

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة فرحات عباس- سطيف-  
UNIVERSITE FERHAT ABBAS -SETIF-  
UFAS (ALGERIE)

## MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences  
Département de Biologie  
Pour l'obtention du Diplôme de

## MAGISTER

En Biologie

Option : Immunologie et Biologie Moléculaires Appliquées

Par :

**Mr. BOUSSIF Abdelali**

## THÈME

**Etude *In vitro* de l'implication de certaines voies de signalisation dans  
l'activation de deux fonctions du neutrophile humain :  
La dégranulation et la flambée respiratoire**

Soutenu le 18 Avril 2007 à 10h00 Devant la commission d'examen

Pr. CHERMAT Rabha	Professeur au CHU de Sétif	Président.
Dr. BOURICHE Hamama	M.C à l'Université de Sétif	Rapporteur.
Dr. SENATOR Abderrahmane	M.C à l'Université de Sétif	Examineur.
Dr. ARRAR Lekhmissi	M.C à l'Université de Sétif	Examineur.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أهدي هذا العمل المتواضع إلى أبي و أمي

*Ce travail est dédié  
à la mémoire de notre cher regretté  
le Professeur Laid SELLOUM*

# Remerciement

*Louange au Dieu le tout puissant qui m'a accordé la foi, le courage et la patience pour mener ce travail à terme.*

*Je tiens à remercier infiniment Dr : Mme BOURICHE Hamama pour sa patience et ses conseils précieux qui m'ont été très utiles. Permettez-moi Mme de vous exprimer ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.*

*Je remercie également les membres du jury : Pr. CHERMAT Rabha, Dr. SENATOR Abderrahmane et Dr. ARRAR Lekhmissi qui m'ont honoré en acceptant de juger et d'enrichir ce modeste travail.*

*Mes remerciements sont destinés aussi à : Mme BOUDOKHA C , M<sup>elle</sup> BELAMBRI A et à tous et toutes mes collègues de magister pour leur aide et leur soutien.*

**Résumé :**

Dans la présente étude, l'effet de quelques inhibiteurs spécifiques de certaines voies de signalisation impliquées dans la régulation de la dégranulation et de la flambée respiratoire des neutrophiles humains fMLP/CB et PMA-activés, a été étudié. L'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles stimulés est exploitée pour estimer la dégranulation de ces cellules. Tandis que, la chimiluminescence amplifiée par le luminol est utilisée pour évaluer la flambée respiratoire des PMNs stimulés. La dégranulation des neutrophiles fMLP/CB ou PMA-stimulés est significativement inhibée par la chelerythrine chloride, la génistéine et le PD980590. Le wortmannin a exercé une inhibition significative sur la dégranulation des PMNs fMLP/CB-stimulés seulement, sans affecter la dégranulation induite par le PMA. Cependant, tous les inhibiteurs utilisés dans la présente étude ont exercé une inhibition significative sur la flambée respiratoire des neutrophiles stimulés aussi bien par le fMLP/CB que par le PMA. Cette étude fournit une évidence que la PKC, la PI3kinase, les tyrosine kinases et les p42/p44 MAPK sont impliquées dans la signalisation de dégranulation et de la flambée respiratoire au sein du neutrophile. Nos résultats fournissent une évidence que les tyrosine kinases et les p42/p44 MAPK pourraient constituer des effecteurs cytosoliques pour la voie de la PKC au cours de la dégranulation et de la flambée respiratoire au sein des neutrophiles. La voie PI3kinase n'est vraisemblablement pas activée par la voie de signalisation initiée par la PKC au cours de la dégranulation. Cependant, elle peut participer dans la régulation de la signalisation de flambée respiratoire régie par la PKC au sein des neutrophiles PMA-stimulés. La voie de la PKC peut conduire à l'activation des tyrosine kinases aussi bien au cours de la dégranulation que lors de la flambée respiratoire. La PI3kinase peut intervenir, au moins partiellement, dans la signalisation de la flambée respiratoire régie par la PKC au sein des neutrophile. Ces différentes enzymes peuvent constituer des voies communes pour la transduction du signal au cours la dégranulation et de la flambée respiratoire des neutrophiles.

**Mots clés :** Neutrophile, Dégranulation, Flambée respiratoire, Chimiluminescence, Signalisation.

## ملخص:

تم في هذه الدراسة اختبار تأثير بعض المثبطات النوعية لبعض مسارات نقل الإشارة المتدخلة في تنظيم إفراز الحبيبات والشعلة التنفسية لدى الخلايا المتعادلة للإنسان المحفزة بـ fMLP/CB و PMA. تم استغلال نشاطية إنزيم elastase كمؤشر لتحرير الحبيبات، في حين تم استعمال تقنية الوميض الكيميائي (Chemiluminescence) لـ luminol لتقدير الشعلة التنفسية. بينت النتائج أن لكل من chelerythrine chloride و genistein و PD98059 تأثيراً مثبطاً معنوياً على إفراز الحبيبات مع كلا المحفزين. في حين أبدى wortmannin نشاطية مثبّطة لإفراز حبيبات الخلايا المحفزة بـ fMLP/CB فقط. كما أبدت كل المثبطات المستعملة في هذه الدراسة، تثبيطاً معنوياً للشعلة التنفسية للخلايا المتعادلة المحفزة بكل من fMLP/CB و PMA. أظهرت هذه الدراسة إمكانية تدخل إنزيمات PKC، PI3kinase، tyrosine kinases و p42/44 MAPK في نقل الإشارة المؤدية إلى كلٍّ من إفراز الحبيبات وتحفيز الشعلة التنفسية لدى الخلايا المتعادلة. بإمكان مسار PKC تحفيز tyrosine kinases و p42/44 MAPK أثناء كلتا الإستجابتين الخلويتين. كما يمكن أن تتدخل PI3kinase، ولو جزئياً على الأقل، في تنظيم الشعلة التنفسية المحفزة عبر مسار PKC في الخلايا المتعادلة. يمكن أن تشكل مختلف هذه الإنزيمات مسارات مشتركة لنقل الإشارة المتدخلة في تنظيم وظائف الخلايا المتعادلة للإنسان.

**الكلمات المفاتيح:** الخلية المتعادلة، إفراز الحبيبات، الشعلة التنفسية، الوميض الكيميائي،

نقل الإشارة.

## **Abstract:**

The effects of some specific inhibitors of certain signaling pathways involved in both fMLP/CB- and PMA-stimulated human neutrophils degranulation and respiratory burst were studied. Neutrophil degranulation was measured using elastase release as marker. While, Luminol-enhanced chemiluminescence was used to evaluate neutrophil respiratory burst. Results revealed that degranulation was effectively inhibited by chelerythrine chloride, genistein and PD98059 in both fMLP/CB and PMA-stimulated neutrophils. wortmannin showed no effect on PMA-stimulated neutrophil degranulation. On the other hand, all inhibitors used in this study were able to inhibit both fMLP/CB and PMA-induced neutrophil respiratory burst. The present study revealed that PKC, PI3kinase, tyrosine kinases and p42/44 MAPK take part into the intracellular signalling network involved in both neutrophil responses. PKC may activate tyrosine kinases and p42/44 MAPK in PMA-stimulated neutrophils. Whereas, PI3kinase may be partially involved in neutrophil respiratory burst triggered by PKC signalling pathway. These enzymes may constitute a common signalling pathways implied in both neutrophil degranulation and respiratory burst.

**Key words:** Neutrophil, Degranulation, Respiratory burst, Chemiluminescence, Signalling pathways.

## ABRÉVIATIONS

**DAG** : 1,2-Diacylglycerol

**fMLP** : formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine

**GAP** : GTPase Activating Protein

**GEF** : Guanine Exchange Factor

**ICAM** : Intercellular Adhesion Molecules

**IL** : Interleukine

**IP3**: Inositol (1,4,5) triphosphate

**LTB<sub>4</sub>** : Leucotriène B<sub>4</sub>

**MPO** : Myeloperoxydase

**NSF** : N-ethylmaleimide Sensitive Factor

**PAF** : Platelet Activating Factor

**PECAM** : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecules

**PI3 kinase**: Phosphatidylinositol 3 kinase

**PKB/Akt**: Protein kinase B

**PKC**: Protein kinase C

**PLA<sub>2</sub>**: Phospholipase A<sub>2</sub>

**PLC**: Phospholipase C

**PLD**: Phospholipase D

**PMA**: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

**PMNs**: Polymorphonucléaires neutrophiles

**ROS**: Reactive Oxygen Species

**SNAP**: Soluble NSF Attachment Protein

**SNARE**: Soluble NSF Acceptor Receptor

**SOD**: Superoxyde Dismutase

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

## FIGURES

**Figure 1 :** Neutrophile humain au repos.

**Figure 2 :** Activation du neutrophile au cours de l'inflammation.

**Figure 3 :** Modèle SNARE proposé pour expliquer la libération des granules du neutrophile.

**Figure 4 :** Organisation structurale de la NADPH oxydase.

**Figure 5 :** Assemblage de la NADPH oxydase.

**Figure 6 :** Représentation schématique du flux d'électrons à travers le cytochrome *b<sub>558</sub>*.

**Figure 7 :** Différentes ROS générées par le neutrophile stimulé.

**Figure 8 :** Diagramme schématique des voies de signalisation activées par le récepteur des chimioattractants du neutrophile.

**Figure 9 :** Rôle des Phospholipases et de leurs dérivés lipidiques dans la transduction du signal au cours de l'activation du neutrophile.

**Figure 10 :** Voies de transduction du signal impliquées dans l'activation de la flambée respiratoire du neutrophile

**Figure 11 :** Modèle proposé de l'activation de la cascade des MAP kinases au sein du neutrophile.

**Figure 12 :** Différentes voies impliquées dans la transduction du signal déclenché par le récepteur membranaire couplé à la protéine G.

**Figure 13 :** Schéma récapitulatif des principales étapes d'isolement des polynucléaires neutrophiles à partir du sang humain.

**Figure 14 :** Structure des différents inhibiteurs utilisés.

**Figure 15 :** Evaluation de la cytotoxicité des différents inhibiteurs sur les neutrophiles humains.

**Figure 16 :** L'activation des PMNs en réponse aux différents stimulants.

**Figure 17 :** Effet des différents inhibiteurs sur l'activité de l'élastase leucocytaire.

**Figure 18 :** Effet de la chelerythrine chloride sur la dégranulation des PMNs.

**Figure 19 :** Effet du wortmannin sur la dégranulation des PMNs.

**Figure 20 :** Effet de la genistein sur la dégranulation des PMNs.

**Figure 21 :** Effet du PD98059 sur la dégranulation des PMNs.

**Figure 22 :** Effet des différents inhibiteurs sur la dégranulation des PMNs stimulés par le fMLP ou par le PMA.

**Figure 23 :** Cinétique de la chimiluminescence des neutrophiles.

**Figure 24 :** Effet de la chelerythrine chloride sur la luminescence des neutrophiles.

**Figure 25 :** Effet du wortmannin sur la luminescence des neutrophiles.

**Figure 26 :** Effet de la genistein sur la luminescence des neutrophiles.

**Figure 27 :** Effet du PD98059 sur la luminescence des neutrophiles.

**Figure 28 :** Effet des différents inhibiteurs sur la chimiluminescence des PMNs stimulés par le fMLP et le PMA.

**Figure 29 :** Comparaison entre les effets des différents inhibiteurs sur la dégranulation et sur la chimiluminescence des PMNs stimulés par le fMLP ou par le PMA.

## **TABLEAUX**

**Tableau 1 :** Constituants majeurs des granules du neutrophile humain.

**Tableau 2 :** Chimioattractants du neutrophiles

**Tableau 3 :** IC<sub>50</sub> des différents inhibiteurs sur la dégranulation des neutrophiles.

**Tableau 4 :** IC<sub>50</sub> des différents inhibiteurs sur la dégranulation des neutrophiles.

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I- Neutrophile : effecteur principal de la réponse inflammatoire</b> .....	1
1. 1. Fonctions du neutrophile .....	2
1. 1. 1. Dégranulation du neutrophile .....	5
1. 1. 1. 1. Différentes granules du neutrophile .....	5
1. 1. 1. 2. Mécanisme de dégranulation .....	7
1. 1. 2. Flambée respiratoire du neutrophile .....	10
1. 1. 2. 1. NADPH oxydase .....	10
1. 1. 2. 2. Génération des ROS .....	15
<b>II- Transduction du signal au cours de la dégranulation et de la flambée respiratoire du neutrophile</b> .....	17
2. 1. Protéine G .....	17
2. 2. Phospholipases .....	19
2. 3. Protéine Kinase C (PKC).....	21
2. 4. Phosphatidyl inositol 3-Kinase (PI3K).....	23
2. 5. Petites GTPases .....	24
2. 6. Tyrosine Kinases .....	26
2. 7. MAP Kinases (MAPK).....	28

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	32
<b>1. MATÉRIEL</b> .....	32
1. 1. Réactifs .....	32
1. 2. Matériel biologique .....	32
<b>2. MÉTHODES</b> .....	32
2. 1. Préparation des cellules .....	32
2. 1. 1. Isolement des PMNs.....	32
2. 1. 2. Pureté et viabilité cellulaire .....	33
2. 2. Cytotoxicité des substances étudiées.....	35
2. 3. Essai de dégranulation .....	35
2. 3. 1. Effet des différents inhibiteurs sur l'activité de l'élastase leucocytaire .....	36
2. 3. 2. Effet des différents inhibiteurs sur la dégranulation des PMNs .....	36

2. 4. Essai de Chimiluminescence .....	37
3. Analyse statistique .....	37
<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>38</b>
1. Préparation des neutrophiles.....	38
2. Cytotoxicité des substances utilisées .....	38
3. Etude de la dégranulation du neutrophile humain .....	38
3.1. Effets des différents inhibiteurs sur l'activité de l'élastase leucocytaire.....	41
3. 2. Effets des différents inhibiteurs sur la dégranulation des PMNs.....	41
3.2.1. Effet de la chelerythrine chlorure .....	41
3. 2. 2. Effet du wortmannin.....	41
3. 2. 3. Effet de la genistein .....	45
3. 2. 4. Effet du PD98059 .....	45
4. Etude de la flambée respiratoire du neutrophile humain.....	49
4. 1. Effets des différents inhibiteurs sur la flambée respiratoire des PMNs .....	49
4. 1. 1. Effet de la chelerythrine chlorure .....	49
4. 1. 2. Effet du wortmannin.....	52
4. 1. 3. Effet de la genistein .....	52
4. 1. 4. Effet du PD98059 .....	52
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>58</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>71</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>72</b>

# INTRODUCTION

Les neutrophiles jouent un rôle très important dans la défense de l'organisme contre les invasions pathogènes, ils représentent l'élément cellulaire clé du système immunitaire inné. Attirés par chimiotactisme en réponse aux différents agents activateurs, les neutrophiles sont les premières cellules recrutées au foyer de l'inflammation. Les neutrophiles accomplissent leur fonction d'élimination des agents infectieux par la phagocytose, la dégranulation et la flambée respiratoire. Ces deux dernières se traduisent par la mobilisation des différents granules intracellulaires et libération d'un arsenal d'enzymes protéolytiques emmagasinées dans ces granules, et par la production de grandes quantités de dérivés hautement toxiques connus sous le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par l'activation d'un complexe enzymatique, la NADPH oxydase. Ces deux fonctions sont nécessaires pour l'élimination des microorganismes pathogènes et les débris cellulaires ingérés.

Cependant, lorsque les mécanismes de régulation de ces fonctions échouent, le neutrophile devient par son activation excessive la principale cause de graves lésions tissulaires qui sont à l'origine de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme et l'emphysème pulmonaire. Il en ressorte ainsi que la compréhension des mécanismes qui régulent la signalisation impliquée dans l'activation de la dégranulation et de la flambée respiratoire du neutrophile permettra d'établir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et précises. Il sera alors possible de moduler ces fonctions, ce qui constituerait une intervention anti-inflammatoire hautement spécifique.

Dans ce sens notre travail s'est orienté, et a été consacré à :

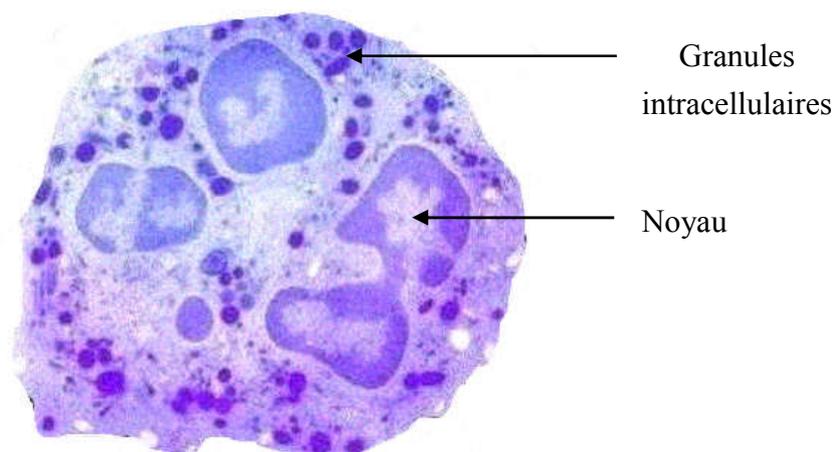
- l'identification de certaines enzymes impliquées dans les voies de signalisation qui régissent la dégranulation en utilisant quelques inhibiteurs spécifiques de ces enzymes. L'effet de ces inhibiteurs spécifiques a été étudié sur la dégranulation des neutrophiles humains activés par le fMLP/CB ou par le PMA, en exploitant la libération de l'élastase leucocytaire comme marqueur de la dégranulation des neutrophiles.
- La mise en évidence de l'implication de ces enzymes dans la signalisation qui conduit à la production des ROS au cours de la flambée respiratoire, en testant l'effet de quelques inhibiteurs spécifiques de ces enzymes sur la production du superoxyde par les neutrophiles fMLP/CB- et PMA-stimulés, en utilisant la technique de la chimiluminescence.

*Revue*  
*Bibliographique*

## I- Neutrophile : effecteur principal de la réponse inflammatoire

Les neutrophiles, ou polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) constituent l'élément cellulaire clé de l'immunité innée, ce sont les cellules les plus importantes et les plus étudiées de la réponse inflammatoire. Ils représentent les premières cellules recrutées au foyer inflammatoire où ils accomplissent leurs fonctions phagocytaires et microbicides (Gompertz *et* Stockley, 2000). Les PMNs sont des phagocytes professionnels très mobiles qui représentent environ 70% de l'ensemble des leucocytes (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

A l'égard de tous les leucocytes, le neutrophile dérive d'une cellule souche myéloïde (myéloblaste) dans la moelle osseuse (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Sous l'effet de nombreux facteurs de croissance, essentiellement le G-CSF et le GM-CSF, le myéloblaste se différencie en plusieurs étapes. Au cours de leur différenciation, les cellules deviennent plus volumineuses et perdent leur capacité de division rapide et donnent à la fin de leur maturation une cellule renfermant un noyau polylobé et de différents types de granules cytoplasmiques (**Fig. 1**), qui est le neutrophile (Lakshman *et* Finn, 2001). Les neutrophiles matures demeurent dans la moelle osseuse pendant 5 jours avant d'être libérés dans la circulation. Après avoir circulé 6 à 8 heures où ils peuvent être activés par de différents stimuli, les PMNs migrent vers les tissus périphériques où ils survivent de 2 à 5 jours (Janeway *et al.*, 2001). L'absence ou le dysfonctionnement des neutrophiles provoque des infections récidivantes sévères même lorsque la réponse immunitaire acquise fonctionne correctement (Lakshman *et* Finn, 2001).



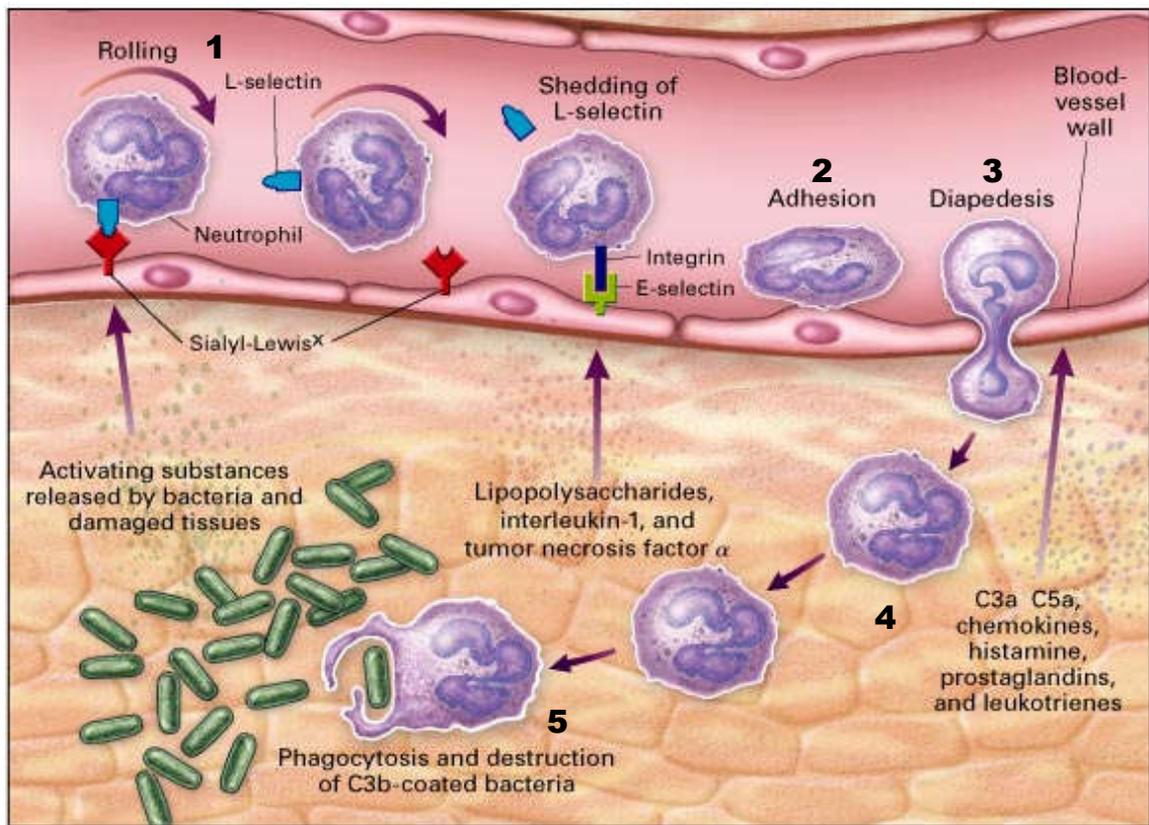
**Figure 1** : Neutrophile humain au repos. (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

## 1. 1. Fonctions du neutrophile

Le neutrophile joue un important rôle dans la première ligne cellulaire de défense de l'organisme contre les agressions étrangères. La réponse des neutrophiles au cours de la réaction inflammatoire est un processus complexe qui implique de nombreuses étapes.

Au cours de la phase précoce de l'inflammation, les neutrophiles circulants répondent aux différents médiateurs pro-inflammatoires (C5a, PAF, LTB<sub>4</sub>, Il-8, TNF<sub>α</sub>...etc.) ce qui aboutit à leur activation et leur marginalisation vers les parois des vaisseaux sanguins périphériques (Liu *et al.*, 2003). Au niveau de la paroi interne des vaisseaux, les neutrophiles établissent des interactions avec les cellules endothéliales activées ce qui entraîne leur roulement, leur adhésion ferme aux parois, le changement de leur morphologie puis leur diapédèse vers l'espace extracellulaire (**Fig. 2**) (Seely *et al.*, 2003). L'interaction entre les neutrophiles et les cellules endothéliales est facilitée par de nombreuses molécules d'adhésion exprimées à la surface du neutrophile (L-selectines, PECAMs et les intégrines) ainsi qu'à la membrane des cellules endothéliales (E-selectines, ICAMs) (Wagner *et Roth*, 2000). Une fois dans l'espace extravasculaire, les neutrophiles sont attirés sous l'effet de nombreux facteurs dits chimioattractants (**Tab. 1**) qui confèrent aux PMNs un mouvement unidirectionnel orienté vers le foyer inflammatoire. Les neutrophiles migrent suivant un gradient créé par des concentrations croissantes du chimioattractant (Liu *et al.*, 2003). Les substances chimiotactiques possèdent au niveau de la membrane plasmique des PMNs des récepteurs couplés à une protéine G, qui sont distribués à la surface des PMNs activés de façon à polariser les cellules dans le sens du gradient (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Arrivé au site d'infection, le neutrophile entreprend sa fonction d'élimination des agents pathogènes par phagocytose. La membrane du neutrophile étend des pseudopodes qui entourent et internalisent les microorganismes qui se trouvent opsoniser essentiellement par le fragment C3b du complément et les immunoglobulines de la classe G et M (Seely *et al.*, 2003). Les particules opsonisées s'attachent passivement au neutrophile via des interactions entre les opsonines et leurs récepteurs leucocytaires (CR<sub>3</sub> et FCγR). La membrane du neutrophile s'invagine ensuite au niveau de la zone de contact établi avec le pathogène qui finit par être complètement internalisé dans un phagosome pour y être détruit (Roos *et Van Bruggen*, 2000).



**Figure 2 :** Activation du neutrophile au cours de l'inflammation. (1) Captation et roulement des PMNs. (2) Adhésion ferme à l'endothélium vasculaire. (3) Transmigration vers l'espace extravasculaire. (4) Migration orientée vers le foyer de inflammation. (5) Élimination *in situ* des éléments étrangers par génération des ROS, et libération des granules intracellulaires contenant les substances microbicides (Seely *et al.*, 2003).

**Tableau 1** : Chimioattractants du neutrophile (Seely et al., 2003).

<i>Spécifiques</i>	<i>Non spécifiques</i>
Interleukine-8 Granulocyte Chemotactic Protein (GCP)-2 Endothelial cell-derived neutrophil attractant (ENA)-78 Neutrophil-Activated Peptide (NAP)-2 Growth-Related Oncogene (GRO)- $\alpha$ , $-\beta$ , $-\gamma$ Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1,-2 Platelet Factor (PF)-4 Mast cell-derived chemotactic factor 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid	Complement fragment C5a Tumor Necrosis Factor (TNF) Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1,-2,-3,-4 f-Met-Leu-Phe (fMLP) Macrophage Chemotactic and Activating Factor (MCAF) Platelet Activating Factor (PAF) RANTES Casein Leukotriene-B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> )

La fonction phagocytaire des neutrophiles est accélérée par la libération de nombreuses enzymes lytiques au cours de la dégranulation (Lakchmann *et* Finn, 2001). Le neutrophile est équipé de quatre types de granules intracellulaires qui renferment des substances microbicides, protéines et enzymes lytiques telles que les protéases, les matricé-métalloprotéinases et la myéloperoxydase (Borregaard *et* Cowland, 1997). La fusion des granules intracellulaires avec le phagosome permet de l'enrichir avec de nombreuses substances protéolytiques nécessaires pour la destruction des pathogènes (Seely *et* al., 2003). Ces enzymes lytiques peuvent également être libérées dans l'espace extracellulaire où elles peuvent causer de graves lésions tissulaires, conduisant dans certains cas à des pathologies inflammatoires chroniques (Witko-Sarsat *et* al., 2000).

A côté de l'arsenal enzymatique et microbicide emmagasiné dans les différentes granules, le neutrophile dispose d'un mécanisme très puissant pour détruire les agents pathogènes. L'activation du neutrophile par différents facteurs induit la production de grandes quantités d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par une enzyme associée à la membrane du phagosome et celle des PMNs, la NADPH oxydase (Roos, 1991). L'anion superoxyde est le précurseur essentiel des autres espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) générées au cours d'un processus dit flambée respiratoire (Babior, 2002).

La destruction des agents pathogènes est améliorée par la combinaison de l'action des protéines lytiques issues de la dégranulation et l'effet des produits de la flambée respiratoire. Ces produits sont munies d'un pouvoir microbicide potentiel, mais elles sont aussi très délétères pour les composants cellulaires et tissulaires (Gustafson, 1995 ; Frasch *et* al., 1998).

## 1. 1. 1. Dégranulation du neutrophile

### 1. 1. 1. 1. Différentes granules du neutrophile

Le neutrophile dispose d'un grand nombre de protéines lytiques et de substances microbicides renfermées dans des structures intracellulaires dites granules leucocytaires. En effet, quatre types de granules/vésicules sont présents dans le cytoplasme du neutrophile quiescent : granules azurophiles, granules spécifiques, granules à gélatinases et vésicules sécrétoires. Ces granules diffèrent les unes des autres non seulement par leur contenu intragranulaire mais aussi par les marqueurs exprimés sur leurs membranes (**Tab. 2**).

**a. Granules azurophiles (primaires) :** ce sont les premières granules à apparaître au cours de la différenciation du neutrophile, mais avec la maturation leur nombre décroît (Witko-Sarsat *et al*, 2000). Ces granules sont des peroxydase-positives caractérisées par leur haute teneur en myéloperoxydase (MPO). Les granules azurophiles renferment des hydrolases acides et des substances bactéricides telles que les sérines protéases (Borregaard *et* Cowland, 1997 ; Faurschou *et al*, 2002).

**b. Granules spécifiques (secondaires) :** elles sont formées dans les myélocytes, métamyélocytes et les neutrophiles segmentés (Ligeti *et* Mócsai, 1999; Faurschou *et* Borregaard, 2003). Ces granules sont identifiées grâce à leur haute teneur en lactoferrine, mais elles sont peroxydase-négatives (Borregaard *et* Cowland, 1997; Faurschou *et* Borregaard, 2003). Les granules spécifiques renferment également des taux considérables de substances antibiotiques, et sont mobilisées plus rapidement que les granules azurophiles au cours de l'exocytose (Faurschou *et* Borregaard, 2003).

