a été utilisé à la place de LPS (données non présentées). Cet effet de la 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub> est en accord avec sa capacité à inactiver l'activité de IKK $\beta$  par une modification directe de la cystéine 179 de IKK $\beta$  (Rossi *et al.*, 2000). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Ward *et al.*, (2002) montrant que la 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub> empêche la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  chez les neutrophiles humains.



**Figure 3.1.8 Expression des kinases en amont du complexe IKK chez les neutrophiles humains au repos et activés.**

**A**, les neutrophiles fraîchement isolés (deux différents donneurs) et les PBMCs autologues ont été lysés par la méthode de cavitation à l'azote et les cavitats ( $0,75 \times 10^6$  équivalents de cellules) ont été analysés par immunobuvardage de type western. **B**, les neutrophiles ont été stimulés jusqu'à 60 min avec le LPS (100 ng/ml) et ensuite été lysés par la méthode de cavitation à l'azote. Les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été analysées par immunobuvardage de type western (16  $\mu$ g/piste pour les fractions du cytoplasme, ce qui représente  $0,5 \times 10^6$  équivalents de cellules, et 24  $\mu$ g/piste pour les fractions nucléaires, représentant  $1 \times 10^6$  équivalents de cellules). Les résultats sont représentatifs de trois expériences.



**Figure 3.1.9 Effet des inhibiteurs de différentes voies de signalisation sur l'activation d'IKK et sur la phosphorylation de RelA chez les neutrophiles humains.**

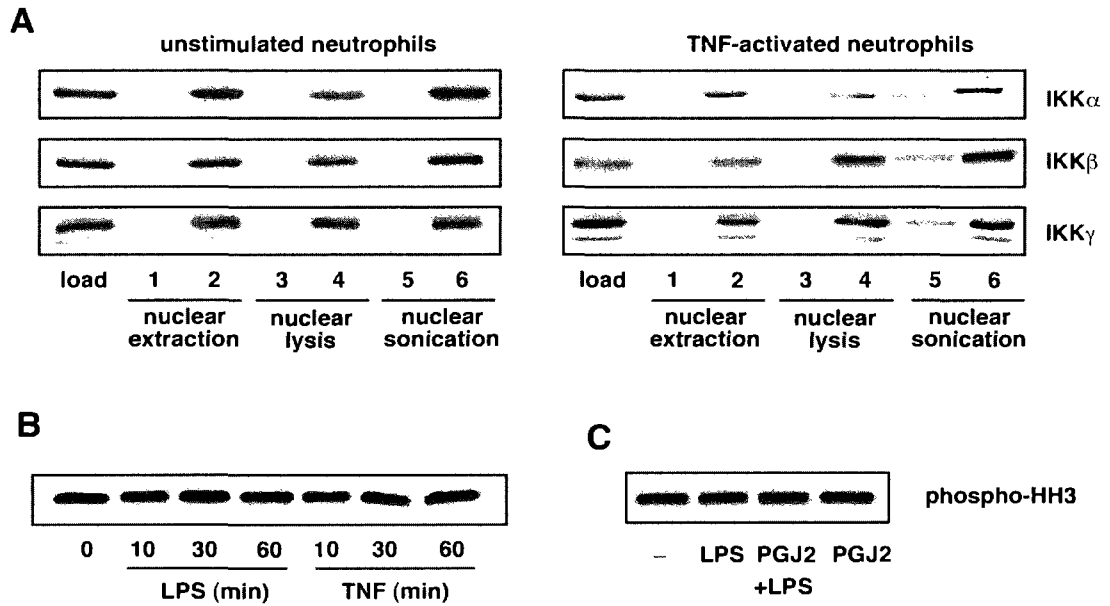
Les neutrophiles ont été prétraités pendant 60 min avec 3  $\mu$ M de SB 203580 (SB, un inhibiteur de p38 MAPK), 20  $\mu$ M de PD 98059 (PD, un inhibiteur de MEK), 20  $\mu$ M de SP-600125 (SP, un inhibiteur de JNK), 15  $\mu$ M de 6-dichloro-1- $\alpha$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (CKII, un inhibiteur de la caséine kinase II), 25  $\mu$ M de PGE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), avec des inhibiteurs de PI3K (20  $\mu$ M de LY-294202 ou 200 nM de wortmannin; LY et wort), avec 20  $\mu$ M de H89 (un inhibiteur de PKA) et, finalement, avec 30  $\mu$ M de 15-deoxy-PGJ<sub>2</sub> (PGJ<sub>2</sub>, un inhibiteur de IKK $\beta$ ), avant la stimulation avec le LPS (100 ng/ml) pour 15 min. Les cellules ont ensuite été lysées par la méthode de cavitation à l'azote et les cavitats ont été analysés par immunobuvardage de type western (25  $\mu$ g/piste, représentant 0,4 x 10<sup>6</sup> équivalents de cellules). Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

### **3.1.6 Association à la chromatine des isoformes du complexe IKK dans les neutrophiles activés**

Certaines évidences révèlent que diverses sous-unités du complexe IKK, en plus d'exercer des activités dans le cytoplasme, peuvent migrer dans le noyau et s'associer à la chromatine pour réguler de nombreux aspects de l'expression de gènes qui sont dépendants ou indépendants du NF- $\kappa$ B (Birbach *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003; Anest *et al.*, 2003; Massa *et al.*, 2005). Puisque les neutrophiles expriment constitutivement ces protéines dans le noyau, nous avons cherché à savoir si les sous-unités du complexe IKK pouvaient s'associer de façon basale ou inductible à la chromatine dans ces cellules. À cette fin, des fractions nucléaires de neutrophiles stimulés ou au repos ont été traitées de différentes façons. Pour déterminer si les sous-unités du complexe IKK se lient à la chromatine, de la même façon que les protéines NF- $\kappa$ B/Rel, les noyaux des neutrophiles ont été extraits (dans un tampon contenant 400 mM NaCl) dans le but d'obtenir les mêmes extraits nucléaires que ceux qui sont généralement utilisés pour les analyses EMSA. En parallèle, les noyaux des neutrophiles ont été délibérément lysés dans un tampon à haute concentration de sel (800 mM NaCl) afin de vérifier si l'efficacité d'extraction des IKKs pouvait être améliorée par une haute concentration du sel. Dans une démarche plus agressive, les noyaux des neutrophiles ont été lysés par sonication, une procédure étant connue pour cisailer la chromatine et pour désorganiser les membranes nucléaires, et utilisée par Anest *et al.*, (2003) pour mettre en évidence l'association d'IKKs avec la chromatine. Tel que montré à la figure 3.1.10A, seule cette dernière procédure a permis une dissociation partielle de protéines du



complexe IKK à partir de noyaux isolés des neutrophiles; fait important encore, cela ne s'est produit que dans des cellules stimulées. Ces résultats constituent donc une preuve indirecte de l'association inductible du complexe IKK avec la chromatine dans les neutrophiles activés. Puisqu'il a été montré que IKK $\alpha$  pouvait phosphoryler la protéine histone H3 sur la sérine 10 (Anest *et al.*, 2003), nous avons cherché à définir si l'inhibition de l'activité d'IKK par la 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub> affecterait la phosphorylation d'histone H3. De façon inattendue, nous avons constaté que la protéine histone H3 était fortement phosphorylée dans les neutrophiles au repos, et que cette phosphorylation n'était pas significativement modulable par la stimulation des neutrophiles avec le LPS ou le TNF- $\alpha$ , même jusqu'à 60 min d'incubation (Figure 3.1.10B). De la même façon, la 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub> n'a pas eu d'effet sur la phosphorylation constitutive d'histone H3 dans les neutrophiles activés ou au repos (Figure 3.1.10C). Bien que ces résultats n'excluent pas un rôle nucléaire pour des complexes IKKs liés à la chromatine dans les neutrophiles humains, ils indiquent que la protéine histone H3 n'est probablement pas une cible du complexe IKK activé dans ces cellules.



**Figure 3.1.10 Association à la chromatine des isoformes du complexe IKK dans les neutrophiles humains activés.**

A, les neutrophiles ont été incubés en absence ou en présence du TNF- $\alpha$  (100 U/ml) pendant 15 min et ont été lysés par une méthode de cavitation à l'azote. Les fractions nucléaires ont été traitées de trois façons différentes. Certains noyaux ont été soumis à l'extraction comme dans un protocole de EMSA (c'est-à-dire, 400 mM NaCl pendant 20 min sur la glace, avant la centrifugation à grande vitesse; extraction nucléaire), produisant des extraits nucléaires (piste 1) ou des noyaux résiduels (post-extraction) (piste 2). Certains noyaux ont été plutôt délibérément lysés (lyse nucléaire) par l'incubation dans 800 mM NaCl pendant 20 min avant la centrifugation, produisant les lysats nucléaires (piste 3) et les culots correspondants (piste 4). D'autre part, certains noyaux ont été lysés par sonication (sonication nucléaire) avant la centrifugation à grande vitesse, produisant des « nuclear sonicates » (piste 5) et des culots correspondants (piste 6). Toutes ces fractions ont ensuite été analysées par

immunobuvardage de type western ( $1,5 \times 10^6$  équivalents de cellules/piste). **B**, les neutrophiles ont été stimulés avec le LPS (100 ng/ml) ou le TNF- $\alpha$  (100 U/ml) pour différents temps et ensuite été lysés par une méthode de cavitation à l'azote. Les cavitats ( $0,6 \times 10^6$  équivalents de cellules) ont été analysés par immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps anti-phospho-histone H3 (phospho-HH3). **C**, les neutrophiles ont été prétraités pendant 60 min en présence ou en absence de 30  $\mu$ M de 15-désoxy-PGJ<sub>2</sub> (PGJ<sub>2</sub>) avant d'être stimulés avec le LPS pour 15 min. Les cellules ont ensuite été lysés par la méthode de cavitation à l'azote et les fractions nucléaires ont été analysées par immunobuvardage de type western ( $0,4 \times 10^6$  équivalents de cellules) en utilisant un anticorps anti-phospho-histone H3. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

## **CHAPITRE III- RÉSULTATS**

### **SECTION 2**

#### **IMPLICATION DE LA KINASE TAK1 DANS L'ACTIVATION DU COMPLEXE IKK CHEZ LES NEUTROPHILES HUMAINS**

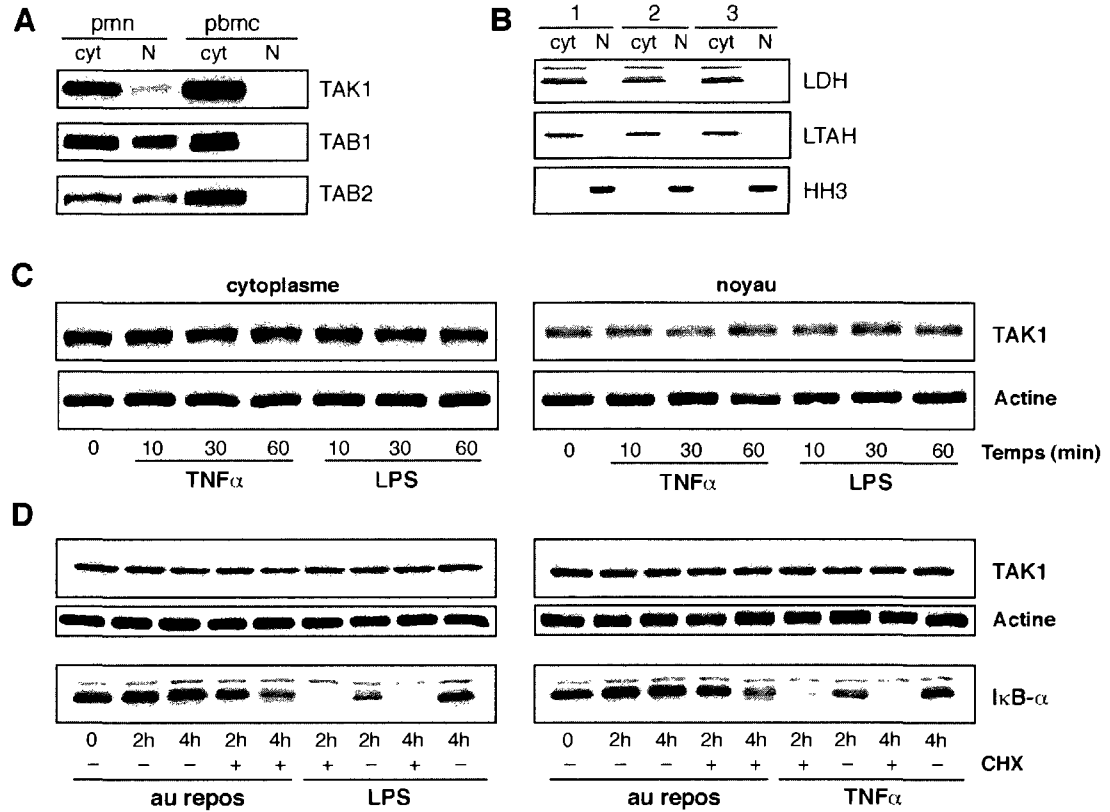
Cette section présente nos travaux portant sur le rôle de la protéine kinase TAK1 dans l'activation cytoplasmique et nucléaire du complexe IKK et du NF- $\kappa$ B, et dans les réponses cellulaires (comme la production de certaines cytokines et chimiokines) en réponse au TNF $\alpha$  ou au LPS.

### **3.2.1 Expression et distribution de la kinase TAK1 et de ses protéines associées (TAB1 et TAB2) chez les neutrophiles humains**

Plusieurs MAP3Ks jouent un rôle de premier plan dans l'activation de NF- $\kappa$ B (Ghosh et Karin, 2002; Bonnizi et Karin, 2004). Parmi celles-ci, la kinase TAK1, en concert avec TAB1 et TAB2, s'est révélée la plus prometteuse dans l'activation du complexe IKK chez la plupart des cellules autres que les neutrophiles humains (Sakurai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Takaesu *et al.*, 2003). Nos résultats précédents (voir section 1) ont montré que les trois principales sous-unités formant le complexe IKK (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , et IKK $\gamma$ ) sont distribuées dans les compartiments cytoplasmiques et nucléaires des neutrophiles humains. Cela nous a incité à déterminer si la kinase TAK1 et les protéines associées à celle-ci, TAB1 et TAB2, sont exprimées dans les neutrophiles et à trouver leur localisation cellulaire. À cet effet, des fractions cytoplasmiques et nucléaires de neutrophiles au repos ont été analysées par immunobuvardage de type western. Nous avons constaté que la kinase TAK1 et les protéines TAB1 et TAB2 se localisaient à la fois dans le cytoplasme et le noyau dans les neutrophiles humains, alors qu'elles étaient strictement cytoplasmiques dans les PBMC (Figure 3.2.1A). La pureté de nos fractions subcellulaires (Figure 3.2.1B) a été vérifiée par la présence de marqueurs nucléaires et cytoplasmiques, tel que nous l'avons décrit précédemment.

La stimulation des neutrophiles par le TNF- $\alpha$  ou le LPS n'a pas d'incidence sur la compartimentalisation de la kinase TAK1 (Figure 3.2.1C). De façon semblable, le

niveau d'expression de TAK1 n'est pas affecté par un traitement à la cycloheximide, et ce aussi bien dans des cellules au repos que celles activées (Figure 3.2.1D). Ce résultat nous donne une indication de la longue demi-vie de cette kinase. Par comparaison, la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ , tel que précédemment observé, a été rapidement dégradée dans les cellules au repos lorsque la synthèse des protéines est bloquée, et sa synthèse *de novo* suite à une stimulation avec le TNF- $\alpha$  ou le LPS a également été bloquée par la cycloheximide (Figure 3.2.1D). Ainsi, le cycle de vie d'I $\kappa$ B $\alpha$  est rapide, alors que le niveau d'expression de TAK1 est très stable.



**Figure 3.2.1 Expression, distribution et stabilité de la kinase TAK1 et des protéines TAB1 et TAB2 chez les neutrophiles humains et les PBMC.**

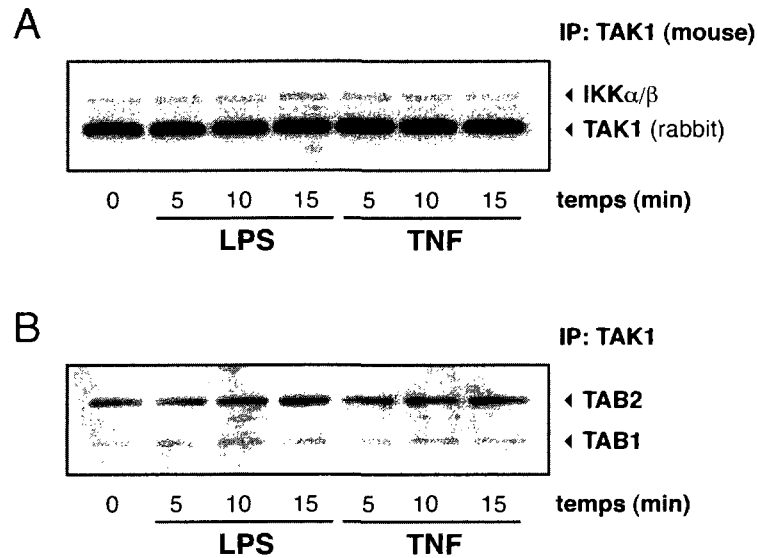
**A**, les neutrophiles (PMN) et les PBMC autologues ont été lysés par cavitation à l'azote, et les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été analysées par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques contre la TAK1, la TAB1 et la TAB2 (un volume équivalent à  $0,5 \times 10^6$  cellules a été chargé par piste sur le gel). **B**, les fractions subcellulaires des neutrophiles de trois différents donneurs ont été analysées par immunobuvardage de type western pour la présence de marqueurs cytoplasmiques, la lactate déshydrogénase (LDH) et la leucotriène A<sub>4</sub> hydrolase (LTAH), ou de marqueurs nucléaires, la protéine histone H3 (HH3). **C**, les neutrophiles ont été stimulés avec le TNF- $\alpha$  (100 U/ml) ou le LPS (100 ng/ml) pour les différents temps, et les fractions subcellulaires ont été analysées par immunobuvardage de type western pour la

présence de TAK1. **D**, les cellules ont été prétraitées pendant 30 min en absence ou en présence de 20 µg/ml de cycloheximide (CHX) avant la stimulation avec le LPS (100 ng/ml) ou le TNF-α (100 U/ml) pour les différents temps indiqués. Les cavités ont été ensuite analysés par immunobuvardage de type western pour la présence de TAK1 et d'IκB-α. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.



### **3.2.2 Association de la kinase TAK1 avec les protéines TAB1 et TAB2 ou avec les kinases IKK $\alpha/\beta$ chez les neutrophiles humains**

Il a été montré que la kinase TAK1 peut interagir avec les protéines TAB1 et TAB2 ou avec le complexe kinase IKK $\alpha/\beta$  dans des systèmes de leur surexpression ou suite à une stimulation des cellules par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$  (Shibuya *et al.*, 1996; Takaesu *et al.*, 2000; Sakurai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Takaesu *et al.*, 2003). Pour déterminer si ces phénomènes se produisent également dans les neutrophiles humains, ces derniers ont été stimulés avec le TNF- $\alpha$  ou le LPS pour divers intervalles de temps et les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps murin anti-TAK1. Le complexe immunoprécipité a été ensuite analysé par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps de lapin anti-TAB1, anti-TAB2, anti-IKK $\alpha/\beta$ , ou anti-TAK1 (en prenant un anticorps différent de celui utilisé pour l'immunoprécipitation). Tel que montré à la figure 3.2.2, la kinase TAK1 est associée de façon constitutive aux protéines TAB1 et TAB2, ainsi qu'au complexe IKK $\alpha/\beta$  dans les neutrophiles au repos. Cette interaction demeure inchangée suite au traitement des neutrophiles avec le TNF- $\alpha$  ou le LPS (Figure 3.2.2). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps IKK $\alpha/\beta$  et révélés avec un anti-TAK1 (données non présentées). Ceci suggère que dans les neutrophiles humains, il n'est pas nécessaire d'avoir un recrutement inductible de la kinase TAK1 à un complexe multimérique contenant les sous-unités IKK $\alpha/\beta$  et/ou les isoformes TAB1 et TAB2 pour l'activation de NF- $\kappa$ B, contrairement à ce qui est observé pour d'autres types cellulaires (Sakurai *et al.*, 1999).



**Figure 3.2.2 Association de TAK1 avec TAB1, TAB2, et IKK $\alpha/\beta$  dans les neutrophiles humains.**

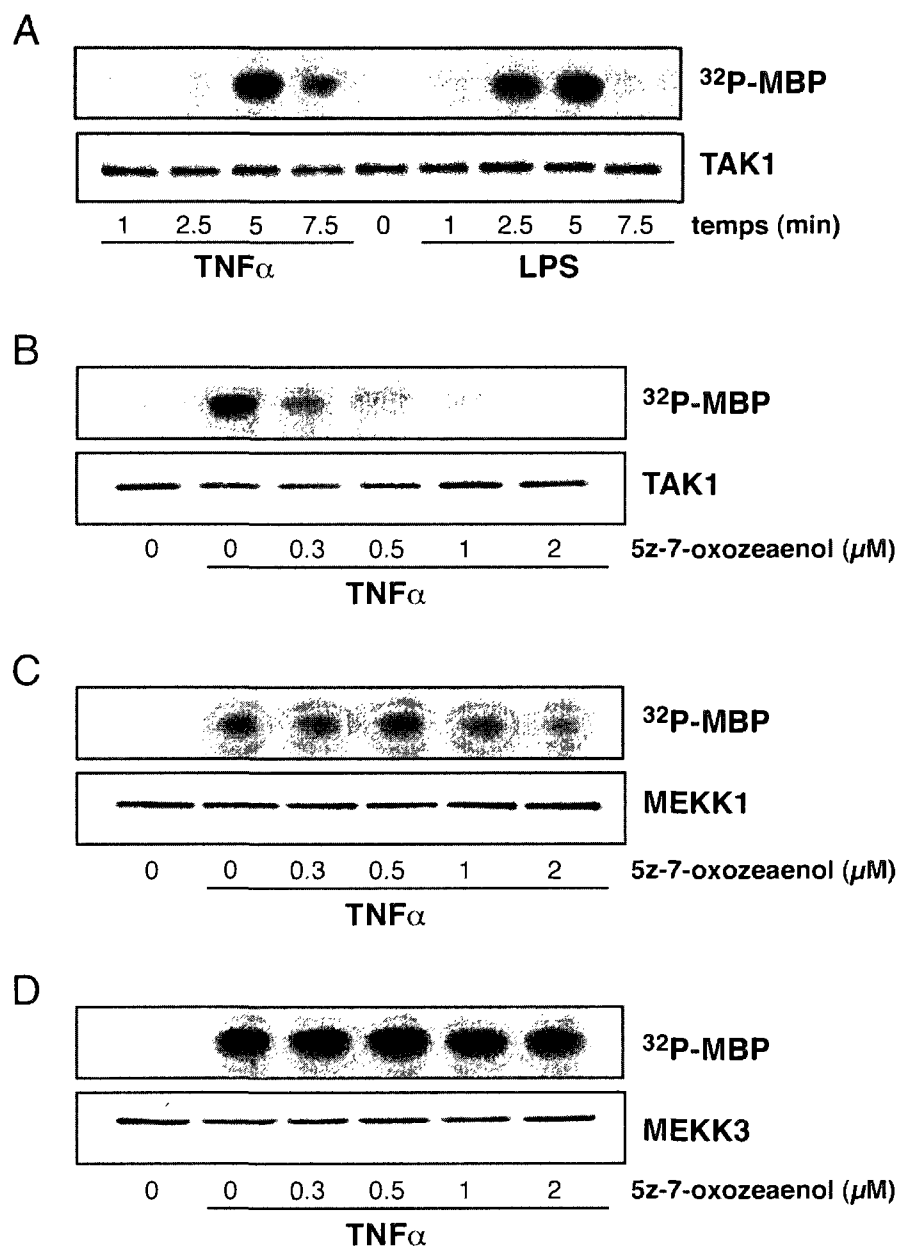
**A**, les cellules ont été stimulées à l'aide de LPS (100 ng/ml) ou de TNF- $\alpha$  (100 U/ml) pour les temps indiqués. Les lysats correspondants ont été ensuite immunoprécipités avec un anticorps murin anti-TAK1, et les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps de lapin anti-IKK $\alpha/\beta$ . La membrane a été ensuite réhybridée avec un anticorps de lapin anti-TAK1 pour vérifier la quantité de protéines chargées sur le gel. **B**, les mêmes produits d'immunoprécipitation ont été analysés par immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps de lapin anti-TAB1, et la membrane a été ensuite réhybridée avec un anticorps de chèvre anti-TAB2. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

### 3.2.3 Activation et inhibition de la kinase TAK1 chez les neutrophiles humains

Nous avons ensuite cherché à savoir si la kinase TAK1 est activée suite à la stimulation des neutrophiles. À cette fin, des neutrophiles ont été stimulés à l'aide de TNF- $\alpha$  ou de LPS pour divers courts intervalles de temps pour tenir compte de la cinétique rapide d'activation des MAP3Ks (Avdi *et al.*, 1996 et 1997). Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-TAK1, et l'activité de la kinase TAK1 a été déterminée par un essai de kinase en utilisant la protéine MBP comme substrat. Nous avons observé que le niveau de phosphorylation de la protéine MBP par la TAK1 immunoprécipitée était fortement augmenté suite à une stimulation avec le TNF- $\alpha$  ou le LPS (Figure 3.2.3A). L'activation de la kinase TAK1 était rapide et transitoire : un sommet en 5 min et une diminution rapide par la suite. Ainsi, la TAK1 est activée avec une cinétique rapide dans les neutrophiles humains.

Pour définir le rôle de l'activation de TAK1 dans les processus de signalisation en aval, nous avons cherché à inhiber son activité kinase. À cet égard, le 5z-7-oxozeaenol a été rapporté comme étant un inhibiteur hautement sélectif de la kinase TAK1, dans la mesure où il bloque l'activité de TAK1 sans avoir d'incidences significatives sur les activités d'autres MAP3Ks comme MEKK1 ou ASK-1 (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 2003). Afin de déterminer la concentration de 5z-7-oxozeaenol nécessaire pour inhiber efficacement l'activité kinase de TAK1 dans les neutrophiles humains, les cellules ont été préincubées pendant 30 min avec des concentrations croissantes de 5z-7-oxozeaenol avant la stimulation avec le TNF- $\alpha$ . Les lysats cellulaires ont été

immunoprécipités avec des anticorps reconnaissant la kinase TAK1 ou d'autres MAP3Ks, soit MEKK1 et MEKK3. L'activité des kinases fut déterminée par des essais kinase *in vitro*. Comme le montre la figure 3.2.3B, l'activité kinase de TAK1 induite par le TNF- $\alpha$  a été progressivement atténuée par l'augmentation des concentrations de l'inhibiteur de TAK1, une inhibition quasi complète étant obtenue en utilisant 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeaenol. En revanche, cet inhibiteur (que ce soit à 1  $\mu$ M ou des concentrations plus élevées) n'a pas affecté l'activité des kinases MEKK1 ou MEKK3 dans les neutrophiles humains (Figures 3.2.3C et 3.2.3D). Des résultats semblables ont été obtenus lorsque les neutrophiles ont été stimulés avec le LPS au lieu du TNF- $\alpha$  (données non présentées). Ces résultats montrent donc que le 5z-7-oxozeaenol inhibe la kinase TAK1 d'une manière hautement sélective dans les neutrophiles humains.