**c. Granules à gélatinase (tertiaires) :** ces granules se forment parallèlement aux granules spécifiques, et par conséquent elles sont peroxydase-négatives, mais contrairement à ces dernières elles sont de petite taille. Ces granules sont riches en gélatinase et en autres métalloprotéinases (collagénases et leukolysines), comme elles expriment le cytochrome *b*<sub>558</sub> sur leur membrane plasmique (Faurschou *et* Borregaard, 2003). Au cours de la dégranulation, les granules à gélatinase sont mobilisées plus aisément que des granules spécifiques (Borregaard *et* Cowland, 1997).

**d. Vésicules sécrétoires :** Les vésicules sécrétoires apparaissent au cours de la maturation des neutrophiles, elles pourraient être d'origine endocytaire parce qu'elles contiennent des protéines de plasma telles que l'albumine, qui sert de marqueur pour ces vésicules (Borregaard *et* Cowland, 1997). Ces vésicules constituent un réservoir des récepteurs associés à la membrane qui sont nécessaires à la phase précoce de la réponse inflammatoire gouvernée par

**Tableau 2:** Constituants essentiels des différentes granules du neutrophile humain (Faurouchou et Borregaard, 2003).

	<i>Granules azurophiles</i>	<i>Granules spécifiques</i>	<i>Granules à gélatinase</i>	<i>Vésicules sécrétoires</i>
<b>Matrice</b>	Acide $\beta$ -glycerophosphatase Acide mucopolysaccharide $\alpha_1$ -Antitrypsine $\alpha$ -Mannosidase Azurocidine BP1 $\beta$ -Glycerophosphatase Cathepsines Defensines Elastase Lysosyme MPO N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase Protéinase-3 Sialidase Ubiquitin-protein	$\beta_2$ -Microglobuline Collagénase CRISP-3(SGP28) Gélatinase hCAP-18 Histaminase Heparanase Lactoferrine Lysosyme NGAL uPA Sialidase Transcobalamine-1	Acétyltransférase $\beta_2$ -Microglobuline CRISP-3 Gélatinases Lysosyme	Protéines plasmatiques (y compris la tetractine)
<b>Membrane</b>	CD63, CD68 Presenilin 1 Stomatine	CD11b/CD18 CD15, CD66, CD67 Cytochrome $b_{558}$ Récepteur de l'fMLP Récepteur de fibronectine Sous-unité $\alpha$ de la protéine G Récepteur de laminine Leukolysine L'antigène NB1 Protéine de 19 KDa Protéine de 155 KDa RAP1, RAP 2 SCAMP SNAP-23,-25 Récepteur de thrombospondine Récepteur de TNF VAMP-2 Récepteur de vitronectine	CD11b/CD18 Cytochrome $b_{558}$ Enzyme de deacetylation du diacylglycerol Récepteur de l'fMLP Leukolysine NRAMP-1 SNAP-23,-25 Récepteur de l'uPA H <sup>+</sup> -ATPase de type V	Phosphatase alcaline CD11b/CD18 CD13, CD14, CD16 CR1 Récepteur C1a Cytochrome $b_{558}$ DAF(Decay-accelerating factor) Leukolysine VAMP-2

les neutrophiles (Faurischou *et* Borregaard, 2003). Les vésicules sécrétoires sont les granules les plus mobilisées dans le neutrophile, mais elles ne font pas une partie des vésicules constitutives d'endocytose/exocytose. Une fois mobilisées, les vésicules sécrétoires ne sont plus reformées que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Ligeti *et* Mócsai, 1999).

La formation de ces différentes granules apparaît pendant la différenciation du neutrophile, la granulogénèse prend place quand les vésicules immatures de transport qui dérivent de l'appareil de Golgi fusionnent entre elles (Borregaard *et* Cowland, 1997; Faurischou *et* Borregaard, 2003). Cependant, il paraît qu'il n'y a pas d'adressage individuel des protéines vers chaque type de granules, mais au moment de leur synthèse elles s'accumulent dans le type de granule en formation (Faurischou *et* Borregaard, 2003).

Au cours de l'activation des PMNs, ces différentes granules sont mobilisées pour déverser leur contenu soit dans les phagosomes, soit dans l'espace extracellulaire. L'exocytose des granules leucocytaires conduit à la libération des protéines stockées, et la translocation de protéines spécifiques vers la membrane plasmique. Ces deux processus ont une grande importance dans la fonction défensive du neutrophile (Ligeti *et* Mócsai, 1999).

### **1. 1. 1. 2. Mécanisme de dégranulation**

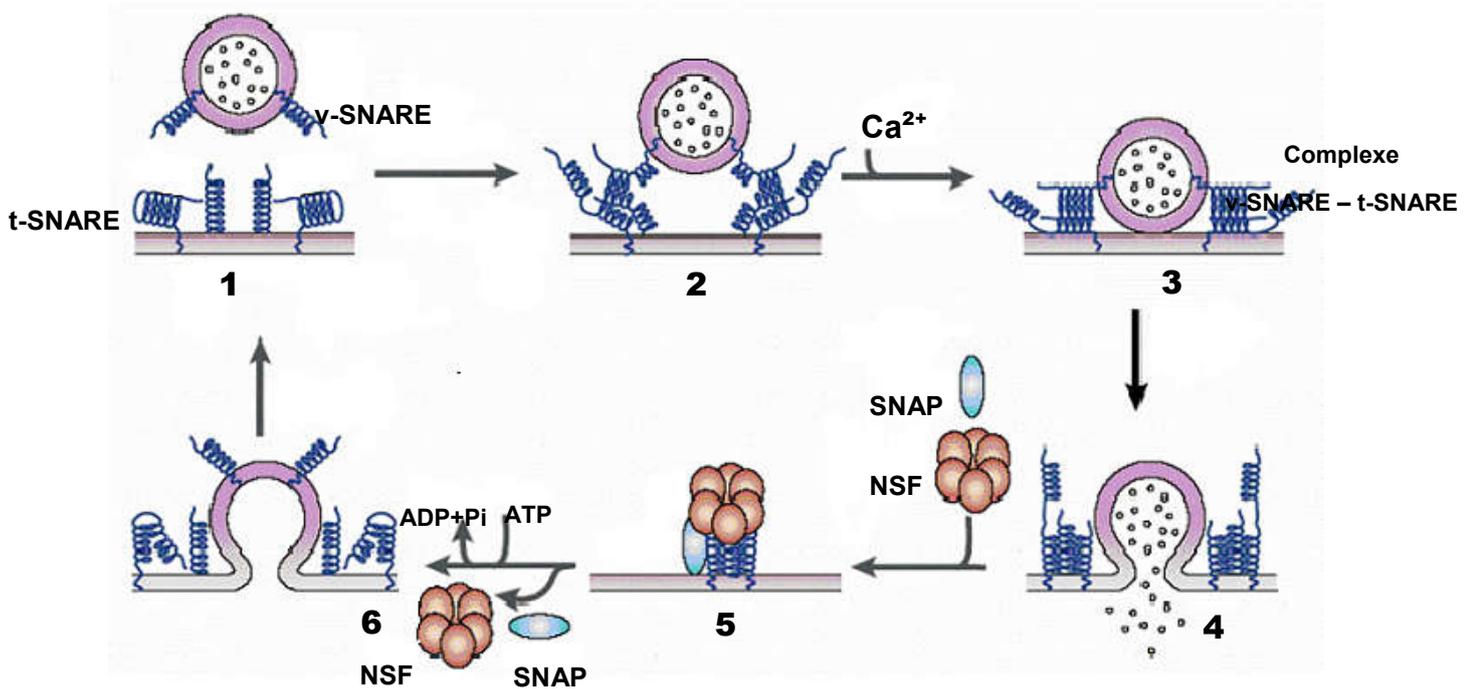
La mobilisation des différentes granules intracellulaires du neutrophile montre une différence dans leur disponibilité pour l'exocytose (Faurischou *et* Borregaard, 2003). La cinétique de libération du contenu des granules leucocytaires reflète une hiérarchie stricte de mobilisation aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Les vésicules sécrétoires sont les plus rapidement libérées suivies des granules à gélatinase, tandis que la libération des granules spécifiques se fait plus lentement (Ligeti *et* Mócsai, 1999). Ces différentes granules sont mobilisées à des moments différents de l'activation du neutrophile et selon des stimulations hiérarchisées. Cette hiérarchie semble être ajustée aux rôles que ces différents organites jouent pendant l'implication du neutrophile dans l'inflammation (Borregaard *et* Cowland, 1997). La stimulation *in vitro* des PMNs avec des concentrations de l'ordre du nanomolaire des médiateurs inflammatoires tels que le fMLP mène à une exocytose rapide et presque complète des granules. La stimulation avec des agonistes plus puissants comme le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) induit une libération exhaustive des granules à gélatinase, une libération modérée des granules spécifiques, et une faible exocytose des granules azurophiles.

L'élévation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique paraît jouer un rôle important dans l'induction de l'exocytose des granules dans une variété de cellules (Sengelov *et al.*, 1993). La

dégranulation en réponse au calcium semble, par ailleurs, être biphasique: la première phase de haute affinité au calcium (faible concentration du  $\text{Ca}^{2+}$ ) correspond à l'exocytose des granules spécifiques et celles à gélatinase. La seconde phase de faible affinité (forte concentration du  $\text{Ca}^{2+}$ ) correspond la sécrétion des granules azurophiles (Sengelov *et al.*, 1993). Cette différence de sensibilité des diverses populations de granules au  $\text{Ca}^{2+}$  peut être liée aux variations de régulation des annexines (I, II,...XI), un groupe de protéines régulées par le  $\text{Ca}^{2+}$  et qui interviennent dans l'agrégation et la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (Borregaard *et* Cowland, 1997; Ligeti *et* Mócsai, 1999). En outre, le calcium pourrait favoriser la dégranulation du neutrophile en agissant sur les interactions entre les SNAP (*Soluble NSF attachment protein*) et les SNARE (*SNAP receptor proteins*). Les SNAREs sont des protéines ubiquitaires et hautement conservées composant une machinerie d'accostage et de fusion de vésicules (Fauschou *et* Borregaard, 2003). Chaque vésicule de transport exprime sur sa membrane un v-SNARE (*vesicle Soluble NSF Acceptor REceptor*) qui reconnaît et interagit spécifiquement avec un seul type de t-SNARE (*target SNARE*) présent sur la membrane plasmique (**Fig. 3**). L'intervention du calcium renforce l'interaction v-SNARE – t-SNARE et facilite la fusion des deux membranes. Après la fusion, le recrutement de SANP et d'une ATPase cytosolique, le NSF (*N-ethylmaleimide Sensitive Factor*) qui permet l'hydrolyse de l'ATP et entraîne la dissociation du complexe et l'incorporation de la membrane de granule dans la membrane de la cellule (Chen *et* Scheller, 2001).

Dans le neutrophile, les protéines t-SNAREs, syntaxine-4 et -6 sont détectées exclusivement dans la membrane plasmique; alors que les v-SNAREs, VAMP-2 (*Vesicle Associated Membrane Protein*) et SCAMP (*Secretory Carrier Membrane Protein*) sont présentes au niveau de la membrane des vésicules sécrétoires, les granules à gélatinase et les granules spécifiques. Les SNAP-23 et -25 (*Synaptosome Associated Protein 23 et 25*) sont trouvés principalement au niveau des membranes des granules peroxydase-négatives (Martin-Martin *et al.*, 2000; Fauschou *et* Borregaard, 2003).

Une fois le neutrophile stimulé, les granules déversent leur contenu dans le phagosome ou dans le compartiment extracellulaire, alors que leurs membranes s'incorporent dans la membrane plasmique. La libération des différentes populations de granules est d'une grande importance pour l'activité défensive du neutrophile (Ligeti *et* Mócsai, 1999). Dès les premiers roulements du neutrophile sur l'endothélium, les vésicules sécrétoires sont mobilisées grâce à la présence du CD11b sur leurs membranes qui permet au neutrophile activé d'établir des interactions fermes avec l'endothélium.



**Figure 3 :** Modèle SNARE proposé pour expliquer la libération des granules du neutrophile. (1) Le v-SNARE reconnaît spécifiquement un t-SNARE présent sur la membrane plasmique. (2) L'assemblage des SNAREs permettrait (3) l'ancrage de la vésicule à la membrane puis (4) la fusion des deux membranes et la libération du contenu granulaire. (5) La liaison de SNAP permet la fixation de NSF. (6) l'hydrolyse de l'ATP par NSF permettrait la dissociation des SNAREs (Adapté de Chen *et* Scheller, 2001).

Quant aux granules à gélatinase, elles facilitent au neutrophile le franchissement de la membrane basale grâce aux différentes matrices-métalloprotéinases qu'elles renferment. Tandis que Les granules spécifiques et azurophiles sont chargées de l'élimination des microorganismes entourés dans les phagosomes. Les granules spécifiques assurent la disponibilité du cytochrome  $b_{558}$ , constituant majeur de la NADPH oxydase; tandis que les granules azurophiles disposent d'un arsenal microbicide très puissant. Ainsi, la sécrétion de la myéloperoxydase couplée à la NADPH oxydase activée entraîne la production des ROS responsables de l'activité bactéricide oxygène-dépendante des PMNs (Roos, 1991).

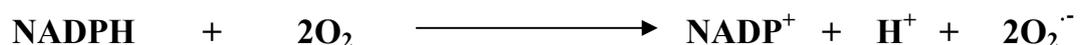
## 1. 1. 2. Flambée respiratoire du neutrophile

Un des plus importants événements au cours de l'activation du neutrophile est la flambée respiratoire, qui se caractérise par une augmentation de la consommation de l'oxygène du milieu environnant par le neutrophile. Cette consommation excessive de l'O<sub>2</sub> se traduit par la production de quantités énormes de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), qui représente le premier précurseur indispensable pour la formation d'autres dérivés toxiques de l'O<sub>2</sub> regroupés sous le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Roos, 1991; Babior, 2002).

La génération des oxydants microbicides par le neutrophile résulte de l'activation d'un complexe enzymatique multiprotéique, NADPH oxydase (Quinn *et Gauss*, 2004), qui catalyse le transfert d'un seul électron de NADPH cytosolique à l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) extracellulaire ou intraphagosomial (Sheppard *et al.*, 2005). Le processus de la flambée respiratoire est capital pour éliminer les microorganismes pathogènes, tel qu'il est montré par la susceptibilité accrue aux infections des individus atteints de la CGD (*Chronic Granulomatous Disease*) qui est une maladie génétique caractérisée par une NADPH oxydase absente ou inactive (Nauseef *et al.*, 1990; Hampton *et al.*, 1998; Quinn *et Gauss*, 2004).

### 1. 1. 2. 1. NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un système producteur d'anions superoxydes, il est localisé dans les phagocytes (neutrophiles, éosinophiles et monocytes/macrophages) et même dans d'autres types cellulaires, telles que les cellules endothéliales (Roos, 1991). La NADPH oxydase catalyse la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par réduction monoélectronique de l'O<sub>2</sub>, en utilisant comme donneur d'électron le NADPH suivant la réaction :



#### 1. Organisation de la NADPH Oxydase

De point de vue structure, la NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique constitué d'au moins six composants répartis entre la membrane plasmique et le cytosol (**Fig. 4**).

##### a. Composants membranaires

La NADPH oxydase des neutrophiles est constituée d'une flavohémoprotéine associée à la membrane plasmique et à celle des granules spécifiques qui joue le rôle du centre redox (El Benna *et al.*, 1997; Babior, 1999). Le cytochrome *b*<sub>558</sub> est une protéine hétérodimérique constituée de 2 sous unités, une sous unité glycosylée de 91 KDa (gp91<sup>phox</sup>) et une autre plus

petite non glycosylée de 22 KDa (p22<sup>phox</sup>) qui vient s'associer à la gp91<sup>phox</sup> de façon non covalente afin d'assurer sa stabilité au niveau de la membrane (Sumimoto *et al.*, 1996; Regier *et al.*, 2000). Le cytochrome *b*<sub>558</sub> comporte deux hèmes et deux sites pour le FAD et pour le NADPH, ainsi il possède toute la machinerie requise pour le transfert d'électrons du NADPH à l'O<sub>2</sub> (Regier *et al.*, 2000; Quinn *et Gauss*, 2004). La membrane plasmique renferme également, une petite GTPase de la famille des Ras, la Rap-1A qui se trouve associée au cytochrome *b*<sub>558</sub> (Quinn *et Gauss*, 2004 ; Sheppard *et al.*, 2005).

### **b. Composants cytosoliques**

Les composants cytosoliques de la NADPH oxydase sont des protéines solubles d'un poids moléculaire de 40, 47 et 67 KDa appelées p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup>, respectivement (Clark, 1999). La p47<sup>phox</sup> est une protéine hautement basique, elle renferme de nombreux sites de phosphorylation (résidues 314-347), une paire de domaines Src Homology 3 (SH3), un domaine C-terminal riche en proline ainsi qu'un domaine N-terminal *phox* homology (PX domain). La p67<sup>phox</sup> contient deux domaines SH3, un domaine riche en proline et quatre motifs TPR (Tetratricopeptide Repeat motif) portés sur le domaine N-terminal. Tandis que, la p40<sup>phox</sup> comprend un seul domaine SH3, un domaine PX et un motif C-terminal *Phox* et Cdc (PC domain) (**Fig. 4**). Chez le neutrophile quiescent, ces trois protéines forment un complexe multimérique d'environ 250 KDa constitué de taux équimolaires (1:1:1) de p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> (Babior, 1999). Ce complexe est stabilisé, en partie, par des interactions au niveau des domaines SH3 qui sont renforcées par des interactions additionnelles entre le domaine C-terminal riche en proline de la p47<sup>phox</sup> et le domaine C-terminal SH3 de la p67<sup>phox</sup>. Ces interactions maintiennent le complexe cytosolique sous un état inactif et empêchent sa translocation vers la membrane plasmique, et par conséquent empêchent son association avec le cytochrome *b*<sub>558</sub> (Quinn *et Gauss*, 2004).

En plus des trois protéines cytosoliques, un quatrième facteur cytosolique a été identifié, il s'agit d'une petite protéine G monomérique appelée Rac (1/2). La protéine Rac est une petite GTPase de la sous-famille des Rho liée au GDP à l'état inactif (Heywoorth *et al.*, 1999; Bokoch *et Diebold*, 2002; Li *et al.*, 2002).

## **2. Assemblage et Activation de la NADPH oxydase**

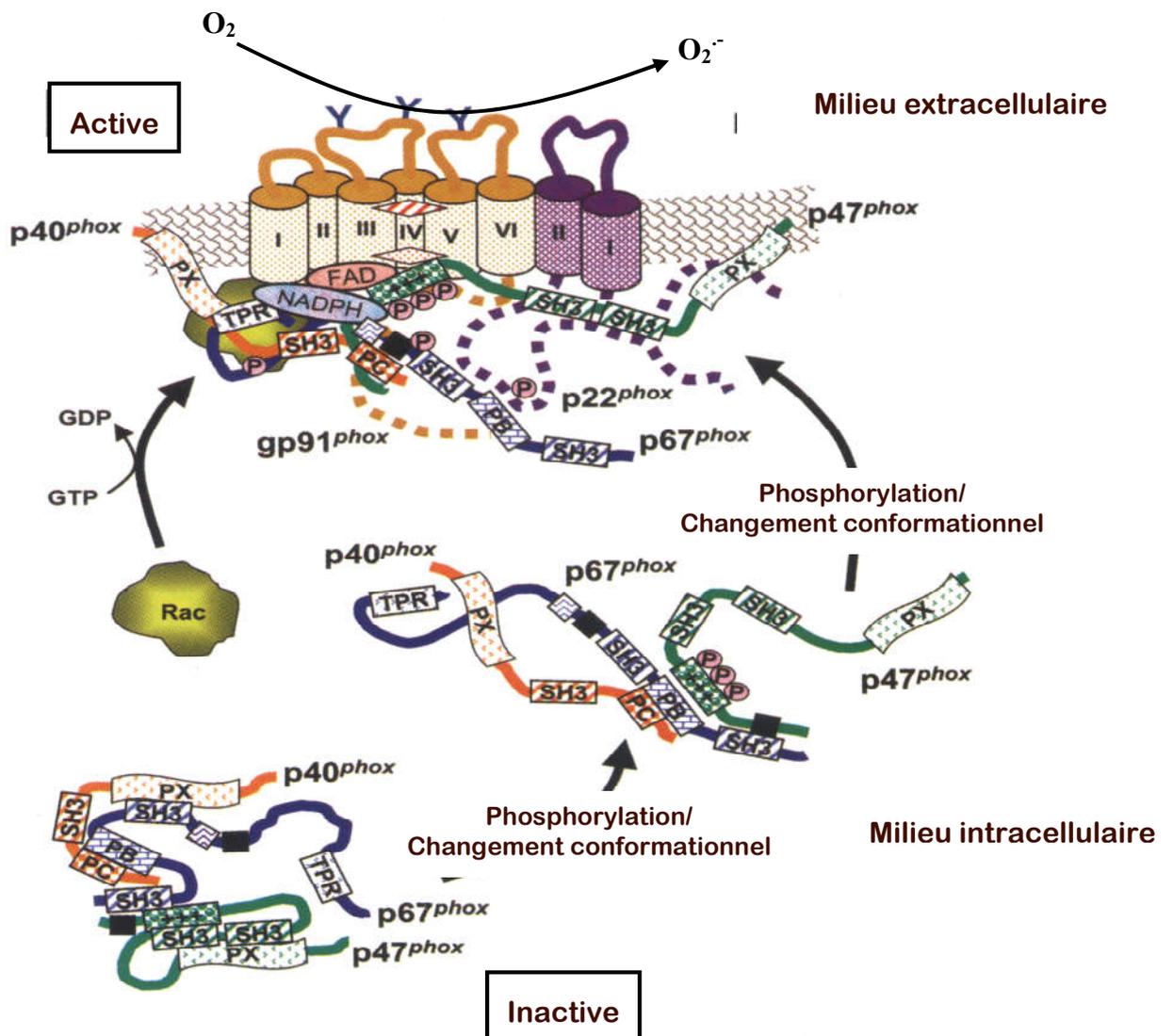
Au sein du neutrophile non activé, la NADPH oxydase apparaît comme un complexe enzymatique multimérique inactif. L'activation de cette enzyme nécessite la translocation et l'assemblage de ses composants au niveau de la membrane plasmique (Dang *et al.*, 1999). Après l'activation du neutrophile, les composants cytosoliques (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et

Rac) migrent vers la membrane plasmique, où ils s'associent au flavocytochrome  $b_{558}$  (Sheppard *et al.*, 2005). L'assemblage de la NADPH oxydase nécessite la phosphorylation des différents composants du complexe multimérique (Sumimoto *et al.*, 1996).

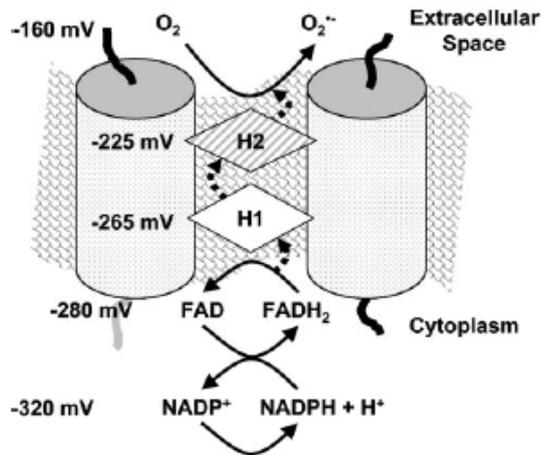
Les composants cytosoliques  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  et  $p67^{phox}$  forment un complexe dans le cytosol du neutrophile non activé. La formation d'un tel complexe constitue un mécanisme de régulation négative par auto-inhibition de la NADPH oxydase (Quinn *et Gauss*, 2004). Au cours de l'activation du neutrophile, une cascade de phosphorylation prend place au niveau de la membrane plasmique et dans le cytosol. Grâce à leurs multiples sites de phosphorylation les effecteurs cytosoliques de la NADPH oxydase constituent une cible éminente pour ces phosphorylations (Sumimoto *et al.*, 1996; Clark, 1999).

La phosphorylation de la  $p47^{phox}$  et de la  $p67^{phox}$  induit un changement conformationnel de ces sous unités et entraîne leur translocation vers la membrane plasmique où elles s'associent avec les composants du cytochrome  $b_{558}$  ( $gp91^{phox}$  et  $p22^{phox}$ ) phosphorylés à leur tour aussi (Quinn *et Gauss*, 2004 ; Sheppard *et al.*, 2005). La translocation de  $p47^{phox}$  est indispensable pour la translocation de la  $p67^{phox}$  vers la membrane, ces deux protéines subissent des phosphorylations au niveau des résidus séryl, thréonyl et tyrosyl (El Benna *et al.*, 1997). Alors que, la  $p40^{phox}$  paraît réguler négativement l'activation du complexe oxydase (Quinn *et Gauss*, 2004). La translocation de la Rac vers la membrane nécessite l'échange du GDP contre le GTP via l'intervention d'un facteur protéique, le GEF (*Guanine Exchange Factor*). Cet échange s'accompagne avec la dissociation du complexe de la protéine GDI (*GDP-Dissociation Inhibitor*) qui maintient la Rac sous forme inactive liée au GDP dans le cytosol, loin de ses cibles membranaires (Bokoch *et Diebold*, 2002).

La phosphorylation des sous unités cytoplasmiques  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  et la présence du cytochrome  $b_{558}$  (site d'ancrage pour les composants cytosoliques) à la membrane plasmique sont des événements indispensables dans le processus de translocation puis d'activation de la NADPH oxydase (**Fig. 5**) (Babior, 1999). Cependant, les petites GTPases Rac (1/2) et Rap 1A paraissent jouer le rôle de protéines adaptatrices qui facilitent l'association entre les composants cytosoliques et membranaires de la NADPH oxydase (Quinn *et Gauss*, 2004). La NADPH oxydase ainsi activée catalyse le transfert d'un seul électron, dans une première étape du NADPH vers le FAD, puis dans une deuxième étape du FAD vers les noyaux hèmes et finalement vers l'oxygène moléculaire pour générer l'anion superoxyde précurseur des autres espèces réactives de l'oxygène (**Fig. 6**) (Clark, 1999 ; Quinn *et Gauss*, 2004).



**Figure 5 :** Assemblage de la NADPH oxydase. La phosphorylation des composants cytosoliques **p47<sup>phox</sup>**, **p67<sup>phox</sup>** ainsi que **p40<sup>phox</sup>** induit leur translocation vers la membrane plasmique . l'interaction de la **p47<sup>phox</sup>**, la **p67<sup>phox</sup>** et la petite GTPase **Rac** avec les composants membranaire **gp91<sup>phox</sup>** et **p22<sup>phox</sup>** entraine l'activation du complexe enzymatique NADPH oxydase et la génération du  $O_2^-$  (Quinn et Gauss, 2004).



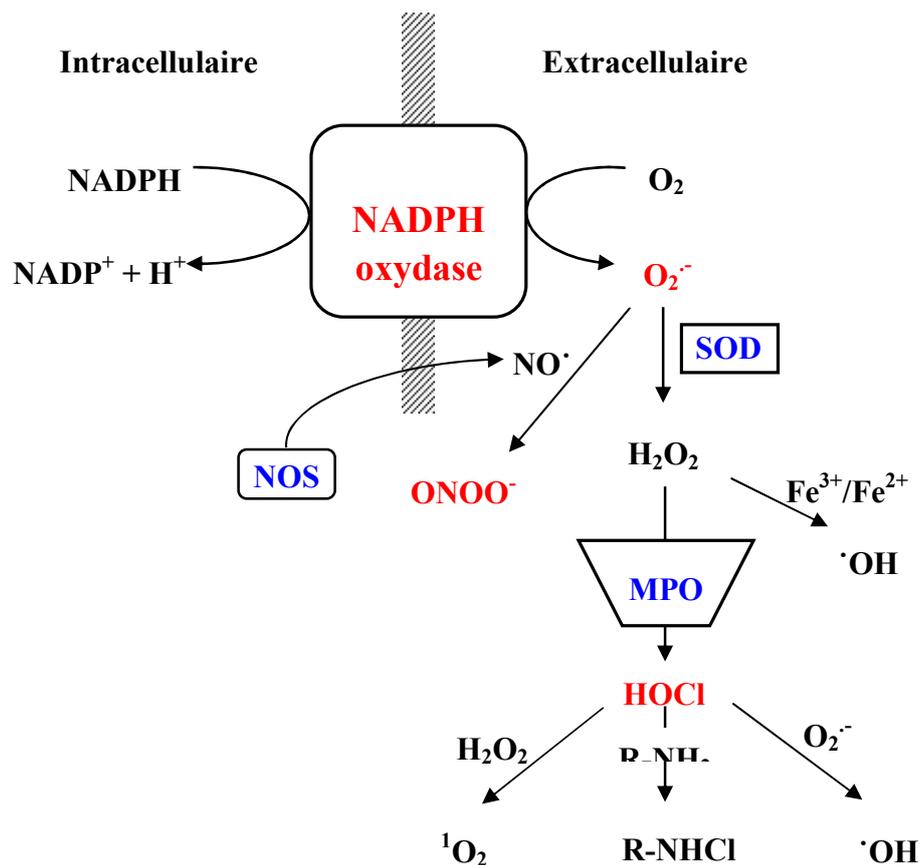
**Figure 6 :** Représentation schématique du flux d'électron au travers le centre redox du flavocytochrome  $b_{558}$ . Les deux hèmes (**H1**, **H2**) sont coordonnés par les hélices transmembranaires du flavocytochrome  $b_{558}$  de façon à permettre le transfert d'électron à travers la membrane à partir du **NADPH** puis le **FAD** et finalement l'**O<sub>2</sub>**. Des différences du potentiel à pH 7.0 sont indiquées pour chaque étape dans la voie (Quinn *et Gaus*, 2004).

L'assemblage et l'activation du complexe NADPH oxydase dépendent de plusieurs enzymes de phosphorylation activées par différentes voies de signalisation déclenchées au cours de la stimulation du neutrophile. De nombreuses kinases se montrent candidates pour jouer ce rôle, incluant la PKC, la PI3-K, les MAPK, la PKA et la PKB/Akt (Regier *et al.*, 2000; Ueyama *et al.*, 2004).

### 1. 1. 2. 2. Génération des ROS

L'assemblage de la NADPH oxydase, sous l'effet de nombreux stimuli, donne place à un complexe enzymatique à activité NADPH-O<sub>2</sub> oxydoréductase, qui catalyse la réaction de génération du superoxyde (Quinn *et Gaus*, 2004). Le superoxyde est le premier précurseur de nombreuses autres espèces très réactives de l'oxygène (**Fig. 7**).

L'anion superoxyde peut subir une réaction spontanée de dismutation en milieu protoné, ce qui entraîne la génération du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Hampton *et al.*, 1998). Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé peut réagir avec l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pour former le radical hydroxyle (•OH). Cette réaction est excessivement lente, sauf quand elle est catalysée par le fer (Martinez-Cayuella, 1994). *In vitro*, les chélateurs de fer de faible poids moléculaire tel que l'ADP-Fe<sup>3+</sup> permettent d'accélérer cette réaction (Grisham *et Ganger*, 1988), alors que la lactoferrine inhibe cette réaction par captation du fer (Hampton *et al.*, 1998).



**Figure 7 :** Différentes ROS générées par le neutrophile stimulé. **MPO :** Myélopéroxydase ; **NOS :** Nitric Oxide Synthase. (D'après Hampton *et al.*, 1995).

Le peroxyde d'hydrogène sert également de substrat pour la myélopéroxydase qui catalyse la production de l'acide hypochloreux (HOCl). L'acide hypochloreux ainsi généré réagit rapidement avec les groupements amines pour donner les dérivés chloramines (R-NHCl) qui sont des oxydant très puissants. D'autre part, l'HOCl en réagissant avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , produit l'oxygène singlet ( $^1\text{O}_2$ ) (Hampton *et al.*, 1998; Droge, 2003). La présence de l'oxyde nitrique dans le milieu peut conduire à la génération des espèces réactives du nitrogène qui sont très dangereux et très délétères pour les tissus (Hampton *et al.*, 1998).

L'effet des ROS peut être limité à l'élimination des agents étrangers, mais lorsque leur production est excessive ou les mécanismes de régulation de cette production échouent, les ROS peuvent entraîner des endommagements tissulaires importants. En effet, la haute réactivité des ROS leur permet d'interagir avec toute sorte de molécules organiques : lipides, protéines, glucides et même avec les acides nucléiques. Ce qui entraîne des conséquences biochimiques, cellulaires et tissulaires très graves, qui sont à l'origine de plusieurs pathologies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'emphysème pulmonaire (Martinez-Cayuela, 1994).

## II- Transduction du signal au cours de la dégranulation et de la flambée respiratoire du neutrophile

La stimulation du neutrophile humain conduit à de nombreuses réponses cellulaires indispensables pour la défense de l'organisme, essentiellement le chimiotactisme, la dégranulation et la flambée respiratoire (Baggiolini *et al.*, 1993). Ces différentes fonctions des PMNs peuvent être induites par plusieurs agents activateurs tels que le fMLP, le fragment C5a du complément, le PAF, le LTB<sub>4</sub>, ainsi que Il-8 (Bokoch, 1995). La majorité de ces activateurs du neutrophile agissent via des récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés à une protéine G multimérique exprimée sur la membrane plasmique des PMNs (Ben-Baruch *et al.*, 1995; Ali *et al.*, 1999).

L'activation du neutrophile est déclenchée suite à la fixation du stimulus sur son récepteur correspondant, le couplage ligand-récepteur engendre un signal dont la transduction aboutit aux différentes réponses cellulaires (Ben-baruche *et al.*, 1995). La transduction du signal est assurée par une série de voies intracellulaires. De nombreuses enzymes et seconds messagers sont soupçonnés d'être impliqués dans la stimulation fonctionnelle des neutrophiles humains, comprenant les protéines G, le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, la PKC, la PI3-kinase, les tyrosine kinases et les MAP kinases (Bochok, 1995 ; Kogut *et al.*, 2001).

### 2. 1. Protéine G

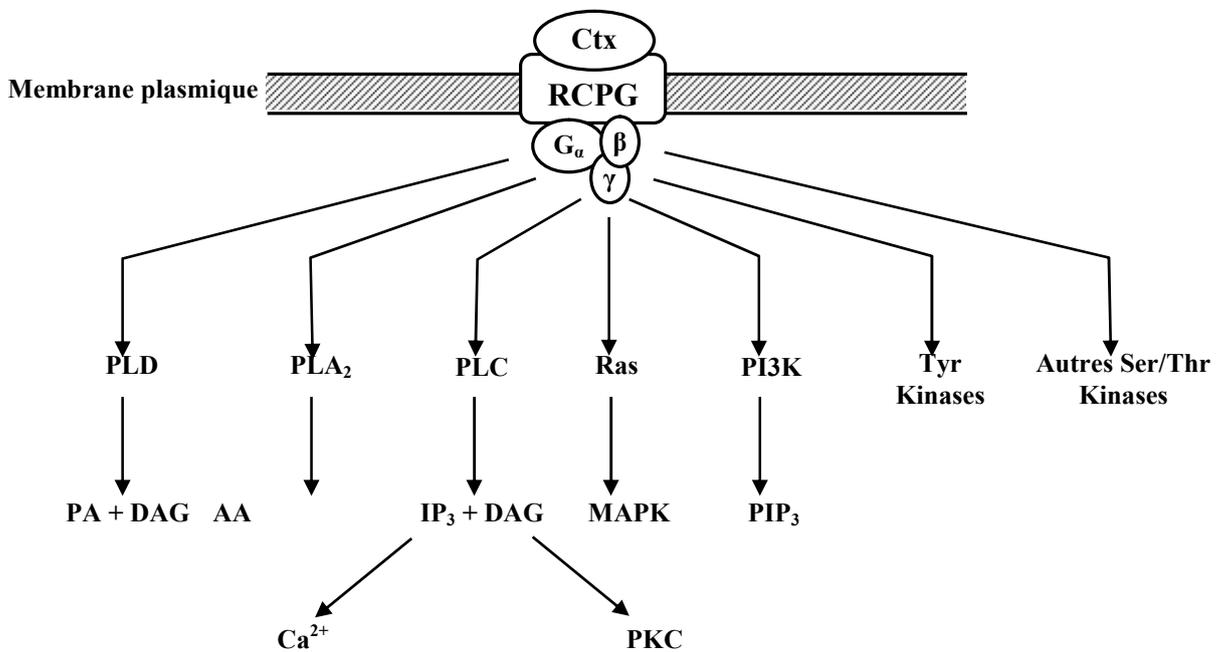
Les protéines G membranaires sont représentées par une large famille de protéines hétérotrimériques constituées de 3 sous-unités différentes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . A l'état inactif, la sous-unités  $G\alpha$  se trouve liée à une molécule du GDP (Vines *et Prossnitz*, 2004). La majorité des réponses des PMNs sont régulées via des récepteurs membranaires couplés à la protéine G (RCPG) sensibles à la toxine pertussique, suggérant que la protéine G est de type  $G\alpha_i$  (Ben-baruch *et al.*, 1995;).

La fixation du stimulus sur son RCPG induit l'activation de la protéine G, la sous-unité  $G\alpha$  échange son GDP contre une molécule de GTP et se dissocie de la paire  $\beta\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  qui se trouve ainsi libre interagit avec la phospholipase C (PLC) pour induire son activation.

La paire  $\beta\gamma$  pourrait également activer la PLC mais moins efficacement que la sous unité  $\alpha$  (Ben-baruch *et al.*, 1995; Vines *et Prossnitz*, 2004). L'activation de la PLC via la protéine G provoque une accumulation du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3), ainsi que l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Cette augmentation du taux du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire

facilite la translocation de la protéine Kinase C (PKC) vers la membrane plasmique où son activation sera potentialisée par le DAG (Baggiolini *et al.*, 1993).

De nombreuses autres voies de signalisations sont déclenchées par les récepteurs des chimioattractants liés à la protéine G (**Fig. 8**). En effet, la paire  $\beta\gamma$  de la protéine G peut activer également la PI3kinase qui génère des phosphoinositides triphosphates, ces derniers agissent comme seconds messagers et participent à l'induction des différentes réponses intracellulaires. L'activation de la protéine G peut induire également l'activation des petites GTPases de la superfamille des Ras (Rac, Rho et Cdc42), les MAP kinases et les tyrosine kinases (Gaudry *et al.*, 1993; Niggli, 2003 ; Dianqing, 2005 ).



**Figure 8** : Diagramme schématisé des voies de signalisation activées par le récepteur des chimioattractants du neutrophile. **Ctx** : Chimioattractant ; **RCPG** : récepteur membranaire couplé à la protéine G (Bochok, 1995).

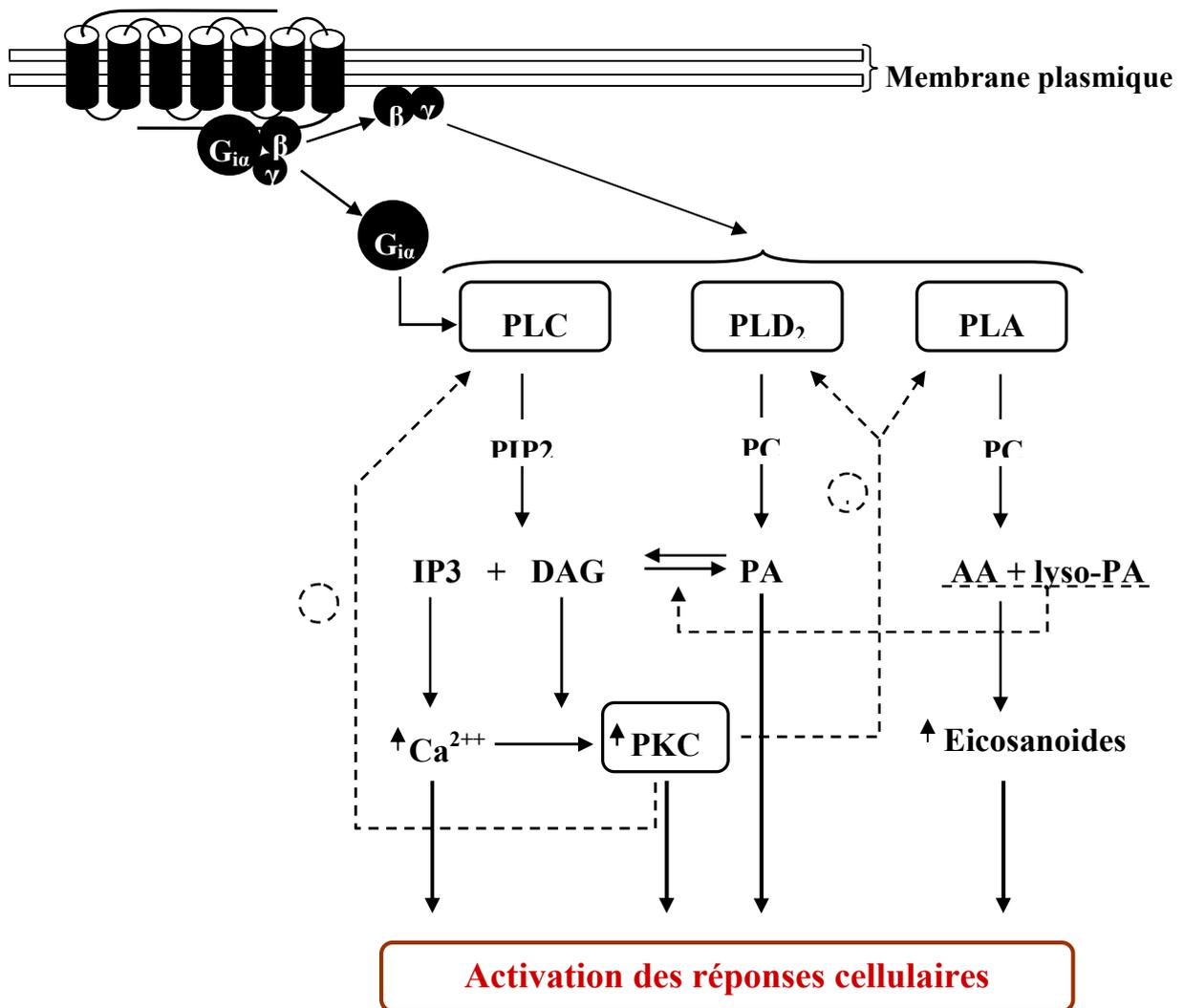
## 2. 2. Phospholipases

L'activation de la protéine G induit la dissociation de la sous-unité  $G\alpha$  des deux sous-unités  $\beta\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  se trouvant ainsi liée au GTP réagit avec la phospholipase C pour induire son activation. La paire  $\beta\gamma$  est également capable d'activer la PLC mais à moindre degré, comme elle peut activer les phospholipases D et  $A_2$  (Bokoch, 1995).

**Les phospholipases C :** ce sont un groupe de lipases qui comprend quatre membres :  $PLC_\alpha$ ,  $PLC_\beta$ ,  $PLC_\gamma$  et  $PLC_\delta$ ; ces différentes PLC sont constituées d'une seule chaîne de polypeptides. Toutes les quatre formes de la PLC ont des propriétés catalytiques similaires, elles catalysent l'hydrolyse calcium-dépendante de trois phosphoinositides communs : le phosphatidyl inositol, le phosphatidyl inositol 4-phosphate et le phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate. Cependant, le potentiel de dépendance au  $Ca^{2+}$  diffère suivant l'isoforme de la PLC (Dennis *et al.*, 1991).

L'activité de la PLC permet la génération du DAG et de l'IP<sub>3</sub>, qui jouent un rôle très important dans la transduction du signal (Bokoch, 1995). L'IP<sub>3</sub> étant hydrosoluble diffuse à travers le cytosol où il se fixe sur les canaux calciques au niveau du réticulum endoplasmique et induit la libération du  $Ca^{2+}$ . L'augmentation de la concentration du  $Ca^{2+}$  intracellulaire active de nombreuses enzymes calcium dépendantes, parmi ces dernière la PKC (**Fig. 9**) (Morel *et al.*, 1992 ; Bokoch, 1995). A un certain seuil de l'augmentation du  $Ca^{2+}$ , la PKC subit une translocation vers la membrane plasmique où son activation sera potentialisée par le DAG qui reste ancré dans la membrane plasmique de la cellule (Nishzuka, 1995). Toutefois, l'activation de la PLC est un événement précoce et transitoire qui est relayé par l'activation de la phospholipase D (PLD) (Morel *et al.*, 1992).

**La phospholipase D :** est une phospholipase qui catalyse l'hydrolyse de la phosphatidylcholine pour produire l'acide phosphatidique et la choline. Chez le neutrophile ainsi que dans les cellules HL-60, l'activation de la PLD peut être induite par le fMLP, cette activation semble se faire via la protéine G et requière la présence du calcium. Les activateurs de la PKC, tels que les esters de phorbol, sont également rapportés être capables d'activer la PLD probablement via la PKC (Dennis *et al.*, 1991 ). L'acide phosphatidique issu de l'activité de la PLD est déphosphorylé par une PA-phosphatase pour former le DAG, qui peut activer à son tour la PKC (Dennis *et al.*, 1991 ; Morel *et al.*, 1992). En fait, La PLD est suggéré participer dans la transduction du signal impliqué dans de nombreuses réponses cellulaires. Ainsi, la répression de la PLD par des inhibiteurs spécifiques tels que l'éthanol ou le propranolol réduit l'activation de la NADPH oxydase ainsi que la libération des granules



**Figure 9** : Rôle des Phospholipases et de leurs dérivés lipidiques dans la transduction du signal au cours de l'activation du neutrophile. **PIP<sub>2</sub>** : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ; **PC** : Phosphatidylcholine ; **PA** : Acide phosphatidique; **AA** : Acide arachidonique; **lyso-PA** : Acide lysophosphatidique . (+) : activation ; (-) : inhibition ; (---) : voie non confirmée. (Baggiolini *et al.*, 1993; Bokoch, 1995 ; Nisizuka, 1995).

intracellulaires au sein des neutrophiles activés par le fMLP. Ceci confirme la participation de la PLD dans la signalisation qui régit ces processus (Kaldi *et al.*, 2002).

**La phospholipase  $A_2$**  : est une autre phospholipase qui intervient dans la signalisation au sein du neutrophile à côté de la PLC et de la PLD (Bokoch, 1995). La phospholipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) catalyse la réaction de l'hydrolyse des phospholipides au niveau de la position *sn*-2-*acyl* pour induire la libération des acides gras *cis*-insaturés, préférentiellement l'acide arachidonique (AA), ainsi que les lysophospholipides. Cette activité de la  $PLA_2$  est vraisemblablement  $Ca^{2+}$ -indépendant (Baggiolini *et al.*, 1993 ; Nishizuka, 1992 *et* 1995). Des agonistes tels que le fMLP et le facteur de croissance sont capables d'activer la  $PLA_2$  via leur récepteurs couplés à la protéine G. En outre, des études faites sur des neutrophiles intacts ont montré également la possibilité de l'activation de la  $PLA_2$  par la PKC (Nishizuka, 1992 ; 1995). L'acide arachidonique et l'acide phosphatidique libérés sous l'action de la  $PLA_2$  et à des concentrations physiologiques, peuvent activer la NADPH oxydase, la dégranulation des neutrophiles ainsi que l'expression du récepteur type 3 du complément (CR3) (Baggiolini *et al.*, 1993 ; Bokoch, 1995 ; Tithof *et al.*, 1998 ; Moghaddami *et al.*, 2003 ). L'acide arachidonique sert également de précurseur pour de nombreux médiateurs inflammatoires regroupés sous le terme d'eicosanoides (prostaglandines, thromboxane, leucotriènes). Ces derniers jouent d'importants rôles aussi bien physiologiques que pathophysiologiques (Tithof *et al.*, 1998).

### **2. 3. Protéine Kinase C (PKC)**

L'accumulation du DAG et de l'IP3 suite à l'activation de la PLC, constitue un évènement important dans la transduction du signal, ces deux produits jouent le rôle de seconds messagers (Dennis *et al.*, 1991). L'IP3 induit le relâchement du  $Ca^{2+}$  de son réservoir intracellulaire, le  $Ca^{2+}$  libéré facilite la translocation de la protéine kinase C du cytosol vers la membrane plasmique où son activation est potentialisée par le DAG qui reste associé à la membrane plasmique (Baggiolini *et al.*, 1993, Nishizuka, 1995). Une fois activée, la PKC est responsable de l'induction des réponses du neutrophile y compris la dégranulation et la flambée respiratoire (Gaudry *et al.*, 1993).

Les PKCs constituent une famille de protéines à activité sérine/thréonine kinase phospholipides-dépendantes (Nishizuka, 1995). Les PKCs sont subdivisées suivant leur structure et leur mode d'activation en 3 sous-familles: les PKCs conventionnelles (cPKCs), les nouvelles PKCs (nPKCs) et les PKCs atypiques (aPKC) (Nishizuka, 1995; Laudanna *et al.*, 1998). Les cPKCs renferment 4 isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$  et  $\gamma$ ) qui sont toutes  $Ca^{2+}$ - et DAG-

dépendantes, elles requièrent la phosphatidylsérine pour leur activation. Le groupe des nPKCs est constitué de 5 isoformes ( $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\mu$ ,  $\eta$  et  $\theta$ ) qui nécessitent la phosphatidylsérine et le DAG pour leur activation, mais elles sont  $C^{2+}$ -indépendantes. Tandis que les aPKCs constituent une sous-familles qui renferme seulement deux isoformes ( $\zeta$  et  $\iota/\lambda$ ), les aPKCs sont  $Ca^{2+}$ - et DAG-indépendantes mais elles requièrent la phosphatidylsérine pour leur activité (Nixon *et al.*, 1999; Korchak *et al.*, 2001). Cependant, seulement 5 isoformes de la PKC :  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\delta$  et  $\zeta$  sont identifiées au sein du neutrophile humain. Mais le rôle exact de chacune des isoformes dans l'induction des réponses du neutrophile est encore mal connu (Dang *et al.*, 2001). En dépit des différentes conditions requises des cofacteurs, il y a une petite différence entre les spécificités des isoformes de la PKC vis-à-vis du substrat *in vitro* (Larsen *et al.*, 2000).

L'activation de la PKC est induite suite à la fixation d'un stimulus tel que l'fMLP sur son récepteur membranaire lié à la protéine G, comme elle peut être induite par les esters de phorbol analogues du DAG tel que PMA (Laudanna *et al.*, 1998). Le PMA est capable d'activer directement la PKC en se fixant sur le site de liaison du DAG (Gamet-Payraastre *et al.*, 1999). D'autres études ont rapporté la possibilité de l'activation de la PKC par la PI3K (Vlahos, 1995 ; Le Good *et al.*, 1998) ainsi que par les petites GTPases de la famille des Rho (Laudanna *et al.*, 1998). D'autre part, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de la PKC montre qu'elle possède de nombreux effecteurs intracellulaires. Il a été rapporté que la PKC induit la phosphorylation des composants cytosoliques ( $p47^{phox}$  et  $p67^{phox}$ ) de la NADPH oxydase, qui est une étape primordiale pour l'assemblage et l'activation du complexe générateurs du superoxyde (Lopes *et al.*, 1999 ; Regier *et al.*, 2000). Il a également été rapporté que la PKC pourrait constituer un effecteur cytosolique de différents types de récepteurs pour réguler l'activité de nombreuses autres protéines kinases telles que les MAPK (Selvatici *et al.*, 2003) , probablement via l'activation du Raf (Chen *et al.*, 2005).

Il est actuellement bien établi que la PKC joue un rôle très important dans la régulation de nombreux processus au sein du neutrophile. La PKC pourrait être impliquée dans la flambée respiratoire (Vlahos, 1995), la dégranulation (Faurischou *et al.*, 2003), l'adhésion cellulaire intégrines dépendante (Laudanna *et al.*, 1998) ainsi que dans le chimiotactisme des PMNs (Dunzendorfen *et al.*, 2000). Cependant, le rôle exact des isoformes de la PKC et les mécanismes par lesquels elles interviennent dans la régulation des fonctions des neutrophiles sont à investiguer.

## 2. 4. Phosphatidyl inositol 3-Kinase (PI3K)

La phosphatidyl inositol 3-Kinase (PI3K) est une enzyme lipide kinase qui pourrait être impliquée dans la signalisation de nombreuses fonctions cellulaires y compris la prolifération, la génération du superoxyde, le chimiotactisme ainsi que la mobilisation des vésicules cellulaires (Walker *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2000). Les PI3Ks sont un groupe d'enzymes hétérodimériques qui catalysent la phosphorylation de l'hydroxyl en position D3 de l'inositol du phosphatidylinositol, du phosphatidylinositol 4-phosphate, et du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate pour générer le phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP), le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) et le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>), respectivement (Al-Shami *et al.*, 1997). Ces produits lipidiques de la PI3K sont insensibles à l'action de la PLC, et jouent le rôle de seconds messagers dans l'activation des protéines spécifiques du signal (Payraastre *et al.*, 2001).

Les PI3Ks sont classées, selon leur structure et leur spécificité vis-à-vis le substrat, en trois classes: PI3K I, PI3K II et PI3K III (Walker *et al.*, 1999). La classe PI3K I est d'un important intérêt physiologique dans le neutrophile, elle est subdivisée en deux sous-classes IA et IB. La sous-classe IA renferme des hétérodimères constitués d'une sous-unité régulatrice p85 ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) liée à une sous-unité catalytique p110 ( $\alpha$ ,  $\beta$ , ou  $\gamma$ ), l'activation de ces isoformes se fait via les tyrosine kinases. Alors que, la sous-classe IB renferme seulement un seul membre hétérodimérique constitué d'une sous-unité catalytique p110 $\gamma$  qui est associée à une sous-unité régulatrice p101 dont l'activation se fait par les sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine G associée aux récepteurs des chimioattractants. Les enzymes de la classe I sont exprimées au sein du neutrophile, elles phosphorylent préférentiellement le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate pour générer le PIP<sub>3</sub> (Wymann *et Pirola*, 1998; Naccache *et al.*, 2000). L'activité de la PI3K peut être rapidement induite suite à l'activation des PMNs par l'fMLP qui agit via son récepteur associé à une protéine G, mais cette activation peut être inhibée par le wortmannin ou le LY294002. Ces deux inhibiteurs réduisent la phosphorylation de la protéine p47<sup>phox</sup> et abolissent l'activation de la NADPH oxydase, ainsi que la mobilisation des granules intracellulaires du neutrophile activé, ce qui reflète l'importance de l'PI3K dans ces deux processus (Vlahos, 1995; Capodici *et al.*, 1998).

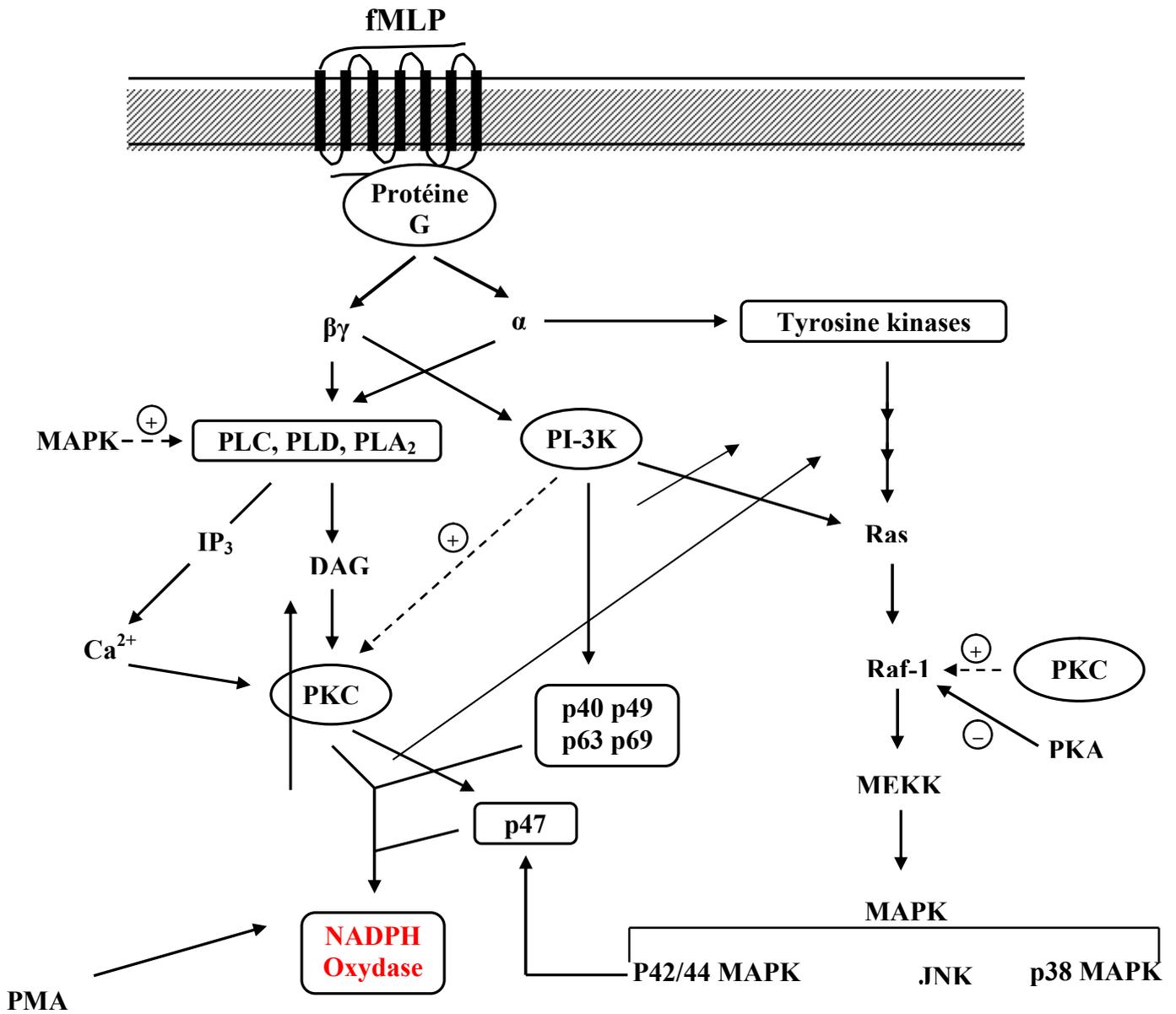
La PI3K montre une double spécificité dans son activité. Cette enzyme possède une activité lipide kinase lui permettant de générer les produits lipidiques phosphorylés (PIP<sub>3</sub>), et une activité protéine kinase intrinsèque nécessaire pour activer certaines protéines du signal (Bondeva *et al.*, 1998).