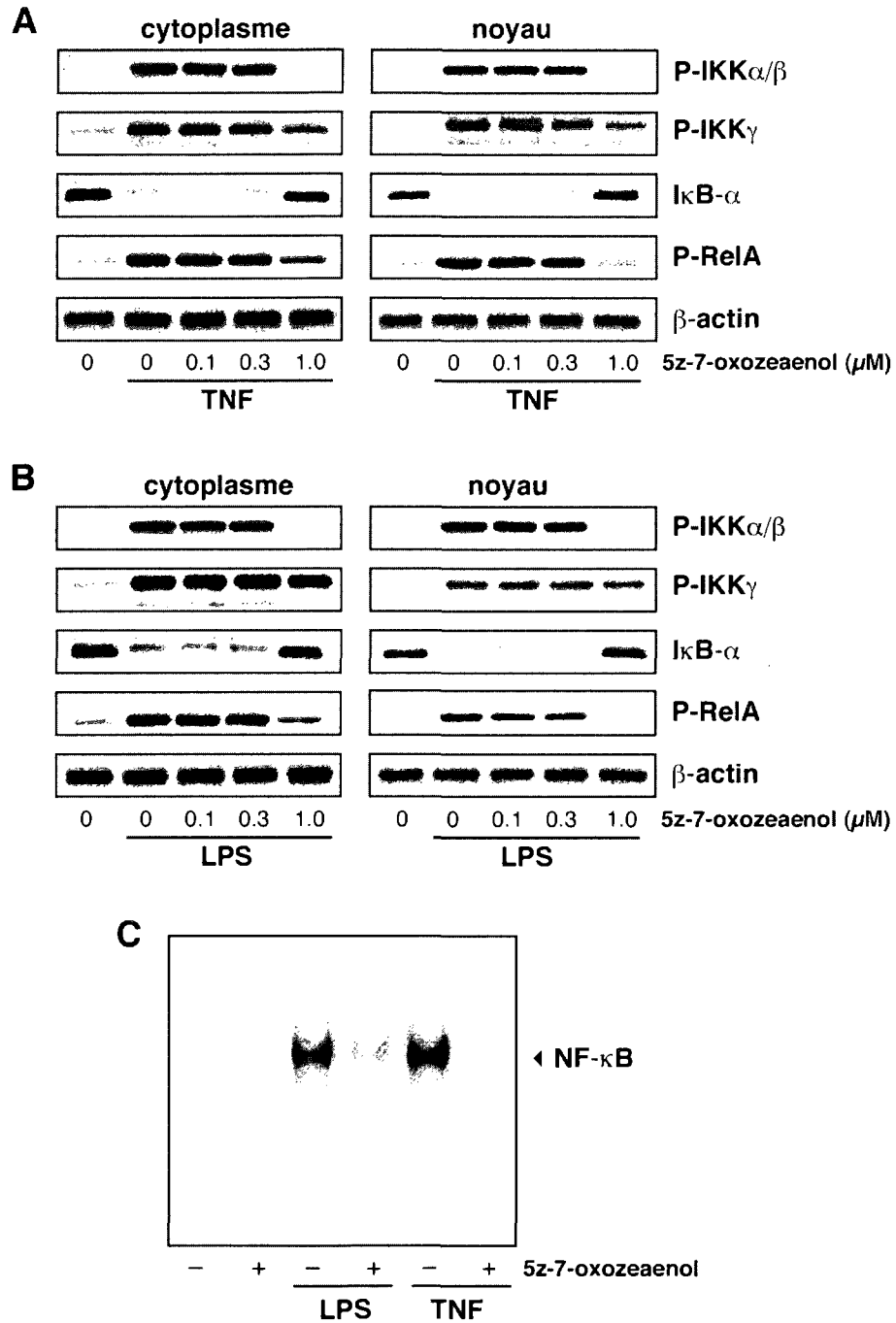
**Figure 3.2.3** Activation inductible de TAK1 et spécificité de l'inhibiteur de TAK1, 5z-7-oxozeaenol, chez les neutrophiles humains.

A, les neutrophiles ont été stimulés à l'aide de TNF- $\alpha$  (100 U/ml) ou de LPS (100 ng/ml) pour les temps indiqués. Les cellules ont été lysées et la TAK1 a été

immunoprécipitée à partir du lysat. Les produits d'immunoprécipitation ont été divisés en deux parties : une partie a immédiatement été analysée par des essais kinase de TAK1 en utilisant la MBP comme substrat; et, la deuxième partie a été analysée par immunobuvardage de type western pour détecter TAK1. **B-D**, les neutrophiles ont été prétraités pendant 45 min avec des concentrations croissantes de 5z-7-oxozeaenol (inhibiteur de TAK1) avant la stimulation avec le TNF- $\alpha$  (100 U/ml) pendant 5 min. Les cellules ont été lysées et TAK1 (panneau **B**), MEKK1 (panneau **C**), ou MEKK3 (panneau **D**) ont été immunoprécipitées. Les produits d'immunoprécipitation ont été divisés en deux parts, qui ont été analysés soit par des essais kinase pour TAK1 en utilisant la MBP comme substrat, ou analysés par immunobuvardage de type western pour détecter la présence de TAK1, MEEK1, ou MEKK3. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

### 3.2.4 Impact de la kinase TAK1 sur la cascade d'activation IKK/NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles humains

Nous avons montré dans la section 1 que la phosphorylation des isoformes de IKK ( $\alpha/\beta/\gamma$ ) induite par le TNF- $\alpha$  ou le LPS se produisait à la fois dans le cytoplasme et le noyau des neutrophiles humains. Cependant, les kinases en amont de l'activation d'IKK demeurent inconnues. Pour déterminer si la TAK1 pourrait être une IKK kinase, les neutrophiles ont été prétraités avec le 5z-7-oxozeaenol avant la stimulation par le TNF- $\alpha$  ou le LPS. Tel qu'illustré aux figures 3.2.4A et 3.2.4B, 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeaenol a presque complètement bloqué la phosphorylation de IKK $\alpha/\beta$  et de RelA, et a prévenu la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les fractions cytoplasmique et nucléaire. De façon semblable, l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$  ou le LPS est presque complètement abolie par 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeaenol (Figure 3.2.4C). En revanche, la même concentration de 5z-7-oxozeaenol n'a pas eu d'effet sur la phosphorylation d'IKK $\gamma$  induite par le LPS (Figure 3.2.4B) et a à peine réduit le niveau de phosphorylation d'IKK $\gamma$  induite par le TNF- $\alpha$  (Figure 3.2.4A). Ces résultats suggèrent fortement que, dans les neutrophiles humains, la kinase TAK1 est un facteur de régulation clé en amont de la plupart des événements d'activation associés à la cascade de signalisation IKK cytoplasmique et nucléaire. De plus, ces résultats nous montrent que la kinase TAK1 participe activement à la phosphorylation et à la liaison à l'ADN du facteur NF- $\kappa$ B.



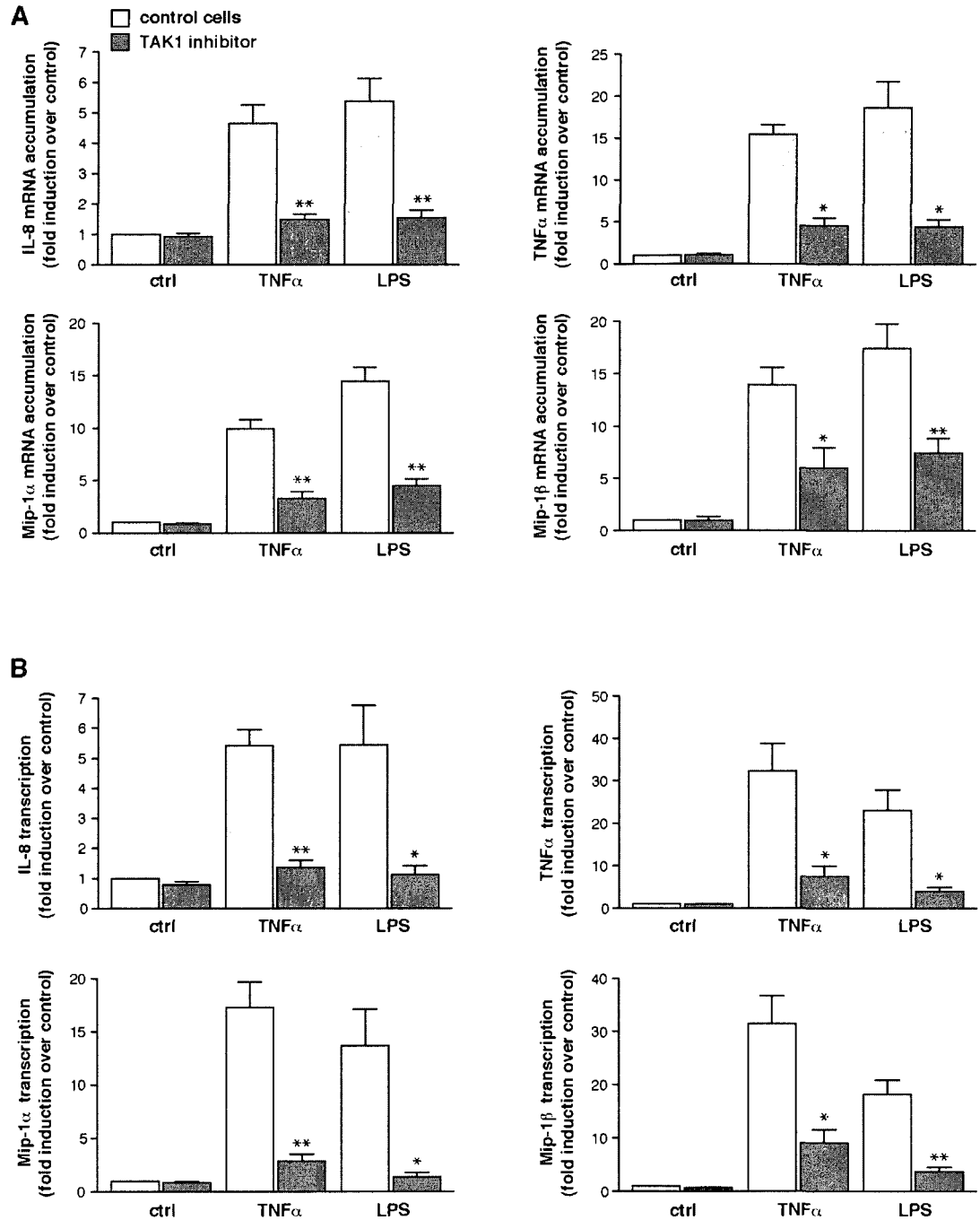
**Figure 3.2.4** Impact de l'inhibition de la kinase TAK1 sur la cascade d'activation IKK/NF- $\kappa$ B dans les neutrophiles humains.



(**A, B**) les neutrophiles ont été prétraités pendant 45 min avec le 5z-7-oxozeaenol, un inhibiteur de TAK1, avant la stimulation des neutrophiles par 100 U/ml de TNF- $\alpha$  (**A**) ou 100 ng/ml de LPS (**B**). Les fractions cytoplasmiques et nucléaires ont été utilisées pour l'analyse par immunobuvardage de type western des différents composants de la cascade de signalisation IKK/NF- $\kappa$ B. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle de protéines chargées sur gel. (**C**) Les cellules ont été prétraitées pendant 45 min avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeaenol avant la stimulation par le TNF- $\alpha$  (100 U/ml) ou le LPS (100 ng/ml) pendant 15 min. Les extraits nucléaires ont ensuite été préparés et analysés par EMSA en utilisant un oligonucléotide contenant la séquence consensus NF- $\kappa$ B. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

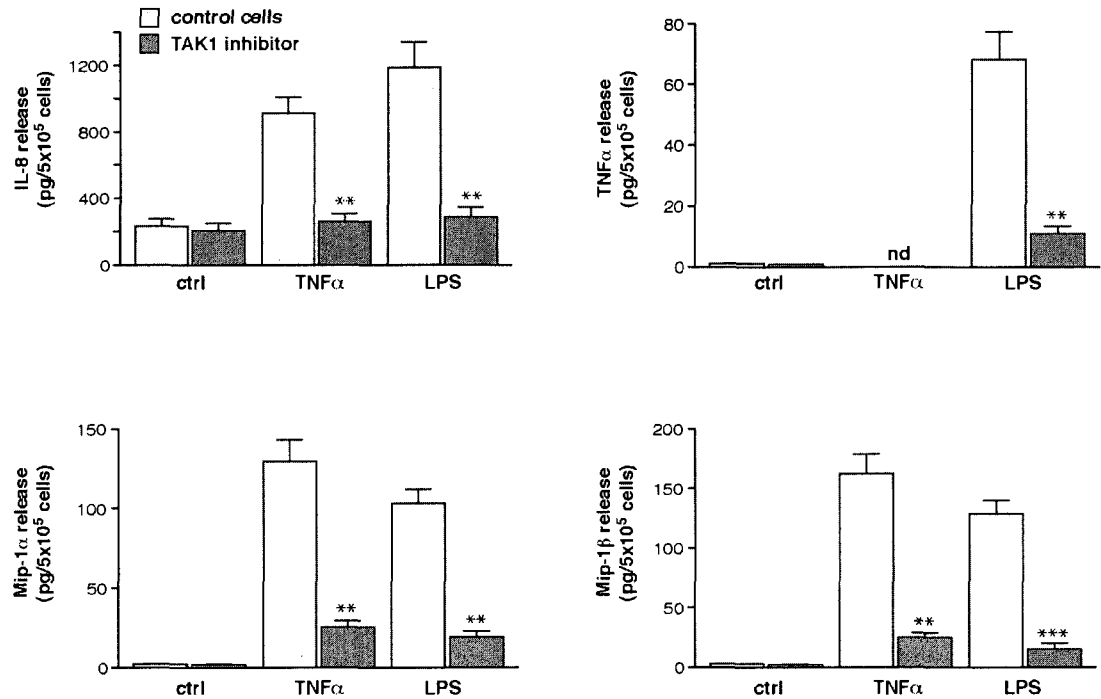
### **3.2.5 Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur l'expression et la sécrétion de certaines cytokines et chimiokines chez les neutrophiles humains.**

Nous avons montré dans la section 1 que plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoires générées par les neutrophiles sont sous le contrôle de NF- $\kappa$ B. Nous avons donc voulu déterminer la conséquence fonctionnelle de l'inhibition de TAK1 sur la capacité des neutrophiles à produire ces médiateurs inflammatoires. À cette fin, les cellules ont été prétraitées avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeaenol avant une stimulation par le TNF- $\alpha$  ou le LPS. Comme précédemment, l'expression des ARNm et la sécrétion de cytokines et de chimiokines a été analysée par PCR en temps réel et par ELISA. Comme le montre la figure 3.2.5A, l'inhibition de TAK1 a fortement réprimé l'expression de l'ARNm de l'IL-8, du TNF- $\alpha$ , du MIP-1 $\alpha$  et du MIP-1 $\beta$ ). Nous avons également mesuré par PT-PCR que l'inhibition de TAK1 a exercé un effet comparable sur la transcription inductible de ces mêmes gènes dans les neutrophiles humains (Figure 3.2.5B). Ces résultats nous indiquent que l'effet du 5z-7-oxozeaenol sur le niveau d'expression d'ARNm reflète principalement une inhibition transcriptionnelle. En accord avec ces résultats, la sécrétion de ces cytokines et chimiokines a également été profondément diminuée dans les neutrophiles prétraités avec cet inhibiteur (Figure 3.2.6). Ainsi, la kinase TAK1 apparaît comme une molécule de signalisation cruciale pour la production de plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoires dans les neutrophiles activés par des agonistes physiologiques.



**Figure 3.2.5** Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur la transcription et l'expression des gènes dépendants de NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles humains.

**A**, les neutrophiles ( $40 \times 10^6$  cellules/condition) ont été prétraités pendant 45 min avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeaenol, avant d'être stimulés ou non à l'aide de TNF $\alpha$  (100 U/ml) ou de LPS (100 ng/ml) pendant 60 min. L'ARN total a été extrait, transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par réaction de transcription inverse et analysé pour l'expression des gènes par PCR en temps réel. Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'ARN 18S ribosomal et ont été représentées par un index de stimulation (fold increase) qui est relatif aux cellules au repos. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences réalisées en duplicata. **B**, l'ADNc des expériences ci-hauts (**3.2.5A**) a été analysés par « real-time primary transcript (PT)-PCR », i.e., en utilisant des amorces qui amplifient des séquences non transcrites localisées dans le premier intron d'un gène, ce qui permet de mesurer l'activité transcriptionnelle. Les valeurs ont été normalisées pour l'ARN 18S ribosomal, et ont été représentées par un index de stimulation (fold increase) relatifs aux cellules au repos. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test t non-pairé (\* =  $p < 0.05$  par rapport au stimulus; \*\* =  $p < 0.01$  par rapport au stimulus).



**Figure 3.2.6 Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur la sécrétion de cytokines inflammatoires chez les neutrophiles humains.**

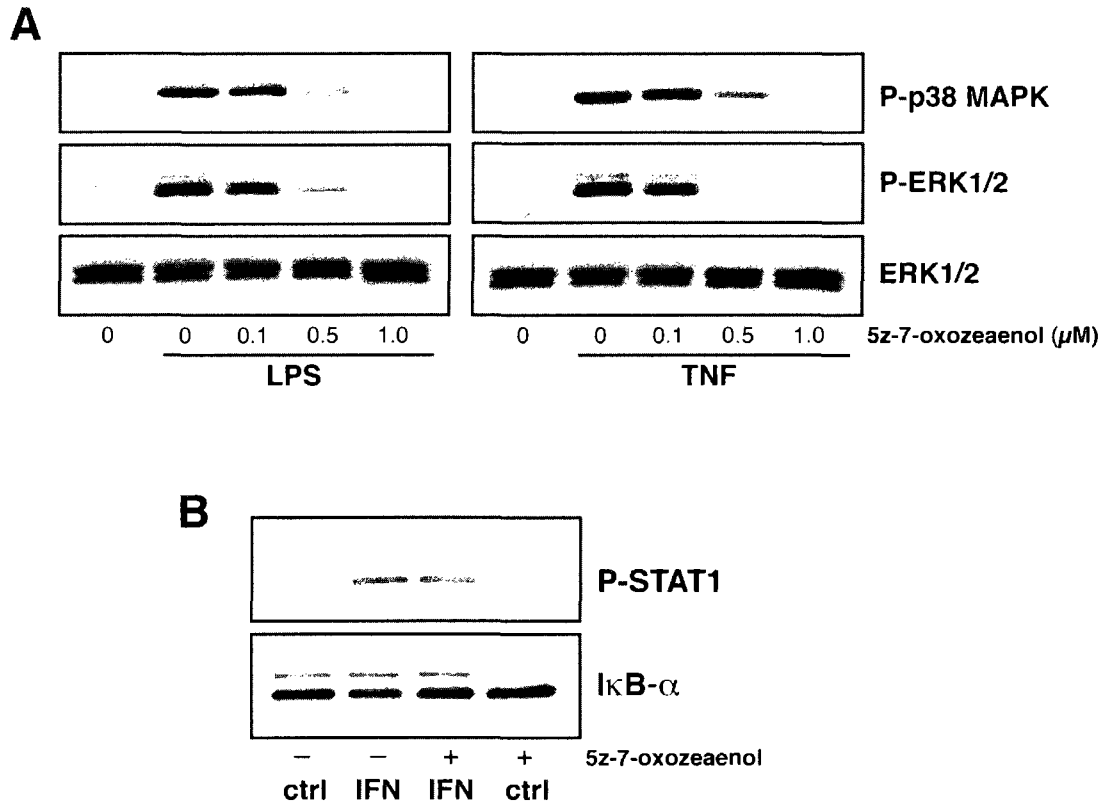
Les neutrophiles ont été prétraités pendant 45 min avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeaenol, un inhibiteur de TAK1, avant une stimulation à l'aide de TNF $\alpha$  (100 U/ml) ou de LPS (100 ng/ml) pendant 5 h. Les surnageants ont ensuite été recueillis et analysés par ELISA. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences réalisées en duplicata. nd, non déterminé. La signification statistique a été déterminée par un test t non-pairé (\*\* = p < 0.01 par rapport au stimulus; \*\*\* = p < 0.001 par rapport au stimulus).

### **3.2.6 Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur d'autres cascades de signalisation chez les neutrophiles humains.**

Des études de notre laboratoire (Cloutier *et al.*, 2007) et d'autres (Zu *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 1999) ont montré la participation des voies p38 MAPK et MEK/ERK, mais pas JNK (Cloutier *et al.*, 2003), dans la production de certaines cytokines proinflammatoires par les neutrophiles activés. Puisqu'il a été rapporté que la kinase TAK1 peut agir en amont des MAP kinases p38 et ERK1/2, ainsi que JNK, dans certains types cellulaires (Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1997 et 1998; Sato *et al.*, 2005), nous avons voulu examiner si l'inhibition de TAK1 pouvait avoir une incidence sur la phosphorylation de p38 MAPK et de ERKs. A cet effet, les neutrophiles ont été prétraités pendant 30 min avec des concentrations croissantes d'inhibiteur de TAK1 avant une stimulation par le TNF- $\alpha$  ou le LPS. L'état de phosphorylation de p38 et de ERK1/2 a été analysé par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques contre les formes phosphorylées de ces kinases. Tel que montré à la figure 3.2.7A, le prétraitement des cellules avec le 5z-7-oxozeaenol a empêché la phosphorylation de la p38 MAPK et des ERKs induites par le TNF- $\alpha$  ou le LPS. Ainsi, la kinase TAK1 agit également en amont de ces deux voies de signalisation dans les neutrophiles humains.

Nous avons enfin étudié l'effet de l'inhibition de TAK1 sur la signalisation induite par l'IFN $\gamma$ , puisque ce dernier est requis comme un co-stimulus pour la production de certaines cytokines dépendantes du NF- $\kappa$ B, comme le CXCL9/MIG, le

CXCL10/IP-10, le CXCL11/I-TAC et l'IL-12 (Cassatella *et al.*, 1995; Cassatella *et al.*, 1997; Gasperini *et al.*, 1999). A cette fin, nous avons examiné la phosphorylation inducible du facteur de transcription STAT1, qui survient en réponse à l'IFN $\gamma$  dans les neutrophiles (Bovolenta *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1998). Comme le montre la figure 3.2.7B, l'inhibition de TAK1 n'a eu aucun effet sur la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN $\gamma$ , ce qui est en accord avec le fait que l'IFN $\gamma$  n'a pas été rapporté pour induire une signalisation via la kinase TAK1. Dans ces mêmes expériences, le niveau d'expression d'I $\kappa$ B $\alpha$  n'a pas été affecté par l'inhibiteur de TAK1 ou par le traitement avec l'IFN $\gamma$ . Ces derniers résultats sont en accord avec le fait que l'IFN $\gamma$  n'induit pas l'activation du NF- $\kappa$ B ou la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  chez les neutrophiles humains (McDonald *et al.*, 1997; Tamassia *et al.*, 2007). Collectivement, ces résultats montrent une implication sélective de la kinase TAK1 dans différentes voies de signalisation mobilisées dans les neutrophiles activés.



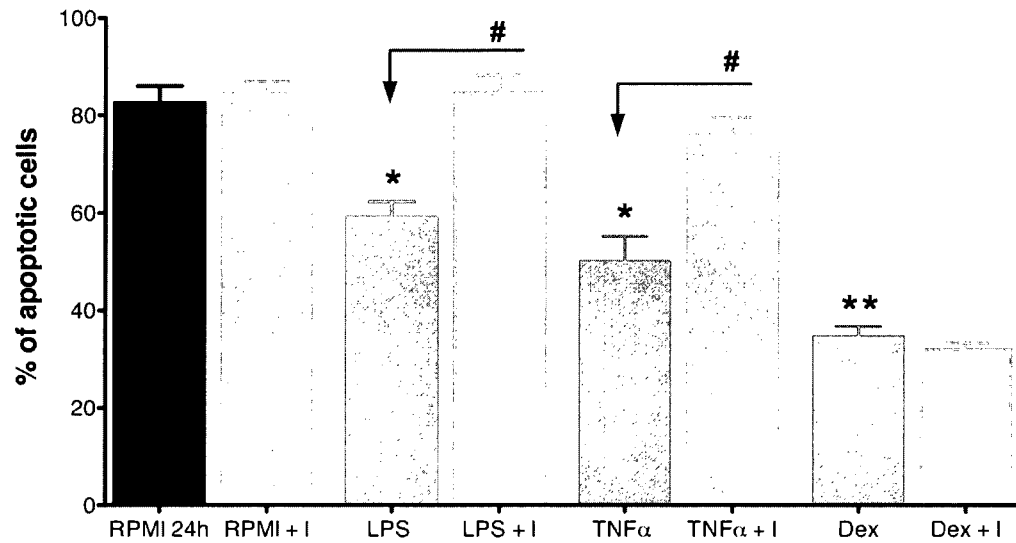
**Figure 3.2.7 Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur d'autres cascades de signalisation chez les neutrophiles humains.**

**A**, les neutrophiles ont été prétraités pendant 45 min avec le 5z-7-oxozeaenol avant d'être stimulés par le TNF $\alpha$  (100 U/ml) ou le LPS (100 ng/ml) pendant 15 min. Les échantillons cellulaires totaux (whole-cell samples) ont été analysés par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps anti-phospho-p38 MAPK, anti-phospho-ERK1/2 ou anti-ERK1/2 (comme contrôle de chargement). **B**, les cellules ont été prétraitées pendant 45 min en absence ou en présence de 1  $\mu$ M 5z-7-oxozeaenol, avant une stimulation par l'IFN $\gamma$  (100 U/ml) pendant 15 min. Les échantillons cellulaires totaux ont été analysés par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps anti-phospho-STAT1 ou anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ . Les résultats sont représentatifs de trois expériences.



### **3.2.7 Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur le retardement de l'apoptose chez les neutrophiles humains.**

Les neutrophiles entrent en apoptose de façon spontanée après quelques heures de culture. Ce phénomène peut cependant être retardé par une exposition à plusieurs stimuli. Une stimulation par le LPS et le TNF- $\alpha$  retarde ce phénomène d'apoptose et est associé à la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B, ainsi qu'aux voies p38 MAPK et ERK (Dunican *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2003; François *et al.*, 2005; Avdi *et al.*, 2002; Sabroe *et al.*, 2003; Kilpatrick *et al.*, 2006). Puisque nos résultats montrent que la kinase TAK1 agit en amont de ces trois voies de signalisation dans les neutrophiles, nous avons examiné si l'inhibition de TAK1 pouvait interférer avec la survie des neutrophiles en réponse au LPS ou au TNF- $\alpha$ . Comme contrôle, nous avons également examiné l'effet anti-apoptotique de la dexaméthasone, un stimulus qui n'emprunte pas les voies NF- $\kappa$ B, p38 MAPK, ou ERK (Pétrin, 2004; Pétrin *et al.*, 2006; Saffar *et al.*, 2008). Tel que montré à la figure 3.2.8, l'apoptose constitutive des neutrophiles n'a pas été affectée par la présence de 5 $\alpha$ -7-oxozeaenol dans le milieu de culture, montrant que cet inhibiteur n'accélère pas l'apoptose par lui-même. Par contre, l'inhibition de TAK1 a renversé l'effet anti-apoptotique du LPS ou du TNF- $\alpha$ , mais n'a eu aucune incidence sur la survie favorisée par la dexaméthasone. Ainsi, la kinase TAK1 semble être un intermédiaire essentiel régulant la modulation de l'apoptose des neutrophiles humains en réponse à des stimuli utilisant les cascades de signalisation du NF- $\kappa$ B et/ou des MAPKs.



**Figure 3.2.8 Effet de l'inhibition de la kinase TAK1 sur le retardement de l'apoptose des neutrophiles humains induite par le LPS ou le TNF- $\alpha$ .**

Les neutrophiles ont été prétraités pendant 45 min avec 1  $\mu$ M de 5z-7-oxozeaenol, un inhibiteur de TAK1 (I), avant une incubation pendant 24 h en absence ou en présence de 100 ng/ml de LPS, de 100 U/ml de TNF- $\alpha$  ou de 100 nM de dexaméthasone (Dex). La liaison de l'annexine V aux phosphatidylsérines a été analysée conjointement à l'intercalation d'iodure de propidium à l'ADN afin de déterminer les niveaux d'apoptose. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test t non-pairé (\* =  $p < 0.05$  par rapport au contrôle non stimulé; \*\* =  $p < 0.01$  par rapport au contrôle non stimulé; # =  $p < 0.05$  par rapport au stimulus).

## CHAPITRE III- RÉSULTATS

### SECTION 3

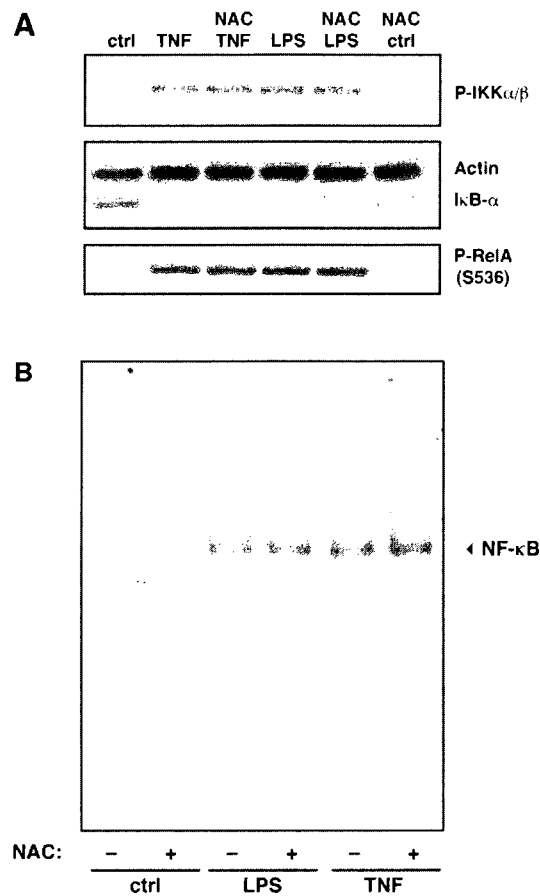
#### **L'ACTIVITÉ INDUCTIBLE DU NF- $\kappa$ B N'EST PAS MODULABLE PAR LES ROS ENDOGÈNES CHEZ LES NEUTROPHILES HUMAINS.**

Cette section présente nos travaux sur l'activation inductible du NF- $\kappa$ B et les réponses dépendantes du NF- $\kappa$ B (comme l'activation transcriptionnelle des gènes dépendants du NF- $\kappa$ B) qui ne sont pas modulées par des ROS endogènes, que ce soit chez les neutrophiles humains ou chez les cellules PLB-985 différenciées en granulocytes.