Le nombre de molécules de signalisation suggérées être les cibles de la PI3K sont de plus en plus mises en évidence. En effet, Le PIP<sub>3</sub> après liaison au domaine d'homologie au pleckstrin de PKB/Akt permet l'association du phosphatidyl inositol-dépendantes kinases (PDK1 et PDK2) et l'activation d'Akt par la phosphorylation de la Thr308 et de la Ser473 (Yum *et al.*, 2001 ; Strassheim *et al.*, 2004). Le PIP<sub>3</sub> peut également activer les isoformes Ca<sup>2+</sup>-dépendantes et Ca<sup>2+</sup>-indépendantes de la PKC, dont certaines isoformes ont été rapportées être activées par la PDK1; cette activation est inhibée par le LY294002 qui est un inhibiteur spécifique de la PI3-K (Le Good *et al.*, 1998). Les isoforme  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\tau$  et  $\zeta$  de la PKC sont suggérées être des cibles pour l'activité PI3K, ce qui pourrait expliquer la relation entre l'activation de la PI3-kinase et la phosphorylation du facteur p47<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase. D'autres protéines peuvent se présenter comme cibles de la PI3 kinase telles que la PLD (Stoyanova *et al.*, 1997; Wymann *et Pirola*, 1998), ainsi qu'une famille de protéines kinases cytosoliques de 69, 63, 49 et 40 KDa qui peuvent phosphoryler et activer directement la p47<sup>phox</sup> (**Fig. 10**). La PI3K induit également l'activation de la cascade des MAP kinases (Bondeva *et al.*, 1998). A la liste des cibles de la PI3K pourrait s'ajouter la petite GTPase Ras (p21<sup>ras</sup>), qui active à son tour la protéine Raf-1. Cette dernière, activée également par la PKC, phosphoryle et active une famille de MEKs (MEK1, 2 et 3) responsable de l'activation des MAPK (Downey *et al.*, 1996, Walker *et al.*, 1999).

## 2. 5. Petites GTPases

Les Rho GTPases sont une sous famille des Ras et comportent les membres suivants : Rho (A, B et C) , Rac (1,2 et 3) et Cdc 42 (Cdc42Hs et G25K). Ces Rho GTPases jouent un rôle central dans la transduction et la régulation du signal induit par les récepteurs membranaires ainsi que les réponses cellulaires régies par ces récepteurs (Kim *et Dinauer*, 2001 ; Kim *et al.*, 2003)..

Les Rho GTPases s'alternent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. A l'état inactif, les Rho GTPases se trouvent liées au GDP, cette liaison est renforcée par l'intervention d'un facteur régulateur de l'activité des petites GTPases, le GDI qui maintient les GTPases inactive dans le cytosole (Kim *et al.*, 2003). L'activation des Rho GTPases peut être induite via le GEF suite à la fixation d'un stimulus tel que le fMLP à son récepteur membranaire. Lorsque les cellules sont activées, le facteur GEF s'associe à la GTPase-GDP et active l'échange du GDP contre le GTP. La complexation GTPase-GTP provoque un changement conformationnel qui induit l'activation des petites GTPases.



**Figure 10 :** Voies de transduction du signal impliquées dans la flambé respiratoire du neutrophile activé. (-) : inhibition ; (+) : activation ; (---) : voie non confirmée. (Adapté de Nishizuka, 1995 ; Vlahos, 1995).

Le processus d'activation des Rho GTPase est complété par l'hydrolyse du GTP en GDP, cette hydrolyse est accélérée par le facteur GAP (*GTPase Activating Protein*) (Li *et al.*, 2002).

Les voies spécifiques d'activation de ces GTPases au sein du neutrophile sont encore mal connues (Kim *et* Dinauer, 2001). Certaines études rapportent que les Rho GTPases peuvent être activées directement par la sous unité  $G_{\beta\gamma}$  de la protéine G, ainsi que par le  $PIP_3$  produit par la PI3K. Les Rac GTPase peuvent également être activées par les tyrosine kinases au sein des neutrophiles humains fMLP-stimulés (Kim *et al.*, 2003).

Les Rho GTPases interviennent dans la régulation d'un large spectre de fonctions cellulaires. L'activation de la production des ROS est la première fonction qui a été attribuée aux Rac GTPases chez les neutrophiles (Philips *et al.*, 1995). Il a été démontré que les membres Rac1 et Rac2 sont essentiels pour l'activation de la NADPH oxydase (Bochok *et* Diebold, 2002). Les Rac sous leur forme associée au GTP se lient au composant cytosolique  $p67^{phox}$  et probablement au cytochrome  $b_{558}$  au niveau de la membrane plasmique, et participent ainsi à l'assemblage de la NADPH oxydase (Gorzalczany *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2002). Par la suite, il a été démontré que les Rho GTPase participent dans de nombreuses fonctions leucocytaires. Elles peuvent intervenir dans la mobilisation des granules intracellulaires des PMNs (Fauschou *et* Borregard, 2003), la phagocytose (Li *et al.*, 2002) ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette et la migration des neutrophiles (Kim *et* Dinauer, 2001).

De nombreux effecteurs intracellulaires semblent constituer des cibles pour les Rho GTPases. Certaines études récentes rapportent que les Rho GTPase peuvent activer des phosphoinositides kinases, des serine/thréonine kinases ainsi que des protéines d'interaction avec l'actine telles que les Arp (*Actin-Relating Protein*) (Werner, 2004). D'autres, ont montré que la régulation de la dégranulation et de la phagocytose des neutrophiles humain par les Rac et le Cdc42 se fait probablement via l'activation des MAP kinases (Zhong *et al.*, 2003).

## **2. 6. Tyrosine Kinases**

Il est connu que la stimulation des récepteurs membranaires du neutrophile se traduit par une augmentation de la phosphorylation de multiples protéines au niveau des résidus sérine, thréonine et tyrosine, régies par de nombreuses protéines kinases parmi lesquelles figurent les tyrosine kinases (Zhong *et al.*, 1998). Au sein du neutrophile, différentes familles de tyrosine kinases sont exprimées : les Src tyrosine kinases (Lyn, Hck, Fgr, Yes et c-Src), les Syk tyrosine kinases et les Pyk2 tyrosine kinases (Proline rich tyrosine kinases) (Bochok, 1995 ; Lowell *et* Berton, 1999).

Plusieurs études montrent que l'activité tyrosine kinase prend part dans les mécanismes de régulation des réponses fonctionnelles du neutrophile (McColl *et al.*, 1991 ; Gaudry *et al.*, 1993 ; Mocsai *et al.*, 2000). L'activation des tyrosines kinases, peut être induite par des récepteurs membranaires liés à la protéine G tel que celui du fMLP (Yamaguchi *et al.*, 1995). Les tyrosines kinases, notamment la famille des Src-tyrosine kinases, sont activées par la sous unité  $\alpha$  de la protéine G. les Src-tyrosine kinases activent une GTPase de faible poids moléculaire (p21<sup>ras</sup>), activée également par la PI3K, via la phosphorylation du Shc. Les Shc sont un groupe de protéines adaptatrices qui renferment des domaines SH2 et SH3. L'association tyrosine kinases-Shc induit le recrutement du Grb2 et Sos vers la membrane plasmique (Bochok, 1995). L'activation de la petite GTPase p21<sup>ras</sup> par les tyrosine kinases conduit à l'activation de la protéine Raf-1 (Nishizuka, 1995), Cette dernière peut induire la cascade des MAPK (Walker *et al.*, 1999). Le complexe formé par le membre Lyn des Src-tyrosine kinase avec le Shc (Lyn-Shc) interagit également avec la PI3K, suggérant ainsi que les tyrosine kinases jouent un rôle dans la régulation de l'activité de la PI3K (Bochok, 1995). Cependant, certaines études ont rapporté que la phosphorylation tyrosine kinases-dépendante est sensible au wortmannin, inhibiteur de la PI3K, indiquant une possible régulation des tyrosines kinases par la PI3K. La caractérisation d'une nouvelle famille de tyrosine kinases qui contiennent un domaine PH (Plekstrin Homology), famille de Tec tyrosine kinases, a prouvé cette hypothèse et a fourni une évidence du lien possible entre les tyrosine kinases et la PI3K (Gilbert *et al.*, 2003 ; Lachance *et al.*, 2003). Il a été également rapporté que l'activité des tyrosine kinases peut être contrôlée par la PKC. En effet, la stimulation des neutrophiles par les esters de phorbol, qui activent directement la PKC, provoque l'activation et la translocation des tyrosine kinases vers la membrane plasmique. Cette activation est bloquée par les inhibiteurs de la PKC, indiquant que cette dernière est requise pour la régulation de l'activité des tyrosine kinases (Gaudry *et al.*, 1993).

De nombreuses observations mettent en évidence l'implication des tyrosine kinases dans la régulation des fonctions du neutrophile. Il a été rapporté que de nombreux inhibiteurs des tyrosine kinases répriment la génération du superoxide induite par différents agonistes. En effet, l'augmentation de l'activité de la phosphotyrosine phosphatase provoque la diminution de la génération des ROS par les neutrophiles (Mocsai *et al.*, 1997). D'autre part, l'implication des tyrosine kinases dans la régulation de la dégranulation des neutrophiles a été également rapportée (Ligeti *et Mocsai*, 1999). L'activation des neutrophiles par le fMLP induit la translocation du Fgr (membre des Src-tyrosine kinases) vers la membrane plasmique, cette translocation est associée avec la libération des granules secondaires des PMNs.

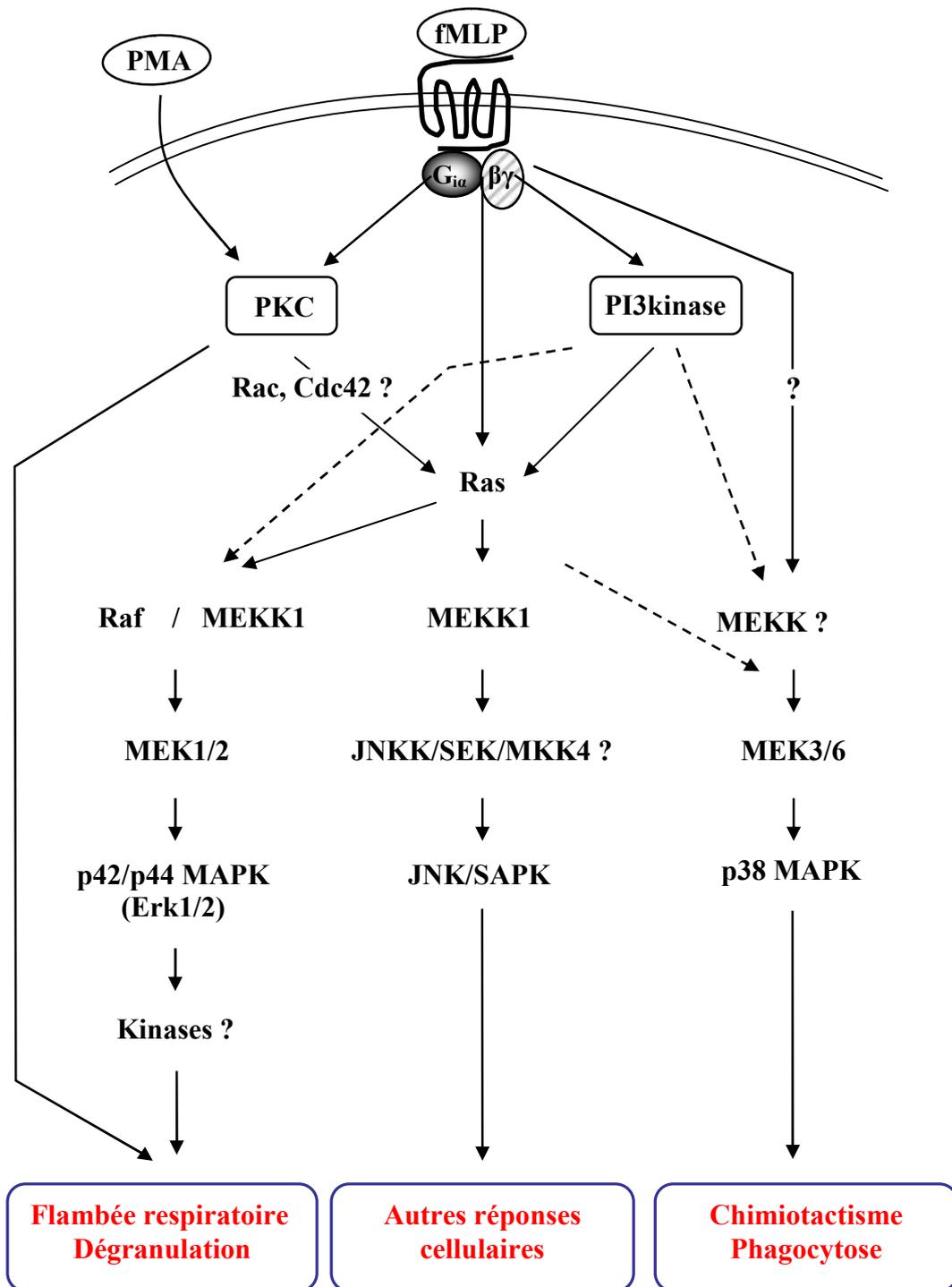
L'activation de Hck tyrosine kinase est accompagnée de la mobilisation des granules primaires vers le phagosome au sein des neutrophiles activés par le zymozan opsonisé (Mocsai *et al.*, 1999).

Cependant, les différentes études apportées sur les tyrosine kinases ne fournissent pas assez de détails sur le rôle précis des différents membres des tyrosine kinases dans la régulation des réponses du neutrophile, ainsi que les mécanismes exacts par lesquels ses tyrosine kinases agissent.

## 2. 7. MAP Kinases (MAPK)

Les MAP Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) sont des "proline-directed serine/threonine kinases", elles sont subdivisées en trois familles : les ERKs (*Extracellular-Regulated Kinases*), les c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK, appelées également SAPK) et les p38 MAP kinases (Downey *et al.*, 1998). Plusieurs isoformes d'ERKs ont été décrites, et au moins deux d'entre elles (ERK1 et ERK2) sont exprimées chez le neutrophile. ERK1/2 sont des protéines de 42 et 44 KDa (p42/p44<sup>MAPK</sup>), respectivement. La seconde famille des MAPK, p38 MAPK, est définie comme étant un groupe d'isoformes de 38 KDa. Cette famille comprend quatre différentes protéines homologues: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  MAPK. Chez le neutrophile, seulement les deux isoformes p38 $\alpha$  et p38 $\delta$  ont été identifiées (Chen *et al.*, 2005). Certaines études récentes ont démontré que les voies des ERKs et de p38 MAPK, mais non pas les JNK sont activées dans les neutrophiles humains par le fMLP, le PMA, le GM-CSF et le TNF (Dewas *et al.*, 2002).

L'activation des MAPK se fait via une cascade en trois étapes. La première étape implique l'intervention des MEKK1 (MAP kinases Kinases Kinases 1). Les MEKKs induisent l'activation d'un groupe de protéines kinases, les MEKs (MAP kinases kinases). L'activation des MEKKs et MEK se fait par des phosphorylations au niveau des résidus sérines et thréonines (Avdi *et al.*, 2002). Les MEKs sont un groupe de protéines kinases à double spécificité qui reconnaissent et phosphorylent les MAPKs au niveau des résidus thréonines et tyrosines au sein du motif Thr-Gly-Tyr (Rane *et al.*, 2001). Les MEK3/6 (membres des MEK) activent les p38 MAPK, alors que les p42/44 MAPK (ERKs) sont plutôt activées par les MEK1/2 (Downey *et al.*, 1998). Cependant, les JNKs MAPK pourraient être activées par les MEK4 ou JNKK (JNK kinases) activées à leur tour par les MEKKs (**Fig. 11**). L'activation des MAPKs peut être déclenchée par des RCPGs tel que le récepteur de l'fMLP ou de GM-CSF. Cette activation se fait par l'intermédiaire de la petite GTPase Ras (p21<sup>ras</sup>), la p21<sup>ras</sup> facilite l'activation de Raf-1 qui phosphoryle et active la famille des MEKs,

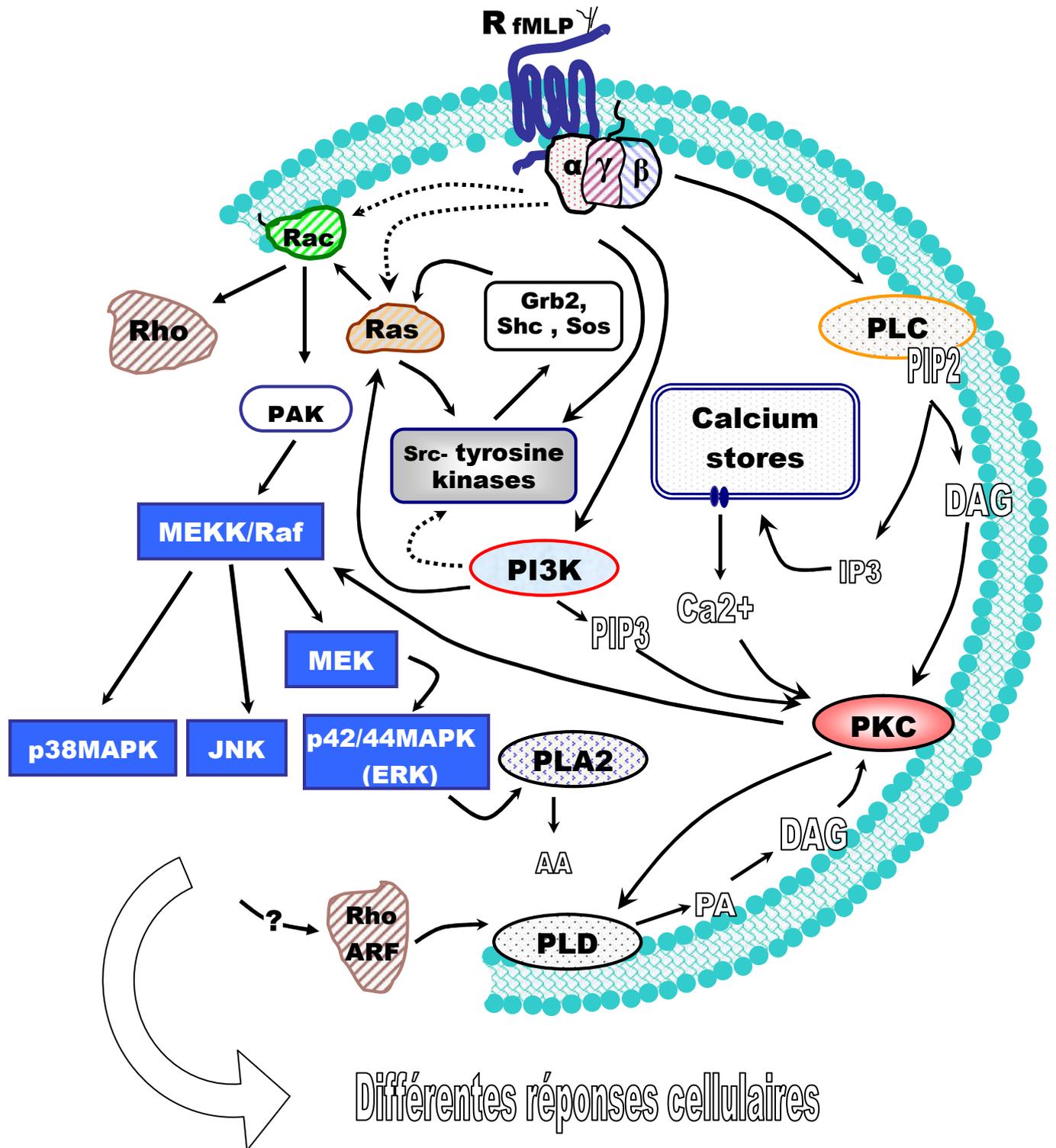


**Figure 11 :** Modèle proposé de l'activation de la cascade des MAP kinases au sein du neutrophile. Trois voies de **MAPK** sont distinguées au sein du neutrophile, les **ERKs** (p42/44 MAPK), les **p38 MAPK** et la voie de **c-JNK/SAPK**. (Avdi *et al.*, 1996).

aboutissant à la phosphorylation et l'activation des MAPK (Avdi *et al.*, 1996; Downey *et al.*, 1998). D'autres études ont également rapporté que les MAPKs peuvent constituer des effecteurs cytosoliques pour de nombreuses enzymes impliquées dans la transduction du signal au sein du neutrophile. Ainsi, il a été rapporté que la phosphorylation *in vitro* des MAPKs est bloquée par le wortmannin, inhibiteur spécifique de la PI3K, indiquant que cette enzyme est requise pour la régulation de l'activité des MAPKs (Chen *et al.*, 2005). Il a été aussi rapportée que la PKC est capable d'activer les MAPKs via l'activation de la protéine Raf (Krump *et al.*, 1997). Les tyrosine kinases peuvent être aussi impliquées dans l'activation des MAPKs au sein du neutrophile stimulés (Zhang *et al.*, 1998).

En réponse à différents activateurs, les MAPK participent dans la transduction du signal de nombreuses réponses des PMN (Ward *et al.*, 2000). En effet, les MAPK sont suggérés être impliquées dans le remodelage du cytosquelette, l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub>, ainsi que l'activation de la NADPH oxydase (Downy *et al.*, 1998). D'ailleurs, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques des MAPK tels que le PD098059 (inhibiteur des ERKs) et le SB203580 (inhibiteur de p38 MAPK) inhibe l'adhésion, le chimiotactisme, la dégranulation et la production du O<sub>2</sub><sup>-</sup> par les neutrophiles (Lian *et al.*, 1999).

Toutes ces enzymes et seconds messagers s'interagissent et s'interfèrent pour constituer un réseau de signalisation très complexe qui aboutit aux différentes réponses au sein du neutrophile activé (**Fig. 12**). Toutefois, les informations disponibles concernant le rôle des différentes enzymes dans la transduction du signal impliqué dans la régulation des fonctions du neutrophile sont encore très divergentes et parfois contradictoires et méritent une meilleure investigation.



**Figure 12 :** Différentes voies impliquées dans la transduction du signal déclenché par le récepteur membranaire couplé à la protéine G (Récepteur du fMLP) au sein du neutrophile (Adapté de Mills *et al.*, 1999).

*Partie*  
*Expérimentale*

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. MATÉRIEL

### 1. 1. Réactifs

Les produits utilisés dans la présente études sont : Hanks' Balanced Salt sans  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS<sub>1</sub>) ou avec  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS<sub>2</sub>), Ficoll-Histopaque, Héparinate de lithium, Dextran, Bleu de Trypan, acide N-[2-hydroxyethyl]Piprasine-N'-[2-éthanesulfanique] (HEPES), Genistein , Chelerythrine chloride, Wortmannin, PD98059. N-Méthoxy-Suc-(Ala)<sub>2</sub> – Pro – Val – p - Nitroanilide, Formyl – Méthionyl – Leucyl - Phénylalanine (fMLP), Cytochalasine B, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) et Superoxyde dismutase des érythrocytes bovines (SOD) proviennent de Sigma (Germany). Tous les solvants et les autres produits utilisés sont de grade analytique et proviennent de Sigma (Germany), Fluka et Prolabo (France).

### 1. 2. Matériel biologique

Le sang humain frais est obtenu par prélèvement de donneurs volontaires sains, non fumeurs et qui ont certifié n'avoir subi aucune médication d'aucune sorte pendant au moins 15 jours.

## 2. MÉTHODES

### 2. 1. Préparation des cellules

#### 2. 1. 1. Isolement des PMNs

Les PMNs sont isolés selon la méthode décrite par Selloum et ses collaborateurs (2001). Brièvement, le sang est prélevé sur héparinate de lithium (5U/ml, dans NaCl 0,9%) dans des tubes coniques en polypropylène. Pour accélérer la sédimentation des hématies, 1 ml de Dextran (10% dans NaCl 0,9%) est ajouté à 10 ml de sang prélevé. Après une heure de sédimentation à température ambiante, le plasma est transféré dans un nouveau tube et 2 ml d'Histopaque sont injectées au fond du tube, suivi d'une centrifugation à 1000 rpm pendant 25 min à 4°C (Rotina R35, Germany). Les cellules mononucléaires (lymphocytes et macrophages) restent à l'interphase formant un anneau limpide, tandis que les neutrophiles et les hématies résiduelles précipitent avec les autres granulocytes dans le culot. Pour éliminer

les hématies contaminantes, une série d'hémolyse hypotonique est effectuée en ajoutant de l'eau distillée fraîche pendant 30 secondes. Chaque hémolyse est suivie d'un lavage avec une solution fraîche de HBSS<sub>1</sub> (Hank's sans Ca<sup>+2</sup> et Mg<sup>+2</sup>, 0,95%), la suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 1000 rpm pendant 10 min à 4°C. L'étape de la lyse hypotonique et de la centrifugation est répétée 3 fois. Après la dernière centrifugation, les cellules sont récupérées dans le HBSS<sub>1</sub> et conservées à une concentration de 2.5×10<sup>6</sup> cellules/ml dans un bain de glace. Lors de son utilisation, la suspension cellulaire est centrifugée à 1000 rpm 10 min à 4°C, puis les cellules sont récupérées dans le HBSS<sub>2</sub> (Hank's avec Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, 0,95%) à la concentration choisie (**Fig. 13**).

## **2. 1. 2. Pureté et viabilité cellulaire**

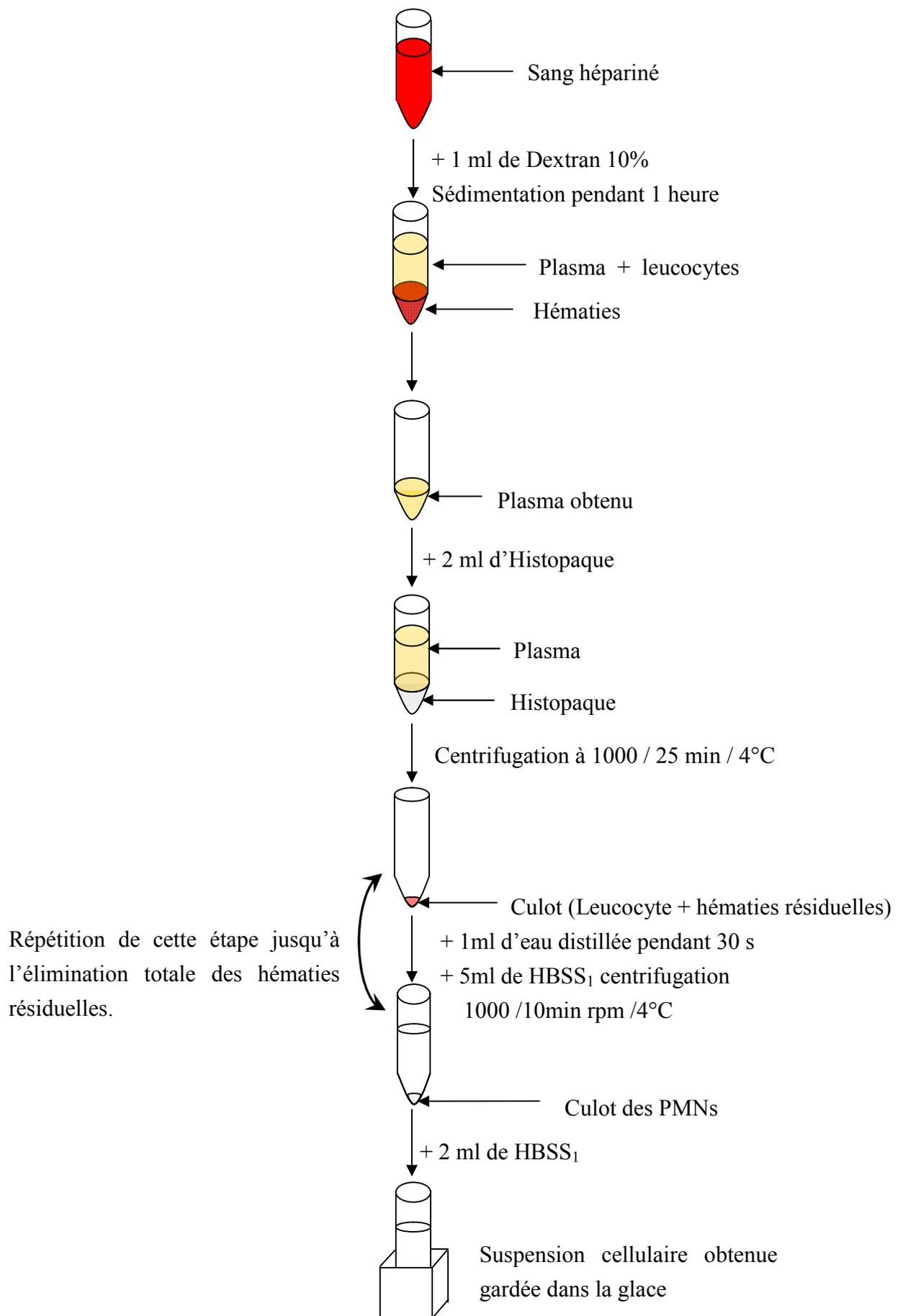
Le nombre des PMNs obtenus à la fin de l'isolement est déterminé à l'aide d'une cellule de Thoma. Pour cela, 50 µl de la suspension cellulaire sont rigoureusement mélangés à 450 µl de la solution Turk. Les PMNs sont comptés dans les 16 carreaux de la cellule à l'aide du grossissement X100 d'un microscope (Zeiss, Germany). La pureté de la suspension cellulaire est ensuite déterminée par réalisation d'un frottis, et cela en étalant une goutte de la suspension cellulaire sur une lame en verre. Après fixation avec le méthanol pendant 5 min et coloration par le Wright stain pendant 2 min, le frottis est observé à l'aide du grossissement X400 d'un microscope (Zeiss, Germany). La formule leucocytaire est établie sur un nombre de cent cellules. La pureté de la suspension est alors définie comme étant le pourcentage de neutrophiles sur cent cellules comptées aléatoirement dans le frottis.

La viabilité des cellules isolées est immédiatement évaluée après l'isolement, par le test d'exclusion au bleu de Trypan (Cabanis, 1996). Pour cela, un volume de 300 µl de la suspension cellulaire est incubé avec 300 µl d'une solution de bleu de Trypan (0.4%) pendant 10 min à 37°C. Le nombre de PMNs colorés en bleu (cellules mortes) est compté à l'aide de la cellule de Thoma. Le pourcentage de viabilité est alors défini selon la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = (N_{\text{total}} - N_{\text{mortes}} / N_{\text{total}}) \times 100$$

\* **N<sub>total</sub>** : Nombre total de cellules comptées (viables et non viables).

\* **N<sub>mortes</sub>** : Nombre de cellules mortes (non-colorées).



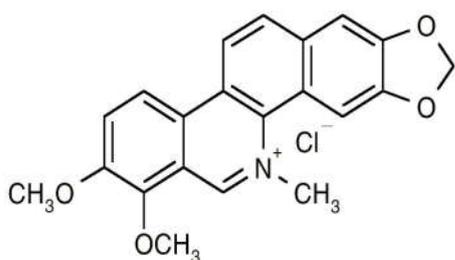
**Figure 13:** Principales étapes d'isolement des PMNs à partir du sang humain.

## 2. 2. Cytotoxicité des substances étudiées

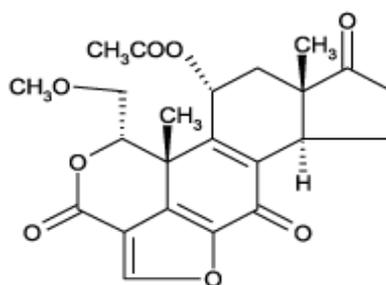
La cytotoxicité des différentes substances utilisées est évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Pour cela les PMNs ( $3 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés pendant 30 minutes à 37°C avec chacune de substances utilisées (wortmannin à 100 nM, genistein et chelerythrine chloride à 100  $\mu$ M, PD09850 à 50  $\mu$ M et DMSO 1%). La viabilité de ces PMNs est ensuite estimée comme précédemment décrit.

## 2. 3. Essai de dégranulation

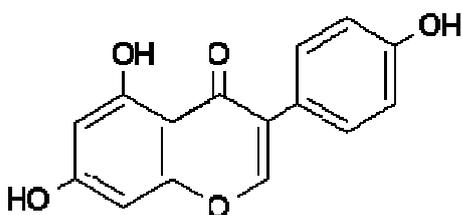
La dégranulation des neutrophiles activés par le fMLP ou le PMA, en présence ou en absence des différents inhibiteurs (**Fig. 14**) est évaluée par dosage de l'activité de l'élastase leucocytaire libérée dans le surnageant des cellules activées en utilisant le substrat spécifique de l'élastase leucocytaire, tel que décrit par Vocks et ses collaborateurs (2003).



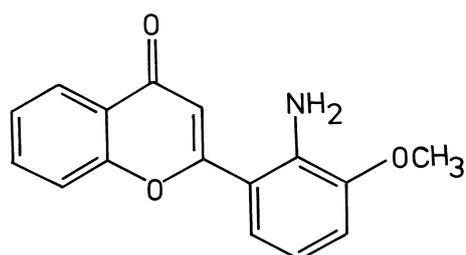
Chelerythrine chloride



Wortmannin



Genistein



PD089059

**Figure 14** : Structure des différents inhibiteurs utilisés.

### **2. 3. 1. Effet des différents inhibiteurs sur l'activité de l'élastase leucocytaire**

Avant de tester l'effet des différents inhibiteurs sur la dégranulation des PMNs, nous avons évalué leur effet sur l'activité de l'élastase elle-même. Pour cela, les PMNs ( $5.5 \times 10^6$  cellules/ml dans HBSS<sub>2</sub>) sont incubés pendant 25 min à 37°C, en présence du fMLP/cytochalasine B ( $10^{-6}$  M /  $10^{-5}$  M). Après centrifugation (5000 rpm / 25min / 4°C), le surnageant contenant l'élastase est récupéré puis incubé pendant 10 min à 37°C avec la genistein ou chelerythrine chloride à 100 µM, le wortmannin à 100 nM ou le PD98059 à 50 µM. Ensuite, 75 µl du surnageant sont déposés dans une plaque transparente de microtitration avec 75 µl du substrat spécifique de l'élastase [N-Méthoxy-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-*p*-Nitroanilide ( $5 \times 10^{-4}$  M) préparé dans le 1-méthyl 2-pyrrolidone et dilué dans le tampon HEPES 0.1M, pH7.4]. La plaque est incubée pendant 25 min à 37°C. L'activité de l'élastase est évaluée par mesure de l'absorbance de *p*-Nitroanilide libéré à 405 nm contre des puits contenant du surnageant sans inhibiteurs. Toutes les concentrations citées sont des concentrations finales.

### **2. 3. 2. Effet des différents inhibiteurs sur la dégranulation des PMNs**

Pour étudier l'effet des différents inhibiteurs sur la dégranulation, les PMNs ( $5,5 \times 10^6$  cellules/ml) sont équilibrés dans le HBSS<sub>2</sub> pendant 2 min à 37°C, puis différentes concentrations d'inhibiteurs (préparés dans le DMSO et dilués dans le HBSS<sub>2</sub>) : wortmannin (10-100 nM), chelerythrine chloride (1-100 µM), genistein (1-100 µM) ou PD98059 (1-50 µM) sont ajoutées à la suspension cellulaire. Après 10 min d'incubation avec chacun des inhibiteurs, les neutrophiles sont activés par le PMA ( $10^{-7}$  M) ou par le fMLP/Cytochalasine B ( $10^{-6}$  M /  $10^{-5}$  M), l'incubation est effectuée à 37° C pendant 15 min pour le fMLP et 20 min pour le PMA. Après centrifugation (5000 rpm / 25 min / 4°C) 75 µl de chaque surnageant contenant l'élastase libérée des PMNs sont déposés dans une plaque de microtitration transparente puis 75 µl de N-Méthoxy-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-*p*-Nitroanilide ( $5 \times 10^{-4}$  M) sont ajoutés. La plaque est ensuite incubée pendant 25 min à 37°C. L'activité élastasique est déterminée par mesure de l'absorbance de la *p*-nitroanilide libérée dans le milieu, contre des puits contrôles. Dans les puits contrôles, les inhibiteurs sont remplacés par un volume équivalent du tampon HBSS<sub>2</sub>. Les résultats sont exprimés en pourcentage de dégranulation par rapport aux contrôles sans inhibiteurs qui représente le 100%.

## 2. 4. Essai de Chimiluminescence

L'effet des différents inhibiteurs sur la flambée respiratoire des neutrophiles est déterminé par l'évaluation de la chimiluminescence induite par l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) généré par les PMNs activés, et amplifiée par le luminol. Cette chimiluminescence est le produit de l'interaction du luminol avec les ROS générés par les PMNs. Le luminol est oxydé par les ROS produites au cours de la flambée respiratoire pour donner une molécule excitée, la désexcitation de la molécule (retour à l'état basal) génère une émission de photons lumineux détectables qui seront exploités pour étudier l'activation des PMNs (DeChatelet *et al*, 1982 ; Lieberman *et al*, 1996).

Pour investiguer la flambée respiratoire, les neutrophiles ( $2 \times 10^6$  cellules/ml dans le HBSS<sub>2</sub>) sont incubés dans des plaques de microtitration opaques pendant 2 min à 37°C avec différentes concentrations d'inhibiteurs : genistein (1-100  $\mu$ M), wortmannin (10-100 nM), chélérythrine chloride (1-100  $\mu$ M), ou PD98059 (1-50  $\mu$ M). Dans les puits contrôles, le volume de l'inhibiteur est remplacé par un volume équivalent du tampon HBSS<sub>2</sub>. Juste avant la stimulation, 50  $\mu$ l de luminol ( $10^{-4}$  M) sont ajoutés à chaque puit. Puis, les PMNs sont stimulés avec 25  $\mu$ l de PMA ( $10^{-7}$  M), ou de fMLP/Cytochalasine B ( $10^{-6}$  M /  $10^{-5}$  M), en utilisant un système d'injection approprié. Le volume final dans chaque puit est de 250  $\mu$ l. La luminescence résultant de l'interaction du  $O_2^-$  généré par les PMNs avec le luminol est suivie pendant 15 et pour le fMLP et 30 min pour le PMA dans un Luminomètre (MicrolumatPlus LB 95, Berthold Technologies ; Germany). Pour vérifier la sensibilité de la réaction de chimiluminescence, 50  $\mu$ l de la SOD (100 U/ml) sont ajoutés à la suspension cellulaire. Toutes les concentrations citées sont des concentrations finales.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la luminescence par rapport aux puits contrôles qui représentent le 100% de chimiluminescence.

## 3. Analyse statistique

Les résultats des différents essais réalisés sont exprimés comme étant la moyenne d'au moins 3 répétitions. La signification statistique entre le contrôle et les échantillons traités est déterminée par le test t de Student et les différences sont considérées significatives au seuil de 0.05%.

*Résultats*

# RESULTATS

## 1. Préparation des neutrophiles

Les PMNs sont isolés à partir de sang frais prélevé de donneurs sains par centrifugation sur un gradient de densité du Ficoll-Histopaque. Cette méthode d'isolement nous a permis d'obtenir jusqu'à 3 millions de cellules par ml de sang.

Après la purification des PMNs et avant chaque manipulation, l'efficacité de la méthode d'isolement est vérifiée par le test de viabilité ainsi que par le test de pureté de la suspension cellulaire. Dans la plupart des préparations cellulaires, la viabilité cellulaire obtenue était supérieure à 95% dont plus de 90% sont des neutrophiles.

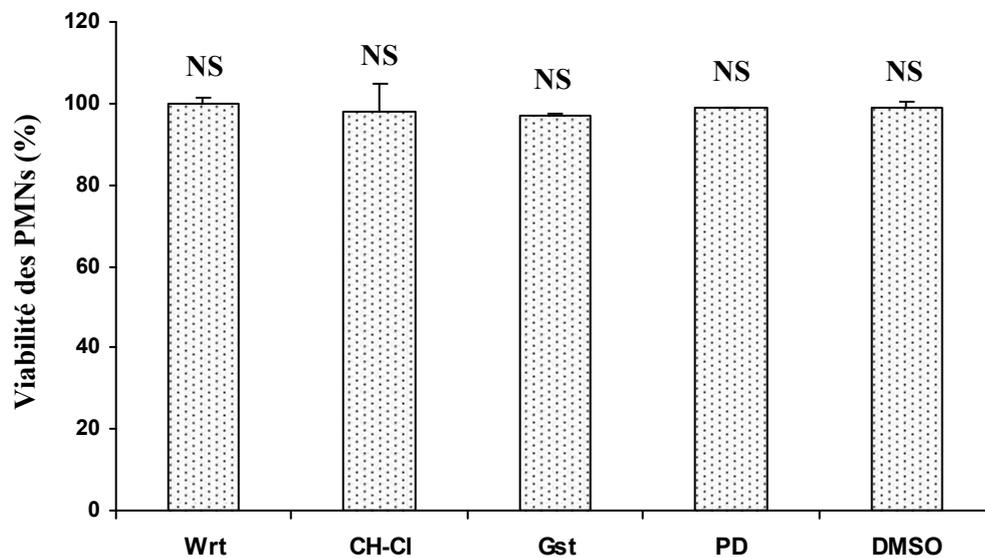
## 2. Cytotoxicité des substances utilisées

La cytotoxicité des substances utilisées envers les neutrophiles est évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. La viabilité des neutrophiles traités avec le wortmannin (100 nM), la chelerythrine chloride et la genistein (100  $\mu$ M), le PD098059 (50  $\mu$ M) ainsi qu'avec le DMSO (1%) est évaluée après 30 min d'incubation. L'incubation des PMNs avec chacun de ces agents a donné une viabilité supérieure à 95% (**Fig. 15**), sans qu'il y'ait de différences significatives par rapport au contrôle. Ce résultat montre l'absence de tout effet cytotoxique des inhibiteurs utilisés envers les PMNs humains aux concentrations utilisées dans ce travail. Il est ainsi exclu que tout effet inhibiteur de ces substances soit dû à leur cytotoxicité.

## 3. Etude de la dégranulation du neutrophile humain

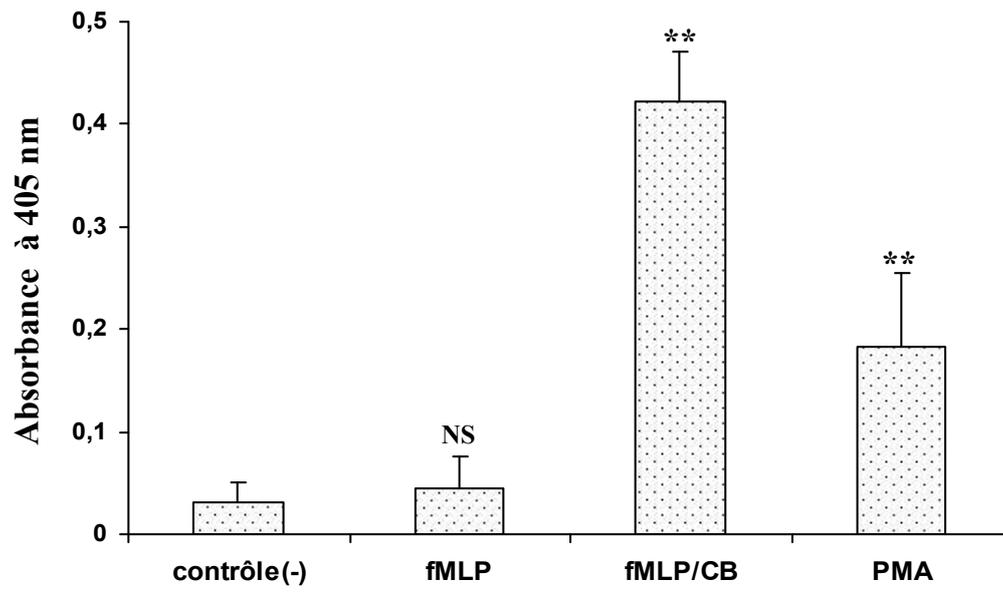
Afin d'investiguer quelques voies de signalisation impliquées dans l'activation des réponses des PMNs, essentiellement la dégranulation et la flambée respiratoire, des inhibiteurs spécifiques des enzymes impliquées dans ces voies sont utilisés.

Dans la présente étude nous avons utilisé l'activité de l'élastase comme marqueur de la dégranulation des neutrophiles. L'activité de l'élastase libérée des granules des PMNs est évaluée en utilisant un substrat spécifique le *N*-Méthoxy-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-*p*-Nitroanilide. L'absorbance de la *p*-nitroanilide libérée par l'élastase est mesurée à 405 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la dégranulation par rapport au contrôle ne contenant pas l'inhibiteur et qui représente le 100%.



**Figure 15 :** Cytotoxicité des différents inhibiteurs sur les neutrophiles humains. Les PMNs ( $3 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubées à 37°C pendant 30 min en absence ou en présence des inhibiteurs, wortmannin (Wrt, 100 nM), chelerythrine chlorure (CH-Cl, 100  $\mu$ M), genistein (Gst, 100  $\mu$ M) et PD98059 (PD, 50  $\mu$ M) et du DMSO (1%). la viabilité cellulaire (exprimée en %) est évaluée par le test d'exclusion par le bleu de Trypan. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). les inhibiteurs vs Contrôle; NS: non significatif (test t de Student).

Les résultats obtenus montrent que le fMLP seul n'induit pratiquement pas de dégranulation détectable comparé aux cellules non stimulées. Cependant, l'activation par le fMLP /CB induit une forte dégranulation des PMNs. Cette dégranulation est plus rapide et presque trois fois plus importante ( $0,42 \pm 0,049$  d'absorbance) que celle induite par le PMA ( $0.18 \pm 0.072$ ). D'autre part, la quantité de l'élastase libéré par les neutrophiles stimulés par le fMLP/CB, au bout de 25 min est deux fois plus importante que la quantité d'enzyme libérée pendant les 30 min d'activation par le PMA (**Fig. 16**).



**Figure 16 :** Activation de la dégranulation des PMNs par différents stimulateurs. Les PMNs ( $5.5 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés à  $37^\circ\text{C}$ , en absence (Contrôle négatif) ou en présence du PMA ( $10^{-7}$  M) ou du fMLP ( $10^{-6}$  M) seul ou supplémenté de cytochalasine B à  $10^{-5}$  M (fMLP/CB). La dégranulation est déterminée par l'évaluation de l'activité de l'élastase leucocytaire libérée en utilisant le *N*-Méthoxy-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-*p*-Nitroanilide. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SD ( $n=4$ ). Contrôle vs stimulants; NS : non significatif ; \*\* $p < 0.01$  (test t de Student).

### 3.1. Effets des différents inhibiteurs sur l'activité de l'élastase leucocytaire

Avant d'évaluer l'effet des différents inhibiteurs sur la dégranulation, nous avons procédé dans un premier temps à tester l'effet de ces inhibiteurs sur l'activité de l'élastase leucocytaire utilisée comme marqueur de dégranulation des neutrophiles. Comme le montre la **Figure 17**, la genistein et la chelerythrine chlorure à 100  $\mu\text{M}$ , le wortmannin à 100 nM ainsi que le PD09859 à 50  $\mu\text{M}$  n'exercent aucun pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité de l'élastase leucocytaire.

### 3. 2. Effets des différents inhibiteurs sur la dégranulation des PMNs

#### 3.2.1. Effet de la chelerythrine chlorure

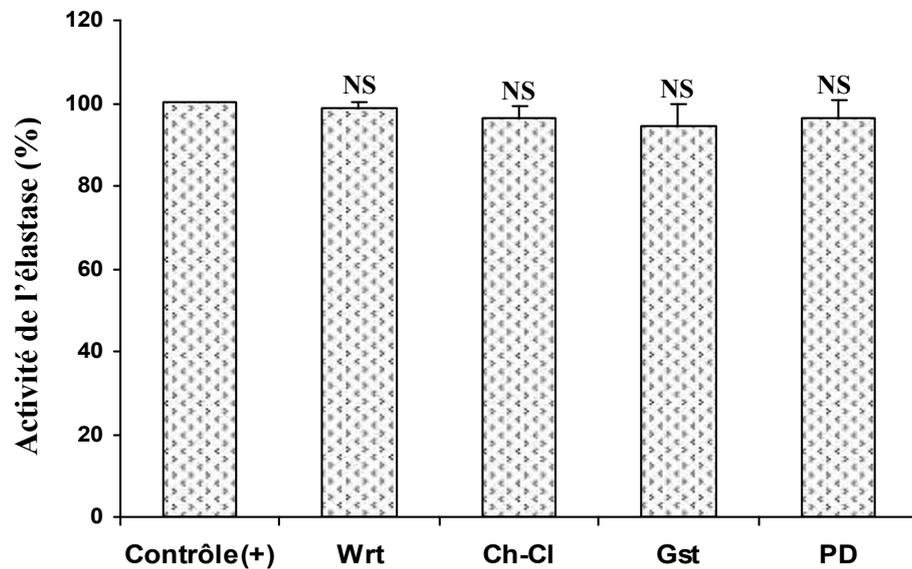
L'implication de la PKC, une enzyme clé dans la signalisation cellulaire est vérifiée en utilisant un inhibiteur spécifique de cette enzyme, la chelerythrine chlorure. La préincubation des neutrophiles avec une gamme de concentrations de la chelerythrine chlorure (1-100  $\mu\text{M}$ ) montre qu'elle exerce un effet inhibiteur significatif ( $p < 0.05$ ) et dose-dépendant sur la libération de l'élastase des granules des PMNs activés, que ce soit par le fMLP/CB ou par le PMA. L'effet inhibiteur est presque totale ( $90.70 \pm 2.19\%$ ) à partir de 25  $\mu\text{M}$ , dans le cas des neutrophiles activés par le fMLP/CB (**Fig. 18**).

Le prétraitement des PMNs par les mêmes concentrations de la chelerythrine chlorure abolit considérablement et de manière dose-dépendante la dégranulation induite par PMA. Le taux d'inhibition passe de  $1.42 \pm 8.27\%$  à  $85.11 \pm 4.07\%$  pour des concentrations de 1  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  respectivement (**Fig. 18**).

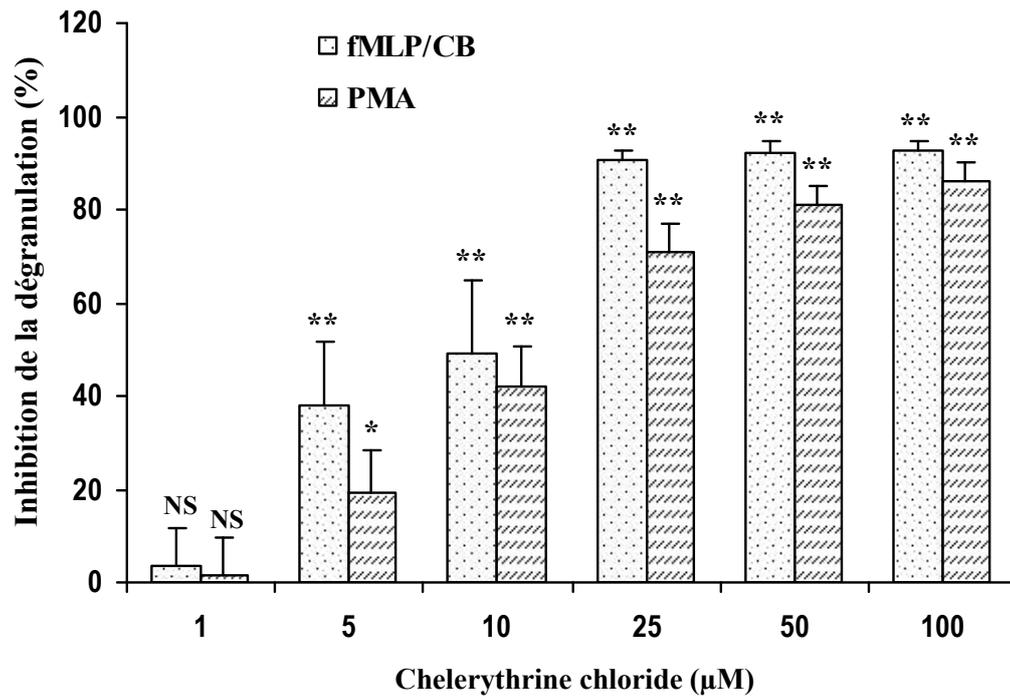
Les  $\text{IC}_{50}$  (concentration qui inhibe 50% de la dégranulation des PMNs) sont égales à 11.66 pour le fMLP/CB et 15.74  $\mu\text{M}$  pour le PMA.

#### 3. 2. 2. Effet du wortmannin

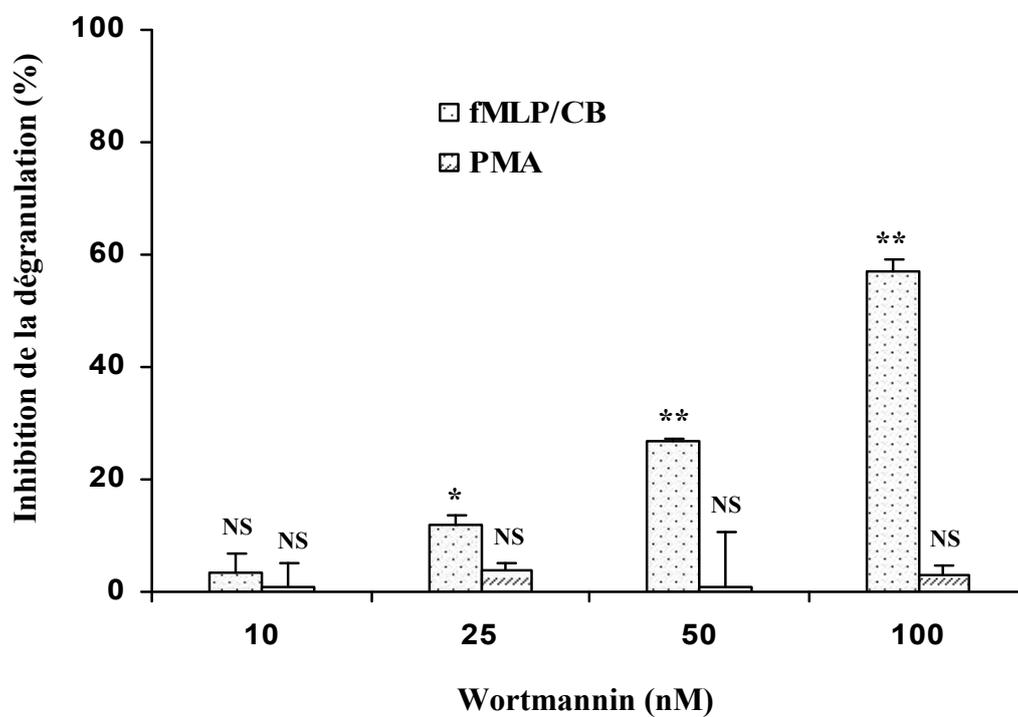
Le wortmannin, un inhibiteur spécifique de la PI3-kinase est utilisé pour vérifier son rôle dans la cascade d'activation de la dégranulation des PMNs. A des concentrations de l'ordre du nanomolaire (10-100 nM), nous avons constaté que le wortmannin exerce une inhibition partielle et dose-dépendante sur la dégranulation des PMNs stimulés par le fMLP/CB. Cette inhibition est de  $27.1 \pm 0.43\%$  à la concentration de 50 nM. Alors qu'à 100 nM, l'activité résiduelle de l'élastase libérée par exocytose des PMNs induite par le fMLP/CB est estimée à  $43.19 \pm 2.16\%$  (**Fig. 19**). Par ailleurs, l' $\text{IC}_{50}$  du wortmannin sur la dégranulation des PMNs fMLP/CB-stimulés est de 79.78 nM.



**Figure 17 :** Effet de quelques inhibiteurs sur l'activité de l'élastase leucocytaire. Les PMNs ( $5.5 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant 30 min en présence du fMLP/CB ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M) puis centrifugés à 5000 rpm pendant 25 min. le surnageant contenant l'élastase libérée par les PMNs est ensuite incubé avec wortmannin (Wrt, 100 nM), chelerythrine chlorure (Ch-Cl, 100 $\mu\text{M}$ ), genisteine (Gst, 100  $\mu\text{M}$ ) et PD98059 (PD, 50  $\mu\text{M}$ ) pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$ . L'activité de l'élastase est évaluée en utilisant le N-Méthoxy-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-*p*-Nitroanilide. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité de l'élastase leucocytaire. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). L'inhibiteur vs Contrôle; NS : non significatif (test t de Student).



**Figure 18 :** Effet de la chelerythrine chloride sur la dégranulation des PMNs. Les PMNs ( $5.5 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés avec la chelerythrine chloride (1-100  $\mu\text{M}$ ) pendant 10 min à  $37^\circ\text{C}$ , puis activés par le fMLP ( $10^{-6}$  M) supplémenté de cytochalasine B ( $10^{-5}$  M) ou par le PMA ( $10^{-7}$  M). La dégranulation est évaluée par détermination de l'activité de l'élastase leucocytaire libérée en utilisant le *N*-Méthoxy-Suc-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Val-*p*-Nitroanilide. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Contrôle vs la chelerythrine chloride; NS : non significatif ; \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  (test t de Student).



**Figure 19 :** Effet du wortmannin sur la dégranulation des PMNs. Les PMNs ( $5.5 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés avec le wortmannin (10-100 nM) pendant 10 min à 37°C, puis activés par le fMLP/CB ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M) ou par le PMA ( $10^{-7}$  M). La dégranulation est évaluée comme décrit sur la figure 18. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Contrôle vs wortmannin; NS : non significatif ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (test t de Student).

Cependant, le wortmannin (10-100 nM) ne montre aucun effet sur la libération de l'élastase des PMNs stimulés par le PMA (**Fig. 19**).

### 3. 2. 3. Effet de la genistein

Le rôle des tyrosine kinases, une famille d'enzymes à activité tyrosine kinase soupçonnées jouer un rôle important dans la cascade d'activation des PMNs, est investigué en utilisant la genistein comme inhibiteur de ces enzymes. Les résultats obtenus montrent que l'incubation des PMNs fMLP/CB-stimulés avec la genistein inhibe significativement ( $p < 0.05$ ) la libération de l'élastase des granules des PMNs, de manière dose-dépendante. Le taux d'inhibition est estimé à 14.60 % à 1  $\mu$ M, cette inhibition augmente pour atteindre 69.55 % à 100  $\mu$ M (**Fig. 20**). l' $IC_{50}$  de la genistein est estimée à 9.10  $\mu$ M.