### 3.3.1 Effet des ROS endogènes sur la cascade d'activation IKK/I $\kappa$ B chez les neutrophiles humains

Les ROS endogènes sont connus pour leur implication dans la régulation de l'activation de NF- $\kappa$ B dans plusieurs types cellulaires (Arrigo, 1999; Janssen-Heininger *et al.*, 2000). Cependant, dans les neutrophiles, la modulation de l'activation de NF- $\kappa$ B par les ROS endogènes demeure incertaine et ce malgré le fait que les neutrophiles produisent probablement plus de ROS que n'importe quel autre type cellulaire (Vollebregt *et al.*, 1998; Pietarinen-Runtti *et al.*, 2000; Strassheim *et al.*, 2004). Nous avons donc voulu clarifier cette problématique. À cette fin, nous avons prétraité les neutrophiles avec la N-acétyl-cystéine, un puissant antioxydant, avant une stimulation par le LPS ou le TNF- $\alpha$ . Nous avons ensuite analysé les événements de l'activation de la cascade IKK/I $\kappa$ B. Comme montré dans la figure 3.3.1A, la pré-incubation des neutrophiles avec la N-acétyl-cystéine n'a pas affecté le niveau de phosphorylation inductible de IKK $\alpha/\beta$  et de RelA, ou la dégradation inductible d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Il n'est pas surprenant de constater que la capacité de liaison du NF- $\kappa$ B à l'ADN demeure inchangée dans ces conditions (Figure 3.3.1B).

Puisque les neutrophiles primaires sont résistants à la transfection, il nous est impossible d'entreprendre des études de promoteurs utilisant de différents mutants de protéines ou de kinases. Nous avons donc utilisé une lignée cellulaire de type neutrophilique, les PLB-985, afin de pouvoir valider l'absence d'une modulation de l'activation du NF- $\kappa$ B par les ROS endogènes.

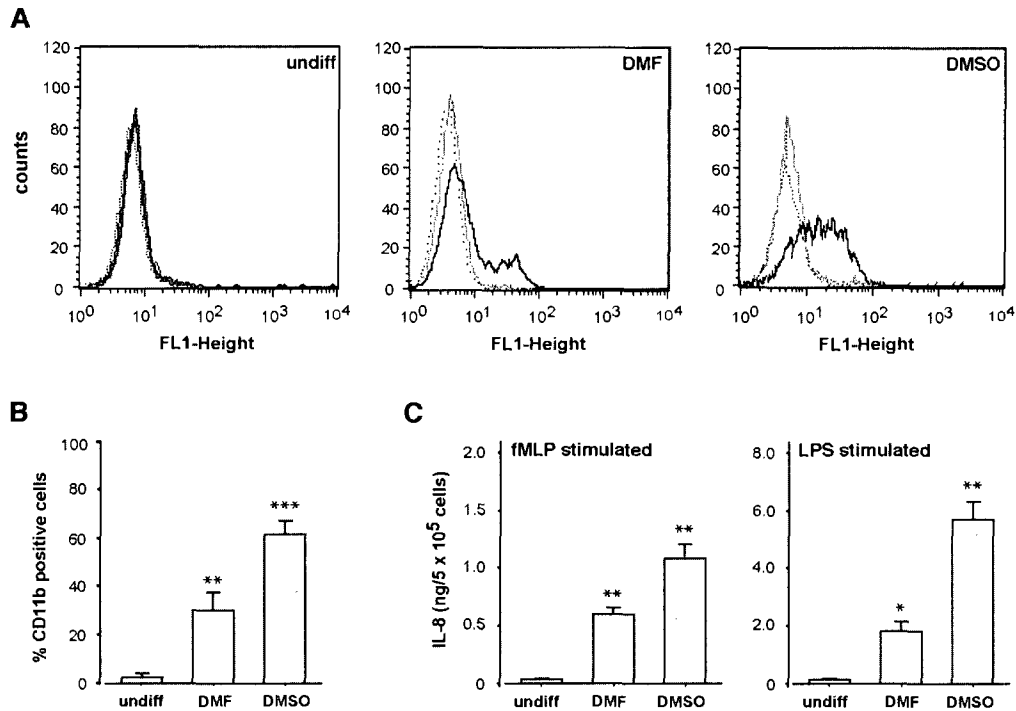


**Figure 3.3.1 Effet de la N-acétyl-cystéine sur la cascade d'activation IKK/IκB/NF-κB chez les neutrophiles humains.**

**A**, les neutrophiles ont été prétraités avec 20 mM de N-acétyl-cystéine (NAC) ou son diluant pendant 30 min à 37°C et ensuite incubés en absence (ctrl) ou en présence de TNF-α (100 U/ml) ou de LPS (100 ng/ml). Les échantillons ont été analysés par immunobuvardage de type western. L'actine et l'IκB-α sont montrées sur la même membrane puisque la membrane a d'abord été hybridée avec un anticorps anti-IκB-α et ensuite réhybridée avec un anticorps anti-actine. **B**, les neutrophiles ont été prétraités tel que décrit ci-haut. Les extraits nucléaires ont ensuite été préparés et analysés par EMSA en utilisant un oligonucléotide contenant la séquence consensus NF-κB. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

### 3.3.2 Caractéristiques des cellules PLB-985 non-différenciées et différenciées

Les cellules PLB-985 sont des cellules promyélocytaires qui peuvent être différenciées en cellules ressemblant phénotypiquement et fonctionnellement aux neutrophiles par l'apport d'un ou plusieurs agents de différenciation dans le milieu de culture (Tucker *et al.*, 1987). Bien que le DMF et le DMSO aient été rapportés comme étant des agents de différenciation granulocytaire (Tucker *et al.*, 1987; Shen *et al.*, 1994; Monczak *et al.*, 1997; Lowenthal et Levy, 1999; Pessach et Levy, 2000; Pedruzzi *et al.*, 2002), nous avons constaté que le DMSO était un meilleur agent de différenciation si on se fie à l'expression du marqueur de surface CD11b, et à sa capacité de production de certaines cytokines et chimiokines, comme l'IL-8, en réponses au LPS et au fMLP (Figure 3.3.2 et données non présentées). Ceci est en accord avec l'observation selon laquelle la différenciation granulocytaire est en corrélation avec l'apparition des récepteurs de surface CD14 et de fMLP (Pedruzzi *et al.*, 2002; Liberty *et al.*, 2004). Ceci indique aussi que le traitement avec le DMSO mène à une différenciation plus complète des cellules PLB-985 en phénotype neutrophilique « neutrophil-like ». En conséquence, nous avons utilisé le DMSO comme un agent de différenciation dans toutes les expériences ultérieures.



**Figure 3.3.2** Caractéristiques des cellules PLB-985 non-différenciées et différenciées.

**A**, les cellules PLB-985 ont été différenciées pendant 5 jours en présence de DMF ou de DMSO, ou laissées non-différenciées. Les cellules sont alors marquées à l'aide d'un anticorps anti-CD11b (ligne noire), un isotype contrôle (ligne grise), et sans anticorps primaire (ligne pointillée) avant l'incubation avec un anticorps secondaire conjugué à la FITC. L'expression de CD11b à la surface cellulaire a ensuite été déterminée par une analyse de cytofluorimètre (cytofluorimètre FACScan). Un minimum de 10 000 cellules a été analysé pour chaque expérience et les résultats sont représentatifs de cinq expériences. **B**, les résultats obtenus ci-haut ont été compilés et exprimés selon la moyenne de cinq expériences  $\pm$  SEM. **C**, les cellules PLB-985 ont été différenciées pendant 5 jours en présence de DMF ou de DMSO, ou laissées non-différenciées, avant la stimulation pendant 6 h à 37°C avec le fMLP (30 nM) ou le LPS (100 ng/ml). Les surnageants ont ensuite été recueillis et analysés par ELISA. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de six expériences indépendantes réalisées en duplicata. La signification statistique a été déterminée par un test t non-pairé (\* =  $p < 0.05$  par rapport aux cellules non-différenciées; \*\* =  $p < 0.01$  par rapport aux cellules non-différenciées; \*\*\* =  $p < 0.001$  par rapport aux cellules non-différenciées).

### **3.3.3 Effet des ROS endogènes sur l'activation inductible de NF- $\kappa$ B dans les cellules PLB-985 de type neutrophilique**

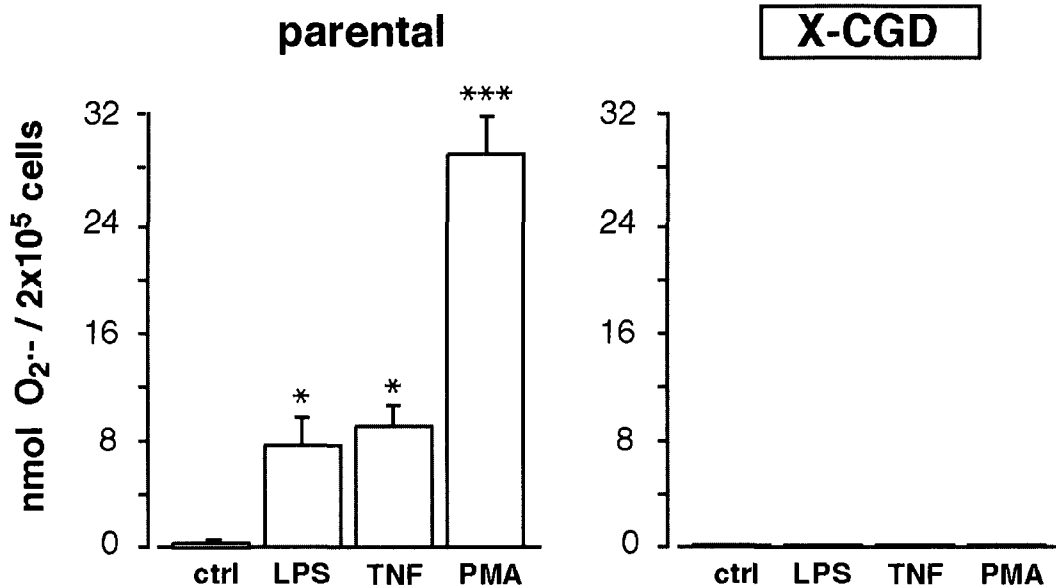
Étant donné que les anti-oxydants ajoutés de façon exogène n'ont pas d'effets sur la cascade d'activation du NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles primaires, nous avons utilisé des cellules X-CGD/PLB-985 où la NADPH oxydase est inactive en raison d'une perturbation ciblée d'un élément clé de la NADPH, le gp91phox (Zhen *et al.*, 1993). En conséquence les cellules X-CGD/PLB-985 ne devraient pas produire des ROS.

Afin de nous assurer que les cellules X-CGD/PLB-985 sont différentes de la lignée parentale (PLB-985) en terme d'une production des ROS, nous avons mesuré la production de superoxide chez ces cellules après leur différenciation. En effet, la figure 3.3.3 montre que les cellules PLB-985 granulocytaires parentales répondent au TNF- $\alpha$ , au LPS, ou à l'activateur plus classique de NADPH oxydase (comme le PMA) en sécrétant plus de superoxide, alors que les cellules granulocytaires X-CGD/PLB-985 n'ont plus la capacité d'en produire. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes (Hiraoka *et al.*, 1998; Zhen *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1999).

Nous avons ensuite examiné l'effet du LPS et du TNF- $\alpha$  sur l'activation du NF- $\kappa$ B dans les cellules X-CGD/PLB-985 différenciées. Comme nous pouvons le voir à la figure 3.3.4, le NF- $\kappa$ B conserve sa capacité à lier à l'ADN en réponse au LPS ou au TNF- $\alpha$  dans les cellules X-CGD/PLB-985 différenciées, à un niveau comparable aux

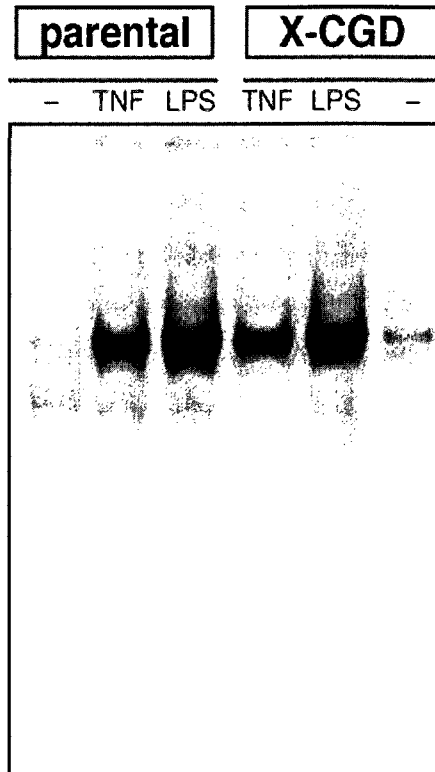


cellules PLB-985 de type sauvage. Ainsi, l'activation du NF- $\kappa$ B ne semble pas être influencée par des ROS endogènes dans les granulocytes humains.



**Figure 3.3.3 Production de superoxide par les cellules PLB-985 parentales et les cellules X-CGD PLB-985.**

Les cellules PLB-985 parentales différenciées (panneau gauche) et les cellules PLB-985 X-CGD différenciées (déficientes en p91phox) (panneau droit) ont été incubées pendant 30 min en présence ou en absence du LPS (100 ng/ml), du TNF- $\alpha$  (100 U/ml) ou du PMA (25 nM) avant la mesure de la production de superoxide par un essai de réduction de cytochrome c. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences. La signification statistique a été déterminée par un test t non-pairé (\* =  $p < 0.05$  par rapport au contrôle non stimulé; \*\*\* =  $p < 0.001$  par rapport au contrôle non stimulé).



**Figure 3.3.4** Effet des ROS endogènes sur la capacité de liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN dans les cellules PLB-985 de type neutrophilique.

Les cellules PLB-985 parentales différenciées (panneau gauche) et les cellules X-CGD/PLB-985 différenciées (déficientes en p91phox) (panneau droit) ont été incubées pendant 15 min en absence (-) ou en présence (+) de LPS (100 ng/ml) ou de TNF- $\alpha$  (100 U/ml). Les extraits nucléaires ont ensuite été préparés et analysés par EMSA en utilisant un oligonucléotide contenant la séquence consensus NF- $\kappa$ B. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

### 3.3.4 Effet des ROS endogènes sur l'activation inductible des gènes rapporteurs sous le contrôle du NF- $\kappa$ B chez les cellules PLB-985 de type neutrophilique

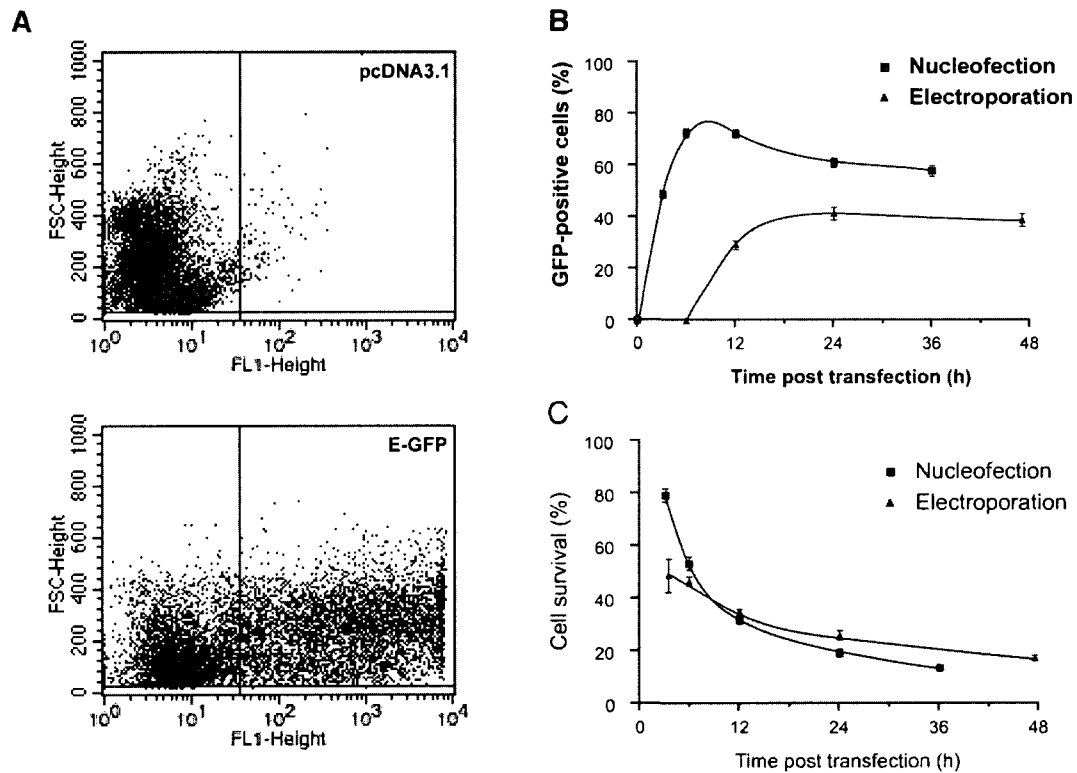
Plusieurs études ont montré qu'il était possible de transférer de façon transitoire les cellules PLB-985 par électroporation. Cependant, l'efficacité de transfection est faible et le taux de mortalité très élevé (Dana *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2000). Étant donné qu'une autre technique de transfection, la nucléofection (Amaya Biosystems, Köln, Germany), a été rapportée comme étant efficace pour une majorité de types cellulaires, nous avons donc comparé ces deux techniques de transfection afin de déterminer quelle méthode est la plus efficace pour transférer les cellules PLB-985 différenciées. À cet égard, les cellules ont été électroporées ou nucléofectées avec le vecteur pcDNA3.1 contenant le gène de la GFP (pcDNA3.1/GFP) ou avec le vecteur vide (pcDNA3.1). Le pourcentage de cellules fluorescentes a été déterminé par cytofluorimétrie, tandis que le nombre des cellules survivantes (relativement au nombre de cellules utilisées au départ pour la transfection) a été déterminé par comptage au bleu de Trypan. Nous avons observé que la nucléofection était meilleure que l'électroporation à plusieurs égards. Tel que montré à la figure 3.3.5A, les cellules PLB-985 différenciées et nucléofectées avec le vecteur pcDNA3.1/GFP ont une fluorescence très augmentée par rapport aux cellules nucléofectées avec le vecteur vide (pcDNA3.1). Dans 8 expériences indépendantes, l'efficacité de transfection était de  $73 \pm 4\%$  6 h après la nucléofection, qui s'est avéré le meilleur temps (Figure 3.3.5B). Par comparaison, l'électroporation avec ce même vecteur dans les cellules PLB-985 différenciées a exigé beaucoup plus de temps pour atteindre une efficacité d'expression optimale ( $36 \pm 5\%$ ) qui était plus faible que celle

obtenue par nucleofection (Figure 3.3.5B). À l'instar de l'électroporation, la nucleofection est connue pour causer des dommages irréversibles aux cellules, et ce même dans des conditions optimales. La figure 3.3.5C montre que le taux de survie des cellules PLB-985 différenciées après la nucleofection était de  $56 \pm 6\%$  à 6 h ( $n = 8$ ) et diminuait progressivement à environ 20% après 24 h. Par comparaison, l'électroporation a entraîné un taux de mortalité initiale beaucoup plus élevé (Figure 3.3.5C). Ainsi, la nucleofection s'est avérée rapide, fiable, efficace, et relativement douce pour surexprimer une protéine d'intérêt dans cellules PLB-985 différenciées.

Puisque la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN ne semble pas être influencée par les ROS endogènes (Figure 3.3.4), nous avons cherché à savoir si l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B était affectée par les ROS endogènes. À cette fin, les cellules X-CGD/PLB-985 différenciées et les cellules parentales ont été nucléofectées avec des plasmides contenant un gène rapporteur luciférase sous le contrôle du NF- $\kappa$ B (pNF- $\kappa$ B-Luc) ou sous le contrôle du promoteur de l'IL-8 (pIL8-Luc) suivant une stimulation par le LPS ou le TNF- $\alpha$  pendant 6 heures. L'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B a par la suite été analysée par des essais luciférase. Comme montrée à la figure 3.3.6, chaque construction est activée à un niveau similaire, dans les X-CGD/PLB-985 différenciées comme dans les cellules parentales. Ainsi, l'activation du NF- $\kappa$ B et les réponses en aval ne semblent pas être sous le contrôle des ROS endogènes dans les granulocytes.

Collectivement, ces résultats établissent que l'activation du NF- $\kappa$ B et des réponses dépendantes de NF- $\kappa$ B (comme l'activation transcriptionnelle des gènes

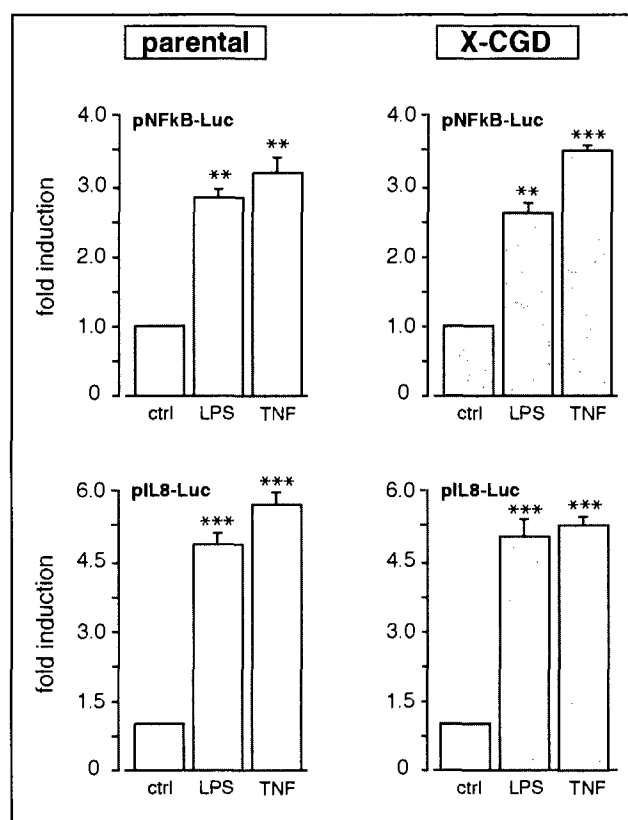
dépendants de NF- $\kappa$ B) sont indépendantes des ROS endogènes chez les neutrophiles humains.



**Figure 3.3.5 Surexpression de la protéine GFP dans les cellules PLB-985 de type neutrophilique.**

A, les cellules PLB-985 différenciées ont été nucleofectées avec le vecteur pcDNA3.1 contenant le gène de la GFP (pcDNA3.1/GFP) ou avec le vecteur vide (pcDNA3.1). Les cellules ont été récoltées 6 h après la transfection et ont été analysées par FACScan. Un minimum de 10 000 cellules a été analysé dans chaque expérience. Les résultats sont

représentatifs de huit expériences. **B**, les cellules PLB-985 différenciées ont été nucleofectées (carrée) ou électroporées (triangle) avec le vecteur pcDNA3.1/GFP et ensuite cultivées selon les temps indiqués. Le pourcentage des cellules transfectées a été déterminé par FACScan. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules fluorescentes et représentent la moyenne  $\pm$  SEM de cinq expériences. La signification statistique de chaque point a été déterminée par un test t non-pairé ( $p < 0.01$ ). **C**, les cellules PLB-985 différenciées ont été nucleofectées (carrée) ou électroporées (triangle) avec le vecteur pcDNA3.1/GFP et ensuite cultivées pendant les temps indiqués. Le décompte des cellules viables a été fait selon la méthode d'exclusion au bleu de Trypan. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules survivantes par rapport au nombre initial utilisé au départ pour la transfection et représentent la moyenne  $\pm$  SEM de quatre expériences. La signification statistique de chaque point a été déterminée par un test t non-pairé ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3.3.6** Effet des ROS endogènes sur l'activation de gènes rapporteurs sous le contrôle du NF- $\kappa$ B dans les cellules PLB-985 de type neutrophilique.

Les cellules PLB-985 parentales différenciées (panneau de gauche) et les cellules PLB-985 X-CGD différenciées, déficientes en p91phox, (panneau de droite) ont été nucléofectées avec des plasmides contenant un gène rapporteur luciférase sous le contrôle du NF- $\kappa$ B (pNF $\kappa$ B-Luc) ou sous le contrôle du promoteur de l'IL-8 (pIL-8-Luc). Après une incubation de 6 h en présence ou en absence de LPS (100 ng/ml) ou de TNF- $\alpha$  (100 U/ml), la capacité d'activation de NF- $\kappa$ B a été analysé par des essais luciférase. Les valeurs ont été représentées par un index de stimulation (fold increase) qui est relatif aux cellules au repos. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences. La signification statistique a été déterminée par un test t non-pairé (\*\* =  $p < 0.01$  par rapport au contrôle non stimulé; \*\*\* =  $p < 0.001$  par rapport au contrôle non stimulé).

## CHAPITRE IV- DISCUSSION

### 4.1 EXPRESSION ET ACTIVATION NUCLÉAIRE DU COMPLEXE IKK CHEZ LES NEUTROPHILES HUMAINS

Dans la présente étude, nous avons étudié les événements de signalisation en amont de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les neutrophiles humains. De plus, nous avons caractérisé le rôle du facteur NF- $\kappa$ B sur l'expression et la sécrétion d'IL-8, de TNF- $\alpha$ , de MIP-1 $\alpha$  et de MIP-1 $\beta$ . Les travaux antérieurs de notre laboratoire et d'autres ont montré qu'environ la moitié du contenu cellulaire des protéines p50, RelA, c-Rel, et I $\kappa$ B $\alpha$  est localisée dans le noyau des neutrophiles au repos (McDonald *et al.*, 1997; Vancurova *et al.*, 2001; et nos données non publiées). De plus, l'activation des neutrophiles entraîne une dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  à la fois dans le cytoplasme et le noyau (Vancurova *et al.*, 2001; et nos données non publiées). Nous rapportons maintenant que les neutrophiles constituent un exemple unique de cellule inflammatoire dans lequel les principaux événements liés à l'activation du NF- $\kappa$ B, à savoir, l'activation du complexe IKK, la phosphorylation et dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$ , et la phosphorylation de RelA, peuvent se produire dans le noyau en plus du cytoplasme. Une autre caractéristique intrigante des neutrophiles est que leur activation conduit à une disparition rapide et transitoire de la sous-unité IKK $\alpha$  dans ces deux compartiments cellulaires. Nous présentons également une preuve que les isoformes du complexe IKK nucléaire peuvent s'associer à la chromatine dans les neutrophiles activés. Enfin, nous rapportons que l'activation de NF- $\kappa$ B est un événement central dans l'expression basale et inductible de différentes



cytokines et chimiokines inflammatoires, tel que le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, le MIP-1 $\alpha$  et le MIP-1 $\beta$  chez les neutrophiles humains. Nos résultats dévoilent plusieurs facettes nouvelles et inattendues dans la voie de signalisation activant le NF- $\kappa$ B. Nos résultats montrent de nouvelles particularités de la signalisation de NF- $\kappa$ B ainsi que son impact dans la génération de cytokines et de chimiokines par les neutrophiles humains.

Bien que l'induction de l'expression de cytokines et de chimiokines inflammatoires suggère fortement la participation de NF- $\kappa$ B dans les neutrophiles, une telle démonstration n'était pas encore formellement rapportée dans la littérature. En outre, des études effectuées dans d'autres types cellulaires ont révélé que l'expression de certains gènes de cytokines inflammatoires requiert, en plus de la voie NF- $\kappa$ B, une participation coopérative avec d'autres facteurs de transcription (Yasumoto *et al.*, 1992; Mukaida *et al.*, 1994). En conséquence, l'étendue de la contribution du NF- $\kappa$ B sur la production de cytokines dans les neutrophiles avait aussi besoin d'une clarification. Pour aborder cette problématique, nous avons utilisé un certain nombre d'inhibiteurs de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B. Nous avons montré que le prétraitement de neutrophiles avec ces inhibiteurs du NF- $\kappa$ B bloque significativement l'induction de gènes précoces encodant pour le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, le MIP-1 $\alpha$ , et le MIP-1 $\beta$ , en empêchant non seulement leur expression mais également leur sécrétion. Ainsi, le NF- $\kappa$ B semble être un acteur clef dans l'expression et la sécrétion de certaines cytokines et chimiokines inflammatoires par les neutrophiles. Nos données sont en accord avec deux autres études effectuées dans les neutrophiles. Dans la première étude, la réticulation (« cross-linking ») des intégrines à la surface des neutrophiles stimule plusieurs réponses, dont

l'activation de NF- $\kappa$ B et la sécrétion du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ . Cette sécrétion est entravée dans des cellules prétraitées à l'aide d'inhibiteurs de NF- $\kappa$ B, dont le MG-132 et le SN50 (Kim *et al.*, 2004). Dans la seconde étude, un peptide de fusion fait d'une séquence de la protéine virale Tat et d'une séquence qui se lie à IKK $\gamma$ , empêchant ainsi son interaction avec IKK $\beta$ , a inhibé l'activation de NF- $\kappa$ B et l'expression du gène *I $\kappa$ B $\alpha$*  en réponse à une stimulation par le LPS. Une accélération de l'apoptose constitutive des neutrophiles fut alors observée (Choi *et al.*, 2003). Ainsi, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B apparaît comme un élément régulateur clé des réponses fonctionnelles et cellulaires des neutrophiles humains incluant la génération de cytokines inflammatoires et l'apoptose spontanée.

Malgré les nombreux aspects de l'activation du NF- $\kappa$ B dans les neutrophiles soient connus depuis les premières études de notre laboratoire sur ce sujet (McDonald et Cassatella, 1997; McDonald *et al.*, 1997 et 1998), la présente étude montre pour la première fois que la protéine RelA peut subir une phosphorylation inductible et que divers composants en amont d'*I $\kappa$ B $\alpha$* , dont les trois isoformes du complexe IKK, les kinases reliées à IKK (IKK $\epsilon$  et TBK-1) ainsi que la kinase NIK, sont exprimés dans ces cellules. De façon inattendue, l'activation des neutrophiles par des stimuli, comme le LPS ou le TNF- $\alpha$ , conduit à une perte transitoire d'IKK $\alpha$ , un phénomène qui, à notre connaissance sans précédent. La finalité de cette perte d'expression demeure à ce jour incertaine. Nous avons montré que la perte d'IKK $\alpha$  pouvait être en partie évitée par des inhibiteurs du protéasome, soulevant ainsi la possibilité que cette protéine soit une cible de la dégradation protéolytique. Que cette protéolyse ait eu lieu à la fois dans le

cytoplasme et le noyau est en accord avec la présence du protéasome dans ces deux compartiments (Low *et al.*, 2000; Bahrami *et al.*, 2002). Nous avons également constaté que l'inhibition d'IKK $\beta$ , par le PGJ<sub>2</sub>, a effectivement empêché la perte d'expression d'IKK $\alpha$  dans les neutrophiles activés. De plus, la baisse rapide du niveau d'expression d'IKK $\alpha$ , observée après la stimulation des neutrophiles, indique que le complexe IKK fonctionnel des neutrophiles est essentiellement être composé des sous-unités IKK $\beta$  et IKK $\gamma$ . Un tel scénario est en accord avec des données de la littérature. En effet, il fut rapporté que les sous-complexes IKK $\beta$ -IKK $\gamma$  endogènes existent dans le cytoplasme de la lignée monocyttaire humaine THP-1 et présentent une activité accrue suite à une stimulation de ces cellules par le TNF- $\alpha$  (Quirling *et al.*, 2004). De façon similaire, des études d'immunodéplétion ont montré la présence de complexes IKK $\beta$ -IKK $\gamma$  ayant été activés par la stimulation de cellules T humaines par un anti-CD3/CD28 (Khoshnan *et al.*, 1999).

L'activation des neutrophiles par le LPS et le TNF- $\alpha$  a entraîné une forte activation du complexe IKK, tel que déterminée par la phosphorylation de ses sous-unités et d'I $\kappa$ B $\alpha$ , son substrat prototypique. Une particularité de cette étude est l'absence de phosphorylation sur les sérines 176/180 (Figure 3.1.6) sur la sous-unité IKK $\alpha$ . Nous avons également noté une absence de phosphorylation sur la thréonine 23 (résultats non montrés). À cet égard, la baisse du niveau d'expression d'IKK $\alpha$  qui se produit suite à la stimulation des neutrophiles pourrait être l'une des raisons de l'absence de phosphorylation détectable d'IKK $\alpha$ . Quoiqu'il en soit, la perte d'expression d'IKK $\alpha$  et l'absence de phosphorylation suggère que la kinase IKK $\alpha$  contribue peu aux réponses

suscitées par les stimuli classiques des neutrophiles. Cependant, il ne peut être exclu que la kinase IKK $\alpha$  puisse être phosphorylée dans certaines conditions particulières. En revanche, la stimulation des neutrophiles a induit une phosphorylation de IKK $\beta$  sur les sérines 177 et/ou 181, et de IKK $\gamma$  sur la sérine 376. Ces résultats sont cohérents avec le fait que la phosphorylation d'IKK $\beta$  permet à cette kinase de phosphoryler ces substrats tels que I $\kappa$ B $\alpha$  et RelA. De la même façon, les études réalisées à l'aide de mutants de délétion de IKK $\gamma$  ont montré que la partie C-terminale de la protéine, c'est-à-dire, la région qui est phosphorylée dans nos expériences, est nécessaire à l'activation du complexe IKK via les protéines adaptatrices, ainsi que pour l'activation de NF- $\kappa$ B en aval (Rothwarf *et al.*, 1998; Makris *et al.*, 2002). En conséquence, nous avons observé que l'apparition de la phosphorylation des sous-unités IKK $\beta$  et IKK $\gamma$  a fidèlement reflété les cinétiques de phosphorylation et de dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , de la phosphorylation de RelA et de la capacité de liaison de RelA à l'ADN dans les neutrophiles humains (cette étude; McDonald *et al.*, 1997 et 1998; Vancurova *et al.*, 2001). Cette forte corrélation appuie l'idée que toutes ces réponses sont reliées dans les neutrophiles, comme observé dans beaucoup d'autres types cellulaires, mais avec cette particularité exceptionnelle que **l'ensemble du processus peut avoir lieu dans le noyau des neutrophiles humains.**

Dans le cas particulier de la phosphorylation de RelA sur la sérine 536, le lien avec l'activation du complexe IKK n'est probablement pas direct dans les neutrophiles. En effet, malgré des similarités en termes de localisation intracellulaire et de cinétique d'activation entre les deux protéines, l'inhibition spécifique de la kinase IKK $\beta$ , par le PGJ<sub>2</sub> ou le BAY 117082, n'a eu qu'un effet modeste sur la phosphorylation de RelA

dans les neutrophiles traités au LPS. Bien que l'inhibition incomplète de la phosphorylation de RelA laisse envisager une participation mineure de la kinase IKK $\beta$  dans ce processus, du moins dans les cellules stimulées par le LPS, d'autres kinases jouent clairement un rôle plus important. Parmi les kinases qui peuvent potentiellement phosphoryler RelA, on peut exclure la caséine kinase II et la kinase PKA, puisque leur inhibition n'a pas altéré le niveau de phosphorylation de RelA dans les neutrophiles. De façon semblable, plusieurs autres inhibiteurs des différentes cascades de signalisation se sont révélés inefficaces. Ainsi, l'identité d'une kinase, ou des kinases, responsable de la phosphorylation de RelA reste incertaine à ce stade. Puisque que ce processus se produit à la fois dans le cytoplasme et le noyau des neutrophiles, la kinase en amont doit, idéalement, être présente dans ces deux compartiments cellulaires. Alternativement, différentes kinases peuvent phosphoryler la protéine RelA selon sa localisation. En accord avec un tel scénario, les neutrophiles expriment les kinases IKK $\epsilon$  et TBK-1 dans le cytoplasme. Ces deux kinases ont été démontrées comme étant capables de phosphoryler la protéine RelA sur la sérine 536 (Buss *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2003). À ce jour, nos données nous laissent supposé qu'un tel lien existe. Cependant, ils ne fournissent pas d'indications quant à l'identité de kinase qui pourrait phosphoryler la protéine RelA dans le noyau. Ceci souligne la nécessité de poursuivre de plus amples études (voir 4.2).

L'identité de la kinase (ou des kinases) qui pourrait phosphoryler les sous-unités du complexe IKK que ce soit dans les neutrophiles, ou dans d'autres types cellulaires, demeure également incertaine. À cet égard, un large éventail d'inhibiteurs de diverses

cascades de signalisation n'a pas altéré de façon significative l'activation du complexe IKK dans les neutrophiles. Néanmoins, plusieurs kinases en amont ont été proposées comme étant des IKK kinases. L'un de ces candidats est la kinase NIK, qui s'associe à IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  et les phosphoryle (Woronicz *et al.*, 1997; Regnier *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998). L'autre est la TBK-1, qui peut elle aussi phosphoryler la kinase IKK $\beta$  (Tojima *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2003). Nous avons constaté que les kinases NIK et TBK-1 avaient un profil de distribution intracellulaire bien distinct dans les neutrophiles humains. La première est strictement nucléaire alors que la deuxième est plutôt cytoplasmique. Toutefois, il n'est pas clair à ce stade si les kinases NIK et TBK-1 sont activées après la stimulation des neutrophiles. De plus, il est important d'établir si la cinétique d'activation de ces deux kinases correspond à celle de la phosphorylation des sous-unités du complexe IKK, à la fois, dans le cytoplasme et le noyau. Inversement, il est également concevable que ni la NIK ni la TBK-1 soient impliquées dans l'activation de IKK. Des études d'inactivation de gène ont en effet soulevé des doutes sur la capacité réelle de NIK et TBK-1 d'agir comme des kinases de IKK (Hemmi *et al.*, 2004; Shinkura *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été proposé que l'activation du complexe IKK puisse découler d'une phosphorylation croisée de ses sous-unités après leur assemblage en un complexe nommé signalosome (Hayden et Ghosh, 2004). Cela représente un concept attrayant en ce qui concerne le complexe IKK cytoplasmique, en particulier parce que l'inhibition de IKK $\beta$  (avec la PGJ<sub>2</sub>) a nettement diminué la phosphorylation de IKK $\beta$ . Dans le cas du complexe IKK nucléaire, cependant, l'assemblage d'un signalosome en absence de protéines adaptatrices associées aux récepteurs est plus

difficile à envisager. Par conséquent, un rôle pour une kinase du complexe IKK nucléaire ne peut être exclu (voir 4.2).

L'existence d'une cascade IKK/I $\kappa$ B nucléaire suscite un certain nombre d'interrogations, comme celle de savoir si elle favorise une association des isoformes du complexe IKK à la chromatine suite à une stimulation cellulaire (Anest *et al.*, 2003) et si le complexe IKK peut lier de façon constitutive la chromatine dans les cellules au repos. À cet égard, nous avons présenté des évidences indirectes d'une association inductible de l'ensemble des trois composantes du complexe IKK à la chromatine. Une telle association requiert toutefois une confirmation par des moyens plus directs, par exemple des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP assay). Une autre interrogation découlant de la présence constitutive du complexe IKK nucléaire dans les neutrophiles est de savoir si ses composantes font la navette entre le noyau et le cytoplasme. À cet effet, des expériences de blocage d'exportation nucléaire, à l'aide de leptomycine B, ont montré une absence d'activité d'échange des isoformes du complexe IKK entre le cytoplasme et le noyau, que ce soit dans les neutrophiles au repos ou activés. L'absence de cette navette montre ainsi que l'activation simultanée du complexe IKK dans les deux compartiments cellulaires reflète des processus parallèles. Ces résultats suggèrent également que l'association des isoformes du complexe IKK à la chromatine implique essentiellement les IKKs nucléaires. En revanche, nous constatons une légère accumulation nucléaire des protéines RelA et I $\kappa$ B $\alpha$  quand les neutrophiles au repos sont cultivés en présence de la leptomycine B pendant 6-8 heures, suggérant ainsi un faible mouvement entre ces deux compartiments cellulaires. Cette observation est en

accord avec celles qui sont faites dans d'autres types cellulaires (Harhaj et Sun, 1999; Huang *et al.*, 2000; Carlotti *et al.*, 2000; Birbach *et al.*, 2002; Ghosh et Karin, 2002; Le et Verma, 2002; Buss *et al.*, 2004). Dans les neutrophiles activés, les protéines I $\kappa$ B $\alpha$  et RelA se sont également accumulées dans le noyau en présence de la leptomycine B. Cela était évident aux temps plus précoces (2-4 heures), ce qui supporte la notion que la navette des protéines I $\kappa$ B $\alpha$  et RelA est relativement plus prononcée dans les cellules stimulées, comme c'est le cas d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les neutrophiles (Castro-Alcaraz *et al.*, 2002). Dans les cellules activées, nous avons également constaté que la leptomycine B interférait avec la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , à la fois dans le cytoplasme et le noyau. La dégradation retardée, ou l'inhibition partielle de la dégradation, d'I $\kappa$ B $\alpha$  observée chez les neutrophiles traités avec la leptomycine B reflète probablement une interférence avec la protéolyse d'I $\kappa$ B $\alpha$  d'une manière opposée à sa phosphorylation. En effet, la phosphorylation d'IKK $\beta$  et d'I $\kappa$ B $\alpha$  n'est pas affectée par la leptomycine B (Figure 3.1.7B et résultats non-montrés). À l'appui de cette conclusion, la leptomycine B a été décrite pour entraver l'activité catalytique du protéasome (Rodriguez *et al.*, 1999), qui est responsable de la dégradation inductible d'I $\kappa$ B $\alpha$ .

#### **4.2 IMPLICATION DE LA KINASE TAK1 DANS L'ACTIVATION DU COMPLEXE IKK CHEZ LES NEUTROPHILES HUMAINS**

Dans cette section, nous avons investigué la kinase en amont du complexe IKK qui est potentiellement impliquée dans l'activation de la cascade de signalisation IKK/NF- $\kappa$ B et dans certaines réponses fonctionnelles des neutrophiles. En premier lieu,



nous avons montré que les neutrophiles expriment la MAP3K, TAK1, ainsi que ses protéines associées, TAB1 et TAB2. Ces trois protéines sont localisées à la fois dans les fractions cytoplasmique et nucléaire des neutrophiles humains. Ces protéines sont typiquement exprimées dans le cytoplasme dans la plupart des autres types cellulaires, comme nous l'avons montré ici dans le cas des cellules mononuclées (PBMC). Une autre particularité de TAK1 dans les neutrophiles est que cette kinase est associée de façon constitutive aux protéines TAB1 et TAB2, ainsi qu'avec les sous-unités du complexe IKK. Cette association est invariable et ce suivant la stimulation des cellules. En réponse à une stimulation avec le TNF- $\alpha$  ou le LPS, la kinase TAK1 est activée de façon rapide et transitoire. Cette cinétique d'activation précède la phosphorylation des sous-unités du complexe IKK et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les deux compartiments cellulaires, suggérant ainsi que la kinase TAK1 cytoplasmique et nucléaire pourrait fonctionner comme une kinase d'IKK. Afin d'élucider cette possibilité, nous avons examiné les conséquences du prétraitement des neutrophiles avec un inhibiteur hautement sélectif de TAK1, le 5z-7-oxozeaenol, sur la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B. L'inhibition pharmacologique de TAK1 a révélé que cette kinase est impliquée dans la plupart des aspects de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B dans les neutrophiles humains. En effet, le prétraitement des cellules avec le 5z-7-oxozeaenol a empêché la phosphorylation d'IKK $\alpha/\beta$  et de RelA, ainsi que la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  induite par le TNF- $\alpha$  ou le LPS. Parallèlement, il y a une inhibition prononcée des événements en aval d'IKK comme la liaison à l'ADN du NF- $\kappa$ B et la transactivation de promoteur sous le contrôle du NF- $\kappa$ B. En conséquence, la transcription, l'expression génique et la libération de plusieurs cytokines, tel que le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, le MIP-1 $\alpha$  et le MIP-1 $\beta$

dépendantes du NF- $\kappa$ B, dans les neutrophiles sont aussi profondément inhibées (voir section 1). De plus, le retardement de l'apoptose spontanée, par le TNF- $\alpha$  ou le LPS, a également été fortement réduit par l'inhibiteur de TAK1 dans ces cellules. Ces résultats montrent que l'activation de TAK1 est un événement en amont crucial pour une mobilisation de la cascade de signalisation IKK/NF- $\kappa$ B cytoplasmique et nucléaire, ainsi que pour les réponses fonctionnelles en aval de celle-ci dans les neutrophiles humains.

Nos résultats ont montré que l'inhibiteur de TAK1 n'avait aucun effet sur l'activité d'autres MAP3Ks, comme la MEKK1 et la MEKK3, à une concentration qui abolit l'activité de TAK1. Cela confirme la haute sélectivité de l'inhibiteur de TAK1 observée dans d'autres études (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 2003; Safwat *et al.*, 2005; Windheim *et al.*, 2007). Ainsi, les nombreux résultats que nous avons obtenus en utilisant cet inhibiteur ne peuvent pas être attribués à une inhibition non sélective d'autres MAP3Ks. Cette spécificité est particulièrement importante dans le cas de MEKK1 et MEKK3 car ces deux kinases peuvent agir comme des IKK kinases dans d'autres cellules (Lee *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Samanta *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004). Cela dit, il ne peut pas être exclu que les kinases MEKK1 et MEKK3 participent à l'activation du complexe IKK. À cet égard, nos données montrent que la TAK1 n'agit pas en amont des isoformes de MEKKs puisque l'inhibiteur de TAK1 n'a aucun effet sur l'activité kinase des isoformes de MEKKs. En conséquence, ces dernières pourraient donc agir en amont de TAK1 ou être activés en parallèle et ainsi exercer un impact sur la cascade d'IKK cytoplasmique et/ou nucléaire des neutrophiles. D'ailleurs, nos résultats montrent pour la première fois que la kinase MEKK3 est exprimée et activable dans les

neutrophiles humains, et que l'activité de MEKK1 peut également être induite en réponse au LPS, en plus de ce qui a précédemment été rapporté pour le fMLP ou le TNF- $\alpha$  (Nick *et al.*, 1997; Avdi *et al.*, 2000). Une étude réalisée à l'aide d'un système de surexpression, dans les cellules HEK 293, effectuée par Blonska *et al.* (2005) a montré que les kinases TAK1 et MEKK3 peuvent former un complexe fonctionnel. En effet, l'activité de TAK1 pourrait régulariser l'autophosphorylation de MEKK3, en plus de réguler la phosphorylation de MEKK3. Cette coopération mènerait à l'activation de NF- $\kappa$ B. Dans notre étude, l'inhibiteur de TAK1 n'a eu aucune incidence sur l'activité de MEKK3 (ou de MEKK1), ce qui suggère que l'activité de MEKK3 (ou de MEKK1) est indépendante de TAK1. Il semblerait donc que l'activation de NF- $\kappa$ B se produit sans avoir besoin d'une coopération entre TAK1 et MEKK3 (ou MEKK1). Ce qui est en accord avec une étude de Yao *et al.* (2007), qui a rapporté une absence d'interaction endogène entre la TAK1 et la MEKK3 en réponse à une stimulation par l'IL-1.

Bien que la phosphorylation inductible de IKK $\alpha/\beta$  soit abolie par un inhibiteur de TAK1, ce dernier n'a aucune incidence sur la phosphorylation de IKK $\gamma$  en réponse au LPS et très légèrement dans le cas du TNF- $\alpha$ . Ceci suggère d'une part que l'inhibiteur de TAK1 ne se comporte pas comme un inhibiteur général de la voie de signalisation induite par le LPS ou le TNF- $\alpha$  chez les neutrophiles humains. D'autre part, la phosphorylation d'IKK $\gamma$  semble principalement être médiée par une kinase autre que la TAK1, comme la MEKK1 ou la MEKK3, ou par un processus différent chez les neutrophiles humains. À cet égard, l'étude effectuée par Yao *et al.* (2007) dans les cellules HEK 293 et les MEF déficientes en TAK1, en MEKK3, en IKK $\alpha$ , en IKK $\beta$  et

en IKK $\alpha/\beta$ , a démontré la participation de deux voies de signalisation parallèle menant à l'activation de NF- $\kappa$ B. La première dite “**voie dépendante de TAK1**” mène à la phosphorylation et l'activation d'IKK $\beta$ , résultant à l'activation classique de NF- $\kappa$ B. La deuxième voie dite “**voie dépendante de MEKK3 et indépendante de TAK1**” implique une phosphorylation d'IKK $\gamma$  et une activation de IKK $\alpha$ , ce qui résulte en une activation du NF- $\kappa$ B via la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et sa dissociation subséquente du NF- $\kappa$ B mais sans la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Selon ce modèle, nos résultats suggèrent que c'est la kinase TAK1, et non pas MEKK3, qui serait impliquée dans l'activation de la cascade IKK/NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles humains puisque qu'on observe la phosphorylation d'une sous-unité IKK $\beta$  et la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  en réponse au TNF- $\alpha$  ou au LPS.

Nos résultats montrent que la phosphorylation de RelA sur la sérine 536, induite par le TNF- $\alpha$  ou le LPS, est abolie par l'inhibiteur de TAK1. Cette inhibition se fait par l'entrave de la phosphorylation d'IKK $\alpha/\beta$ . Ce qui suggère que la kinase TAK1, et/ou le complexe IKK $\alpha/\beta$ , serait impliqués dans la phosphorylation du RelA (S536) chez les neutrophiles humains. Ces résultats sont en accord avec une étude de Sakurai *et al.* (2003) qui a montré qu'une surexpression de TAK1, de TAB1, de IKK $\alpha$  et de IKK $\beta$  stimule la phosphorylation du RelA (S536). Au contraire, les formes mutantes dominantes négatives ou les siRNA (small interfering RNAs) de TAK1, de IKK $\alpha$  et de IKK $\beta$  inhibent la phosphorylation de RelA (S536) en réponse au TNF- $\alpha$  dans les cellules HeLa et HEK 293. Dans un même ordre d'idées, une étude de Buss *et al.* (2004), également réalisée dans les cellules HeLa et les HEK 293, a rapporté que la

phosphorylation de RelA (S536), en réponse à l'IL-1, était affectée par au moins cinq kinases incluant IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TBK, et une autre kinase qui est, à ce jour, inconnue.

L'inhibiteur de TAK1 a renversé l'effet anti-apoptotique associé à une stimulation des neutrophiles par le TNF- $\alpha$  ou le LPS. À l'opposé, la dexaméthasone est sans effet. Ces résultats indiquent que la dexaméthasone emprunte une voie de signalisation différente de celle du TNF- $\alpha$  ou du LPS, et indépendante de TAK1, afin de réduire l'apoptose des neutrophiles humains. Bien que les mécanismes moléculaires sous-tendant les effets anti-apoptotiques de la dexaméthasone chez les neutrophiles humains ne soient pas bien connus à ce jour, plusieurs aspects sont associés à une prolongation de la survie des neutrophiles. En particulier, la dexaméthasone augmente de l'expression de l'ARNm et de la protéine FLAP, qui est requise pour l'activation de la 5-LO et pour la production de leucotriènes (Pouliot *et al.*, 1994). De plus, elle amène l'augmentation de l'expression du récepteur de haute affinité pour le leucotriène B<sub>4</sub>, le BLT1 (Stankova *et al.*, 2002), et, une régulation à la hausse de l'expression de la protéine anti-apoptotique, Mcl-1 (Cox et Austin, 1997 ; Moulding *et al.*, 1998; Akgul *et al.*, 2001; Leuenroth *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2004; Saffar *et al.*, 2008). Ceci impliquerait les voies de la phosphatidylinositol 3-kinases et Src (Pétrin, 2004, mémoire, M.Sc. en Immunologie, Université de Sherbrooke; Saffar AS *et al.*, 2008). Par ailleurs, nos résultats montrent que l'effet anti-apoptotique de la dexaméthasone n'a pas été affecté par l'inhibition de TAK-1. Dans notre étude, l'inhibition de TAK1 bloque la phosphorylation de p38 MAPK et de ERK, ce qui suggère que la dexaméthasone n'emprunte pas la voie de p38

MAPK et/ou de ERK. Ces résultats sont en accord avec les études de Pétrin (2004, mémoire, M.Sc. en Immunologie, Université de Sherbrooke) et de Saffar *et al.* (2008) qui rapportent que la kinase ERK n'est pas impliquée dans le retardement de l'apoptose des neutrophiles humains en réponse à la dexaméthasone. Dans le cas de la p38 MAPK, Saffar *et al.* (2008) a plutôt montré son implication dans une prolongation de survie des neutrophiles humains favorisée par la dexaméthasone; par contre, la concentration de l'inhibiteur de la p38 MAPK (SB203580) utilisée dans son étude était remarquablement élevée (10 et 25  $\mu\text{M}$ ). Cette concentration pourrait expliquer un effet non spécifique de l'inhibiteur. En effet, notre groupe de recherche a mesuré, par un essai kinase de p38 en utilisant ATF-2 comme substrat, que 3  $\mu\text{M}$  de SB203580 est suffisant pour inhiber de façon significative et spécifique l'activité de la p38 MAPK chez les neutrophiles humains en réponse au LPS ou au TNF- $\alpha$  (Cloutier *et al.*, 2007). Dans le même ordre d'idées, la spécificité du SB203580 a également été mise en doute dans d'autres études. Dans ces études, des concentrations élevées de cet inhibiteur pourraient affecter plusieurs autres kinases, y compris les kinases JNK/SAPK (Clerk et Sugden, 1998), ERK (Lian *et al.*, 1999), PDK et PKB (Lali *et al.*, 2000).

#### **4.3 L'ACTIVITÉ INDUCTIBLE DU NF- $\kappa$ B N'EST PAS MODULABLE PAR LES ROS ENDOGÈNES CHEZ LES NEUTROPHILES HUMAINS**

Nos résultats dans cette section suggèrent que l'activation du NF- $\kappa$ B et les réponses cellulaires dépendantes du NF- $\kappa$ B sont indépendantes des ROS endogènes, et ce aussi bien dans les neutrophiles humains primaires que dans la lignée

promyélocytaire PLB-985 différenciée en granulocytes. Parallèlement, nous avons optimisé les conditions de transfection des PLB-985 différenciées, ce qui rend possible des études portant sur l'activation des promoteurs chez les granulocytes.

Nous avons observé que la N-acétyl-cystéine, un puissant antioxydant, n'avait pas d'effet sur la cascade d'activation de IKK/I $\kappa$ B à différents niveaux. Nous avons montré que la phosphorylation de IKK $\alpha/\beta$  et de RelA, la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$ , ainsi que la capacité de liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN n'étaient pas affectées par la présence de N-acétyl-cystéine. Une explication possible pourrait être que le LPS et le TNF $\alpha$  ne sont pas des activateurs puissants de la NADPH oxydase des neutrophiles. C'est pourquoi les ROS endogènes ne joueraient aucun rôle, ou très peu, dans ces processus cellulaires. Une autre raison pourrait être que la N-acétyl-cystéine n'est pas assez puissante pour enrayer l'activité de ROS endogènes produites par les neutrophiles vu que ces cellules en sont des grands producteurs. À cet égard, nous avons utilisé les cellules X-CGD/PLB-985 différenciées en granulocytes, dans lesquelles gp91phox, un composant du complexe NADPH oxydase responsable de la production des ROS, est inactif (Zhen *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1999). En conséquence, ces cellules ne produisent pas de ROS en réponse aux activateurs de la NADPH oxydase (Figure 3.3.3, panneau droit). Il est à noter que les cellules PLB-985 différenciées avec le DMSO acquièrent non seulement un phénotype neutrophilique du point de vue de la morphologie, granulosité, et marqueurs de surface; mais présentent également le même profil d'expression de certaines cytokines et chimiokines (TNF $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , et l'IP-10) et d'activation de quelques facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B, STAT et AP-1) que les

neutrophiles primaires (résultats non-montrés). Malgré l'absence totale de ROS endogènes (Figure 3.3.3, panneau droit), nous avons observé que'en réponse au TNF $\alpha$  ou au LPS, les cellules X-CGD/PLB-985 différenciées se comportaient de la même façon que les cellules parentales. En effet, ces cellules montrent une cinétique d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (liaison du NF- $\kappa$ B à l'ADN) ou d'activation des promoteurs (pNF- $\kappa$ B-Luc ou pIL8-Luc) similaire. Ces résultats nous indiquent que l'activation de NF- $\kappa$ B, ainsi que les réponses en aval de celui-ci, sont indépendantes de la production de ROS endogènes chez les granulocytes humains. Nos résultats sont en accord avec ceux de Vollebregt *et al.* (1998), qui ont rapporté que les ROS étaient abondamment produits dans les neutrophiles en phagocytose, et que l'activation du NF- $\kappa$ B dans ces conditions demeurait inchangée en présence de divers « oxidant scavengers » (catalase exogène, superoxyde dismutase, ou méthionine). Inversement, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène n'induisait pas l'activation de NF- $\kappa$ B. En accord avec ces résultats, nous avons également observé que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène (jusqu'à 1 mM) n'active pas non plus le NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles humains (résultats non montrés).