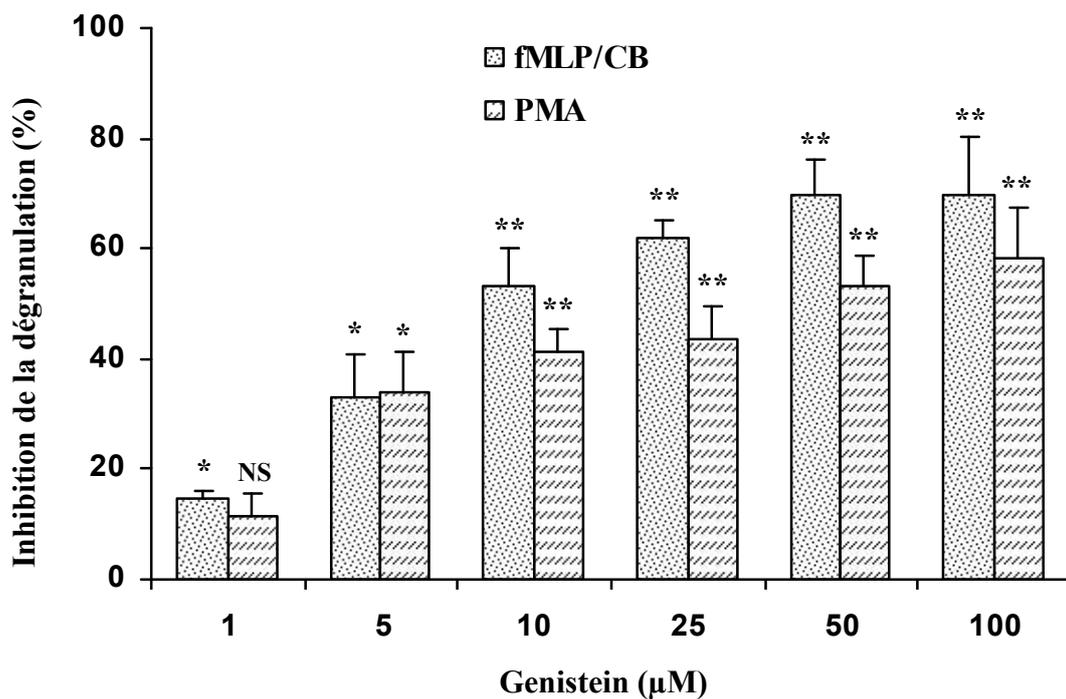
D'autre part, la genistein exerce une inhibition partielle et de manière concentration dépendante sur la dégranulation des PMNs stimulés par le PMA. Ainsi, à 1  $\mu$ M la genistein inhibe la libération de l'élastase leucocytaire de  $11.52 \pm 4.17\%$ , alors qu'à une concentration de 100  $\mu$ M, le taux d'inhibition passe à  $58.35 \pm 8.90\%$  (**Fig. 20**). Dans ce cas, l' $IC_{50}$  est estimée à 41.86  $\mu$ M.

### 3. 2. 4. Effet du PD98059

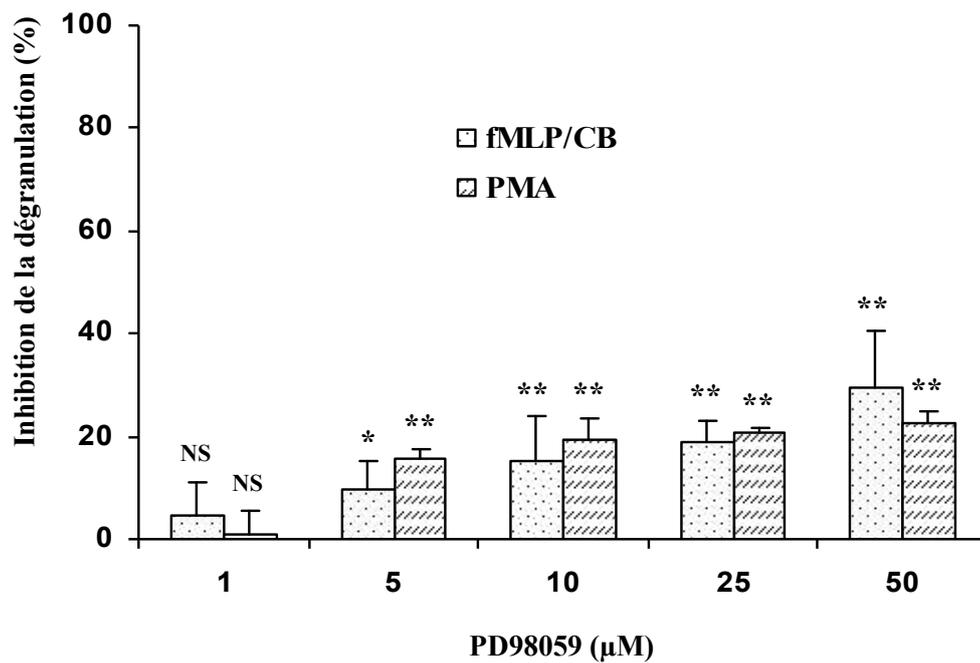
Les p42/44 MAP kinases, membres de la famille des MAP kinases soupçonnées être impliquées dans la signalisation des PMNs, sont étudiées en utilisant un inhibiteur spécifique, le PD98059. Les résultats obtenus montrent que cet inhibiteur exerce une faible inhibition sur la dégranulation des neutrophiles, dans le cas de l'fMLP/CB ou du PMA. En effet, l'inhibition est estimée à 4.80 % à 1  $\mu$ M dans le cas de stimulation par le fMLP/CB. Cette inhibition augmente successivement avec la concentration pour atteindre un maximum de  $29.68 \pm 10.80\%$  à la concentration maximale de 50  $\mu$ M (**Fig. 21**).

Dans le cas d'activation par le PMA, le PD98059 ne présente aucun effet sur la dégranulation des PMNs à la concentration de 1  $\mu$ M. Au-delà de cette concentration l'inhibition reste presque constante et atteint un maximum de 21.16% à la concentration de 50  $\mu$ M (**Fig. 21**).

La comparaison entre les effets des différents inhibiteurs utilisés (**Fig. 22**) montre qu'il n'y a pratiquement aucune différence entre l'effet de la chelerythrine chloride (100  $\mu$ M) sur la dégranulation fMLP/CB ou PMA-stimulée. Ce qui est traduit par des  $IC_{50}$  proches dans le cas de stimulation par le fMLP/CB et par le PMA (**Tab. 3**). Cependant, l'effet exercé par le wortmannin (à 100nM) sur la dégranulation induite par le fMLP/CB est significativement

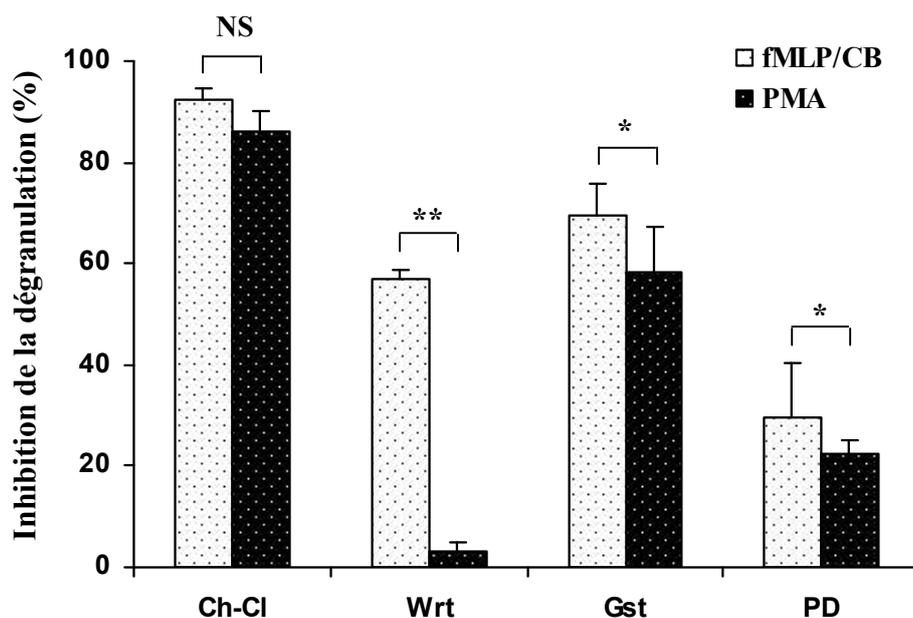


**Figure 20 :** Effet de la genistein sur la dégranulation des PMNs. Les PMNs ( $5.5 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés avec genistein (1-100 nM) pendant 10 min à 37°C, puis activés par le fMLP/CB ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M) ou par le PMA ( $10^{-7}$  M). La dégranulation est évaluée comme décrit sur la figure 18. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à un contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Contrôle vs genistein; NS: non significatif; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (test t de Student).



**Figure 21 :** Effet du PD98059 sur la dégranulation des PMNs. Les PMNs ( $5.5 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés avec le PD98059 (1-50  $\mu$ M) pendant 10 min à 37°C, puis activés par le fMLP/CB ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M) ou par le PMA ( $10^{-7}$  M). La dégranulation est évaluée comme décrit sur la figure 19. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à un contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Contrôle vs PD98059; NS : non significatif ; \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  (test t de Student).

( $p < 0.01$ ) très important, mais cet inhibiteur n'a pas affecté la dégranulation PMA-induite. Tandis que la genistein (100  $\mu\text{M}$ ) a exercé un effet significativement ( $p < 0.05$ ) plus remarquable sur la dégranulation induite par le fMLP/CB comparé à son effet sur la dégranulation induite par le PMA. Le PD98059 (50 $\mu\text{M}$ ) a exercé un léger effet inhibiteur de 30% sur la dégranulation fMLP/CB-induite et de 20% dans le cas de stimulation par le PMA. Ceci est confirmé par les  $\text{IC}_{50}$  enregistrées pour chacun des activateurs (**Tab. 3**).



**Figure 22 :** Effets de la chelerythrine chloride (Ch-Cl, 100  $\mu\text{M}$ ), du wortmannin (Wrt, 100 nM), la genistein (Gst, 100  $\mu\text{M}$ ) et du PD98059 (PD, 100  $\mu\text{M}$ ) sur la dégranulation des PMNs stimulés par le fMLP/CB ou par le PMA. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). fMLP vs PMA; NS: non significatif; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (test t de Student).

**Tableau 3 :**  $\text{IC}_{50}$  des différents inhibiteurs sur la dégranulation des neutrophiles.

	fMLP/CB	PMA
Chelerythrine chloride ( $\mu\text{M}$ )	11.66	15.74
Wortmannin (nM)	79.78	Non-déterminé
Genistein ( $\mu\text{M}$ )	9.10	41.86
PD98059 ( $\mu\text{M}$ )	Non-déterminé	Non-déterminé

## 4. Etude de la flambée respiratoire du neutrophile humain

Dans la présente étude nous avons investigué également l'effet des différents inhibiteurs sur la flambée respiratoire, une autre réponse majeure des neutrophiles activés. La flambée respiratoire est évaluée en exploitant la luminescence résultant de la génération des espèces réactives oxygénées par les PMNs stimulés par le fMLP/CB ou par le PMA, cette luminescence est amplifiée en utilisant une substance luminophore, le luminol.

La **Figure 23** montre la cinétique de chimiluminescence des PMNs stimulés par le fMLP/CB et par le PMA en absence des inhibiteurs. La chimiluminescence des PMNs activés par le fMLP/CB apparaît rapidement au cours de la première minute après l'incubation avec le stimulant, elle atteint son maximum (35000 *URL/s*) au bout de 5 min, puis la réponse s'éteint rapidement au cours de 15 min.

D'autre part, la luminescence induite par le PMA apparaît un peu plus en retard par rapport à l'fMLP/CB. En effet, cette réponse nécessite 9 min pour atteindre son maximum (54000 *URL/s*), mais elle est d'une intensité plus importante, cette chimiluminescence diminue successivement pour atteindre son minimum au bout 30 min.

Comme nous avons observé que la chimiluminescence induite par le fMLP/CB apparaît en deux pics sur la courbe, alors que l'activation par le PMA ne donne qu'un seul pic sur la courbe de luminescence (**Fig. 23**).

Cependant, l'incubation des cellules avec la SOD (100 UI/ml), avec chacun des deux stimulants, inhibe totalement la chimiluminescence engendrée par l'anion superoxyde dans les deux cas d'activateurs.

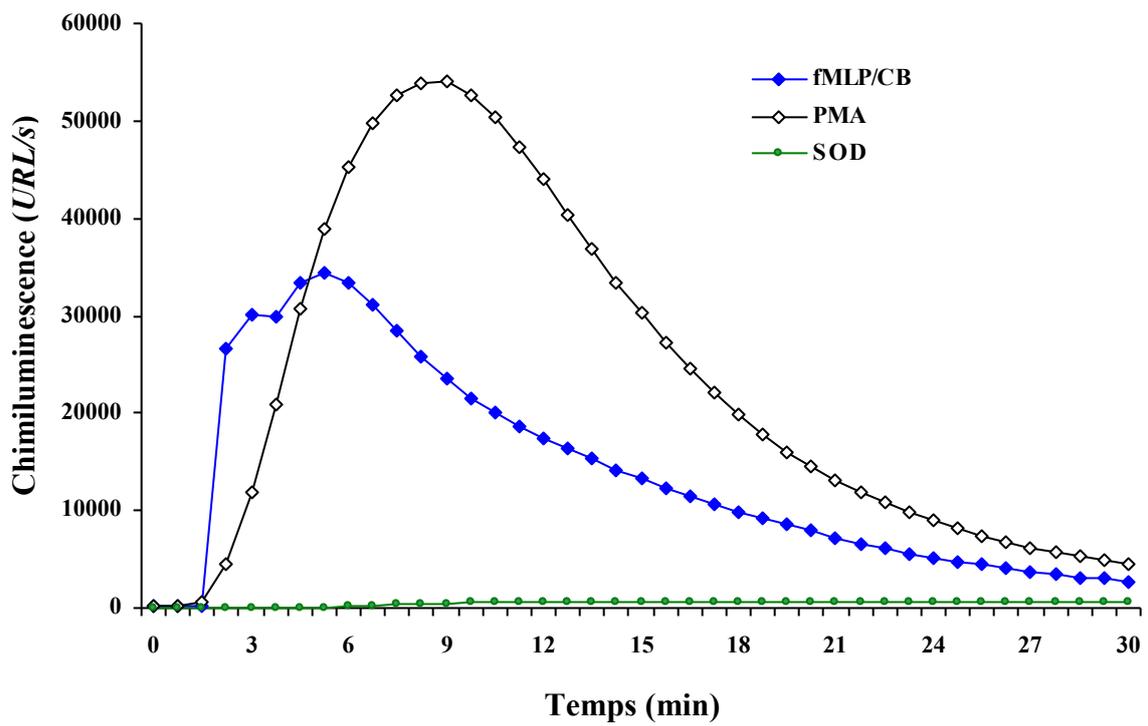
### 4. 1. Effets des différents inhibiteurs sur la flambée respiratoire des PMNs

#### 4. 1. 1. Effet de la chelerythrine chloride

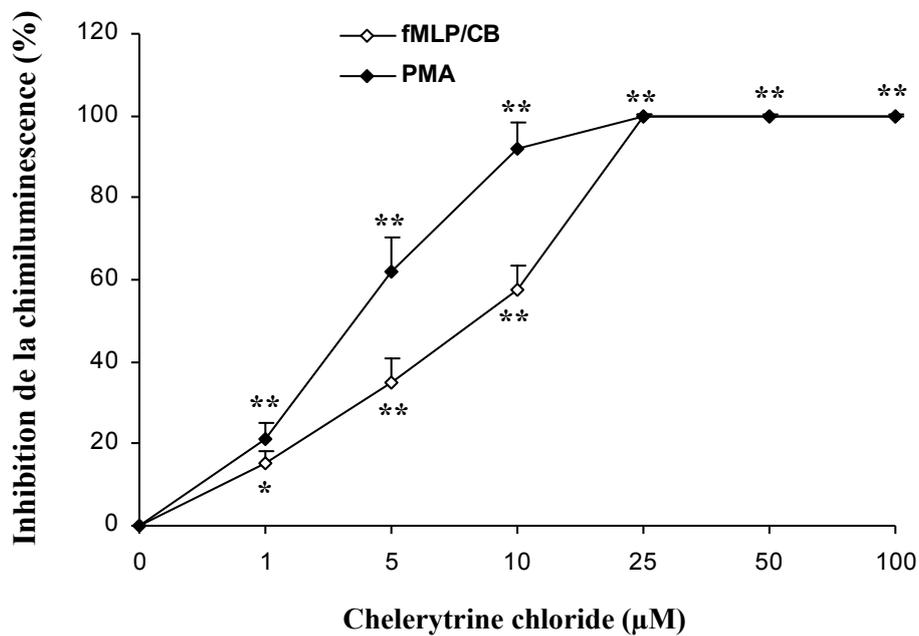
La chelerythrine chloride, inhibiteur de la PKC, montre un effet inhibiteur dose-dépendant sur la luminescence des PMNs stimulés par le fMLP/CB. Le taux d'inhibition de la luminescence est faible et n'est que de  $15.29 \pm 2.93\%$  à 1  $\mu\text{M}$ , mais il atteint presque 50% à 10  $\mu\text{M}$ , puis la luminescence s'éteint presque totalement à partir de 25  $\mu\text{M}$  (**Fig. 24**).

La chelerythrine chloride exerce un effet plus puissant sur la luminescence des PMNs PMA-stimulés. En effet, elle inhibe  $20.92 \pm 3.92\%$  de la luminescence à 1  $\mu\text{M}$ , cette inhibition augmente rapidement pour atteindre le taux de 92 % à 10  $\mu\text{M}$ , et l'inhibition devient totale à partir de 25  $\mu\text{M}$  (**Fig. 24**).

La chelerythrine chloride a exercé un puissant effet inhibiteur sur la



**Figure 23:** Cinétique de la chimiluminescence des neutrophiles activés par l’fMLP/ CB ou par le PMA, en présence ou en absence de la superoxyde dismutase (SOD). Les résultats sont exprimés en unité relative de luminescence ( $URL/s$ ) par rapport à un contrôle sans activateur.



**Figure 24 :** Effet de la chelerythrine chloride sur la chimiluminescence des neutrophiles. Les PMNs ( $2 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés avec la chelerythrine chloride (1-100  $\mu$ M) pendant 2 min à 37°C, puis activés par l'fMLP/CB ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M) ou par le PMA ( $10^{-7}$  M). La luminescence est évaluée en présence luminol ( $10^{-5}$  M). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la luminescence par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD. Contrôle vs chelerythrine chloride; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (test t de Student).

chimiluminescence des PMNs stimulés aussi bien par le fMLP/CB que par le PMA. Les  $IC_{50}$  correspondantes ont été estimées à 9.68 et 4.26  $\mu$ M, respectivement.

#### **4. 1. 2. Effet du wortmannin**

Le wortmannin exerce une inhibition importante sur la flambée respiratoire des neutrophiles fMLP/CB-stimulés. L'inhibition de la luminescence est estimée à 23 % à 10 nM, cette inhibition atteint un taux de 89.26 % à 50 nM, et elle est presque totale à la concentration maximale non cytotoxique de 100 nM. L' $IC_{50}$  du wortmannin sur la luminescence des PMNs fMLP-stimulés est de 27,54 nM.

Le wortmannin exerce une inhibition partielle sur la génération de l'anion superoxyde par les PMNs PMA-stimulés (**Fig. 25**). L'inhibition est négligeable à 10 nM ( $3.06 \pm 0.27\%$ ). Cette inhibition augmente successivement avec les concentrations pour atteindre un taux de 55 % à la concentration de 100 nM. L' $IC_{50}$  du wortmannin sur la chimiluminescence des PMNs PMA-stimulés a été estimée à 84.89 nM.

#### **4. 1. 3. Effet de la genistein**

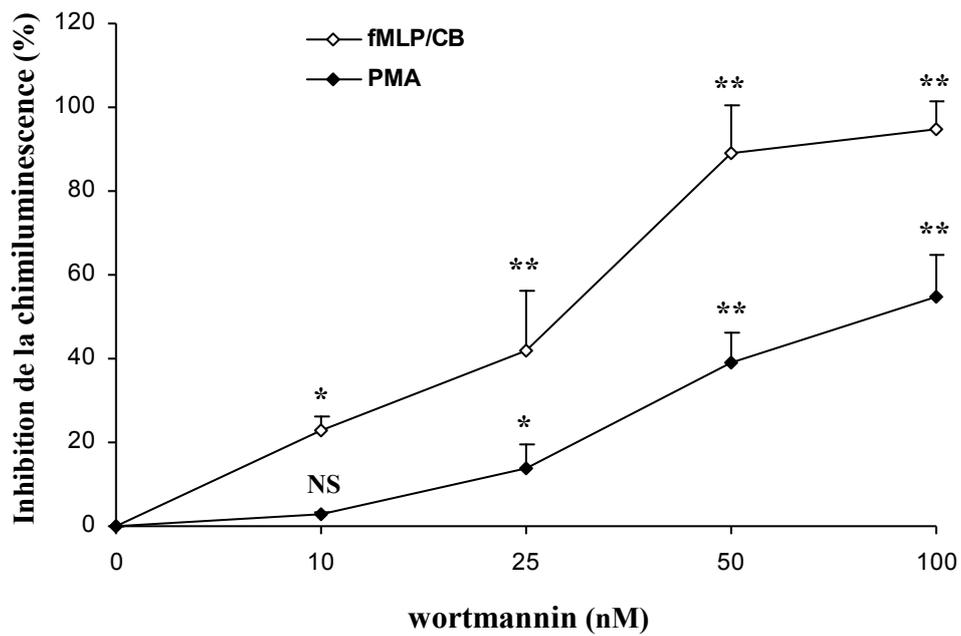
La genistein montre une inhibition considérable sur la chimiluminescence induite par le fMLP/CB ou par le PMA. Ainsi, à 1  $\mu$ M la genistein inhibe 17 % de la flambée respiratoire des PMNs stimulés par le fMLP/CB, cette inhibition atteint un taux de 57 % à 25  $\mu$ M puis de 80 % et 90 % à 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M, respectivement (**Fig. 26**). L' $IC_{50}$  enregistrée pour la genistein sur la luminescence des PMNs fMLP-stimulés est estimée à 21.32  $\mu$ M.

Dans le cas de stimulation par le PMA, la genistein à 1  $\mu$ M réduit la flambée respiratoire deux fois plus que dans le cas de stimulation par le fMLP/CB. L'inhibition augmente avec la dose pour atteindre 76.10 % à 50 (**Fig. 26**). Cet effet de la genistein sur la chimiluminescence des neutrophiles PMA-stimulés est traduit par une  $IC_{50}$  de 13.41  $\mu$ M.

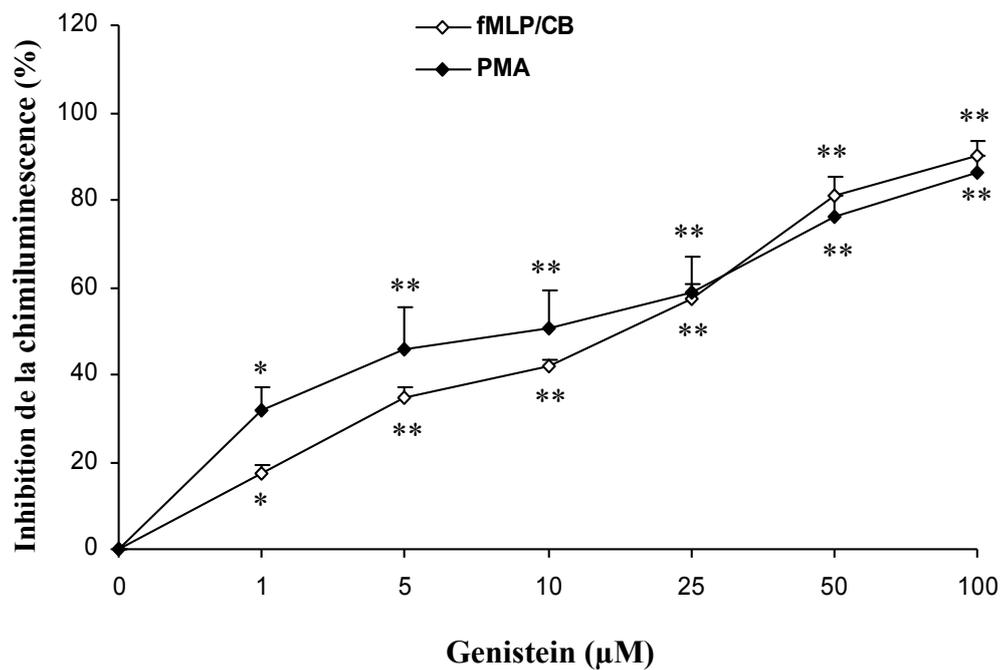
#### **4. 1. 4. Effet du PD98059**

Le PD98059, inhibiteur des p42/44 MAPK, exerce une faible inhibition sur la luminescence des PMNs induite par le fMLP/CB. L'inhibition est d'environ 8 % à 1  $\mu$ M et de 19 % à 50  $\mu$ M (**Fig. 27**).

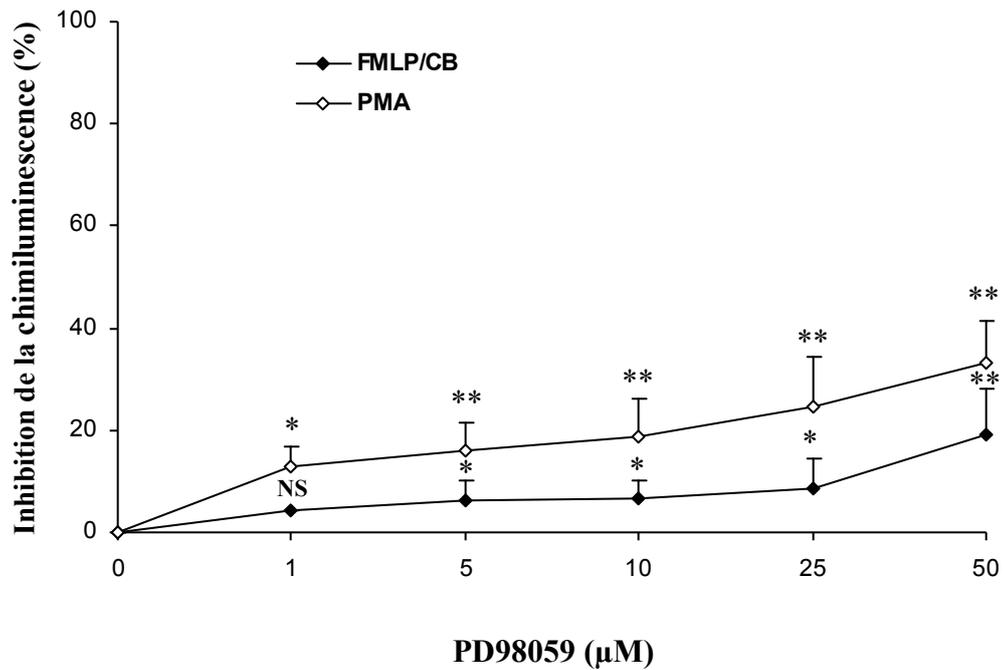
En présence du PMA, le PD98059 a exercé un effet faible mais plus remarquable par rapport à l'activation par le fMLP/CB. Le taux d'inhibition est de 12 % à 1  $\mu$ M, ce taux augmente avec la concentration mais reste toujours faible et n'atteint que 33 % à la concentration maximale de 50  $\mu$ M (**Fig. 27**).



**Figure 25 :** Effet du wortmannin sur la chimiluminescence des neutrophiles. Les PMNs ( $2 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés avec le wortmannin (10-100 nM) pendant 2 min à  $37^\circ\text{C}$ , puis activés par l'fMLP/CB ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M) ou par le PMA ( $10^{-7}$  M). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la luminescence par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD. Contrôle vs wortmannin; NS : non significatif ; \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  (test t de Student).

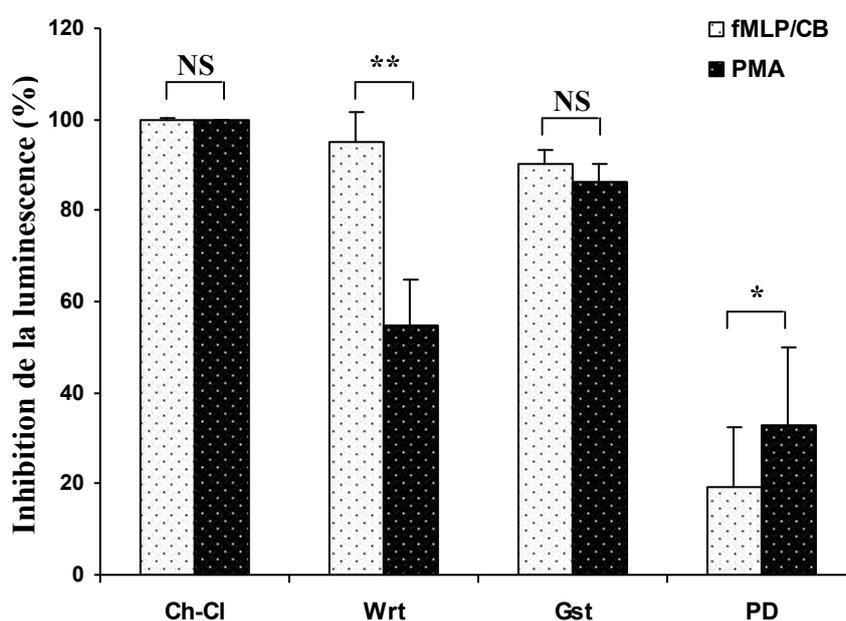


**Figure 26 :** Effet de la genistein sur la chimiluminescence des neutrophiles. Les PMNs ( $2 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés avec la genistein (1-100  $\mu$ M) pendant 2 min à 37°C, puis activés par l’fMLP/CB ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M) ou par le PMA ( $10^{-7}$  M). Les résultats sont exprimés en pourcentage d’inhibition de la luminescence par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD. Contrôle vs la genistein; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (test t de Student).