C'est peut-être justement parce que les neutrophiles sont d'excellents producteurs de ROS qu'ils sont si bien protégés contre leurs effets néfastes. À cet égard, il a été rapporté que l'activité spécifique de la catalase est au moins 4 fois plus élevée dans les neutrophiles que dans les autres phagocytes, et que les fonctions des neutrophiles ne sont pas affectées par l'addition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène (Vollebregt *et al.*, 1998). De la même façon, il a été rapporté que parmi les cellules du sang humain, les neutrophiles expriment un niveau élevé d'enzyme méthionine-sulfoxyde-réductase qui est impliqué dans la



résistance aux oxydants, en réduisant les méthionines sulfoxydes en méthionines (Pietarinen-Runtti *et al.*, 2000). Quoiqu'il en soit, il est maintenant évident que ni les ROS endogènes ni les ROS exogènes, comme l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , influencent de façon significative l'activation de NF- $\kappa$ B et les réponses cellulaires dépendantes de celui-ci dans les neutrophiles humains.

D'un point de vue technique, nos résultats montrent que l'approche de nucléofection, par opposition à l'électroporation, est particulièrement bien adaptée à la surexpression transitoire de différentes protéines dans les cellules PLB-985 différenciées en granulocytes. En effet, l'efficacité de transfection élevée et le taux de mortalité relativement modéré nous a permis d'introduire avec succès des plasmides encodant la protéine GFP (Figures 3.3.5), la  $\beta$ -galactosidase, ou la PKC dans ces cellules (données non-montrées). Alors que notre travail était presque achevé, Boulven *et al.* (2006) a aussi réussi à surexprimer deux sous-unités mutantes de la PI3 kinase dans les cellules PLB-985 différenciées en utilisant une approche de nucléofection semblable à celle décrite dans cette étude. Bien que les paramètres et le tampon de nucléofection utilisés par Boulven *et al.* (2006) étaient différents de ceux qui sont utilisés dans la présente étude, l'efficacité de transfection était comparable (T. Ear, données non publiées). Cette dernière étude de même que nos résultats sont venus valider l'approche de la transfection par nucléofection. Cette approche par nucléofection nous a également permis de transférer, avec une bonne efficacité, certains autres types cellulaires comme les lignées U937, THP1, Jurkat, et HeLa (T. Ear, données non publiées).

D'un point de vue fonctionnel, les résultats des expériences où nous avons introduit des constructions de gène rapporteur luciférase dans les cellules PLB-985 différenciées ont aussi confirmé plusieurs observations faites chez les neutrophiles primaires. En particulier, l'induction de l'activité d'un gène rapporteur luciférase sous le contrôle du NF- $\kappa$ B est tout à fait semblable à l'observation que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B peut être activé dans les neutrophiles humains stimulés avec le LPS ou le TNF- $\alpha$  (McDonald *et al.*, 1997 et 1998). À l'opposé, ni le LPS ni le TNF- $\alpha$  active le gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'AP-1 quand ce dernier est transfecté dans les cellules PLB-985 différenciées (données non montrées). Cette observation est, encore une fois, en accord avec l'étude par notre laboratoire montrant que le facteur de transcription AP-1 n'est pas activable dans les neutrophiles humains (Cloutier *et al.*, 2003). En somme, il est également intéressant de mentionner que l'activation du gène rapporteur sous le contrôle du NF- $\kappa$ B, observée dans cette étude, constitue une première démonstration directe de la capacité d'un facteur de transcription à transactiver un gène en aval dans les granulocytes humains. Ceci ouvre la voie à des études de promoteurs plus approfondies avec des promoteurs de gènes précoces.

## CHAPITRE V- CONCLUSION

Les neutrophiles influencent l'immunité innée et adaptative en générant de nombreux médiateurs inflammatoires, notamment des cytokines et des chimiokines (Lloyd et Oppenheim 1992; Cassatella, 1995 et 1999; Bennouna *et al.*, 2003; Wittamer *et al.*, 2005; van Gisbergen *et al.*, 2005; Nathan, 2006; Appelberg, 2007). Bien qu'elle ne fût pas encore bien caractérisée chez les neutrophiles humains, la régulation de l'expression de certaines cytokines et chimiokines dépend, dans plusieurs types cellulaires, de l'activation d'un facteur de transcription appartenant à la famille NF- $\kappa$ B/Rel. Malgré la caractéristique inhabituelle des neutrophiles humains d'exprimer de façon constitutive une quantité importante des protéines NF- $\kappa$ B et I $\kappa$ B $\alpha$  dans le cytoplasme et le noyau, nous avons voulu déterminer si d'autres éléments de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B pouvaient être localisés et activés dans ces deux compartiments cellulaires. De plus, nous avons voulu déterminer si l'activation de cette voie est requise pour la production de certaines cytokines et chimiokines par les neutrophiles humains. Les résultats présentés dans le présent projet de recherche montrent que :

- l'activation du NF- $\kappa$ B est requise dans la production du TNF- $\alpha$ , de l'IL-8, du MIP-1 $\alpha$  et du MIP-1 $\beta$  par des neutrophiles humains.

- IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , et IKK $\gamma$  sont constitutivement exprimées à la fois dans le cytoplasme et le noyau des neutrophiles, alors que les kinases reliées à IKK (IKK $\epsilon$  et TBK-1) et NIK sont strictement cytoplasmiques et nucléaires, respectivement. En

réponse au TNF- $\alpha$  ou LPS, IKK $\beta$  et IKK $\gamma$  deviennent transitoirement phosphorylées, tandis que l'expression d'IKK $\alpha$  disparaît temporairement de ces deux compartiments cellulaires. La phosphorylation de RelA et d'I $\kappa$ B $\alpha$  ainsi que la dégradation de cette dernière induite par le TNF- $\alpha$  ou le LPS peuvent également se produire dans les deux compartiments. Le complexe IKK peut s'associer à la chromatine dans les neutrophiles activés. Cette association représente probablement une propriété des isoformes nucléaires d'IKK puisque ces derniers ne semblent pas faire de navette entre le cytoplasme et le noyau.

- TAK1, TAB1 et TAB2 sont constitutivement exprimées dans le cytoplasme et le noyau des neutrophiles humains. TAK1 est associée de façon constitutive avec les protéines TAB1 et TAB2, ainsi qu'avec les sous-unités du complexe IKK. Cette association est inchangée suivant la stimulation des neutrophiles. En réponse au TNF- $\alpha$  ou au LPS, TAK1 devient rapidement et transitoirement activée. L'inhibition de l'activité kinase de TAK1 a empêché la phosphorylation de IKK $\alpha/\beta$ , de RelA et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans le cytoplasme et le noyau. La capacité de liaison à l'ADN de NF- $\kappa$ B, ainsi que l'expression et la sécrétion de certaines cytokines et chimiokines induites par le TNF- $\alpha$  ou le LPS fut également bloqués par l'inhibition de TAK1. La phosphorylation d'IKK $\gamma$ , induite par le TNF- $\alpha$ , est partiellement régulée par TAK1, alors que la phosphorylation d'IKK $\gamma$ , induite par le LPS, exige une autre kinase.

- les ROS endogènes, ou exogènes, n'ont pas d'incidence sur l'activation de NF- $\kappa$ B et sur les réponses cellulaires dépendantes de celui-ci dans les neutrophiles humains

primaires. Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée promyélocytaire PLB-985 différenciée en granulocytes.

Collectivement, l'activation de IKK, la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , et la phosphorylation de RelA sont tous des processus qui peuvent avoir lieu dans le noyau, en plus du cytoplasme des neutrophiles humains. La TAK1 est une MAP3K en amont qui est impliquée dans l'activation des cascades IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B cytoplasmique et nucléaire dans les neutrophiles humains. L'activation du NF- $\kappa$ B est indépendante des ROS endogènes chez ces cellules primaires.

Un important domaine de l'immunologie et de la recherche sur l'inflammation s'articule autour de la question de savoir comment les leucocytes régulent les gènes des réponses précoces, tels que ceux qui codent pour les cytokines et les chimiokines, en réponse à des changements dans les signaux inflammatoires environnementaux. Cependant, notre compréhension sur la régulation de l'expression des cytokines par les neutrophiles demeure, à ce jour, fragmentaire en dépit d'un certain nombre de preuves montrant que les neutrophiles jouent un rôle dans la production de cytokines dès les premières étapes des réponses inflammatoires et immunitaires. De plus, les neutrophiles sont des participants importants dans le développement plusieurs pathologies. Ainsi, une meilleure compréhension sur les mécanismes qui régulent cette réponse des neutrophiles représente une voie d'études importante dans le traitement contre ces pathologies. Dans ce contexte, nos résultats ont apporté la connaissance des principaux éléments de la voie de signalisation qui mènent à la sécrétion de cytokines et de chimiokines chez les

neutrophiles humains. Ils peuvent donc être exploités comme cibles potentielles dans le développement d'une intervention thérapeutique dans le cas des conditions physiopathologiques. En particulier, celles qui sont connues pour être influencées par les neutrophiles, y compris, mais sans s'y limiter, l'arthrite, la goutte, le lupus et les maladies pulmonaires comme l'asthme sévère et la fibrose kystique.

## CHAPITRE VI- PERSPECTIVES

La mise en évidence d'une cascade IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B nucléaire ajoute une nouvelle facette à notre compréhension de l'activation de NF- $\kappa$ B, et de la biologie des neutrophiles. Il reste beaucoup à apprendre sur l'activation de NF- $\kappa$ B dans les neutrophiles. Ce modèle cellulaire représente sans aucun doute un modèle cellulaire unique pour étudier ce processus fondamental.

Tout d'abord, la démonstration que la phosphorylation du complexe IKK et de RelA sur la S536 peut être induite par le TNF- $\alpha$  ou le LPS laisse la porte ouverte à la possibilité que d'autres stimuli tels que l'IL-1, l'IL-15, l'IL-18, le PAF, le LTB<sub>4</sub>, le fMLP ou le GM-CSF amènent aussi cette phosphorylation. Des expériences semblables pourraient être effectuées afin de déterminer si la phosphorylation de RelA peut avoir lieu sur d'autres acides aminés comme la S529. La phosphorylation de ce résidu est connue pour moduler le potentiel de transactivation de NF- $\kappa$ B. Dans le même ordre d'idées, la détermination de l'état d'acétylation de RelA, en réponse aux divers stimuli, serait également intéressante. En effet, il est connu, qu'en plus de phosphorylation de RelA, l'acétylation de celui-ci est également arrivée à une activité transcriptionnelle accrue (Schmitz *et al.*, 2001; Chen et Greene, 2004; Viatour *et al.*, 2005; Perkins, 2006).

Nous avons présenté des preuves indirectes d'une association inductible de l'ensemble des trois composants du complexe IKK à la chromatine. Des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP assay) seront requises pour confirmer

une telle association chez les neutrophiles humains. Cette approche va également nous en apprendre davantage dans un contexte *in vivo* chez les neutrophiles humains quant à la participation réelle de certains facteurs de transcription dans l'induction de l'expression de gènes spécifiques. Ces données viendraient confirmer nos résultats actuels qui ne présentent qu'une corrélation entre l'activation de facteurs de transcription et l'induction de l'expression génique.

Bien que l'expression de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  soit connue aussi bien dans les neutrophiles que dans d'autres types cellulaires, l'expression des autres isoformes ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , et  $\zeta$ ) de cette famille sont non documentés pour les neutrophiles humains. Il serait intéressant déterminer le profil d'expression de ces isoformes dans les neutrophiles, de caractériser les membres de la famille NF- $\kappa$ B/Rel interagissent avec ces isoformes. Finalement, de déterminer leurs rôles sur les fonctions des neutrophiles. Par exemple, Vancurova *et al.* (2001) a proposé une corrélation entre la présence nucléaire d'I $\kappa$ B $\alpha$  et l'apoptose constitutive des neutrophiles. Pourtant, dans des conditions où la survie des neutrophiles est prolongée, en outre en présence de GM-CSF ou de dexaméthasone, la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  nucléaire n'est pas dégradée. Ces résultats suggèrent donc que d'autres éléments, tel qu d'autres isoformes de I $\kappa$ B, ou processus sont également impliqués.

L'étude actuelle pourrait être complétée par utilisation d'inhibiteurs différents visant d'autres kinases, des formes mutantes dominantes négatives ou des essais d'interférence d'ARN (siRNAs) visant les divers isoformes de MEKKs. Ces études nous permettraient de clarifier si MEKK1 ou MEKK3 ou un autre isoforme est impliqué dans



l'activation de IKK dans les neutrophiles humains. De façon semblable, nos résultats montrent que la kinase TAK1 est impliquée dans l'activation de la cascade de signalisation IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B. On pourrait éventuellement confirmer ces résultats en surexprimant un dominant négatif de TAK1, ou en utilisant la technique siRNA ciblant cette kinase) de TAK1 dans les cellules PLB-985 différenciées en granulocytes ou, encore plus intéressant, dans les neutrophiles primaires si l'on parvient à les transfecter. La mise au point des conditions de transfection des neutrophiles humains en utilisant la technique de nucléofection est envisagée. Des études préliminaires sont actuellement en cours dans le laboratoire pour mettre au point cette technique.

Hiérarchiquement, les mécanismes par lesquels la TAK1 est activée chez les neutrophiles humains sont encore, à ce jour, inconnus. À cet égard, nous envisageons de caractériser les molécules connues pour agir en amont de TAK1 comme les protéines IRAKs, TRAFs, ou PKC. Par ailleurs, il est de plus en plus évident que l'ubiquitinylation est un processus de modification post-traductionnelle qui joue un rôle important dans l'activation des molécules de signalisation. À ce propos, il serait intéressant de déterminer quels sont les composants de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B qui deviennent ubiquitinylés suite à une activation des neutrophiles humains.

Un autre aspect important dans la régulation du complexe IKK, c'est le mécanisme qui détermine son inactivation rapide suivant sa stimulation initiale. Quoique quelques candidats comme les phosphatases PP2A et PP2C $\beta$  (DiDonato *et al.*, 1997; Prajapati *et al.*, 2004) ou encore les enzymes de déubiquitinylation CYLD

(Cylindromatosis protein) (Brummelkamp *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2005; Reiley *et al.*, 2005; Kray *et al.*, 2005) et A20 (Lee *et al.*, 2000; Boone *et al.*, 2004; Wertz *et al.*, 2004) soient rapportés comme étant impliqués dans le contrôle négatif de l'activation de ce complexe, ce champ de recherche n'a pas encore été exploré dans les neutrophiles humains.

En somme, les suites possibles des projets décrits dans cette thèse ne manquent pas, et promettent un avenir excitant.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Patrick McDonald, pour m'avoir accueilli et permis de faire mon doctorat sous sa direction ainsi que pour son aide précieuse, sa patience, sa compréhension, et sa grande disponibilité.

Je tiens ensuite à remercier les Drs Abdelaziz Amrani, Fernand-Pierre Gendron et Marc Pouliot pour avoir accepté de prendre de leur temps afin d'évaluer ma thèse.

J'aimerais remercier les Drs Jana Stankova, Marek Rola-Pleszczynski, et Gilles Dupuis pour leur encouragement, leur positivité, leurs conseils et surtout pour leur appui pour que je puisse obtenir une exemption des frais de scolarité pour les étudiants étrangers. Sans leur aide, j'aurais dû payer des frais de scolarité au montant de 24 000 \$ pour mes deux premières années de doctorat; ce qui aurait rendu la poursuite de mes études financièrement impossible.

Je remercie sincèrement mes collègues de travail Carl Fortin, Marilyn Isabel et Emilie Bais-Charron pour les discussions, l'aide scientifique, pour les protocoles de toutes sortes et leur gentillesse. Un merci spécial à Carl pour son aide, bien appréciée, en français. Je veux aussi remercier toute l'équipe du Centre d'excellence en immuno-inflammation qui m'ont permis de travailler dans une ambiance agréable et chaleureuse.

Enfin, j'ai une très grande reconnaissance envers toute ma famille qui, de près (Borassy et Roytanak-Veetou) ou de loin (mes parents, **Theang Ear** et **Mathœurn Leng**, au Cambodge), a eu confiance en moi et qui m'a donné un soutien constant durant toutes ces années.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P.J., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B., et Winter, N. (2005) Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* **106**, 1843-1850.
- Abraham, E. (2000) NF-kappaB activation. *Crit Care Med* **28**, N100-104.
- Abramson, S., et Weissmann, G. (1981) The release of inflammatory mediators from neutrophils. *Ric Clin Lab* **11**, 91-99.
- Aderem, A., et Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**, 593-623.
- Adler, V., Yin, Z., Tew, K.D., et Ronai, Z. (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* **18**, 6104-6111.
- Agarwal, S., et Rao, A. (1998) Long-range transcriptional regulation of cytokine gene expression. *Curr Opin Immunol* **10**, 345-352.
- Ago, T., Nunoi, H., Ito, T., et Sumimoto, H. (1999) Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem* **274**, 33644-33653.
- Aguilera, C., Hoya-Arias, R., Haegeman, G., Espinosa, L., et Bigas, A. (2004) Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16537-16542.
- Ahmadzadeh, N., Shingu, M., Nobunaga, M., et Tawara, T. (1991) Relationship between leukotriene B4 and immunological parameters in rheumatoid synovial fluids. *Inflammation* **15**, 497-503.
- Akgul, C., Moulding, D.A., et Edwards, S.W. (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* **487**, 318-322.
- Aktan, F., Hennes, S., Roufogalis, B.D., et Ammit, A.J. (2003) Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF-kappaB-mediated iNOS protein expression. *Nitric Oxide* **8**, 235-242.

- al-Mokdad, M., Shibata, F., Takano, K., et Nakagawa, H. (1998) Differential production of chemokines by phagocytosing rat neutrophils and macrophages. *Inflammation* **22**, 145-159.
- Al-Shami, A., Mahanna, W., et 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.
- Alghamdi, A.S., et Foster, D.N. (2005) Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod* **73**, 1174-1181.
- Altmann, M., et Trachsel, H. (1993) Regulation of translation initiation and modulation of cellular physiology. *Trends Biochem Sci* **18**, 429-432.
- Alvarez, M.E., Fuxman Bass, J.I., Geffner, J.R., Calotti, P.X., Costas, M., Coso, O.A., Gamberale, R., Vermeulen, M.E., Salamone, G., Martinez, D., et al. (2006) Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation. *J Immunol* **177**, 4037-4046.
- Anderson, K.L., Smith, K.A., Pio, F., Torbett, B.E., et Maki, R.A. (1998) Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood* **92**, 1576-1585.
- Anest, V., Cogswell, P.C., et Baldwin, A.S., Jr. (2004) IkappaB kinase alpha and p65/RelA contribute to optimal epidermal growth factor-induced c-fos gene expression independent of IkappaBalpha degradation. *J Biol Chem* **279**, 31183-31189.
- Anest, V., Hanson, J.L., Cogswell, P.C., Steinbrecher, K.A., Strahl, B.D., et Baldwin, A.S. (2003) A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* **423**, 659-663.
- Appelberg, R. (2007) Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* **15**, 87-92.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Bachelier, F., Thomas, D., et Hay, R.T. (1995) Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **15**, 2689-2696.
- Arrigo, A.P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* **27**, 936-944.
- Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Kim, J.Y., et Abraham, E. (2004) Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol* **172**, 2522-2529.

- Ashcroft, M., Taya, Y., et Vousden, K.H. (2000) Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* **20**, 3224-3233.
- Ashcroft, M., et Vousden, K.H. (1999) Regulation of p53 stability. *Oncogene* **18**, 7637-7643.
- Ashtekar, A.R., et Saha, B. (2003) Poly's plea: membership to the club of APCs. *Trends Immunol* **24**, 485-490.
- Aslan, M., et Ozben, T. (2003) Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxid Redox Signal* **5**, 781-788.
- Attar, R.M., Macdonald-Bravo, H., Raventos-Suarez, C., Durham, S.K., and Bravo, R. (1998) Expression of constitutively active IkappaB beta in T cells of transgenic mice: persistent NF-kappaB activity is required for T-cell immune responses. *Mol Cell Biol* **18**, 477-487.
- Aupperle, K.R., Yamanishi, Y., Bennett, B.L., Mercurio, F., Boyle, D.L., et Firestein, G.S. (2001) Expression and regulation of inducible IkappaB kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes. *Cell Immunol* **214**, 54-59.
- Avdi, N.J., Malcolm, K.C., Nick, J.A., et Worthen, G.S. (2002) A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem* **277**, 40687-40696.
- Avdi, N.J., Winston, B.W., Russel, M., Young, S.K., Johnson, G.L., et Worthen, G.S. (1996) Activation of MEKK by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. Mapping pathways for mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **271**, 33598-33606.
- Babior, B.M. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-1476.
- Babior, B.M. (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* **109**, 33-44.
- Babior, B.M. (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* **16**, 42-47.
- Babior, B.M., Takeuchi, C., Ruedi, J., Gutierrez, A., et Wentworth, P., Jr. (2003) Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3031-3034.
- Baeuerle, P.A. (1998) IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* **95**, 729-731.
- Baeuerle, P.A., et Henkel, T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**, 141-179.

- Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568.
- Baggiolini, M., et Clark-Lewis, I. (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* **307**, 97-101.
- Bahrami, A.R., Bastow, R., Rolfe, S., Price, C., et Gray, J.E. (2002) A role for nuclear localised proteasomes in mediating auxin action. *Plant J* **30**, 691-698.
- Bainton, D.F. (1977) Differentiation of human neutrophilic granulocytes: normal and abnormal. *Prog Clin Biol Res* **13**, 1-27.
- Bainton, D.F. (1999) Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy. *J Immunol Methods* **232**, 153-168.
- Baldi, L., Brown, K., Franzoso, G., et Siebenlist, U. (1996) Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha. *J Biol Chem* **271**, 376-379.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-683.
- Bartek, J., et Lukas, J. (2006) Cell biology. The stress of finding NEMO. *Science* **311**, 1110-1111.
- Batot, G., Martel, C., Capdeville, N., Wientjes, F., et Morel, F. (1995) Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem* **234**, 208-215.
- Bazzoni, F., Cassatella, M.A., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B., and Baggiolini, M. (1991) Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* **173**, 771-774.
- Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A., et Baldwin, A.S., Jr. (1992) I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* **6**, 1899-1913.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., et Baltimore, D. (1995a) Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev* **9**, 2736-2746.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., et Baltimore, D. (1995b) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**, 167-170.



- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., et Henriques-Normark, B. (2006) An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**, 401-407.
- Benes, C., Poitout, V., Marie, J.C., Martin-Perez, J., Roisin, M.P., et Fagard, R. (1999) Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. *Biochem J* **340** ( Pt 1), 219-225.
- Bennouna, S., Bliss, S.K., Curiel, T.J., et Denkers, E.Y. (2003) Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol* **171**, 6052-6058.
- Birbach, A., Gold, P., Binder, B.R., Hofer, E., de Martin, R., et Schmid, J.A. (2002) Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* **277**, 10842-10851.
- Bjerregaard, M.D., Jurlander, J., Klausen, P., Borregaard, N., et Cowland, J.B. (2003) The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood* **101**, 4322-4332.
- Blair, W.S., Bogerd, H.P., Madore, S.J., et Cullen, B.R. (1994) Mutational analysis of the transcription activation domain of RelA: identification of a highly synergistic minimal acidic activation module. *Mol Cell Biol* **14**, 7226-7234.
- Bliss, S.K., Butcher, B.A., et Denkers, E.Y. (2000) Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol* **165**, 4515-4521.
- Blonska, M., Shambharkar, P.B., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B., et 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., et Knaus, U.G. (2003) NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* **28**, 502-508.
- Bonavida, B., Mencia-Huerta, J.M., et Braquet, P. (1989) Effect of platelet-activating factor on monocyte activation and production of tumor necrosis factor. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **88**, 157-160.
- Bonizzi, G., Dejardin, E., Piret, B., Piette, J., Merville, M.P., et Bours, V. (1996) Interleukin-1 beta induces nuclear factor kappa B in epithelial cells independently of the production of reactive oxygen intermediates. *Eur J Biochem* **242**, 544-549.

- Bonizzi, G., et Karin, M. (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280-288.
- Bonnard, M., Mirtsos, C., Suzuki, S., Graham, K., Huang, J., Ng, M., Itie, A., Wakeham, A., Shahinian, A., Henzel, W.J., *et al.* (2000) Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *Embo J* **19**, 4976-4985.
- Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., *et al.* (2004) The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* **5**, 1052-1060.
- Borregaard, N., et Cowland, J.B. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503-3521.
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielsen, M.H., et Bainton, D.F. (1993) Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* **51**, 187-198.
- Borregaard, N., Sorensen, O.E., et Theilgaard-Monch, K. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* **28**, 340-345.
- Boulven, I., Levasseur, S., Marois, S., Pare, G., Rollet-Labelle, E., et Naccache, P.H. (2006) Class IA phosphatidylinositide 3-kinases, rather than p110 gamma, regulate formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated chemotaxis and superoxide production in differentiated neutrophil-like PLB-985 cells. *J Immunol* **176**, 7621-7627.
- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K., et Siebenlist, U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* **72**, 729-739.
- Bovolenta, C., Gasperini, S., et Cassatella, M.A. (1996) Granulocyte colony-stimulating factor induces the binding of STAT1 and STAT3 to the IFNgamma response region within the promoter of the Fc(gamma)RI/CD64 gene in human neutrophils. *FEBS Lett* **386**, 239-242.
- Bovolenta, C., Gasperini, S., McDonald, P.P., et Cassatella, M.A. (1998) High affinity receptor for IgG (Fc gamma RI/CD64) gene and STAT protein binding to the IFN-gamma response region (GRR) are regulated differentially in human neutrophils and monocytes by IL-10. *J Immunol* **160**, 911-919.
- Bowie, A., et O'Neill, L.A. (2000) Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* **59**, 13-23.

- Bowie, A.G., Moynagh, P.N., et O'Neill, L.A. (1997) Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NF-kappaB activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J Biol Chem* **272**, 25941-25950.
- Boyum, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**, 77-89.
- Bracken, C.P., Whitelaw, M.L., et Peet, D.J. (2005) Activity of hypoxia-inducible factor 2alpha is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator. *J Biol Chem* **280**, 14240-14251.
- Brandt, E.R., Linnane, A.W., et Devenish, R.J. (1994) Expression of IFN A genes in subpopulations of peripheral blood cells. *Br J Haematol* **86**, 717-725.
- Braquet, P., et Rola-Pleszczynski, M. (1987) The role of PAF in immunological responses: a review. *Prostaglandins* **34**, 143-148.
- Braquet, P., Touqui, L., Shen, T.Y., et Vargaftig, B.B. (1987) Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev* **39**, 97-145.
- Brennan, P., et O'Neill, L.A. (1995) Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta* **1260**, 167-175.
- Breton, J.J., et Chabot-Fletcher, M.C. (1997) The natural product hymenialdisine inhibits interleukin-8 production in U937 cells by inhibition of nuclear factor-kappaB. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 459-466.
- Brettingham-Moore, K.H., Sprod, O.R., Chen, X., Oakford, P., Shannon, M.F., et Holloway, A.F. (2008) Determinants of a transcriptionally competent environment at the GM-CSF promoter. *Nucleic Acids Res.*
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., et Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535.
- Brizzi, M.F., Aronica, M.G., Rosso, A., Bagnara, G.P., Yarden, Y., et Pegoraro, L. (1996) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **271**, 3562-3567.

- Brown, E.J., et Goodwin, J.L. (1988) Fibronectin receptors of phagocytes. Characterization of the Arg-Gly-Asp binding proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* **167**, 777-793.
- Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G., et Siebenlist, U. (1993) Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2532-2536.
- Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M., Dirac, A.M., et Bernards, R. (2003) Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* **424**, 797-801.
- Bubici, C., Papa, S., Pham, C.G., Zazzeroni, F., et Franzoso, G. (2006) The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol Histopathol* **21**, 69-80.
- Buchanan, J.T., Simpson, A.J., Aziz, R.K., Liu, G.Y., Kristian, S.A., Kotb, M., Feramisco, J., et Nizet, V. (2006) DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**, 396-400.
- Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M.L., Hoffmann, E., Resch, K., et Kracht, M. (2004) Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I $\kappa$ B kinase (IKK)- $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem* **279**, 55633-55643.
- Busse, W.W. (1998) Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, S210-213; discussion S247-218.
- Bylund, J., Samuelsson, M., Collins, L.V., et Karlsson, A. (2003) NADPH-oxidase activation in murine neutrophils via formyl peptide receptors. *Exp Cell Res* **282**, 70-77.
- Caldenhoven, E., Buitenhuis, M., van Dijk, T.B., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., et de Groot, R.P. (1999a) Lineage-specific activation of STAT3 by interferon-gamma in human neutrophils. *J Leukoc Biol* **65**, 391-396.
- Caldenhoven, E., van Dijk, T.B., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., et de Groot, R.P. (1999b) Activation of a functionally distinct 80-kDa STAT5 isoform by IL-5 and GM-CSF in human eosinophils and neutrophils. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**, 95-101.
- Camussi, G., Aglietta, M., Coda, R., Bussolino, F., Piacibello, W., et Tetta, C. (1981) Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine. II. The cellular origin

of human PAF: monocytes, polymorphonuclear neutrophils and basophils. *Immunology* **42**, 191-199.

- Carlotti, F., Dower, S.K., et Qvarnstrom, E.E. (2000) Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem* **275**, 41028-41034.
- Carpagnano, G.E., Barnes, P.J., Geddes, D.M., Hodson, M.E., et Kharitonov, S.A. (2003) Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 1109-1112.
- Cassatella, M.A. (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* **16**, 21-26.
- Cassatella, M.A. (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* **73**, 369-509.
- Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M., et 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., Gasperini, S., Calzetti, F., Bertagnin, A., Luster, A.D., et McDonald, P.P. (1997a) Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur J Immunol* **27**, 111-115.
- Cassatella, M.A., Gasperini, S., et Russo, M.P. (1997b) Cytokine expression and release by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci* **832**, 233-242.
- Cassatella, M.A., Meda, L., Gasperini, S., D'Andrea, A., Ma, X., and Trinchieri, G. (1995) Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* **25**, 1-5.
- Castellano, F., Chavrier, P., et Caron, E. (2001) Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol* **13**, 347-355.
- Castro-Alcaraz, S., Miskolci, V., Kalasapudi, B., Davidson, D., et Vancurova, I. (2002) NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J Immunol* **169**, 3947-3953.
- Caughey, G.E., Pouliot, M., Clelet, L.G., et James, M.J. (1997) Regulation of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 beta synthesis by thromboxane A2 in nonadherent human monocytes. *J Immunol* **158**, 351-358.
- Celsus, C. (1478) *Celsi di medicina libri VIII*. Ed. B. Fontius, Florentia.

- Chakraborty, A., et Tweardy, D.J. (1998) Granulocyte colony-stimulating factor activates a 72-kDa isoform of STAT3 in human neutrophils. *J Leukoc Biol* **64**, 675-680.
- Chang, K.P. (1981) Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg* **30**, 322-333.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., et Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-1583.
- Chen, C.Y., et Shyu, A.B. (1994) Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol* **14**, 8471-8482.
- Chen, H.M., Zhang, P., Voso, M.T., Hohaus, S., Gonzalez, D.A., Glass, C.K., Zhang, D.E., et Tenen, D.G. (1995) Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood* **85**, 2918-2928.
- Chen, L.F., et Greene, W.C. (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 392-401.
- Chen, L.F., Mu, Y., et Greene, W.C. (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *Embo J* **21**, 6539-6548.
- Chen, L.F., Williams, S.A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J.M., Buckbinder, L., et Greene, W.C. (2005) NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol* **25**, 7966-7975.
- Chen, Y., Wu, J., et Ghosh, G. (2003) KappaB-Ras binds to the unique insert within the ankyrin repeat domain of IkappaBbeta and regulates cytoplasmic retention of IkappaBbeta x NF-kappaB complexes. *J Biol Chem* **278**, 23101-23106.
- Chen, Z.J. (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**, 758-765.
- Chen, Z.J., Bhoj, V., et Seth, R.B. (2006) Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection? *Cell Death Differ* **13**, 687-692.
- Chen, Z.J., Parent, L., et Maniatis, T. (1996) Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* **84**, 853-862.
- Cheung, P., Allis, C.D., et Sassone-Corsi, P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**, 263-271.

- Cheung, P.C., Nebreda, A.R., et Cohen, P. (2004) TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. *Biochem J* **378**, 27-34.
- Chiao, P.J., Miyamoto, S., et Verma, I.M. (1994) Autoregulation of I kappa B alpha activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 28-32.
- Chitnis, D., Dickerson, C., Munster, A.M., et Winchurch, R.A. (1996) Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J Leukoc Biol* **59**, 835-839.
- Choi, M., Rolle, S., Wellner, M., Cardoso, M.C., Scheidereit, C., Luft, F.C., et Kettritz, R. (2003) Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* **102**, 2259-2267.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Qi, X., et Ballard, D.W. (1996) Basal phosphorylation of the PEST domain in the I(kappa)B(beta) regulates its functional interaction with the c-rel proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **16**, 5974-5984.
- Clerk, A., et Sugden, P.H. (1998) The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs). *FEBS Lett* **426**, 93-96.
- Cloutier, A., Ear, T., Blais-Charron, E., Dubois, C.M., et 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., et 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., et McDonald, P.P. (2003) Transcription factor activation in human neutrophils. *Chem Immunol Allergy* **83**, 1-23.
- Courey, A.J. (2001) Cooperativity in transcriptional control. *Curr Biol* **11**, R250-252.
- Cox, D., et Greenberg, S. (2001) Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol* **13**, 339-345.
- Cox, G., et Austin, R.C. (1997) Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* **61**, 224-230.

- Crepaldi, L., Gasperini, S., Lapinet, J.A., Calzetti, F., Pinarci, C., Liu, Y., Zurawski, S., de Waal Malefyt, R., Moore, K.W., et Cassatella, M.A. (2001) Up-regulation of IL-10R1 expression is required to render human neutrophils fully responsive to IL-10. *J Immunol* **167**, 2312-2322.
- Crooks, S.W., et Stockley, R.A. (1998) Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 173-178.
- Cross, A., Bucknall, R.C., Cassatella, M.A., Edwards, S.W., et Moots, R.J. (2003) Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 2796-2806.
- Curthoys, N.P., et Gstraunthaler, G. (2001) Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F381-390.
- Dana, R.R., Eigsti, C., Holmes, K.L., et Leto, T.L. (2000) A regulatory role for ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* **275**, 32566-32571.
- Dancey, J.T., Deubelbeiss, K.A., Harker, L.A., et Finch, C.A. (1976) Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* **58**, 705-715.
- Davis, N., Ghosh, S., Simmons, D.L., Tempst, P., Liou, H.C., Baltimore, D., et Bose, H.R., Jr. (1991) Rel-associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* **253**, 1268-1271.
- de Jong, E.M., van Erp, P.E., van Vlijmen, I.M., et van de Kerkhof, P.C. (1992) The inter-relation between inflammation and epidermal proliferation in normal skin following epicutaneous application of leukotriene-B4--an immunohistochemical study. *Clin Exp Dermatol* **17**, 413-420.
- Dechend, R., Hirano, F., Lehmann, K., Heissmeyer, V., Ansieau, S., Wulczyn, F.G., Scheidereit, C., et Leutz, A. (1999) The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene* **18**, 3316-3323.
- Dejardin, E., Droin, N.M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.W., Karin, M., Ware, C.F., et Green, D.R. (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525-535.
- Del Maschio, A., Zanetti, A., Corada, M., Rival, Y., Ruco, L., Lampugnani, M.G., et Dejana, E. (1996) Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the



- disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* **135**, 497-510.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., et Karin, M. (1999) Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* **284**, 309-313.
- Delhase, M., et Karin, M. (1999) The I kappa B kinase: a master regulator of NF-kappa B, innate immunity, and epidermal differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**, 491-503.
- DeLuca, C., Petropoulos, L., Zmeureanu, D., et Hiscott, J. (1999) Nuclear IkappaBbeta maintains persistent NF-kappaB activation in HIV-1-infected myeloid cells. *J Biol Chem* **274**, 13010-13016.
- Delves, P.J., et Roitt, I.M. (2000) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49.
- Denault, S., April, M.J., et Stankova, J. (1997) Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by platelet-activating factor in human peripheral blood monocytes. *Immunology* **91**, 297-302.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., et Chen, Z.J. (2000) Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-361.
- Detmers, P.A., Zhou, D., Powell, D., Lichenstein, H., Kelley, M., et Pironkova, R. (1995) Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol* **155**, 2085-2095.
- Dever, T.E. (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**, 545-556.
- Devillier, P., Baccard, N., et Advenier, C. (1999) Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part I: synthesis, receptors and role of leukotrienes in asthma. *Pharmacol Res* **40**, 3-13.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., et Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491-496.
- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., et Karin, M. (1996) Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* **16**, 1295-1304.

- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., et Karin, M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* **388**, 548-554.
- Dimmeler, S., et Zeiher, A.M. (2000) Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept* **90**, 19-25.
- Dixon, R.A., Diehl, R.E., Opas, E., Rands, E., Vickers, P.J., Evans, J.F., Gillard, J.W., et Miller, D.K. (1990) Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* **343**, 282-284.
- Djeu, J.Y., Serbousek, D., et Blanchard, D.K. (1990) Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **76**, 1405-1409.
- Druker, B.J., Neumann, M., Okuda, K., Franza, B.R., Jr., et Griffin, J.D. (1994) rel Is rapidly tyrosine-phosphorylated following granulocyte-colony stimulating factor treatment of human neutrophils. *J Biol Chem* **269**, 5387-5390.
- Dubravec, D.B., Spriggs, D.R., Mannick, J.A., et 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.
- Dularay, B., Westacott, C.I., et Elson, C.J. (1992) IL-1 secreting cell assay and its application to cells from patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **31**, 19-24.
- Duncan, A.L., Leuenroth, S.J., Grutkoski, P., Ayala, A., et Simms, H.H. (2000) TNFalpha-induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 production. *Shock* **14**, 284-288; discussion 288-289.
- Dussault, A.A., et Pouliot, M. (2006) Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online* **8**, 1-10.
- Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G., et Chen, Z.J. (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* **22**, 245-257.
- Ear, T., Giguere, P., Fleury, A., Stankova, J., Payet, M.D., et Dupuis, G. (2001) High efficiency transient transfection of genes in human umbilical vein endothelial cells by electroporation. *J Immunol Methods* **257**, 41-49.
- Eberharter, A., et Becker, P.B. (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* **3**, 224-229.

- Edmondson, D.G., Davie, J.K., Zhou, J., Mirnikjoo, B., Tatchell, K., et Dent, S.Y. (2002) Site-specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. *J Biol Chem* **277**, 29496-29502.
- Edwards, S.W., Derouet, M., Howse, M., et Moots, R.J. (2004) Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1. *Biochem Soc Trans* **32**, 489-492.
- Ehrlich, P., Lazarus, A., Myers, W., Woodhead, G.S. (1900) Histology of the Blood: Normal and Pathological. *The University Press*.
- El-Benna, J., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalo, M.A., et Elbim, C. (2005) Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**, 199-206.
- Engelhardt, J.F. (1999) Redox-mediated gene therapies for environmental injury: approaches and concepts. *Antioxid Redox Signal* **1**, 5-27.
- Escoubet-Lozach, L., Glass, C.K., et Wasserman, S.I. (2002) The role of transcription factors in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 553-564.
- Ethuin, F., Gerard, B., Benna, J.E., Boutten, A., Gougereot-Pocidalo, M.A., Jacob, L., et Chollet-Martin, S. (2004) Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab Invest* **84**, 1363-1371.
- Eto, A., Muta, T., Yamazaki, S., et Takeshige, K. (2003) Essential roles for NF-kappa B and a Toll/IL-1 receptor domain-specific signal(s) in the induction of I kappa B-zeta. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 495-501.
- Fan, X.C., Myer, V.E., et Steitz, J.A. (1997) AU-rich elements target small nuclear RNAs as well as mRNAs for rapid degradation. *Genes Dev* **11**, 2557-2568.
- Fanger, N.A., Liu, C., Guyre, P.M., Wardwell, K., O'Neil, J., Guo, T.L., Christian, T.P., Mudzinski, S.P., et Gosselin, E.J. (1997) Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood* **89**, 4128-4135.
- Faurschou, M., et Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* **5**, 1317-1327.
- Fava, R.A., Olsen, N.J., Postlethwaite, A.E., Broadley, K.N., Davidson, J.M., Nanney, L.B., Lucas, C., et Townes, A.S. (1991) Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *J Exp Med* **173**, 1121-1132.

- Feinmark, S.J., Lindgren, J.A., Claesson, H.E., Malmsten, C., et Samuelsson, B. (1981) Stimulation of human leukocyte degranulation by leukotriene B4 and its omega-oxidized metabolites. *FEBS Lett* **136**, 141-144.
- Felsenfeld, G., Boyes, J., Chung, J., Clark, D., et Studitsky, V. (1996) Chromatin structure and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9384-9388.
- Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Dvorak, H.F., et Dvorak, A.M. (1998) Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* **187**, 903-915.
- Fernandes, J.M., Kemp, G.D., Molle, M.G., and Smith, V.J. (2002) Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem J* **368**, 611-620.
- Ferrante, A., Nandoskar, M., Walz, A., Goh, D.H., et Kowanko, I.C. (1988) Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **86**, 82-91.
- Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 248-253.
- Flamand, N., Picard, S., Lemieux, L., Pouliot, M., Bourgoin, S.G., et Borgeat, P. (2006) Effects of pyrrophenone, an inhibitor of group IVA phospholipase A2, on eicosanoid and PAF biosynthesis in human neutrophils. *Br J Pharmacol* **149**, 385-392.
- Flohe, L., Brigelius-Flohe, R., Saliou, C., Traber, M.G., et Packer, L. (1997) Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* **22**, 1115-1126.
- Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., et Smith, M.J. (1980) Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* **286**, 264-265.
- Francois, S., El Benna, J., Dang, P.M., Pedruzzi, E., Gougerot-Pocidallo, M.A., et Elbim, C. (2005) Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* **174**, 3633-3642.
- Franzoso, G., Bours, V., Azarenko, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kanno, T., Brown, K., et Siebenlist, U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *Embo J* **12**, 3893-3901.

- Franzoso, G., Bours, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kelly, K., et Siebenlist, U. (1992) The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature* **359**, 339-342.
- Freeman, M., et Gurdon, J.B. (2002) Regulatory principles of developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 515-539.
- Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**, 147-159.
- Fujita, F., Taniguchi, Y., Kato, T., Narita, Y., Furuya, A., Ogawa, T., Sakurai, H., Joh, T., Itoh, M., Delhase, M., *et al.* (2003) Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol* **23**, 7780-7793.
- Fujita, T., Nolan, G.P., Liou, H.C., Scott, M.L., et Baltimore, D. (1993) The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* **7**, 1354-1363.
- Gallin, JI., Snyderman, R. (1999) Inflammation : basic principles and clinical correlates (3rd). Philadelphia, PA: *Lippincott Williams & Wilkins*
- Ganchi, P.A., Sun, S.C., Greene, W.C., et Ballard, D.W. (1992) I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *Mol Biol Cell* **3**, 1339-1352.
- Garavito, R.M., et DeWitt, D.L. (1999) The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* **1441**, 278-287.
- Garavito, R.M., Malkowski, M.G., et DeWitt, D.L. (2002) The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 129-152.
- Garavito, R.M., et Mulichak, A.M. (2003) The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 183-206.
- Garg, A.K., et Aggarwal, B.B. (2002) Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol* **39**, 509-517.
- Garofalo, R.P., et Goldman, A.S. (1998) Cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in human milk: the 1997 update. *Biol Neonate* **74**, 134-142.
- Garrington, T.P., et Johnson, G.L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 211-218.

- Gasperini, S., Calzetti, F., Russo, M.P., De Gironcoli, M., et Cassatella, M.A. (1995) Regulation of GRO alpha production in human granulocytes. *J Inflamm* **45**, 143-151.
- Gasperini, S., Marchi, M., Calzetti, F., Laudanna, C., Vicentini, L., Olsen, H., Murphy, M., Liao, F., Farber, J., et Cassatella, M.A. (1999) Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* **162**, 4928-4937.
- Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U., et Presky, D.H. (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 495-521.
- Gaudreault, E., Thompson, C., Stankova, J., et Rola-Pleszczynski, M. (2005) Involvement of BLT1 endocytosis and Yes kinase activation in leukotriene B4-induced neutrophil degranulation. *J Immunol* **174**, 3617-3625.
- Genova, M.L., Pich, M.M., Bernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., Falasca, A.I., Formiggini, G., Castelli, G.P., et Lenaz, G. (2004) The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci* **1011**, 86-100.
- Gerondakis, S., Morrice, N., Richardson, I.B., Wettenhall, R., Fecondo, J., et Grumont, R.J. (1993) The activity of a 70 kilodalton I kappa B molecule identical to the carboxyl terminus of the p105 NF-kappa B precursor is modulated by protein kinase A. *Cell Growth Differ* **4**, 617-627.
- Ghiran, I., Barbashov, S.F., Klickstein, L.B., Tas, S.W., Jensenius, J.C., et Nicholson-Weller, A. (2000) Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med* **192**, 1797-1808.
- Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S., et Sigler, P.B. (1995) Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* **373**, 303-310.
- Ghosh, S., Gifford, A.M., Riviere, L.R., Tempst, P., Nolan, G.P., et Baltimore, D. (1990) Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal. *Cell* **62**, 1019-1029.
- Ghosh, S., et Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J., et Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-260.

- Gilbert, C., Poubelle, P.E., Borgeat, P., Pouliot, M., et Naccache, P.H. (2003) Crystal-induced neutrophil activation: VIII. Immediate production of prostaglandin E2 mediated by constitutive cyclooxygenase 2 in human neutrophils stimulated by urate crystals. *Arthritis Rheum* **48**, 1137-1148.
- Gloire, G., Dejardin, E., et Piette, J. (2006a) Extending the nuclear roles of IkappaB kinase subunits. *Biochem Pharmacol* **72**, 1081-1089.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., et Piette, J. (2006b) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* **72**, 1493-1505.
- Goldblatt, D., et Thrasher, A.J. (2000) Chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol* **122**, 1-9.
- Goldstein, I.M., Malmsten, C.L., Kindahl, H., Kaplan, H.B., Radmark, O., Samuelsson, B., et Weissmann, G. (1978) Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* **148**, 787-792.
- Gosselin, E.J., Wardwell, K., Rigby, W.F., et Guyre, P.M. (1993) Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J Immunol* **151**, 1482-1490.
- Gottifredi, V., Shieh, S., Taya, Y., et Prives, C. (2001) p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1036-1041.
- Gougerot-Pocidallo, M.A., el Benna, J., Elbim, C., Chollet-Martin, S., et Dang, M.C. (2002) [Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines]. *J Soc Biol* **196**, 37-46.
- Griendling, K.K., et Harrison, D.G. (1999) Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res* **85**, 562-563.
- Grotendorst, G.R., Smale, G., et Pancev, D. (1989) Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J Cell Physiol* **140**, 396-402.
- Grove, M., et 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.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.

- Gullberg, U., Andersson, E., Garwicz, D., Lindmark, A., et Olsson, I. (1997) Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *Eur J Haematol* **58**, 137-153.
- Gupta, A.K., Hasler, P., Holzgreve, W., Gebhardt, S., et Hahn, S. (2005) Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* **66**, 1146-1154.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., et Davis, R.J. (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**, 389-393.
- Hachicha, M., Naccache, P.H., et 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.
- Hachicha, M., Rathanaswami, P., Naccache, P.H., et McColl, S.R. (1998) Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. *J Immunol* **160**, 449-454.
- Haddad, J.J. (2002) Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* **14**, 879-897.
- Haglund, K., et Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* **24**, 3353-3359.
- Hallett, MB. (1989) The Neutrophil: Cellular Biochemistry and Physiology. *CRC Press*
- Halliwell, B. et Gutteridge, J. (1999) Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press, Oxford*.
- Ham, E.A., Soderman, D.D., Zanetti, M.E., Dougherty, H.W., McCauley, E., et Kuehl, F.A., Jr. (1983) Inhibition by prostaglandins of leukotriene B<sub>4</sub> release from activated neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4349-4353.
- Hanada, M., Ninomiya-Tsuji, J., Komaki, K., Ohnishi, M., Katsura, K., Kanamaru, R., Matsumoto, K., et Tamura, S. (2001) Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* **276**, 5753-5759.
- Hanahan, D.J. (1986) Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* **55**, 483-509.
- Hao, L.J., Yang, D., Fujii, Y., Yamauchi, A., Suzuki, N., Kikuchi, H., Kaneda, Y., et Nakamura, M. (2000) Phorbol ester-potentiated liposomal transfection to monocytic PLB-985 cells. *J Biochem* **128**, 989-998.



- Harhaj, E.W., et Sun, S.C. (1999) Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Mol Cell Biol* **19**, 7088-7095.
- Harris, J., Olierre, S., Sharma, S., Sun, Q., Lin, R., Hiscott, J., et Grandvaux, N. (2006) Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon. *J Immunol* **177**, 2527-2535.
- Haruta, H., Kato, A., et Todokoro, K. (2001) Isolation of a novel interleukin-1-inducible nuclear protein bearing ankyrin-repeat motifs. *J Biol Chem* **276**, 12485-12488.
- Haskill, S., Beg, A.A., Tompkins, S.M., Morris, J.S., Yurochko, A.D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., et Baldwin, A.S., Jr. (1991) Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* **65**, 1281-1289.
- Haskill, S., Peace, A., Morris, J., Sporn, S.A., Anisowicz, A., Lee, S.W., Smith, T., Martin, G., Ralph, P., et Sager, R. (1990) Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7732-7736.
- Hatada, E.N., Nieters, A., Wulczyn, F.G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T.W., et Scheidereit, C. (1992) The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2489-2493.
- Hay, R.T. (2004) Modifying NEMO. *Nat Cell Biol* **6**, 89-91.
- Hayakawa, M., Miyashita, H., Sakamoto, I., Kitagawa, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Karin, M., et Kikugawa, K. (2003) Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *Embo J* **22**, 3356-3366.
- Hayden, M.S., et Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**, 2195-2224.
- Hebert, M.J., Takano, T., Holthofer, H., et Brady, H.R. (1996) Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol* **157**, 3105-3115.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., et Akira, S. (2004) The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1641-1650.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y., et Baeuerle, P.A. (1993) Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* **365**, 182-185.

- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., et Floyd, R.A. (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* **28**, 1456-1462.
- Henson, P.M., et Johnston, R.B., Jr. (1987) Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* **79**, 669-674.
- Hiraoka, W., Vazquez, N., Nieves-Neira, W., Chanock, S.J., et Pommier, Y. (1998) Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J Clin Invest* **102**, 1961-1968.
- Hirsch, J.G. (1958) Bactericidal action of histone. *J Exp Med* **108**, 925-944.
- Hoberg, J.E., Popko, A.E., Ramsey, C.S., et Mayo, M.W. (2006) IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol* **26**, 457-471.
- Holloway, A.F., Rao, S., et Shannon, M.F. (2002) Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol Immunol* **38**, 567-580.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., et Karin, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* **284**, 316-320.
- Huang, Q., Yang, J., Lin, Y., Walker, C., Cheng, J., Liu, Z.G., et Su, B. (2004) Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* **5**, 98-103.
- Huang, T.T., Kudo, N., Yoshida, M., et Miyamoto, S. (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1014-1019.
- Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.H., et Miyamoto, S. (2003) Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* **115**, 565-576.
- Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S., et Ghosh, G. (1998) The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* **95**, 759-770.
- Ichinose, Y., Hara, N., Ohta, M., Aso, H., Chikama, H., Kawasaki, M., Kubota, I., Shimizu, T., et Yagawa, K. (1990) Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide maintain the phenotype of and superoxide anion generation by neutrophils. *Infect Immun* **58**, 1647-1652.

- Iida, N., et Grotendorst, G.R. (1990) Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Mol Cell Biol* **10**, 5596-5599.
- Iking-Konert, C., Cseko, C., Wagner, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., et Hansch, G.M. (2001a) Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med* **79**, 464-474.
- Iking-Konert, C., Ostendorf, B., Sander, O., Jost, M., Wagner, C., Joosten, L., Schneider, M., et Hansch, G.M. (2005) Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann Rheum Dis* **64**, 1436-1442.
- Iking-Konert, C., Vogt, S., Radsak, M., Wagner, C., Hansch, G.M., et Andrassy, K. (2001b) Polymorphonuclear neutrophils in Wegener's granulomatosis acquire characteristics of antigen presenting cells. *Kidney Int* **60**, 2247-2262.
- Iking-Konert, C., Wagner, C., Deneffle, B., Hug, F., Schneider, M., Andrassy, K., et Hansch, G.M. (2002) Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* **130**, 501-508.
- Imaizumi, T.A., Stafforini, D.M., Yamada, Y., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., et Zimmerman, G.A. (1995) Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* **238**, 5-20.
- Ingraham, L.M., Coates, T.D., Allen, J.M., Higgins, C.P., Baehner, R.L., et Boxer, L.A. (1982) Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood* **59**, 1259-1266.
- Inoue, J., Kerr, L.D., Kakizuka, A., et Verma, I.M. (1992) I kappa B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B: a new member of the I kappa B family. *Cell* **68**, 1109-1120.
- Irani, K. (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* **87**, 179-183.
- Irie, T., Muta, T., et Takeshige, K. (2000) TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett* **467**, 160-164.

- Ishitani, T., Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Shibuya, H., Gaynor, R.B., et Matsumoto, K. (2003) Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *Embo J* **22**, 6277-6288.
- Izumi, T., et Shimizu, T. (1995) Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* **1259**, 317-333.
- Jacobs, M.D., et Harrison, S.C. (1998) Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* **95**, 749-758.
- Janeway, C.A., Jr., et Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216.
- Janosch, P., Schellerer, M., Seitz, T., Reim, P., Eulitz, M., Brielmeier, M., Kolch, W., Sedivy, J.M., et Mischak, H. (1996) Characterization of IkappaB kinases. IkappaB-alpha is not phosphorylated by Raf-1 or protein kinase C isozymes, but is a casein kinase II substrate. *J Biol Chem* **271**, 13868-13874.
- Janssen-Heininger, Y.M., Poynter, M.E., et Baeuerle, P.A. (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med* **28**, 1317-1327.
- Janssens, S., Tinel, A., Lippens, S., et Tschopp, J. (2005) PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell* **123**, 1079-1092.
- Johnson, C., Van Antwerp, D., et Hope, T.J. (1999) An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J* **18**, 6682-6693.
- Johnson, D.R., Douglas, I., Jahnke, A., Ghosh, S., et Pober, J.S. (1996) A sustained reduction in IkappaB-beta may contribute to persistent NF-kappaB activation in human endothelial cells. *J Biol Chem* **271**, 16317-16322.
- Kajino, T., Ren, H., Iemura, S., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D.L., Matsumoto, K., et Ninomiya-Tsuji, J. (2006) Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem* **281**, 39891-39896.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.H., Deng, L., et Chen, Z.J. (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* **15**, 535-548.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., et Li, Z.W. (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**, 301-310.

- Karin, M., et Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-227.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Burdick, M.D., et Kunkel, S.L. (1994) Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* **152**, 3559-3569.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., et Kunkel, S.L. (1993) Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med* **178**, 63-72.
- Katori, M. (1989) [Pharmacology of prostaglandins; their profile and characterization in the body]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **94**, 159-171.
- Kaufmann, S.H. (2008) Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich et Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* **9**, 705-712.
- Kerr, L.D., Duckett, C.S., Wamsley, P., Zhang, Q., Chiao, P., Nabel, G., McKeithan, T.W., Baeuerle, P.A., et Verma, I.M. (1992) The proto-oncogene bcl-3 encodes an I kappa B protein. *Genes Dev* **6**, 2352-2363.
- Khanna-Gupta, A., Zibello, T., Sun, H., Lekstrom-Himes, J., et Berliner, N. (2001) C/EBP epsilon mediates myeloid differentiation and is regulated by the CCAAT displacement protein (CDP/cut). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8000-8005.
- Khoshnan, A., Kempiak, S.J., Bennett, B.L., Bae, D., Xu, W., Manning, A.M., June, C.H., et Nel, A.E. (1999) Primary human CD4+ T cells contain heterogeneous I kappa B kinase complexes: role in activation of the IL-2 promoter. *J Immunol* **163**, 5444-5452.
- Kiernan, R., Bres, V., Ng, R.W., Coudart, M.P., El Messaoudi, S., Sardet, C., Jin, D.Y., Emiliani, S., et Benkirane, M. (2003) Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem* **278**, 2758-2766.
- Kilpatrick, L.E., Sun, S., Mackie, D., Baik, F., Li, H., et Korchak, H.M. (2006) Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2. *J Leukoc Biol* **80**, 1512-1521.
- Kim, C.H., et Broxmeyer, H.E. (1999) Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* **65**, 6-15.
- Kim, C.H., Lee, K.H., Lee, C.T., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S., et Yoo, C.G. (2004) Aggregation of beta2 integrins activates human neutrophils through the IkappaB/NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol* **75**, 286-292.

- Kim, J.M., Oh, Y.K., Kim, Y.J., Oh, H.B., et Cho, Y.J. (2001) Polarized secretion of CXC chemokines by human intestinal epithelial cells in response to *Bacteroides fragilis* enterotoxin: NF-kappa B plays a major role in the regulation of IL-8 expression. *Clin Exp Immunol* **123**, 421-427.
- Kindt, T.J., Goldsby, R., Osborne, B. (2008) Immunologie : le cours de Janis Kuby avec questions de revision. *Dunod*
- Kita, H., Ohnishi, T., Okubo, Y., Weiler, D., Abrams, J.S., et Gleich, G.J. (1991) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med* **174**, 745-748.
- Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M., et Saito, M. (2000) MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett* **485**, 53-56.
- Kjeldsen, L., Bjerrum, O.W., Askaa, J., et 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.
- Klein, J.B., Buridi, A., Coxon, P.Y., Rane, M.J., Manning, T., Kettritz, R., et McLeish, K.R. (2001) Role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in chemoattractant and LPS delay of constitutive neutrophil apoptosis. *Cell Signal* **13**, 335-343.
- Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., et DeLeo, F.R. (2003) Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* **5**, 1337-1344.
- Koch, A.E., Kunkel, S.L., Shah, M.R., Hosaka, S., Halloran, M.M., Haines, G.K., Burdick, M.D., Pope, R.M., et Strieter, R.M. (1995) Growth-related gene product alpha. A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **155**, 3660-3666.
- Koltai, M., Hosford, D., Guinot, P., Esanu, A., et Braquet, P. (1991) Platelet activating factor (PAF). A review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part I). *Drugs* **42**, 9-29.
- Kopp, E.B., et Medzhitov, R. (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **11**, 13-18.
- Kornberg, R.D., et Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294.
- Kouzarides, T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* **19**, 1176-1179.