**Figure 27 :** Effet du PD98059 sur la chimiluminescence des neutrophiles. Les PMNs ( $2 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés avec le PD98059 (1-100 nM) pendant 2 min à  $37^\circ\text{C}$ , puis activés par l'fMLP ( $10^{-6}$  M) supplémenté de cytochalasine B ( $10^{-5}$  M) ou par le PMA ( $10^{-7}$  M). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la luminescence par rapport à un contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD. Contrôle vs PD98059; NS : non significatif ; \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  (test t de Student).

La comparaison entre les effets des différents inhibiteurs (**Fig. 28**) montre qu'il n'y a pratiquement aucune différence entre les effets inhibiteurs de la chelerythrine chloride et de la genistein sur la chimiluminescence des PMNs fMLP/CB- stimulés et leurs effets sur les PMNs PMA-stimulés. Ceci est confirmé par des  $IC_{50}$  proches les une des autres pour les deux inhibiteurs avec les deux stimulants (**Tab. 4**). Cependant, le wortmannin a exercé un effet inhibiteur significativement ( $p < 0.01$ ) plus important sur la chimiluminescence induite par le fMLP/CB que par le PMA. Tandis que, le PD98059 a exercé un effet significativement ( $p < 0.05$ ) plus remarquable sur la chimiluminescence PMA-induite comparé à son effet sur la dégranulation en réponse au fMLP/CB.

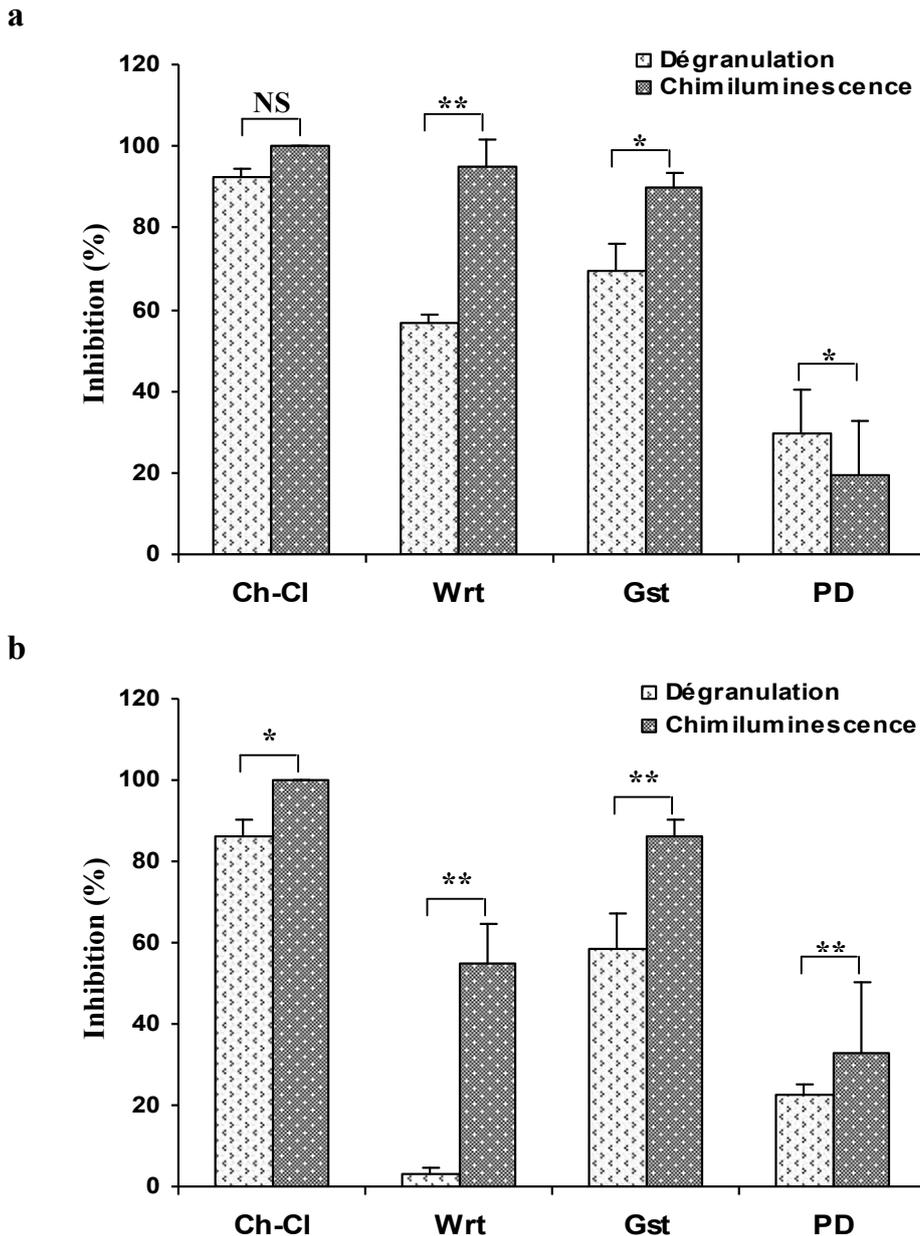


**Figure 28:** Effets de la chelerythrine chloride (Ch-Cl, 100  $\mu$ M), du wortmannin (Wrt, 100 nM), la genistein (Gst, 100  $\mu$ M) et du PD98059 (PD, 100  $\mu$ M) sur la chimiluminescence des PMNs stimulés par le fMLP/B ou par le PMA. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). fMLP/CB vs PMA; NS: non significatif; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (test t de Student).

**Tableau 4 :**  $IC_{50}$  des différents inhibiteurs sur la flambée respiratoire des neutrophiles.

	fMLP/CB	PMA
Chelerythrine chloride ( $\mu$ M)	9.68	4.26
Wortmannin (nM)	27.54	84.89
Genistein ( $\mu$ M)	21.32	13.41
PD98059 ( $\mu$ M)	Non-déterminé	Non-déterminé

La comparaison entre les effets des différents inhibiteurs sur la dégranulation et la flambée respiratoire des neutrophiles stimulés par l’fMLP/CB ou le PMA montre que la chelerythrine chloride, la genistein inhibent les deux réponses des PMNs dans les deux cas de stimulants. Cependant, le wortmannin a inhibé les deux fonctions dans le cas de stimulation par le fMLP/CB, alors qu’en cas de stimulation par le PMA cet inhibiteur a affecté seulement la chimiluminescence des PMNs. Le PD98059 a faiblement affecté les deux réponses des PMNs dans les deux cas de stimulants (**Figure 29**).



**Figure 29:** Comparaison entre les effets de la chelerythrine chloride (Ch-Cl, 100  $\mu$ M), du wortmannin (Wrt, 100 nM), la genistein (Gst, 100  $\mu$ M) et du PD98059 (PD, 100  $\mu$ M) sur la dégranulation et sur la chimiluminescence des PMNs stimulés par (a) le fMLP/CB ou (b) par le PMA. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Dégranulation vs Chimiluminescence; NS: non significatif; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (test t de Student).

*Discussion*

## DISCUSSION

L'implication de certaines voies de signalisation intracellulaire dans l'induction de la dégranulation et de la flambée respiratoire du neutrophile activé a été investiguée dans la présente étude. Dans un premier temps, nous avons étudié certaines voies de signalisation qui régissent la dégranulation des neutrophiles, en utilisant des inhibiteurs spécifiques des enzymes impliquées dans ces voies. Pour cela, deux stimulants qui agissent différemment ont été utilisés pour activer les PMNs, l'fMLP qui est un chimioattractant standard qui active le neutrophile par liaison à son récepteur membranaire et le PMA qui est un activateur direct de la PKC.

### **1. Etude de la dégranulation du neutrophile humain : Implication de quelques voies de signalisation**

La dégranulation du neutrophile implique la libération du contenu des différents granules intracellulaires pour renforcer à l'activité microbicide du neutrophile. Une fois activé, le neutrophile libère le contenu des granules dans le phagosome ou dans la matrice extracellulaire par exocytose (Seely *et al.*, 2003). Dans le présent travail, l'activité de l'élastase libérée des granules azurophiles est utilisée comme indice pour évaluer la dégranulation des neutrophiles. Plusieurs auteurs ont rapporté que la dégranulation des PMNs humains est mieux évaluée par détermination de l'activité de l'élastase leucocytaire (Burnett *et al.*, 1989; Lemke *et Ward*, 1994). Pour Vocks et ces collaborateurs (2003), la libération de l'élastase est un marqueur enzymatique typique pour la détection de la dégranulation des PMNs activées. Toutefois, d'autres enzymes sont utilisées comme indicateurs de la dégranulation telles que la myéloperoxydase (Reichl *et al.*, 2000), la  $\beta$ -glucuronidase (Mócsai *et al.*, 1997; Hii *et al.*, 2001) et la lactoferrine (Mócsai *et al.*, 2000).

Dans la présente étude, la libération de l'élastase à partir des neutrophiles humains est induite par deux stimulants différents, le fMLP/CB ou le PMA. Les résultats obtenus montrent que l'utilisation du fMLP à  $10^{-6}$  M seul n'induit pas la dégranulation détectable; tandis que sa combinaison avec la cytochalasine B à  $10^{-5}$  M provoque une meilleure dégranulation des PMNs. Un tel résultat a été rapporté par Bouriche (2005). En effet, Mócsai et ses collaborateurs (2000) ont rapporté que la cytochalasine B est indispensable au processus d'exocytose. De nombreuses études soutiennent ces résultats et selon lesquelles la préincubation des PMNs avec la cytochalasine B augmente significativement le taux de

libération de l'élastase (Vocks *et al.*, 2003) et de la MPO (Reichl *et al.*, 2000) au cours de la dégranulation induite par l'fMLP. Selon Beker (1990), cet effet activateur de la cytochalasine B est dû au blocage de la polymérisation/dépolymérisation de l'actine qui constitue avec ses microfilaments une barrière sub-membranaire. Ce blocage facilite la fusion des granules avec la membrane plasmique puis la libération de leurs contenus dans le milieu extracellulaire.

Dans le cas de l'activation des PMNs par le PMA ( $10^{-7}$  M), la libération de l'élastase est plus lente. Cette libération de l'élastase est deux fois plus faible que celle induite par l'fMLP/CB. Ce résultat confirme celui rapporté par Bouriche (2005) qui a montré que l'activation des PMNs par le fMLP/CB pendant 30 min induit une dégranulation deux fois plus forte que celle des PMNs stimulés pendant 90 min par le PMA. En fait, le PMA induit la libération des enzymes hydrolytiques préformées dans les granules du neutrophile (Mócsai *et al.*, 19997). Contrairement à l'fMLP, le PMA entraîne la libération de l'élastase par les PMNs indépendamment de l'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Cabanis *et al.*, 1996).

Avant d'étudier l'effet de quelques inhibiteurs spécifiques de certaines enzymes de signalisation qui régulent la dégranulation des PMNs, nous avons testé l'effet de ces inhibiteurs sur l'activité de l'élastase utilisée comme marqueur de la dégranulation des PMNs. Le fait que ces inhibiteurs n'aient montré aucun effet sur l'activité de l'élastase du neutrophile permet d'exclure totalement la possibilité que l'effet de ces inhibiteurs sur la dégranulation des PMNs soit dû à leur action sur l'activité de l'élastase elle-même.

### **Implication de la PI3kinase**

La PI3kinase est une enzyme clé dans la régulation de nombreux processus cellulaires (Vlahos, 1995). Le rôle de la PI3kinase dans la signalisation de dégranulation des PMNs a été étudié dans le présent travail en examinant l'effet de son inhibiteur spécifique, le wortmannin (Davies *et al.*, 2000) sur la dégranulation des PMNs activés par le fMLP/CB ou le PMA.

Les résultats obtenus montrent que le traitement des PMNs par le wortmannin inhibe considérablement ( $p < 0.01$ ) la libération de l'élastase des PMNs stimulés par l'fMLP/CB. Des résultats comparables ont été rapportés par certains auteurs qui ont montré que la libération de l'élastase des PMNs fMLP-stimulés est efficacement réduite par le wortmannin (Tuluc *et al.*, 2004) et le LY290004 (Vocks *et al.*, 2003), un autre inhibiteur spécifique de la PI3K. Sue-A-Quan et ses collaborateurs (1997) ont également rapporté que le wortmannin inhibe la sécrétion des granules des PMNs stimulés par le fMLP. En fait, de nombreux travaux menés sur la PI3kinase rapportent que cette enzyme occupe actuellement une place éminente dans la régulation de la signalisation au sein du neutrophile (Vlahos, 1995; Waymann *et Pirola*,

1998). Ceci est prouvé par le fait que des neutrophiles PI3K-déficients montrent une diminution de leurs réponses stimulées par l'fMLP de façon similaire à celle observée chez les neutrophiles normaux traités par le wortmannin (Sasaki *et al.*, 2000).

Nos résultats et de la bibliographie nous permettent de dire que la PI3kinase pourrait jouer un rôle important dans la signalisation de la dégranulation au sein du neutrophile fMLP-stimulé.

Dans la présente étude, nous avons constaté aussi que le wortmannin exerce une inhibition partielle sur la dégranulation des PMNs fMLP-stimulés. Une telle constatation a été également rapportée par le groupe de Sue-A-Quan (1997). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que la PI3kinase serait une voie importante mais non exclusive pour la transduction du signal déclenché par l'fMLP. Cela nous mène à suggérer l'existence d'autres voies de signalisation, gouvernées par le fMLP et qui agissent parallèlement à celle de la PI3kinase pour induire la dégranulation des PMNs.

De nombreux auteurs ont rapporté que la PI3kinase n'est pas directement impliquée dans le processus de la dégranulation, mais son rôle serait plutôt joué via l'activation d'autres effecteurs cytosoliques (Vlahos, 1995 ; Wymann *et* Pirola, 1998). Certaines auteurs ont présenté la PKC comme l'un des effecteurs de la PI3kinase dans la signalisation de dégranulation du neutrophile (Stoyanova *et al.*, 1997). Afin de vérifier l'existence d'un éventuel lien entre la voie de la PI3kinase et celle de la PKC, l'effet de l'inhibition de la PI3kinase par le wortmannin sur la dégranulation des PMNs PMA-stimulés a été étudié.

Les résultats obtenus montrent que le wortmannin est pratiquement sans effet sur la libération de l'élastase à partir des neutrophiles activés par le PMA. Le fait que la libération de l'élastase des PMNs PMA-stimulés ne soit pas affectée par l'inhibition de la PI3kinase par le wortmannin nous permet de dire qu'à priori la PI3kinase n'est pas impliquée dans la transduction du signal de la dégranulation initiée au niveau de la PKC. En effet, d'après Vlahos (1995), la PI3kinase régule des événements de signalisation qui se situent en amont de la PKC. Sachant que l'activation de la PI3kinase dépend de la sous unité  $\beta\gamma$  de la protéine G des récepteurs des chimioattractants et que le PMA stimule la PKC indépendamment de ces récepteurs (Gaudry *et al.*, 1993). Cependant, le fait que la PI3kinase ne soit pas régulée par la PKC n'exclut pas l'inverse (Vlahos, 1995).

Nos résultats montrent que la PI3kinase pourrait participer dans la régulation de la dégranulation des PMNs, mais elle n'est vraisemblablement pas impliquée dans la voie de signalisation initiée au niveau de la PKC, ce qui pourrait justifier l'absence d'effet inhibiteur du wortmannin sur la dégranulation des PMNs en réponse au PMA.

## **Implication de la PKC**

L'implication de la PKC dans la régulation de la dégranulation des neutrophiles a été vérifiée en investiguant l'effet de la chelerythrine chlorure, un inhibiteur spécifique de la PKC (Laudanna *et al.*, 1998) sur la libération de l'élastase induite par le fMLP/CB ou le PMA.

Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de la PKC par la chelerythrine chlorure abolit fortement la dégranulation des PMNs stimulés aussi bien par le fMLP/CB que par le PMA. Des résultats similaires ont été rapportés par Tuluc et ses collaborateurs (2004) qui ont observé que l'inhibition de la protéine kinase C réduit considérablement la libération de l'élastase des PMNs stimulés par le fMLP/CB. De même, Cabanis et ses collaborateurs (1996) ont rapporté que la stimulation des PMN par le PMA conduit à la libération de l'élastase et que cette libération est inhibée par le GF109203X, un inhibiteur spécifique de la PKC.

Ces résultats permettent de soulever la possibilité que la PKC pourrait intervenir dans la signalisation de la dégranulation du neutrophile. En effet, l'activation des PMNs par le fMLP conduit à l'activation de la PKC via l'augmentation du taux du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et l'accumulation du DAG (Nishizuka, 1992; Ben-Baruch *et al.*, 1995; Bokoch, 1995). En plus, le PMA qui est un analogue synthétique du DAG, peut activer directement la PKC en se fixant sur le site de liaison du DAG (Nishizuka, 1995). Ces résultats et le fait que le traitement des PMNs avec la chelerythrine chlorure prévient leur dégranulation induite aussi bien par le fMLP que par le PMA fournissent une évidence que la PKC occuperait une place importante dans la transduction du signal qui conduit à la dégranulation des PMNs.

Nous avons noté également, que l'effet de la chelerythrine chlorure sur la dégranulation des PMNs stimulés par le fMLP/CB était comparable à celui exercé sur la dégranulation des PMNs PMA-stimulés. Ceci renforce encore plus l'implication de la PKC en tant qu'enzyme essentielle dans la signalisation intracellulaire qui régit la dégranulation des neutrophiles activé par le fMLP/CB ou le PMA.

## **Implication des tyrosines kinases**

Afin d'étudier l'implication des tyrosines kinases dans la signalisation de dégranulation des neutrophiles, nous avons testé l'effet de leur inhibiteur, la genistein sur la libération de l'élastase.

Les résultats obtenus montrent que la genistein inhibe partiellement la libération de l'élastase des PMNs activés par le fMLP. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux rapportés par Mócsai et ses collaborateurs (1997) qui ont montré que l'utilisation de deux inhibiteurs puissants des tyrosine kinases, la genistein et l'erbstatine-A réduit efficacement la

libération de la  $\beta$ -glucuronidase et de l'élastase utilisées comme indice de la dégranulation des PMNs stimulés par le fMLP/CB. Un résultat similaire a été également rapporté par l'équipe de Tuluc (2004) qui ont montré que la genistein inhibe considérablement la libération de l'élastase des neutrophiles fMLP-stimulés. En outre, Mócsai et ses collaborateurs (2000) ont montré que la genistein exerce un puissant effet inhibiteur sur l'exocytose des granules aussi bien primaires que secondaires à partir des neutrophiles activés par l'fMLP/CB. De ce fait, notre résultat confirme la suggestion que les tyrosine kinases seraient probablement impliquées dans la signalisation qui mène à la libération des granules des neutrophiles.

De nombreuses études pharmacologiques et génétiques indiquent que les tyrosine kinases sont très probablement impliquées dans la transduction du signal au cours de la dégranulation des neutrophiles (Ligeti *et* Mócsai, 1999). En effet, il a été rapporté que la phosphorylation des résidus tyrosines de plusieurs protéines est essentielle pour la régulation de nombreux processus au sein des neutrophiles (Gaudry *et al.*, 1993), et que les neutrophiles provenant de souris transgéniques déficientes pour la famille Src-tyrosine kinases présentent une diminution ardente de la dégranulation de ces neutrophiles en réponse au fMLP (Mócsai *et al.*, 2000). Tous ces résultats sont donc en faveur de l'implication des tyrosine kinases dans la régulation du processus de dégranulation des neutrophiles humains. Toutefois, la répression partielle de la dégranulation causée par l'inhibition des tyrosine kinases permet de suggérer que la voie des tyrosine kinases n'est pas la seule voie de transduction du signal de dégranulation, mais elle peut intervenir parallèlement à d'autres voies de signalisation.

Nous avons montré dans notre étude que la genistein affecte également la dégranulation des neutrophiles PMA-stimulés. Ce résultat confirme la participation des tyrosine kinases à la régulation de la dégranulation des PMNs suggérée par le résultat obtenu avec le fMLP. En effet, Mócsai et ses collaborateurs (1997) ont rapporté que 25  $\mu$ M de l'erbstatine-A exerce un effet inhibiteur partiel sur la dégranulation des PMNs stimulés par le PMA. Cependant, ces mêmes auteurs ont montré que la genistein avait seulement un effet marginal sur la réponse de dégranulation PMA-induite des neutrophiles.

La répression de la dégranulation des neutrophiles PMA-stimulés par l'inhibiteur des tyrosine kinases peut être expliquée par le fait que ces dernières soient impliquées dans la voie de signalisation initiée au niveau de la PKC. Effectivement, Gaudry et ses collaborateurs (1993) ont rapporté que l'activation des neutrophiles par le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), un phorbol ester analogue du DAG induit l'activation des tyrosine kinases et leur translocation vers la membrane plasmique. Ces événements sont prévenus par l'inhibition de la PKC prouvant ainsi son implication dans l'activation des tyrosine kinases.

Tenant compte des résultats obtenus dans la présente études et ceux rapportés dans les différentes études citées, on peut dire que les tyrosine kinases sont impliquées dans les voies de signalisation de dégranulation des PMNs activés aussi bien par le fMLP que par le PMA.

### **Implication des MAP Kinases**

L'implication des MAP kinases (MAPK) dans la régulation de la réponse de la dégranulation des PMNs est évaluée dans la présente étude en testant l'effet du PD98059, inhibiteur spécifique des p42/p44 MAPK (Alessi *et al.*, 1995).

Les résultats obtenus montrent que le PD98059 exerce une faible inhibition sur la dégranulation des neutrophiles activés par le fMLP. Ces résultats nous permettent de suggérer que les p42/p44 MAPK pourraient être impliquées dans la signalisation qui induit la dégranulation au sein des neutrophiles activés par le fMLP.

Le rôle des p42/p44 MAPK dans la régulation de la dégranulation des neutrophiles a fait l'objet de nombreuses études. Cependant, les résultats apportés par ces travaux sont très divergents, des fois mêmes contradictoires. Certains auteurs ont rapporté que l'inhibition de l'activation des p42/p44 MAPK par le PD98059 affecte la dégranulation des PMNs activés, prouvant que les p42/p44 MAPK interviennent dans la régulation du mécanisme de dégranulation des neutrophiles (Sue-A-Quan *et al.*, 1997 ; Zhong *et al.*, 2003). Par contre, d'autres auteurs ont montré que le PD98059 n'exerce aucun effet sur la dégranulation des neutrophiles activés par le fMLP excluant ainsi la possibilité de l'implication des p42/p44 MAPK dans la signalisation de dégranulation des neutrophiles (Hii *et al.*, 1999 ; Mócsai *et al.*, 2000). De tels résultats sont difficilement interprétables, mais cette divergence des résultats peut être attribuée en partie aux conditions expérimentales.

La faible inhibition induite par le PD98059 dans la présente étude indique qu'en plus des p42/p44 MAPK, des voies parallèles peuvent également participer à la signalisation de la dégranulation des neutrophiles. Cependant, il a été rapporté que les MAPK peuvent constituer des effecteurs cytosoliques de différentes protéine kinases impliquées dans la signalisation au sein du neutrophile (Bokoch, 1995 ; Bondeva *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1998).

Le PD98059 a également induit une faible inhibition de la libération de l'élastase des neutrophiles PMA-stimulés. Cette inhibition exercée sur la dégranulation des neutrophiles, bien que faible permet de postuler que les p42/p44 MAPK pourraient intervenir dans l'induction de la dégranulation des neutrophiles induite par l'activation de la PKC. En effet, Zhang et ses collaborateurs (1998) ont montré que l'activité PKC est requise pour l'activation des p42/p44 MAPK au sein des neutrophiles stimulés par le PMA ou le fMLP. Cette

activation PKC-dépendante est partiellement inhibée par la répression de l'activité PKC, indiquant ainsi que l'activation des p42/p44 MAPK semble être régie par plusieurs voies dont la PKC (Zhang *et al.*, 1998). Notre résultat confirme cette conclusion puisque l'inhibition de la dégranulation des PMNs PMA-stimulés par le PD98059 était également partielle.

On peut conclure que les p42/p44 MAPK pourraient intervenir dans la signalisation complexe de la réponse de dégranulation des neutrophiles stimulés aussi bien par le fMLP/CB que par le PMA.

## **2. Etude de la flambée respiratoire du neutrophile humain : Implication de quelques voies de signalisation**

La flambée respiratoire, une autre fonction importante des neutrophiles a été investiguée dans la présente étude. Cette réponse se caractérise par une consommation accrue de l'oxygène et la production de grandes quantités du superoxyde par le complexe NADPH oxydase. Pour investiguer quelques voies de signalisation impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase et l'induction de la flambée respiratoire, les neutrophiles humains sont également activés par le fMLP/CB ou le PMA.

La chimiluminescence amplifiée par le luminol a été utilisée pour évaluer la production des ROS par les PMNs activés par le fMLP/CB ou le PMA. Cette chimiluminescence est le résultat de l'interaction du luminol avec les ROS, le luminol est oxydé par les ROS générés au cours de la flambée respiratoire pour donner une molécule électroniquement excitée. La désexcitation de cette molécule est accompagnée d'une émission de photons détectables qui seront exploités pour évaluer la capacité des PMNs à générer les ROS (DeChatelet *et al.*, 1982; Lieberman *et al.*, 1996). La chimiluminescence est actuellement largement utilisée pour étudier la génération des ROS par les PMNs (Tarpey *et al.*, 2004). Cette technique offre plusieurs avantages, elle permet l'utilisation d'un nombre très réduit de cellules, elle facilite les conditions du travail, elle a une sensibilité élevée comparée aux dosages chimiques tel que le test de réduction du cytochrome *c* par les ROS (Arnhold *et al.*, 1999; Tarpey *et al.*, 2004). En outre, la haute perméabilité de la membrane des cellules au luminol permet la détection des ROS générés dans le milieu extracellulaire et intracellulaire (Dahlgren, 1991). Ainsi, la chimiluminescence luminol-dépendante est devenue de plus en plus une technique de choix pour la détection des ROS.

Les résultats obtenus montrent que la cinétique de chimiluminescence des PMNs activés par le fMLP/CB ( $10^{-6}$ M/ $10^{-5}$ M) apparaît rapidement après l'injection du stimulant,

cette chimiluminescence se manifeste en deux pics sur la courbe de cinétique. De nombreux auteurs ont rapporté que la luminescence des PMNs fMLP-activés est biphasique, et se traduit par deux pics sur la courbe de cinétique de chimiluminescence (Dahlgren, 1991; Arnhold *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2002). D'après ces mêmes auteurs, la première phase de la chimiluminescence des PMNs fMLP-activés est due à la génération des ROS extracellulaires, alors que la deuxième phase correspond à l'oxydation du luminol à l'intérieur des PMNs par les ROS intracellulaires. De leur part, Müller et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que la luminescence de la première phase est induite par le premier signal déclenché suite à la fixation du fMLP sur son récepteur, tandis que la luminescence de la deuxième phase serait due à l'amplification du signal apporté par le fMLP suite à l'activation de la PKC, qui contribue à l'activation de la NADPH oxydase, via l'activation de la PLD.

la chimiluminescence qui résulte de l'activation des PMNs stimulés par le PMA ( $10^{-7}$  M) apparaît plus lente et est caractérisée par un seul pic sur la courbe, mais plus intense que celle induite par le fMLP/CB. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Müller et ses collaborateurs (2002), qui ont rapporté que les PMNs donnent une courbe monophasique de chimiluminescence en réponse à l'activation par l'ester de phorbol. Cette réponse est attribuée principalement à la production intracellulaire de ROS. Dans ce cas la courbe complète a été intégrée et représente la production globale de ROS (Müller *et al.*, 2002).

Les différences des cinétiques de chimiluminescences induites par le fMLP/CB ou le PMA pourraient être expliquées par le fait que ces deux stimulants agissent par deux mécanismes différents. Il est bien établi que le fMLP agit via un récepteur membranaire couplé à la protéine G, dont l'activation produit un signal qui est transduit par différentes voies intracellulaires et implique l'activation de nombreuses kinases, y compris la PKC (Bochok, 1995). Ce signal conduit à la phosphorylation puis à l'assemblage des composants de la NADPH oxydase, deux événements indispensables à l'activation de ce complexe enzymatique. Cependant, Le PMA peut activer directement la PKC en se fixant sur le site du DAG; pour cela le PMA doit franchir la membrane plasmique pour atteindre sa cible intracellulaire. Le PMA et les esters de phorbol sont de nature lipidique et peuvent donc traverser passivement la membrane plasmique pour atteindre et activer directement la PKC sans passer par les récepteurs membranaires. Dans ce cas la signalisation intracellulaire débute directement au niveau de la PKC (Nishizuka, 1995; Vlahos, 1995).

La spécificité de la luminescence induite par le fMLP ou le PMA a été vérifiée par la Superoxyde Dismutase. L'incubation des PMNs avec la SOD (100 UI/ml) abolit totalement la luminescence engendrée par les PMNs stimulés que ce soit par le fMLP ou le PMA. La SOD

dismute l' $O_2^-$  pour générer le  $H_2O_2$ , ce qui entraîne un épuisement du  $O_2^-$  (Cabanis, 1996). Ceci reflète la spécificité et la sensibilité de la technique de chimiluminescence utilisée.

La chimiluminescence est une technique de choix pour étudier l'implication de certaines voies de signalisation dans la régulation de la flambée respiratoire des neutrophiles humains activés par le fMLP/CB ou le PMA. Cette étude a été menée en testant l'effet de certains inhibiteurs spécifiques de quelques enzymes qui gouvernent ces voies au sein du neutrophile.