- Kravchenko, V.V., Mathison, J.C., Schwamborn, K., Mercurio, F., et Ulevitch, R.J. (2003) IKKi/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *J Biol Chem* **278**, 26612-26619.
- Kray, A.E., Carter, R.S., Pennington, K.N., Gomez, R.J., Sanders, L.E., Llanes, J.M., Khan, W.N., Ballard, D.W., and Wadzinski, B.E. (2005) Positive regulation of IkappaB kinase signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A. *J Biol Chem* **280**, 35974-35982.
- Krump, E., Pouliot, M., Naccache, P.H., et Borgeat, P. (1995) Leukotriene synthesis in calcium-depleted human neutrophils: arachidonic acid release correlates with calcium influx. *Biochem J* **310 ( Pt 2)**, 681-688.
- Kubonishi, I., Ohtsuki, Y., Miyagi, T., Yoshimoto, S., Akagi, T., et Miyoshi, I. (1986) Electron microscopic and immunohistochemical observations of differentiation of human myeloid leukemia line, PL-21. *J Cancer Res Clin Oncol* **111**, 203-208.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., et Yoshida, M. (1998) Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* **242**, 540-547.
- Kuehl, F.A., Jr., et Egan, R.W. (1980) Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* **210**, 978-984.
- Kuhn, H., et Thiele, B.J. (1999) The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* **449**, 7-11.
- Kunsch, C., Lang, R.K., Rosen, C.A., et Shannon, M.F. (1994) Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* **153**, 153-164.
- Kunsch, C., et Rosen, C.A. (1993) NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* **13**, 6137-6146.
- Kuroki, M., et O'Flaherty, J.T. (1999) Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)-dependent and ERK-independent pathways target STAT3 on serine-727 in human neutrophils stimulated by chemotactic factors and cytokines. *Biochem J* **341 ( Pt 3)**, 691-696.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lali, F.V., Hunt, A.E., Turner, S.J., et Foxwell, B.M. (2000) The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in

- interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **275**, 7395-7402.
- Lallena, M.J., Diaz-Meco, M.T., Bren, G., Paya, C.V., et Moscat, J. (1999) Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol* **19**, 2180-2188.
- Lambeth, J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**, 181-189.
- Lander, H.M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J* **11**, 118-124.
- Langer, J.A., et Pestka, S. (1985) Changes in binding of alpha interferon IFN-alpha A to HL-60 cells during myeloid differentiation. *J Interferon Res* **5**, 637-649.
- Lapinet, J.A., Scapini, P., Calzetti, F., Perez, O., et Cassatella, M.A. (2000) Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun* **68**, 6917-6923.
- Lavender, P., Cousins, D., et Lee, T. (2000) Regulation of Th2 cytokine gene transcription. *Chem Immunol* **78**, 16-29.
- Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P., et Ma, A. (2000) Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* **289**, 2350-2354.
- Lee, F.S., Hagler, J., Chen, Z.J., et Maniatis, T. (1997) Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* **88**, 213-222.
- Lee, F.S., Peters, R.T., Dang, L.C., et Maniatis, T. (1998) MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9319-9324.
- Lee, S.H., et Hannink, M. (2002) Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). *J Biol Chem* **277**, 23358-23366.
- Lee, W.L., Harrison, R.E., et Grinstein, S. (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* **5**, 1299-1306.
- Legrand-Poels, S., Vaira, D., Pincemail, J., van de Vorst, A., et Piette, J. (1990) Activation of human immunodeficiency virus type 1 by oxidative stress. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 1389-1397.



- Lehmeyer, J.E., et Johnston, R.B., Jr. (1978) Effect of anti-inflammatory drugs and agents that elevate intracellular cyclic AMP on the release of toxic oxygen metabolites by phagocytes: studies in a model of tissue-bound IgG. *Clin Immunol Immunopathol* **9**, 482-490.
- Lekstrom-Himes, J., et Xanthopoulos, K.G. (1999) CCAAT/enhancer binding protein epsilon is critical for effective neutrophil-mediated response to inflammatory challenge. *Blood* **93**, 3096-3105.
- Lekstrom-Himes, J.A. (2001) The role of C/EBP(epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation. *Stem Cells* **19**, 125-133.
- Lekstrom-Himes, J.A., et Gallin, J.I. (2000) Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* **343**, 1703-1714.
- Lerner, R.A., et Eschenmoser, A. (2003) Ozone in biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3013-3015.
- Leuenroth, S.J., Grutkoski, P.S., Ayala, A., et Simms, H.H. (2000) The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J Leukoc Biol* **68**, 158-166.
- Li, C., Song, L., Zhao, J., Zhu, L., Zou, H., Zhang, H., Wang, H., and Cai, Z. (2007) Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol* **22**, 663-672.
- Li, H., et Lin, X. (2008) Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* **41**, 1-8.
- Li, M.G., Katsura, K., Nomiyama, H., Komaki, K., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Kobayashi, T., et Tamura, S. (2003) Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2Cepsilon). *J Biol Chem* **278**, 12013-12021.
- Li, N., et Karin, M. (1999) Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J* **13**, 1137-1143.
- Li, Q., Lu, Q., Hwang, J.Y., Buscher, D., Lee, K.F., Izpisua-Belmonte, J.C., et Verma, I.M. (1999a) IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev* **13**, 1322-1328.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F., et Verma, I.M. (1999b) Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* **284**, 321-325.

- Li, Y., Ferrante, A., Poulos, A., et Harvey, D.P. (1996) Neutrophil oxygen radical generation. Synergistic responses to tumor necrosis factor and mono/polyunsaturated fatty acids. *J Clin Invest* **97**, 1605-1609.
- Li, Z., et Nabel, G.J. (1997) A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. *Mol Cell Biol* **17**, 6184-6190.
- Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., et Karin, M. (1999c) The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* **189**, 1839-1845.
- Lian, J.P., Huang, R., Robinson, D., et Badwey, J.A. (1999) Activation of p90RSK and cAMP response element binding protein in stimulated neutrophils: novel effects of the pyridinyl imidazole SB 203580 on activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade. *J Immunol* **163**, 4527-4536.
- Liberty, I.F., Raichel, L., Hazan-Eitan, Z., Pessach, I., Hadad, N., Schlaeffer, F., et Levy, R. (2004) Cytosolic phospholipase A2 is responsible for prostaglandin E2 and leukotriene B4 formation in phagocyte-like PLB-985 cells: studies of differentiated cPLA2-deficient PLB-985 cells. *J Leukoc Biol* **76**, 176-184.
- Lim, J.W., Kim, H., et Kim, K.H. (2001) NF-kappaB, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med* **31**, 355-366.
- Lin, R., Beauparlant, P., Makris, C., Meloche, S., et Hiscott, J. (1996) Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol Cell Biol* **16**, 1401-1409.
- Lin, X., Cunningham, E.T., Jr., Mu, Y., Geleziunas, R., et Greene, W.C. (1999) The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases. *Immunity* **10**, 271-280.
- Lin, X., Mu, Y., Cunningham, E.T., Jr., Marcu, K.B., Geleziunas, R., et Greene, W.C. (1998) Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action. *Mol Cell Biol* **18**, 5899-5907.
- Lin, Y., Ma, W., et Benchimol, S. (2000) Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* **26**, 122-127.
- Lindemann, A., Riedel, D., Oster, W., Meuer, S.C., Blohm, D., Mertelsmann, R.H., et Herrmann, F. (1988) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor induces

interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* **140**, 837-839.

- Lindemann, A., Riedel, D., Oster, W., Ziegler-Heitbrock, H.W., Mertelsmann, R., et Herrmann, F. (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* **83**, 1308-1312.
- Liou, H.C., Nolan, G.P., Ghosh, S., Fujita, T., et Baltimore, D. (1992) The NF-kappa B p50 precursor, p105, contains an internal I kappa B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *Embo J* **11**, 3003-3009.
- Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., Goff, J.P., et Horst, R.L. (2006) Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet Immunol Immunopathol* **113**, 248-255.
- Liu, H.H., Xie, M., Schneider, M.D., et Chen, Z.J. (2006) Essential role of TAK1 in thymocyte development and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11677-11682.
- Livingstone, C., Patel, G., et Jones, N. (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *Embo J* **14**, 1785-1797.
- Lloyd, A.R., et Oppenheim, J.J. (1992) Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* **13**, 169-172.
- Lominadze, G., Powell, D.W., Luerman, G.C., Link, A.J., Ward, R.A., et McLeish, K.R. (2005) Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1503-1521.
- Low, P., Hastings, R.A., Dawson, S.P., Sass, M., Billett, M.A., Mayer, R.J., et Reynolds, S.E. (2000) Localisation of 26S proteasomes with different subunit composition in insect muscles undergoing programmed cell death. *Cell Death Differ* **7**, 1210-1217.
- Lowenthal, A., et Levy, R. (1999) Essential requirement of cytosolic phospholipase A(2) for activation of the H(+) channel in phagocyte-like cells. *J Biol Chem* **274**, 21603-21608.
- Ludwig, J.C., Hoppens, C.L., McManus, L.M., Mott, G.E., et Pinckard, R.N. (1985) Modulation of platelet-activating factor (PAF) synthesis and release from human polymorphonuclear leukocytes (PMN): role of extracellular albumin. *Arch Biochem Biophys* **241**, 337-347.

- Luster, A.D. (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* **338**, 436-445.
- Mackarel, A.J., Russell, K.J., Brady, C.S., FitzGerald, M.X., et O'Connor, C.M. (2000) Interleukin-8 and leukotriene-B(4), but not formylmethionyl leucylphenylalanine, stimulate CD18-independent migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**, 154-161.
- Mackay, C.R. (2001) Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* **2**, 95-101.
- Mahe, Y., Mukaida, N., Kuno, K., Akiyama, M., Ikeda, N., Matsushima, K., et Murakami, S. (1991) Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J Biol Chem* **266**, 13759-13763.
- Malech, H.L., et Gallin, J.I. (1987) Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* **317**, 687-694.
- Malek, S., Chen, Y., Huxford, T., et Ghosh, G. (2001) IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* **276**, 45225-45235.
- Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V., et Wallach, D. (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**, 540-544.
- Maloney, C.G., Kutchera, W.A., Albertine, K.H., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., et Zimmerman, G.A. (1998) Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J Immunol* **160**, 1402-1410.
- Mancuso, P., Nana-Sinkam, P., et Peters-Golden, M. (2001) Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* **69**, 2011-2016.
- Manna, S.K., Zhang, H.J., Yan, T., Oberley, L.W., et Aggarwal, B.B. (1998) Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* **273**, 13245-13254.
- Mantovani, A. (1997) The interplay between primary and secondary cytokines. Cytokines involved in the regulation of monocyte recruitment. *Drugs* **54 Suppl 1**, 15-23.

- Marie, C., Roman-Roman, S., et Rawadi, G. (1999) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins. *Infect Immun* **67**, 688-693.
- Marmorstein, R. (2001) Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 422-432.
- Marucha, P.T., Zeff, R.A., et Kreutzer, D.L. (1991a) Cytokine-induced IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte: transcriptional and post-transcriptional regulation by tumor necrosis factor and IL-1. *J Immunol* **147**, 2603-2608.
- Marucha, P.T., Zeff, R.A., et Kreutzer, D.L. (1991b) Regulation of IL-1 beta gene expression in human peripheral blood PMN. *J Periodontal Res* **26**, 264-267.
- Massa, P.E., Li, X., Hanidu, A., Siamas, J., Pariali, M., Pareja, J., Savitt, A.G., Catron, K.M., Li, J., et Marcu, K.B. (2005) Gene expression profiling in conjunction with physiological rescues of IKKalpha-null cells with wild type or mutant IKKalpha reveals distinct classes of IKKalpha/NF-kappaB-dependent genes. *J Biol Chem* **280**, 14057-14069.
- Matsumoto, T., Funk, C.D., Radmark, O., Hoog, J.O., Jornvall, H., et Samuelsson, B. (1988) Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 26-30.
- Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H.F., Leonard, E.J., et Oppenheim, J.J. (1988) Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* **167**, 1883-1893.
- Mattioli, I., Geng, H., Sebald, A., Hodel, M., Bucher, C., Kracht, M., et Schmitz, M.L. (2006) Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *J Biol Chem* **281**, 6175-6183.
- May, M.J., Marienfeld, R.B., et Ghosh, S. (2002) Characterization of the Ikappa B-kinase NEMO binding domain. *J Biol Chem* **277**, 45992-46000.
- Mayer-Scholl, A., Averhoff, P., et Zychlinsky, A. (2004) How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* **7**, 62-66.
- McColl, S.R., Paquin, R., Menard, C., et 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.

- McDonald, P.P. (2004) Transcriptional regulation in neutrophils: teaching old cells new tricks. *Adv Immunol* **82**, 1-48.
- McDonald, P.P., Bald, A., et 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., et 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., et Cassatella, M.A. (1997) Activation of transcription factor NF-kappa B by phagocytic stimuli in human neutrophils. *FEBS Lett* **412**, 583-586.
- McDonald, P.P., Pouliot, M., et Borgeat, P. (1993a) Enhancement by GM-CSF of agonist-induced 5-lipoxygenase activation in human neutrophils involves protein synthesis and gene transcription. *J Lipid Mediat* **6**, 59-67.
- McDonald, P.P., Pouliot, M., Borgeat, P., et McColl, S.R. (1993b) Induction by chemokines of lipid mediator synthesis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated human neutrophils. *J Immunol* **151**, 6399-6409.
- McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S., et Cassatella, M.A. (1998b) Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* **92**, 4828-4835.
- McElhinny, J.A., Trushin, S.A., Bren, G.D., Chester, N., et Paya, C.V. (1996) Casein kinase II phosphorylates I kappa B alpha at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation. *Mol Cell Biol* **16**, 899-906.
- Menotti, E., Henderson, B.R., et Kuhn, L.C. (1998) Translational regulation of mRNAs with distinct IRE sequences by iron regulatory proteins 1 and 2. *J Biol Chem* **273**, 1821-1824.
- Menten, P., Wuyts, A., et Van Damme, J. (2002) Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 455-481.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., et al. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**, 860-866.
- Merika, M., et Thanos, D. (2001) Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 205-208.
- Metchnikoff, E. (1891) Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation, *Lecture VII* 106 Dover Publications, New York.

- Metchinkoff, I. (1883) "Undersuchungen über die Mesodermalen Phagozyten einiger Wirbeltiere", *Biol. Zent.bl.*, **3**, 18, 560-565.
- Meyer, T., et Vinkemeier, U. (2007) STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention. *Expert Opin Ther Targets* **11**, 1355-1365.
- Michiels, C., Minet, E., Mottet, D., et Raes, M. (2002) Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* **33**, 1231-1242.
- Miller, B.S., et Zandi, E. (2001) Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem* **276**, 36320-36326.
- Miller, R.A., et Britigan, B.E. (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* **10**, 1-18.
- Minami, M., Ohno, S., Kawasaki, H., Radmark, O., Samuelsson, B., Jornvall, H., Shimizu, T., Seyama, Y., et Suzuki, K. (1987) Molecular cloning of a cDNA coding for human leukotriene A4 hydrolase. Complete primary structure of an enzyme involved in eicosanoid synthesis. *J Biol Chem* **262**, 13873-13876.
- Miskolci, V., Castro-Alcaraz, S., Nguyen, P., Vancura, A., Davidson, D., et Vancurova, I. (2003) Okadaic acid induces sustained activation of NFkappaB and degradation of the nuclear IkappaBalpha in human neutrophils. *Arch Biochem Biophys* **417**, 44-52.
- Mitra, S., et Abraham, E. (2006) Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 732-741.
- Miwa, M., Sugatani, J., Ikemura, T., Okamoto, Y., Ino, M., Saito, K., Suzuki, Y., et Matsumoto, M. (1992) Release of newly synthesized platelet-activating factor (PAF) from human polymorphonuclear leukocytes under in vivo conditions. Contribution of PAF-releasing factor in serum. *J Immunol* **148**, 872-880.
- Mollinedo, F., Vaquerizo, M.J., et Naranjo, J.R. (1991) Expression of c-jun, jun B and jun D proto-oncogenes in human peripheral-blood granulocytes. *Biochem J* **273(Pt 2)**, 477-479.
- Monczak, Y., Trudel, M., Lamph, W.W., et Miller, W.H., Jr. (1997) Induction of apoptosis without differentiation by retinoic acid in PLB-985 cells requires the activation of both RAR and RXR. *Blood* **90**, 3345-3355.

- Montuschi, P., et Barnes, P.J. (2002) Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 615-620.
- Morel, C., Badell, E., Abadie, V., Robledo, M., Setterblad, N., Gluckman, J.C., Gicquel, B., Boudaly, S., et Winter, N. (2008) Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice. *Eur J Immunol* **38**, 437-447.
- Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., *et al.* (1996) A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* **271**, 13675-13679.
- Moulding, D.A., Quayle, J.A., Hart, C.A., et Edwards, S.W. (1998) Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* **92**, 2495-2502.
- Moynagh, P.N., Williams, D.C., et O'Neill, L.A. (1994) Activation of NF-kappa B and induction of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 expression in human glial cells by IL-1. Modulation by antioxidants. *J Immunol* **153**, 2681-2690.
- Mukaida, N., Mahe, Y., et Matsushima, K. (1990) Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* **265**, 21128-21133.
- Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T., et Matsushima, K. (1994a) Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* **269**, 13289-13295.
- Mukaida, N., Okamoto, S., Ishikawa, Y., et Matsushima, K. (1994b) Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* **56**, 554-558.
- Mukaida, N., Shiroo, M., et Matsushima, K. (1989) Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* **143**, 1366-1371.
- Muller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L., et Harrison, S.C. (1995) Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* **373**, 311-317.
- Munshi, N., Agaloti, T., Lomvardas, S., Merika, M., Chen, G., et Thanos, D. (2001) Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation. *Science* **293**, 1133-1136.



- Murphy, P.M. (1994) The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* **12**, 593-633.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., et Power, C.A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 145-176.
- Muta, T., Yamazaki, S., Eto, A., Motoyama, M., et Takeshige, K. (2003) IkappaB-zeta, a new anti-inflammatory nuclear protein induced by lipopolysaccharide, is a negative regulator for nuclear factor-kappaB. *J Endotoxin Res* **9**, 187-191.
- Naccache, P.H., et Sha'afi, R.I. (1983) Arachidonic acid, leukotriene B4, and neutrophil activation. *Ann N Y Acad Sci* **414**, 125-139.
- Nacken, W., Lekstrom-Himes, J.A., Sorg, C., et Manitz, M.P. (2001) Molecular analysis of the mouse S100A9 gene and evidence that the myeloid specific transcription factor C/EBPepsilon is not required for the regulation of the S100A9/A8 gene expression in neutrophils. *J Cell Biochem* **80**, 606-616.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**, 173-182.
- Naumann, M., Wulczyn, F.G., et Scheidereit, C. (1993) The NF-kappa B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I kappa B molecules and control nuclear translocation of NF-kappa B. *Embo J* **12**, 213-222.
- Nauseef, W.M. (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* **219**, 88-102.
- Nemeth, Z.H., Deitch, E.A., Szabo, C., et Hasko, G. (2002) Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* **161**, 987-996.
- Nesin, M., et Cunningham-Rundles, S. (2000) Cytokines and neonates. *Am J Perinatol* **17**, 393-404.
- Nick, J.A., Avdi, N.J., Young, S.K., Knall, C., Gerwins, P., Johnson, G.L., et 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.
- Nicosia, S., Capra, V., et Rovati, G.E. (2001) Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulm Pharmacol Ther* **14**, 3-19.

- Niino, H., Otsuka, T., Izuhara, K., Yamaoka, K., Ohshima, K., Tanabe, T., Hara, S., Nemoto, Y., Tanaka, Y., Nakashima, H., *et al.* (1997) Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* **89**, 1621-1628.
- Nikolajczyk, B. (2006) Regulation of cytokine transcription in the context of chromatin. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **54**, 299-305.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kajino, T., Ono, K., Ohtomo, T., Matsumoto, M., Shiina, M., Mihara, M., Tsuchiya, M., et Matsumoto, K. (2003) A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* **278**, 18485-18490.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., et 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.
- Norel, X., et Brink, C. (2004) The quest for new cysteinyl-leukotriene and lipoxin receptors: recent clues. *Pharmacol Ther* **103**, 81-94.
- O'Donnell, V.B., Spycher, S., et Azzi, A. (1995) Involvement of oxidants and oxidant-generating enzyme(s) in tumour-necrosis-factor-alpha-mediated apoptosis: role for lipoxygenase pathway but not mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* **310** (Pt 1), 133-141.
- O'Flaherty, J.T., Wykle, R.L., Miller, C.H., Lewis, J.C., Waite, M., Bass, D.A., McCall, C.E., et DeChatelet, L.R. (1981) 1-O-Alkyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholines: a novel class of neutrophil stimulants. *Am J Pathol* **103**, 70-78.
- Oehler, L., Majdic, O., Pickl, W.F., Stockl, J., Riedl, E., Drach, J., Rappersberger, K., Geissler, K., et Knapp, W. (1998) Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J Exp Med* **187**, 1019-1028.
- Ogawa, Y., Kobayashi, T., Nishioka, A., Kariya, S., Hamasato, S., Seguchi, H., et Yoshida, S. (2003) Radiation-induced oxidative DNA damage, 8-oxoguanine, in human peripheral T cells. *Int J Mol Med* **11**, 27-32.
- Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N., et Matsushima, K. (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* **9**, 617-648.
- Oulhen, N., Morales, J., Cosson, B., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., et Cormier, P. (2007) [Gene expression regulation at the translational level: contribution of marine organisms]. *J Soc Biol* **201**, 297-306.

- Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866.
- Palic, D., Andreasen, C.B., Ostojic, J., Tell, R.M., et Roth, J.A. (2007) Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J Immunol Methods* **319**, 87-97.
- Palmblad, J., Malmsten, C.L., Uden, A.M., Radmark, O., Engstedt, L., et Samuelsson, B. (1981) Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood* **58**, 658-661.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., et Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**, 773-785.
- Pantopoulos, K., et Hentze, M.W. (1995) Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1267-1271.
- Park, G.Y., Wang, X., Hu, N., Pedchenko, T.V., Blackwell, T.S., et Christman, J.W. (2006) NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKKalpha. *J Biol Chem* **281**, 18684-18690.
- Park, K.J., Krishnan, V., O'Malley, B.W., Yamamoto, Y., et Gaynor, R.B. (2005) Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* **18**, 71-82.
- Patat, S.A., Carnegie, R.B., Kingsbury, C., Gross, P.S., Chapman, R., and Schey, K.L. (2004) Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur J Biochem* **271**, 4825-4833.
- Pedruzzi, E., Fay, M., Elbim, C., Gaudry, M., et Gougerot-Pocidal, M.A. (2002) Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Haematol* **117**, 719-726.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**, 921-926.
- Perkins, N.D. (2006) Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* **25**, 6717-6730.

- Perkins, N.D., Felzien, L.K., Betts, J.C., Leung, K., Beach, D.H., et Nabel, G.J. (1997) Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* **275**, 523-527.
- Perry, A.K., Chow, E.K., Goodnough, J.B., Yeh, W.C., et Cheng, G. (2004) Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1651-1658.
- Pessach, I., et Levy, R. (2000) The NADPH oxidase diaphorase activity in permeabilized human neutrophils and granulocytic like PLB-985 cells. *Adv Exp Med Biol* **479**, 107-114.
- Peters, R.T., Liao, S.M., et Maniatis, T. (2000) IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell* **5**, 513-522.
- Peters, R.T., et Maniatis, T. (2001) A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta* **1471**, M57-62.
- Petrin, D., Turcotte, S., Gilbert, A.K., Rola-Pleszczynski, M., et 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.
- Pétrin, D. (2004) Retardement de l'apoptose des neutrophiles humains par le leucotriène B<sub>4</sub> et la dexaméthasone : mécanismes moléculaires. *Mémoire, M.Sc. en Immunologie, Université de Sherbrooke*.
- Pickart, C.M. (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell* **116**, 181-190.
- Pierce, J.W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S.A., Collins, T., and Gerritsen, M.E. (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* **272**, 21096-21103.
- Pierrat, O.A., Mikitova, V., Bush, M.S., Browning, K.S., et Doonan, J.H. (2007) Control of protein translation by phosphorylation of the mRNA 5'-cap-binding complex. *Biochem Soc Trans* **35**, 1634-1637.
- Pietarinen-Runtti, P., Lakari, E., Raivio, K.O., et Kinnula, V.L. (2000) Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C118-125.
- Pomerantz, J.L., et Baltimore, D. (1999) NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* **18**, 6694-6704.

- Pouliot, M., Fiset, M.E., Masse, M., Naccache, P.H., et Borgeat, P. (2002) Adenosine up-regulates cyclooxygenase-2 in human granulocytes: impact on the balance of eicosanoid generation. *J Immunol* **169**, 5279-5286.
- Pouliot, M., Gilbert, C., Borgeat, P., Poubelle, P.E., Bourgoin, S., Creminon, C., Maclouf, J., McColl, S.R., et Naccache, P.H. (1998) Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. *Faseb J* **12**, 1109-1123.
- Pouliot, M., McDonald, P.P., Borgeat, P., et McColl, S.R. (1994a) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates the expression of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in human neutrophils. *J Exp Med* **179**, 1225-1232.
- Pouliot, M., McDonald, P.P., Khamzina, L., Borgeat, P., et McColl, S.R. (1994b) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances 5-lipoxygenase levels in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* **152**, 851-858.
- Pouliot, M., McDonald, P.P., Krump, E., Mancini, J.A., McColl, S.R., Weech, P.K., et Borgeat, P. (1996) Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur J Biochem* **238**, 250-258.
- Prajapati, S., Verma, U., Yamamoto, Y., Kwak, Y.T., et Gaynor, R.B. (2004) Protein phosphatase 2C $\beta$  association with the I $\kappa$ B kinase complex is involved in regulating NF- $\kappa$ B activity. *J Biol Chem* **279**, 1739-1746.
- Proost, P., Wuyts, A., et van Damme, J. (1996) The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res* **26**, 211-223.
- Quirling, M., Page, S., Jilg, N., Plenagl, K., Peus, D., Grubmuller, C., Weingartner, M., Fischer, C., Neumeier, D., and Brand, K. (2004) Detection of IKK $\beta$ -IKK $\gamma$  subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. *J Biol Chem* **279**, 37452-37460.
- Radmark, O., Shimizu, T., Jornvall, H., et Samuelsson, B. (1984) Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. *J Biol Chem* **259**, 12339-12345.
- Radsak, M., Iking-Konert, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., et Hansch, G.M. (2000) Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* **101**, 521-530.
- Regnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z., et Rothe, M. (1997) Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell* **90**, 373-383.

- Reid, G.K., Kargman, S., Vickers, P.J., Mancini, J.A., Leveille, C., Ethier, D., Miller, D.K., Gillard, J.W., Dixon, R.A., et Evans, J.F. (1990) Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J Biol Chem* **265**, 19818-19823.
- Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E., et Sun, S.C. (2005) Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* **25**, 3886-3895.
- Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R., et Kang, S.W. (2003) Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* **14**, S211-215.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S., et Woo, H.A. (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 183-189.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Moniz-de-Souza, M.C., Alexandre-Moreira, M.S., Dias, W.B., Lopes, M.F., Nunes, M.P., Lungarella, G., et DosReis, G.A. (2007) Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol* **179**, 3988-3994.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Moniz-de-Souza, M.C., Borges, V.M., Nunes, M.P., Mantuano-Barradas, M., D'Avila, H., Bozza, P.T., Calich, V.L., et DosReis, G.A. (2005) Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. *J Infect Dis* **192**, 1127-1134.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Otero, A.C., Gomes, N.A., Moniz-De-Souza, M.C., Cysne-Finkelstein, L., Arnholdt, A.C., Calich, V.L., Coutinho, S.G., Lopes, M.F., et DosReis, G.A. (2004) Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* **172**, 4454-4462.
- Richard, M., Louahed, J., Demoulin, J.B., et Renauld, J.C. (1999) Interleukin-9 regulates NF-kappaB activity through BCL3 gene induction. *Blood* **93**, 4318-4327.
- Richards, R.C., O'Neil, D.B., Thibault, P., and Ewart, K.V. (2001) Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 549-555.
- Richmond, A. (2002) Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* **2**, 664-674.
- Roberge, C.J., McColl, S.R., Larochelle, B., et Gosselin, J. (1998) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances EBV-induced synthesis of chemotactic factors in human neutrophils. *J Immunol* **160**, 2442-2448.

- Rodriguez, M.S., Thompson, J., Hay, R.T., et Dargemont, C. (1999) Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* **274**, 9108-9115.
- Rola-Pleszczynski, M., et Stankova, J. (1992) Differentiation-dependent modulation of TNF production by PAF in human HL-60 myeloid leukemia cells. *J Leukoc Biol* **51**, 609-616.
- Rollins, B.J. (1997) Chemokines. *Blood* **90**, 909-928.
- Roos, D., de Boer, M., Kuribayashi, F., Meischl, C., Weening, R.S., Segal, A.W., Ahlin, A., Nemet, K., Hossle, J.P., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., et al. (1996) Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Blood* **87**, 1663-1681.
- Roos, D., van Bruggen, R., et Meischl, C. (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* **5**, 1307-1315.
- Rose, F.R., Bailey, K., Keyte, J.W., Chan, W.C., Greenwood, D., and Mahida, Y.R. (1998) Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* **66**, 3255-3263.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., et Santoro, M.G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403**, 103-108.
- Rossi, D., et Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-242.
- Rothwarf, D.M., et Karin, M. (1999) The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* **1999**, RE1.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., et Karin, M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* **395**, 297-300.
- Royall, J.A., Gwin, P.D., Parks, D.A., et Freeman, B.A. (1992) Responses of vascular endothelial oxidant metabolism to lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha. *Arch Biochem Biophys* **294**, 686-694.
- Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J., et Mak, T.W. (2000) Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev* **14**, 854-862.
- Sabroe, I., Prince, L.R., Jones, E.C., Horsburgh, M.J., Foster, S.J., Vogel, S.N., Dower, S.K., et Whyte, M.K. (2003) Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and

- TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* **170**, 5268-5275.
- Saccani, S., Pantano, S., et Natoli, G. (2002) p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol* **3**, 69-75.
- Saccani, S., Pantano, S., et Natoli, G. (2003) Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell* **11**, 1563-1574.
- Saffar, A.S., Dragon, S., Ezzati, P., Shan, L., et Gounni, A.S. (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase regulate induction of Mcl-1 and survival in glucocorticoid-treated human neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* **121**, 492-498 e410.
- Safwat, N., Ninomiya-Tsuji, J., Gore, A.J., et Miller, W.L. (2005) Transforming growth factor beta-activated kinase 1 is a key mediator of ovine follicle-stimulating hormone beta-subunit expression. *Endocrinology* **146**, 4814-4824.
- Sakaguchi, H., Seki, S., Tsubouchi, H., Daikuhara, Y., Niitani, Y., et Kobayashi, K. (1994) Ultrastructural location of human hepatocyte growth factor in human liver. *Hepatology* **19**, 1157-1163.
- Sakamoto, C., Suzuki, K., Hato, F., Akahori, M., Hasegawa, T., Hino, M., et Kitagawa, S. (2003) Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway. *Int J Hematol* **77**, 60-70.
- Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., et Toriumi, W. (1999a) IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* **274**, 30353-30356.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Toriumi, W., et Sugita, T. (1999b) 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., et 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.
- Samanta, A.K., Huang, H.J., Bast, R.C., Jr., et Liao, W.S. (2004) Overexpression of MEKK3 confers resistance to apoptosis through activation of NFkappaB. *J Biol Chem* **279**, 7576-7583.



- Sandilands, G.P., Ahmed, Z., Perry, N., Davison, M., Lupton, A., et Young, B. (2005) Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology* **114**, 354-368.
- Sandilands, G.P., Hauffe, B., Loudon, E., Marsh, A.G., Gondowidjojo, A., Campbell, C., Ferrier, R.K., et Rodie, M.E. (2003) Detection of cytoplasmic CD antigens within normal human peripheral blood leucocytes. *Immunology* **108**, 329-337.
- Sandilands, G.P., McCrae, J., Hill, K., Perry, M., et Baxter, D. (2006) Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on in vitro and in vivo activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology* **119**, 562-571.
- Sanz, L., Diaz-Meco, M.T., Nakano, H., et Moscat, J. (2000) The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *Embo J* **19**, 1576-1586.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., et Akira, S. (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**, 1087-1095.
- Savill, J. (1997) Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* **61**, 375-380.
- Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., et Haslett, C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* **83**, 865-875.
- Scapini, P., Calzetti, F., et Cassatella, M.A. (1999) On the detection of neutrophil-derived vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Immunol Methods* **232**, 121-129.
- Scapini, P., Carletto, A., Nardelli, B., Calzetti, F., Roschke, V., Merigo, F., Tamassia, N., Pieropan, S., Biasi, D., Sbarbati, A., et al. (2005) Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood* **105**, 830-837.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., et Cassatella, M.A. (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* **177**, 195-203.
- Scapini, P., Laudanna, C., Pinardi, C., Allavena, P., Mantovani, A., Sozzani, S., et Cassatella, M.A. (2001) Neutrophils produce biologically active macrophage

- inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol* **31**, 1981-1988.
- Scherer, D.C., Brockman, J.A., Chen, Z., Maniatis, T., et Ballard, D.W. (1995) Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11259-11263.
- Schmidt, K.N., Traenckner, E.B., Meier, B., et Baeuerle, P.A. (1995) Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* **270**, 27136-27142.
- Schmitz, M.L., Bacher, S., et Kracht, M. (2001) I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci* **26**, 186-190.
- Schmitz, M.L., Stelzer, G., Altmann, H., Meisterernst, M., et Baeuerle, P.A. (1995) Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF-kappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators. *J Biol Chem* **270**, 7219-7226.
- Schoonbroodt, S., et Piette, J. (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem Pharmacol* **60**, 1075-1083.
- Schreck, R., Albermann, K., et Baeuerle, P.A. (1992a) Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* **17**, 221-237.
- Schreck, R., Meier, B., Mannel, D.N., Droge, W., et Baeuerle, P.A. (1992b) Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* **175**, 1181-1194.
- Schreck, R., Rieber, P., et Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* **10**, 2247-2258.
- Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., et Verma, I.M. (1996) Constitutive phosphorylation of IkappaBalpha by casein kinase II occurs preferentially at serine 293: requirement for degradation of free IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* **16**, 3554-3559.
- Sebban, H., Yamaoka, S., et Courtois, G. (2006) Posttranslational modifications of NEMO and its partners in NF-kappaB signaling. *Trends Cell Biol* **16**, 569-577.
- Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**, 197-223.
- Sen, R., et Baltimore, D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716.

- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., *et al.* (2001) Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-1499.
- Sengelov, H., Boulay, F., Kjeldsen, L., et Borregaard, N. (1994a) Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J* **299 ( Pt 2)**, 473-479.
- Sengelov, H., Kjeldsen, L., Diamond, M.S., Springer, T.A., et 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., et Borregaard, N. (1994b) Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J Immunol* **153**, 804-810.
- Shambharkar, P.B., Blonska, M., Pappu, B.P., Li, H., You, Y., Sakurai, H., Darnay, B.G., Hara, H., Penninger, J., et Lin, X. (2007) Phosphorylation and ubiquitination of the IkappaB kinase complex by two distinct signaling pathways. *Embo J* **26**, 1794-1805.
- Shen, Q., Chada, S., Whitney, C., et Newburger, P.E. (1994) Regulation of the human cellular glutathione peroxidase gene during in vitro myeloid and monocytic differentiation. *Blood* **84**, 3902-3908.
- Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., et Collins, T. (1999) Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* **19**, 6367-6378.
- Shi, C.S., et Kehrl, J.H. (2003) Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J Biol Chem* **278**, 15429-15434.
- Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E., et Matsumoto, K. (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* **272**, 1179-1182.
- Shim, J.H., Xiao, C., Paschal, A.E., Bailey, S.T., Rao, P., Hayden, M.S., Lee, K.Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., *et al.* (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* **19**, 2668-2681.

- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., et Akira, S. (1999) IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* **11**, 1357-1362.
- Shinkura, R., Kitada, K., Matsuda, F., Tashiro, K., Ikuta, K., Suzuki, M., Kogishi, K., Serikawa, T., et Honjo, T. (1999) Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf-kappa b-inducing kinase. *Nat Genet* **22**, 74-77.
- Shinohara, H., Yasuda, T., Aiba, Y., Sanjo, H., Hamadate, M., Watarai, H., Sakurai, H., et Kurosaki, T. (2005) PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J Exp Med* **202**, 1423-1431.
- Shirafuji, N., Matsuda, S., Ogura, H., Tani, K., Kodo, H., Ozawa, K., Nagata, S., Asano, S., et Takaku, F. (1990) Granulocyte colony-stimulating factor stimulates human mature neutrophilic granulocytes to produce interferon-alpha. *Blood* **75**, 17-19.
- Shrivastava, A., et Aggarwal, B.B. (1999) Antioxidants differentially regulate activation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, c-jun amino-terminal kinases, and apoptosis induced by tumor necrosis factor: evidence that JNK and NF-kappa B activation are not linked to apoptosis. *Antioxid Redox Signal* **1**, 181-191.
- Shuai, K., et Liu, B. (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* **3**, 900-911.
- Siebenlist, U., Brown, K., et Claudio, E. (2005) Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* **5**, 435-445.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., et Brown, K. (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 405-455.
- Sil, A.K., Maeda, S., Sano, Y., Roop, D.R., et Karin, M. (2004) IkappaB kinase-alpha acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature* **428**, 660-664.
- Silva, M.T., Silva, M.N., et Appelberg, R. (1989) Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. *Microb Pathog* **6**, 369-380.
- Silverman, N., et Maniatis, T. (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* **15**, 2321-2342.
- Simmons, D.L., Botting, R.M., et Hla, T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* **56**, 387-437.
- Simmons, P.M., Salmon, J.A., et Moncada, S. (1983) The release of leukotriene B4 during experimental inflammation. *Biochem Pharmacol* **32**, 1353-1359.

- Sisson, J.H., Prescott, S.M., McIntyre, T.M., et Zimmerman, G.A. (1987) Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B4 metabolism. *J Immunol* **138**, 3918-3926.
- Sizemore, N., Agarwal, A., Das, K., Lerner, N., Sulak, M., Rani, S., Ransohoff, R., Shultz, D., et Stark, G.R. (2004) Inhibitor of kappaB kinase is required to activate a subset of interferon gamma-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7994-7998.
- Skubitz, K. (2003) Neutrophilic leukocytes. In *Wintrobe's Clinical Hematology*. G. F. L. R. P. G. . éd. Lippincott Williams & Wilkins, New York, Vol.1, p. 267.
- Smale, S.T., et Fisher, A.G. (2002) Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu Rev Immunol* **20**, 427-462.
- Smith, M.J., Ford-Hutchinson, A.W., et Bray, M.A. (1980) Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J Pharm Pharmacol* **32**, 517-518.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., et Garavito, R.M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145-182.
- Smith, W.L., Borgeat, P., et Fitzpatrick, F. A. (1991) The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Vance, D. E., and Vance, J., eds), Elsevier, New York, p. 297-325
- Smith, W.L., Garavito, R.M., et DeWitt, D.L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **271**, 33157-33160.
- Spagnuolo, P.J., Ellner, J.J., Hassid, A., et Dunn, M.J. (1980) Thromboxane A2 mediates augmented polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *J Clin Invest* **66**, 406-414.
- Spagnuolo, P.J., Ellner, J.J., Hassid, A., et Dunn, M.J. (1988) Mediation of augmented monocyte adhesiveness by thromboxane. *Inflammation* **12**, 1-9.
- St-Onge, M., Flamand, N., Biarc, J., Picard, S., Bouchard, L., Dussault, A.A., Laflamme, C., James, M.J., Caughey, G.E., Cleland, L.G., et al. (2007) Characterization of prostaglandin E2 generation through the cyclooxygenase (COX)-2 pathway in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 1235-1245.
- Stankova, J., Turcotte, S., Harris, J., et Rola-Pleszczynski, M. (2002) Modulation of leukotriene B4 receptor-1 expression by dexamethasone: potential mechanism for enhanced neutrophil survival. *J Immunol* **168**, 3570-3576.

- Stein, B., et Baldwin, A.S., Jr. (1993) Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **13**, 7191-7198.
- Steinbeck, M.J., Khan, A.U., et Karnovsky, M.J. (1992) Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem* **267**, 13425-13433.
- Steinbeck, M.J., Khan, A.U., et Karnovsky, M.J. (1993) Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J Biol Chem* **268**, 15649-15654.
- Strahl, B.D., et Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Strassheim, D., Asehnoune, K., Park, J.S., Kim, J.Y., He, Q., Richter, D., Mitra, S., Arcaroli, J., Kuhn, K., and Abraham, E. (2004) Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: disparate effects on kinases, NF-kappaB, and cytokine expression. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C683-692.
- Sugita, N., Kimura, A., Matsuki, Y., Yamamoto, T., Yoshie, H., et Hara, K. (1998) Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation* **22**, 253-267.
- Sun, L., et Chen, Z.J. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 119-126.
- Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P., et Chen, Z.J. (2004) The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* **14**, 289-301.
- Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., et Greene, W.C. (1993) NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**, 1912-1915.
- Sunil, V.R., Connor, A.J., Lavnikova, N., Gardner, C.R., Laskin, J.D., et Laskin, D.L. (2002) Acute endotoxemia prolongs the survival of rat lung neutrophils in response to 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate. *J Cell Physiol* **190**, 382-389.
- Suyang, H., Phillips, R., Douglas, I., et Ghosh, S. (1996) Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **16**, 5444-5449.

- Taichman, N.S., Young, S., Cruchley, A.T., Taylor, P., et Paleolog, E. (1997) Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* **62**, 397-400.
- Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., et 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., et Gaynor, R.B. (2003) TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol* **326**, 105-115.
- Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N., et Akira, S. (1999) Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* **284**, 313-316.
- Tallmadge, R.L., Lear, T.L., Johnson, A.K., Guerin, G., Millon, L.V., Carpenter, S.L., et Antczak, D.F. (2003) Characterization of the beta2-microglobulin gene of the horse. *Immunogenetics* **54**, 725-733.
- Tam, W.F., Lee, L.H., Davis, L., et Sen, R. (2000) Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* **20**, 2269-2284.
- Tamassia, N., Le Moigne, V., Calzetti, F., Donini, M., Gasperini, S., Ear, T., Cloutier, A., Martinez, F.O., Fabbri, M., Locati, M., et al. (2007) The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J Immunol* **178**, 7344-7356.
- Tan, B.H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M.T., Krutzik, S.R., Bloom, B.R., Ganz, T., Modlin, R.L., et al. (2006) Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol* **177**, 1864-1871.
- Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L., et Goeddel, D.V. (1999) Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* **10**, 421-429.
- Tang, E.D., Wang, C.Y., Xiong, Y., et Guan, K.L. (2003) A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **278**, 37297-37305.

- Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., et Kelvin, D.J. (1993) Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* **260**, 355-358.
- Taub, D.D., et Oppenheim, J.J. (1994) Chemokines, inflammation and the immune system. *The Immunol* **1**, 229-246.
- Tenoever, B.R., Ng, S.L., Chua, M.A., McWhirter, S.M., Garcia-Sastre, A., et Maniatis, T. (2007) Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science* **315**, 1274-1278.
- Theilgaard-Monch, K., Jacobsen, L.C., Borup, R., Rasmussen, T., Bjerregaard, M.D., Nielsen, F.C., Cowland, J.B., et Borregaard, N. (2005) The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood* **105**, 1785-1796.
- Theilgaard-Monch, K., Porse, B.T., et Borregaard, N. (2006) Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol* **18**, 54-60.
- Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et Ghosh, S. (1995) I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* **80**, 573-582.
- Tiku, K., Tiku, M.L., Liu, S., et Skosey, J.L. (1986a) Normal human neutrophils are a source of a specific interleukin 1 inhibitor. *J Immunol* **136**, 3686-3692.
- Tiku, K., Tiku, M.L., et Skosey, J.L. (1986b) Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* **136**, 3677-3685.
- Timmers, H.T., Pronk, G.J., Bos, J.L., et van der Eb, A.J. (1990) Analysis of the rat JE gene promoter identifies an AP-1 binding site essential for basal expression but not for TPA induction. *Nucleic Acids Res* **18**, 23-34.
- Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., et al. (2000) NAK is an IkkappaB kinase-activating kinase. *Nature* **404**, 778-782.
- Tolone, G., Bonasera, L., Brai, M., et Tolone, C. (1977) Prostaglandin production by human polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis in vitro. *Experientia* **33**, 961-962.
- Tonks, N.K. (2005) Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* **121**, 667-670.
- Townsend, M.J., et McKenzie, A.N. (2000) Unravelling the net ? cytokines and diseases. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3549-3550.



- Tracy, R.P. (2006) The five cardinal signs of inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**, 1051-1052.
- Traenckner, E.B., et Baeuerle, P.A. (1995) Appearance of apparently ubiquitin-conjugated I kappa B-alpha during its phosphorylation-induced degradation in intact cells. *J Cell Sci Suppl* **19**, 79-84.
- Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S., et Baeuerle, P.A. (1995) Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* **14**, 2876-2883.
- Tran, K., Merika, M., et Thanos, D. (1997) Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Mol Cell Biol* **17**, 5386-5399.
- Trinchieri, G. (1998) Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* **70**, 83-243.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P., et Hansen, J.C. (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **18**, 4629-4638.
- Tucker, K.A., Lilly, M.B., Heck, L., Jr., et Rado, T.A. (1987) Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* **70**, 372-378.
- Udalova, I.A., Mott, R., Field, D., et Kwiatkowski, D. (2002) Quantitative prediction of NF-kappa B DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8167-8172.
- Ueda, A., Ishigatsubo, Y., Okubo, T., et Yoshimura, T. (1997) Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J Biol Chem* **272**, 31092-31099.
- Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., et Zychlinsky, A. (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* **8**, 668-676.
- van Gisbergen, K.P., Geijtenbeek, T.B., et van Kooyk, Y. (2005a) Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol* **26**, 626-631.
- van Gisbergen, K.P., Ludwig, I.S., Geijtenbeek, T.B., et van Kooyk, Y. (2005b) Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett* **579**, 6159-6168.

- van Gisbergen, K.P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B., et van Kooyk, Y. (2005c) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* **201**, 1281-1292.
- Van Heerebeek, L., Meischl, C., Stooker, W., Meijer, C.J., Niessen, H.W., et Roos, D. (2002) NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol* **55**, 561-568.
- Vancurova, I., Miskolci, V., et Davidson, D. (2001) NF-kappa B activation in tumor necrosis factor alpha-stimulated neutrophils is mediated by protein kinase Cdelta. Correlation to nuclear Ikappa Balpha. *J Biol Chem* **276**, 19746-19752.
- Vane, J.R., et Botting, R.M. (1996) Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol Suppl* **102**, 9-21.
- Verbeek, W., Lekstrom-Himes, J., Park, D.J., Dang, P.M., Vuong, P.T., Kawano, S., Babior, B.M., Xanthopoulos, K., et Koeffler, H.P. (1999) Myeloid transcription factor C/EBPepsilon is involved in the positive regulation of lactoferrin gene expression in neutrophils. *Blood* **94**, 3141-3150.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., et Miyamoto, S. (1995) Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* **9**, 2723-2735.
- Verma, U.N., Yamamoto, Y., Prajapati, S., et Gaynor, R.B. (2004) Nuclear role of I kappa B Kinase-gamma/NF-kappa B essential modulator (IKK gamma/NEMO) in NF-kappa B-dependent gene expression. *J Biol Chem* **279**, 3509-3515.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., et Haegeman, G. (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* **22**, 1313-1324.
- Viatour, P., Merville, M.P., Bours, V., et Chariot, A. (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* **30**, 43-52.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., et Grinstein, S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* **366**, 689-704.
- Vollebregt, M., Hampton, M.B., et Winterbourn, C.C. (1998) Activation of NF-kappaB in human neutrophils during phagocytosis of bacteria independently of oxidant generation. *FEBS Lett* **432**, 40-44.
- Wagner, J.G., et Roth, R.A. (2000) Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* **52**, 349-374.

- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., et Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351.
- Wang, D., et Baldwin, A.S., Jr. (1998) Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* **273**, 29411-29416.
- Wang, D., Westerheide, S.D., Hanson, J.L., et Baldwin, A.S., Jr. (2000) Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* **275**, 32592-32597.
- Wang, S., Zhang, J., Zhang, Y., Kern, S., et Danner, R.L. (2008) Nitric oxide-p38 MAPK signaling stabilizes mRNA through AU-rich element-dependent and -independent mechanisms. *J Leukoc Biol* **83**, 982-990.
- Wang, W., Zhou, G., Hu, M.C., Yao, Z., et Tan, T.H. (1997) Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J Biol Chem* **272**, 22771-22775.
- Ward, C., Chilvers, E.R., Lawson, M.F., Pryde, J.G., Fujihara, S., Farrow, S.N., Haslett, C., et Rossi, A.G. (1999) NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem* **274**, 4309-4318.
- Webb, N.J., Myers, C.R., Watson, C.J., Bottomley, M.J., et Brenchley, P.E. (1998) Activated human neutrophils express vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cytokine* **10**, 254-257.
- Weih, F., et Caamano, J. (2003) Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol Rev* **195**, 91-105.
- Weiss, S.J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**, 365-376.
- Weiss, S.J., Test, S.T., Eckmann, C.M., Roos, D., et Regiani, S. (1986) Brominating oxidants generated by human eosinophils. *Science* **234**, 200-203.
- Wentworth, P., Jr., McDunn, J.E., Wentworth, A.D., Takeuchi, C., Nieva, J., Jones, T., Bautista, C., Ruedi, J.M., Gutierrez, A., Janda, K.D., et al. (2002) Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science* **298**, 2195-2199.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., et al. (2004) De-ubiquitination and

- ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**, 694-699.
- Wessells, J., Baer, M., Young, H.A., Claudio, E., Brown, K., Siebenlist, U., et Johnson, P.F. (2004) BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J Biol Chem* **279**, 49995-50003.
- Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R., et Israel, A. (1997) I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* **16**, 1413-1426.
- Wilkinson, P.C. (1974) Chemotaxis and inflammation. *J. & A. Churchill London*.
- Willems, J., Joniau, M., Cinque, S., et van Damme, J. (1989) Human granulocyte chemotactic peptide (IL-8) as a specific neutrophil degranulator: comparison with other monokines. *Immunology* **67**, 540-542.
- Wimley, W.C., Selsted, M.E., et White, S.H. (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* **3**, 1362-1373.
- Windheim, M., Lang, C., Peggie, M., Plater, L.A., et Cohen, P. (2007) Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem J* **404**, 179-190.
- Wink, D.A., Nims, R.W., Saavedra, J.E., Utermahlen, W.E., Jr., et Ford, P.C. (1994) The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6604-6608.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., et Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**, 617-653.
- Wittamer, V., Bondue, B., Guillabert, A., Vassart, G., Parmentier, M., et Communi, D. (2005) Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J Immunol* **175**, 487-493.
- Wolf, H.K., Zarnegar, R., et Michalopoulos, G.K. (1991) Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: an immunohistochemical study. *Hepatology* **14**, 488-494.
- Woodman, R.C., Johnston, B., Hickey, M.J., Teoh, D., Reinhardt, P., Poon, B.Y., et Kubes, P. (1998) The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *J Exp Med* **188**, 2181-2186.

- Woods, J.W., Evans, J.F., Ethier, D., Scott, S., Vickers, P.J., Hearn, L., Heibin, J.A., Charleson, S., et Singer, II (1993) 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med* **178**, 1935-1946.
- Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., et Goeddel, D.V. (1997) IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* **278**, 866-869.
- Wu, C., et Ghosh, S. (2003) Differential phosphorylation of the signal-responsive domain of I kappa B alpha and I kappa B beta by I kappa B kinases. *J Biol Chem* **278**, 31980-31987.
- Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M., et Ashwell, J.D. (2006a) Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* **8**, 398-406.
- Wu, Z.H., Mabb, A., et Miyamoto, S. (2005) PIDD: a switch hitter. *Cell* **123**, 980-982.
- Wu, Z.H., Shi, Y., Tibbetts, R.S., et Miyamoto, S. (2006b) Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* **311**, 1141-1146.
- Wulczyn, F.G., Naumann, M., et Scheidereit, C. (1992) Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *Nature* **358**, 597-599.
- Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G.R., et Karin, M. (2000) MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5243-5248.
- Xiao, G., Harhaj, E.W., et Sun, S.C. (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* **7**, 401-409.
- Xu, N., Chen, C.Y., et Shyu, A.B. (2001) Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol* **21**, 6960-6971.
- Xu, X., Prorock, C., Ishikawa, H., Maldonado, E., Ito, Y., et Gelinas, C. (1993) Functional interaction of the v-Rel and c-Rel oncoproteins with the TATA-binding protein and association with transcription factor IIB. *Mol Cell Biol* **13**, 6733-6741.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., et 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, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., *et al.* (2004) Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* **430**, 218-222.
- Yamamoto, Y., et Gaynor, R.B. (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* **107**, 135-142.
- Yamamoto, Y., et Gaynor, R.B. (2004) IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* **29**, 72-79.
- Yamamoto, Y., Verma, U.N., Prajapati, S., Kwak, Y.T., et Gaynor, R.B. (2003) Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* **423**, 655-659.
- Yamashiro, S., Wang, J.M., Yang, D., Gong, W.H., Kamohara, H., and Yoshimura, T. (2000) Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils. *Blood* **96**, 3958-3963.
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T.J., et Ellison, R.T., 3rd (1993) Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* **61**, 719-728.
- Yamazaki, S., Muta, T., et Takeshige, K. (2001) A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem* **276**, 27657-27662.
- Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., et Oppenheim, J.J. (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* **68**, 9-14.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., et Su, B. (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* **2**, 620-624.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., et Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324.
- Yao, J., Kim, T.W., Qin, J., Jiang, Z., Qian, Y., Xiao, H., Lu, Y., Qian, W., Gulen, M.F., Sizemore, N., *et al.* (2007) Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent Versus

MEKK3-dependent NFkappaB activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification. *J Biol Chem* **282**, 6075-6089.

- Yasumoto, K., Okamoto, S., Mukaida, N., Murakami, S., Mai, M., et Matsushima, K. (1992) Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* **267**, 22506-22511.
- Yeaman, G.R., Collins, J.E., Currie, J.K., Guyre, P.M., Wira, C.R., et Fanger, M.W. (1998) IFN-gamma is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* **160**, 5145-5153.
- Yin, L., Wu, L., Wesche, H., Arthur, C.D., White, J.M., Goeddel, D.V., et Schreiber, R.D. (2001) Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* **291**, 2162-2165.
- Yokomizo, T., Izumi, T., et Shimizu, T. (2001) Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys* **385**, 231-241.
- Yoshida, H., Jono, H., Kai, H., et Li, J.D. (2005) The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 AND TRAF7. *J Biol Chem* **280**, 41111-41121.
- Yu, C.L., Huang, M.H., Kung, Y.Y., Tsai, C.Y., Tsai, Y.Y., Tsai, S.T., Huang, D.F., Sun, K.H., Han, S.H., et Yu, H.S. (1998) Interleukin-13 increases prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. *Inflamm Res* **47**, 167-173.
- Yu, L., Cross, A.R., Zhen, L., et Dinauer, M.C. (1999) Functional analysis of NADPH oxidase in granulocytic cells expressing a delta488-497 gp91(phox) deletion mutant. *Blood* **94**, 2497-2504.
- Yujiri, T., Ware, M., Widmann, C., Oyer, R., Russell, D., Chan, E., Zaitsev, Y., Clarke, P., Tyler, K., Oka, Y., et al. (2000) MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7272-7277.
- Zabel, U., et Baeuerle, P.A. (1990) Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* **61**, 255-265.

- Zandi, E., Chen, Y., et Karin, M. (1998) Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science* **281**, 1360-1363.
- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., et 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.
- Zavrski, I., Krebbel, H., Wildemann, B., Heider, U., Kaiser, M., Possinger, K., et Sezer, O. (2005) Proteasome inhibitors abrogate osteoclast differentiation and osteoclast function. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 200-205.
- Zhao, Q., et Lee, F.S. (1999) Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* **274**, 8355-8358.
- Zhen, L., King, A.A., Xiao, Y., Chanock, S.J., Orkin, S.H., et Dinauer, M.C. (1993) Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9832-9836.
- Zhong, H., Voll, R.E., et Ghosh, S. (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* **1**, 661-671.
- Zlotnik, A., et Yoshie, O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127.
- Zu, Y.L., Qi, J., Gilchrist, A., Fernandez, G.A., Vazquez-Abad, D., Kreutzer, D.L., Huang, C.K., and Sha'afi, R.I. (1998) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J Immunol* **160**, 1982-1989.
- Zurier, R.B. (1976) Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* **2**, 815-818.
- Zurier, R.B., Weissmann, G., Hoffstein, S., Kammerman, S., et Tai, H.H. (1974) Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effects of cAMP and cGMP, autonomic agonists, and agents which affect microtubule function. *J Clin Invest* **53**, 297-309.
- Zychlinsky, A., Weinrauch, Y., et Weiss, J. (2003) Introduction: Forum in immunology on neutrophils. *Microbes Infect* **5**, 1289-1291.