### **Implication de la PI3kinase**

Le rôle de la PI3kinase dans la régulation de la production du  $O_2^-$  a été étudié en examinant l'effet du wortmannin sur la chimiluminescence des PMNs activés par le fMLP/CB ou par le PMA.

Les résultats obtenus montrent que le wortmannin réduit considérablement la chimiluminescence des PMNs stimulés par le fMLP. De nombreuses études ont rapporté des résultats similaires aux nôtres. En effet, il a été rapporté que le wortmannin à des concentrations de l'ordre du nanomolaire réduit sévèrement la flambée respiratoire des PMNs activés par le fMLP (Sue-A-Quan *et al.*, 1997; Akasaki *et al.*, 1999). De même, Vocks et ses collaborateurs (2003) ont montré que l'incubation des neutrophiles avec deux inhibiteurs de la PI3kinase, le wortmannin et le LY290004 inhibe fortement la production du  $O_2^-$  induite par le fMLP. Cadwallader et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que l'inhibiteur spécifique de la PI3kinase, LY290004, réprime la production du  $O_2^-$  ainsi que l'accumulation du PIP3 au sein des neutrophiles activés par le fMLP et par le PAF. En fait, les résultats apportés par l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de la PI3kinase sont en accord avec ceux fournis par des études ayant utilisé des souris PI3kinase  $\gamma$  knock-out. L'activation des neutrophiles isolés de ces souris par le fMLP montre une diminution de la production du  $O_2^-$  comparée avec celle des neutrophiles issus de souris normales (Sasaki *et al.*, 2000). Tous ces résultats, y compris les nôtres confirment donc l'implication de la PI3kinase dans la signalisation de la flambée respiratoire chez le neutrophile.

Les résultats obtenus montrent aussi que la préincubation des neutrophiles avec le wortmannin provoque une inhibition partielle de la chimiluminescence des PMNs PMA-activés. De tels résultats indiquent que la PI3kinase est impliquée dans la transduction du signal initié au niveau de la PKC et qui mène à la génération du superoxyde par les neutrophiles PMA-stimulés.

Selon Karlson et ses collaborateurs (2000), le PMA pourrait induire une activation de

la NADPH oxydase de façon sensible à l'inhibition par le wortmannin. D'après ces auteurs, ceci est dû à l'existence de deux niveaux de production du  $O_2^{\cdot-}$  par la NADPH oxydase, un localisé dans la membrane plasmique et l'autre dans les membranes des granules intracellulaires. Il semble que le wortmannin n'affecte pas la production du superoxyde extracellulaire mais plutôt la production intracellulaire du radical au sein des neutrophiles PMA-activés (Karlson *et al.*, 2000). Cela indique que ces deux niveaux de génération du  $O_2^{\cdot-}$  sont différemment régulés par les PI3kinases.

Contrairement à ces résultats, plusieurs auteurs ont rapporté que le wortmannin n'exerce pas un effet remarquable sur la flambée respiratoire des PMNs en réponse à la stimulation par le PMA (Vlahos, 1995). Cette contradiction des résultats peut être attribuée aux méthodes employées pour évaluer la génération des ROS par les neutrophiles. L'utilisation de la réduction du cytochrome *C* comme indice de la génération des ROS ne permet pas de détecter le changement qui pourrait affecter la production intracellulaire du  $O_2^{\cdot-}$ , car la membrane plasmique est imperméable au cytochrome *C* à cause de son poids moléculaire élevé et de sa charge (Tarpey *et al.*, 2004). Cependant, la sensibilité élevée de la chimiluminescence et la haute perméabilité des cellules au luminol permet la détection de la génération des ROS aussi bien extracellulaire qu'intracellulaire.

Nos résultats soulèvent donc la possibilité que la PI3kinase soit impliquée dans la signalisation de la flambée respiratoire activée par le fMLP, ainsi que sa participation à la signalisation gouvernée par la PKC au sein des neutrophiles activés par le PMA.

### **Implication de la PKC**

Pour évaluer le rôle de la PKC dans la génération des ROS au cours de la flambée respiratoire des PMNs, nous avons testé l'effet de son inhibiteur la chelerythrine chlorure sur la production des ROS des PMNs induite par le fMLP/CB ou par le PMA et évaluée par chimiluminescence.

Les résultats obtenus montrent que la chelerythrine chlorure inhibe totalement la chimiluminescence des PMNs dans les deux cas de stimulants. Ces résultats permettent de suggérer que la PKC est très probablement impliquée dans la signalisation qui conduit à la génération du superoxyde au sein du neutrophile. Ces résultats ont été prouvés par de nombreux travaux dans lesquels différents inhibiteurs spécifiques de la PKC ont été utilisés (Laudanna *et al.*, 1998; Korchak *et al.*, 2001; Vocks *et al.*, 2003; Tuluc *et al.*, 2004). En effet, Dunzendorfer et Wiedermann (2000) ont montré que l'utilisation de la staurosporine et le GFX, deux inhibiteurs spécifiques de la PKC inhibe efficacement la flambée respiratoire

des neutrophiles stimulés aussi bien par le fMLP que par le PMA. L'implication de la PKC dans l'induction de chimiluminescence a été rapportée également par Arnhold et ses collaborateurs (1999) en testant l'effet de la staurosporine et du bisindolylmaleimide un autre inhibiteur spécifique de la PKC sur les PMNs activés par le fMLP.

Ces résultats sont renforcés encore plus par d'autres observations fournies par de nombreuses études concernant l'activation du complexe NADPH oxydase. En effet, El Benna et ses collaborateurs (1995 et 1997) ont démontré que l'activation des PMNs par le PMA induit la phosphorylation des sous unités p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> du complexe NADPH oxydase. Cette phosphorylation est réduite par la répression de l'activité de la PKC par le GFX, démontrant ainsi que la PKC est nécessaire pour la phosphorylation des sous unités de la NADPH oxydase. Des résultats semblables ont été rapportés par Nixon et McPhail (1999) qui ont rapporté également que la phosphorylation et l'assemblage des sous unités de la NADPH oxydase dépendent de la translocation de la PKC vers la membrane plasmique. Il est par ailleurs établi que la phosphorylation des sous unités cytosoliques et leur translocation vers la membrane plasmique de la NADPH oxydase est un évènement indispensable à l'assemblage et l'activation du complexe générateur du O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Quinn *et* Gauss, 2004)

L'ensemble de ces résultats nous permet de dire que la PKC est effectivement impliquée dans la transduction du signal qui régule la production du superoxyde des neutrophiles activés aussi bien par le fMLP/CB que par le PMA.

### **Implication des tyrosine kinases**

La chimiluminescence des neutrophiles induite par le fMLP/CB ou par le PMA a été examinée en présence de la genistein, un puissant inhibiteur des tyrosine kinases afin d'étudier leur rôle dans la signalisation de la flambée respiratoire des neutrophiles.

Les résultats montrent que la genistein réduit efficacement la production du O<sub>2</sub><sup>-</sup> par les PMNs stimulés par le fMLP/CB. Ce qui nous permet de suggérer que les tyrosine kinases sont requises pour la régulation du processus de la flambée respiratoire au sein des PMNs en réponse à l'fMLP/CB.

De tels résultats ont été rapportés par Cadwallader et ses collaborateurs (2002) qui ont montré que l'incubation des PMNs avec la genistein induit une inhibition importante de la génération du O<sub>2</sub><sup>-</sup> induite par le fMLP. Mócsai et ses collaborateurs (1997) ont montré que l'utilisation de l'erbstatin-A un autre inhibiteur spécifique des tyrosine kinases induit une inhibition considérable de la production du O<sub>2</sub><sup>-</sup> par les PMNs fMLP-stimulés, mais cette inhibition était légèrement moins prononcée que celle provoquée par la genistein. De plus, le

traitement des PMNs avec le ST-638 diminue remarquablement la chimiluminescence des neutrophiles fMLP-activés (Vocks *et al.*, 2003). L'analyse des données apportées par ces différentes études confirme l'implication des tyrosine kinases dans la signalisation de la flambée respiratoire et qui conduit à la génération du superoxyde par les PMNs.

En outre, notre étude montre que l'inhibition de l'activité des tyrosine kinases par la genistein bloque également la chimiluminescence des PMNs induite par le PMA. En effet, ce résultat soutient celui rapporté par Mócsai et ses collaborateurs (1997) qui ont montré que la répression des tyrosine kinases par l'erbstatin-A inhibe la génération du superoxyde par les neutrophiles PMA-activés. Ces résultats confirment d'une part l'implication des tyrosine kinases dans la signalisation de la flambée respiratoire des PMNs, et suggère qu'elles pourraient être activées par la voie de la PKC d'autre part.

### **Implication des MAP Kinases**

De nombreuses études présentent les MAP kinases comme des effecteurs qui pourraient être impliqués dans les voies de signalisation au sein du neutrophile. Pour vérifier l'implication des MAP kinases dans la signalisation qui gouverne la flambée respiratoire, les PMNs ont été incubés avec le PD98059, un inhibiteur spécifique des p42/p44 MAP kinases.

Les résultats montrent que la répression de l'activation des p42/p44 MAPK par le PD98059 induit une faible inhibition de la chimiluminescence des neutrophiles fMLP/CB-stimulés. De nombreuses études ont rapporté que le prétraitement des neutrophiles par le PD98059 réduit partiellement la production du superoxyde induite par le fMLP (Avdi *et al.*, 1996 ; Downey *et al.*, 1998). Tandis que, Djerdjouri et ses collaborateurs (1999) ont démontré que le PD98059 inhibe considérablement la génération du superoxyde fMLP-induite par les PMNs. D'autres études renforcent encore plus ces résultats, ainsi Dewas et ses collaborateurs (2000) ont prouvé que le blocage de l'activation des p42/p44 MAPK par le PD98059 inhibe la phosphorylation de la p47<sup>phox</sup>, sous unité essentielle pour l'assemblage et l'activation de la NADPH oxydase au sein des neutrophiles.

Donc, tous ces résultats y compris le notre sont en faveur de l'implication des p42/p44 MAPK dans la régulation de la réponse oxydative au sein des neutrophiles.

Des études faites auparavant ont rapportés que les MAP kinases peuvent être des effecteurs cytosoliques de la PKC (Cobb *et* Goldsmith, 1995 ; Nishizuka, 1995 ; Zhang *et al.*, 1998). Pour vérifier la possibilité de l'activation des p42/p44 MAPK par la voie de la PKC, les neutrophiles ont été stimulés par le PMA en présence du PD98059.

Les résultats obtenus montrent que la répression de l'activation des p42/p44 MAPK par le PD98059 exerce une inhibition relativement faible sur la chimiluminescence des PMNs stimulé par le PMA. En effet, notre résultat est confirmé par celui rapporté par Downey et ses collaborateurs (1998) qui ont montré que l'inhibition de l'activité p42/p44 MAPK réduit partiellement la production du  $O_2^-$  par induite suite à l'activation de la PKC par le phorbol ester TPA au sein des PMNs. De plus, Zhang et ses collaborateurs (1998) ont également montré que l'activité PKC est requise dans l'activation des p42/p44 MAPK au sein des neutrophiles stimulés par le PMA, et que cette activation PKC dépendante est partiellement inhibée par la répression de l'activité PKC. Ces résultats nous permettent de suggérer que les p42/p44 MAPK sont impliquée dans la signalisation de la flambée respiratoire régie par la PKC au sein des PMNs PMA-activés.

Les résultats de l'utilisation du PD98059 nous permettent de conclure que les p42/p44 MAPK seraient probablement impliquées dans la régulation du signal qui gouverne la production du  $O_2^-$  au cours de la flambée respiratoire des neutrophiles humains stimulés par le fMLP et le PMA.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail a été consacré à l'investigation de certaines voies de signalisation qui régissent l'activation de la dégranulation et de la flambée respiratoire du neutrophile humain. Nous avons essayé de mettre en évidence l'implication de certaines enzymes dans la cascade de ces deux fonctions.

Nous avons pu montrer que la PKC, la PI3kinase, les tyrosine kinases et les p42/p44 MAPK sont impliquées dans la signalisation de dégranulation et de la flambée respiratoire au sein du neutrophile. Nos résultats fournissent une évidence que les tyrosine kinases et les p42/p44 MAPK pourraient constituer des effecteurs cytosoliques pour la voie de la PKC au cours de la dégranulation et de la flambée respiratoire au sein des neutrophiles. La voie PI3kinase n'est vraisemblablement pas activée par la voie de signalisation initiée par la PKC au cours de la dégranulation. Cependant, elle peut participer dans la régulation de la signalisation de la flambée respiratoire régie par la PKC au sein des neutrophiles PMA-stimulés. Ces différentes enzymes peuvent constituer des voies de signalisation commune entre la dégranulation et la flambée respiratoire au sein des neutrophiles humains, avec quelques divergences concernant le potentiel d'implication de ces enzymes dans chacune des réponses.

Toutefois, la PKC, la PI3kinase, les tyrosine kinases et les MAP kinase sont exprimées sous différentes isoformes au sein du neutrophile. Le rôle de ces isoformes dans la régulation des mécanismes de la mobilisation des différents granules ainsi que dans l'assemblage et l'activation de la NADPH oxydase est encore à établir.

L'utilisation des inhibiteurs spécifiques des isoformes de ces enzymes de signalisation serait un puissant outil qui permettra l'identification des isoformes précises qui sont impliquées dans la transduction du signal au sein du neutrophile. Il est également possible d'adopter une approche génétique qui consiste en l'utilisation des cellules dépourvues d'une isoforme d'enzyme de signalisation pour élucider l'implication de cette isoforme dans la régulation des mécanismes qui conduisent aux réponses des neutrophiles. Ces différentes approches, ainsi que l'utilisation d'autres agents activateurs des neutrophiles offrira la possibilité d'étudier l'implication d'autres voies inexplorées dans la régulation des activités des neutrophiles humains.

*Références*  
*Bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akasaki T, Koga H and Sumimoto H (1999). Phosphoinositide 3-Kinase-dependent and – independent activation of the small GTPase Rac2 in human neutrophils. *J Biol Chem*, **274(25)**, 18055-18059.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT and Saltiel AR (1995). PD098059 is a specific inhibiteur of the activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, **270(46)**, 27498-27494.
- Ali H, Richardson RM, Haribabu B and Snyderman R (1999). Chemoattractant receptor Cross-desensitization. *J Biol Chem*, **274(10)**, 6027-6030.
- Al-Shami A, Bourgpoin SG and Naccache PH (1997). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Activated signalling pathways in human neutrophils. I. Tyrosine phosphorylation-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and inhibition by phorbol esters. *Blood*, **89(3)**, 1035-1044.
- Arnhold J, Bernard S, Kilian U, Reichl S, Schiller J and Arnhold K (1999). Modulation of luminol chemiluminescence of fMet-Leu-Phe-stimulated neutrophils by affecting dephosphorylation and the metabolism of phosphatidic acid. *Lumin*, **14**, 129-137.
- Avdi NJ, Malcom KC, Nick JA and Worthen GS (2002). A role for protein phosphatase-2A in p38 Mitogen-activated Protein Kinase-mediated regulation of the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*, **277(43)**, 40687-40696.
- Avdi NJ, Winston BW, Russel M, Young SK, Johnson GL and Worthen GS (1996). Activation of MEKK by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *J Biol Chem*, **271(52)**, 33598-33606.
- Babior BM (1999). NADPH oxidase: An update. *Blood*, **93**, 1464-1476.
- Babior BM (2002). The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Sci*, **4**, 1023-1024.
- Baggiolini M, Boulay F, Badwey JA and Curnutte JT (1993). Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J*, **7**, 1004-1010.
- Beker EL (1990). The short and happy life of neutrophil activation. *J Leuk Biol*, **47**, 378-389.
- Ben-Baruch A, Michiel DF and Oppenheim JJ (1995). Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem*, **270(20)**, 11703-11706.
- Bochok GM (1995). Chemoattractants signalling and leukocyte activation. *Blood*, **86(5)**, 1649-1660.
- Bochok GM and Diebold BA (2002). Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*, **100**, 2692-2696.
- Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R and Wymann MP (1998).

Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K $\gamma$  to the protein kinases PKB and MAPK. *Sci*, **282**, 293-296.

Borregaard N and Cowland JB (1997). Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood*, **89(10)**, pp3503-3521.

Bouriche H (2005). Modulation of inflammation by *Cleome Arabica* leaf extract, rutin and quercetin, studied *in vivo* and *in vitro*. *Doctorat D'état thesis*. Department of Biology – UFAS university, Algeria, pp 61-94.

Burnett D, Chamba A, Hill SL and Stockley RA (1989). effects of plasma, tumor necrosis factor, endotoxin and dexamethasone on extracellular proteolysis by neutrophil from healthy subjects and patients with emphysema. *Clin Sci*, **77**, 35-41.

Cabanis A (1996). Action pharmacologique des molécules envers les espèces réactives de l'oxygène produites par les granulocytes neutrophiles. Evaluation du mécanisme d'action et perspectives thérapeutiques. *Doctorat thesis*. Lille II, France ; pp ,1-23.

Cabanis A, Gressier B, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M and Cazin JC (1996). Effect of the protein kinase C inhibitor GF109203X on elastase release and respiratory burst of human neutrophils. *APMIS*, **27**, 1409-1414.

Cadwallader KA, Condliffe AM, McGregor A, Walker TR, White JF, Stephens LR and Chilvers ER (2002). Regulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase activity and phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate accumulation by neutrophil priming agents. *J Immunol*, **169**, 3336-3344.

Capodici C, hanft S, Feoktistov M and Pillinger MH (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase mediates chemoattractant-stimulated, CD11b/CD18-dependent Cell-Cell adhesion of human neutrophils: Evidence for an ERK-Independent pathways. *J Immunol*, **160**, 1901-1909.

Chen LW, Lin MW and Hsu CM (2005). Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J Biomed Sci*, **12**, 1-5.

Chen YA and Scheller RH (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 98-106.

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

Cobb MH and Goldsmith EJ (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*, **270(25)**, 14843-14846.

Dahlgren C (1991). Effect of different inhibitors on the intracellularly and extracellularly generated chemiluminescence induced by Formylmethionyl-leucylphenylalanine in polymorphonuclear leukocytes. Cellular response in the presence of Mannitol, Benzoate,

Taurine, Indomethacin and NDGA. *J Biolumin Chemilumin*, **6**, 29-34.

- Dang PMC, Dewas C, Gaudry M, Fay M, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidal MA and El-Benna J (1999). Priming of human neutrophil respiratory burst by Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47<sup>phox</sup>. *J Biol Chem*, **274**(29), 20704-20708.
- Dang PMC, Fontayne A, Jacques H, El-Benna J and Périani A (2001). Protein kinase C $\zeta$  phosphorylates a subset of selective sites of the nadph oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol*, **166**, 1206-1213.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, and Cohen P (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *J Biochem*, **315**, 95-105
- DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW and Cohen MS (1982). Mechanism of Luminol-dependent Chemiluminescence of human neutrophils. *J Immunol*, Vol **124**(4), 1589-1593.
- Dennis E, Rhee SG, Billah MM and Hannun YA (1991). Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J*, **5**, 2068-2077.
- Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidal MA and El-Benna J (2000). The Mitogen-Activated Protein Kinase Extracellular Signal-Regulated Kinases1/2 pathway is involved in formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol*, **165**, 5238-5244.
- Dianqing W (2005). Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. *Cell Res*, **15**(1), 52-56.
- Djerdjouri B, Lenoir M, Giroud JP and Périani A (1999). Contribution of Mitogen-Activated Protein Kinase to stimulation of phospholipase D by the chemotactic peptide fMet-Leu-Phe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 371-375.
- Downey GP, Butler JR, Brumell J, Borregaard N, Kjeldsen L, Sue-A-Quan AK and Grinstein S (1996). Chemotactic Peptide-induced activation of MEK-2, the predominant isoform in human neutrophil. Inhibition by Wortmannin. *J Biol Chem*, **271**(35), 21005-21011.
- Downey GP, Butler JR, Tapper H, Fialkow L, Saltiel AR, Rubin BB and Grinstein S (1998). Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J Immunol*, **160**, 434-443.
- Droge W (2003). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **83**(1), 47-95.
- Dunzendorfer S and Wiedermann CJ (2000). Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprolol. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 915-924.

- El-Benna J, Dang PM, Gaudry M, Fay M, Moral F, Hakim J Gougirol-pocidallo M (1997). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67<sup>phox</sup> during Human neutrophil activation. regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J Biol Chem*, **272**(27), 17204-17208.
- El-Benna J, Faust LRP, Johnson JL and Babior BM (1995). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47<sup>phox</sup> as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein, kinase C, protein kinase A and a Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Biol Chem*, **271**, 6374-6378.
- Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J and Borregaard N (2002). Defensin-rich granules of human neutrophils: Characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta*, **1591**, 29-35.
- Faurschou M and Borregaard N (2003). Forum in immunology: Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infect*, **5**, 1317-1327.
- Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, Bratton DL, Worthen GS and Hensen PM (1998). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J Biol Chem*, **273**, 8389-8397.
- Gamet-Payraastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H and Payraastre B (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI3kinase. *Gen Pharmacol*, **32**, 279-286.
- Gaudry M, Caon AG and Naccache PH (1993). Modulation of the activity and subcellular distribution of protein tyrosine kinases in human neutrophil by phorbol esters. *FASEB J*, **7**, 687-393.
- Gilbert C, Levasseur S, Dsaulnier P, Dusseault AA, Thibault N, Bourgoin S and Naccache PH (2003). chemotactic Factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils. II. Effects of LFM-A13, a specific Btk inhibitor. *J Immunol*, **170**, 5235-5243.
- Gompertz S and Stockley RA (2000). Inflammation-role of the neutrophil and the eosinophil. *Semin Respir Infect*, **15**, 14-23.
- Gorzalczany Y, Sigal N, Itan M, Lotan O and Pick E (2000). Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *J Biol Chem*, **275**(51), 40073-40081.
- Grisham MB and Ganger DN (1988). neutrophil mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci*, **33**, 6S-15S.
- Gustafson A (1995). Function of neutrophil granulocytes in periodontitis pathogenic study of tissue destructive inflammation. *J Clin Periodontol*, 11-15.
- Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC (1998). Inside the Neutrophil Phagosome:

Oxydants, Myeloperoxidase and Bacteria killing. *Blood*, **92(9)**, 3007-3017.

Heyworth PG, Curnutte JT and Badwey JA (1999). Structure and Regulation of NADPH Oxidase of Phagocytic Leukocytes. In: Molecular and Cellular Basis of Inflammation. Edited by Serhan CN and Ward PA, Humana Press. Totowa, New Jersey; pp, 165-191.

Hii CST, Marine LA, Halliday D, Robertson DM, Murray AW and Ferrante AW (2001). Regulation of human neutrophil-mediated cartilage proteoglycan degradation by phosphatidylinositol 3-kinase. *Immunol*, **102**, 59-66.

Hii CST, Stacey K, Moghaddami N, Murrey AW and Ferrante A (1999). Role of the Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase cascade in human neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and in migration. *Infect Immun*, **67(3)**, 1297-1302.

Janeway DW, Travers P, Walport M and Shlomchik M (2001). An introduction to immunobiology and innate immunity. In *Immunology*, 5<sup>th</sup> edition, (New York), pp, 347-380.

Kaldi K, Szeberenyi J, Rada BK, Kovacs P, Geiszt M, Mocsai A and Ligeti E (2002). Contribution of phospholipase D and a brefeldin A-sensitive ARF to chemoattractant-induced superoxide production and secretion of human neutrophils. *J Leukoc Biol*, **71**, 695-700.

Karlson A, Nixon JB and McPhail LC (2000). Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways, dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leuk Biol*, **67(3)**, 396-404.

Kim C and Dinauer MC (2001). Rac2 is essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signalling pathways. *J Immunol*, **166**, 1223-1232.

Kim C, Marchal CC, Penninger J and Dinauer MC (2003). The hemopoietic Rho/Rac Guanine nucleotide Exchange Factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J Immunol*, **171**, 4425-4430.

Kogut MH, Genovese KJ, and Lowry VK (2001). Differential Activation of Signal Transduction Pathways Mediating Phagocytosis, Oxidative Burst, and Degranulation by Chicken Heterophils in Response to Stimulation with Opsonized *Salmonella enteritidis*. *Inflamm*, **25(1)**, 7-15.

Korchak HM and Kilpatrick L (2001). Roles for  $\beta$ II-Protein kinase C and RACK1 in positive and negative signalling for superoxide anion generation in differentiated HL60 cells. *J Biol Chem*, **276(12)**, 8910-8917.

Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W and Grinstein S (1997). Chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and MAPK-activated Protein Kinase-2 in human neutrophils. *J Biol Chem*, **272(2)**, 937-944.

- Lachance G, Levasseur S and Naccache PH (2003). Chemotactic factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils. *J Biol Chem*, **277**(24), 21537-21541.
- Lakshman R and Finn A (2001). Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol*, **54**, 7-19.
- Larsen FC, DiGennaro JA, Saito N, Mehta S, Loegering D, Mazurkiewicz JF and Lennartz MR (2000). Differential requirements for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW264.7 cells. *J Immunol*, **165**, 2809-2817.
- Laudanna C, Mochly-Rosen D, Liron T, Constantin G and Butcher EC (1998). Evidence of  $\zeta$  protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem*, **273**(46), 30306-30315.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P and Parker PJ (1998). Protein kinase C isotypes controlled by Phosphoinositide 3-Kinase through the protein kinase PDK1. *Sci*. **281**, 2042-2046.
- Lemke HD and Ward RA (1994). Methods for assessment of neutrophil function during extracorporeal circulation. *Nephrol Dial Transplant*, **9**(2), 104-111.
- Li S, Yamauchi A, Marchal CC, Molitoris JK, Quilliam LA and Dinayer MC (2002). Chemoattractant-Stimulated Rac activation in Wild-type and Rac2-deficient murine neutrophils: preferential activation of Rac2 and Rac2 gene dosage effect on neutrophil functions. *J Immunol*, **169**, 5043-5051.
- Lian JP, Huang RY, Robinson D and Badwey JA (1999). Activation of p90<sup>RSK</sup> 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.
- Lieberman MM, Sachanandani DM and Pinney CA (1996). Comparative study of neutrophil activation by Chemiluminescence and Flow Cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*, **3**(6), 654-662.
- Ligeti E and Mocsai A (1999). Commentary: Exocytosis of Neutrophil Granulocytes. *Biochem Pharmacol*, **57**(11), 1209-1214.
- Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Luscinskas FW and Parkos CA (2003). Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signalling events. *J Immunol*, **172**, 7-13.
- Lopes LR, Hoyal CR, Knaus UG and Babior BM (1999). Activation of the leukocyte NADPH oxidase by Protein Kinase C in a partially recombinant cell-free system. *J Biol Chem*, **274**(22), 15533-15537.
- Lowell CA and Berton G (1999). Integrin signal transduction in myeloid leukocytes. *J Leuk*

*Biol*, **65**, 313-317.

- Martinez-Cayuela M (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**, 147-161.
- Martin-Martin B, Nabokina SM, Blasi J, Lazo PA and Mollinedo F (2000). Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood*, **96(7)**, 2574-2583.
- McColl SR, Dipersio JF, Caon AC, Ho P and Naccach PH (1991). Involvement of tyrosine kinases in the activation of human peripheral blood neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, **78(7)**, 1842-1852.
- Mills JS, Miettinen HM, Vales MJ and Jesaitis AJ (1999). The *N*-formyl peptide receptor. In: *Molecular and Cellular Basis of Inflammation*. Edited by Serhan CN and Ward PA, Humana Press. Totowa, New Jersey; pp, 215-245.
- Mocsai A, Banfi B, Kapus A, Farkas G, Geiszt M, Buday L and Ligeti FE (1997). Differential effects of tyrosine kinase inhibitors and an inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade on degranulation and superoxide production of human neutrophil granulocytes. *Biochem Pharmacol*, **54(07)**, 781-789.
- Mocsai A, Jakus Z, Vantus T, Berton G, Lowell CA and Ligeti E (2000). Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: The role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase activated by Src family kinases. *J Immunol*, **164**, 4321-4331.
- Mocsai A, Ligeti E, Lowell CA and Berton G (1999). Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol*, **162**, 1120-1126.
- Moghaddami N, Costabile M, Grover PK, Jersmann HPA, Huang Z, Hii CST and Ferrante A (2003). Unique effect of arachidonic acid on human neutrophil TNF receptor expression: up-regulation involving Protein Kinase C, Extracellular Signal-regulated Kinase, and phospholipase A<sub>2</sub>. *J Immunol*, **171**, 2616-2624.
- Morel F, Boulay F, Doussière J and Vigais P (1992). Bases moléculaires de la granulomatose septique chronique. *Med Sci*, **8**, 912-920.
- Müller J, Petkovic M, Sciller J, Arnhold K, Reichl S and Arnhold J (2002). Effects of lysophospholipids on the generation of reactive oxygen species by fMLP- and PMA-stimulated human neutrophils. *Lumini*, **17**, 141-149.
- Naccache PH, Levasseur S, Lachance G, Chakravarti S, Bourgoin SG and McColl SR (2000). Stimulation of human neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$ . *J Biol Chem*, **275**, 23636-23641.
- Nauseef WM, Volpp BD, Mckormick S, Leidal KJ and Clark RA (1990). Assembly of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. Protein kinase C promote cytoskeletal and membranes association of cytosolic oxidase components. *J Bio Chem*, **266(9)**, 5911-5917.

- Niggli V (2003). Signaling to migration in neutrophils: Importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 1619-1938.
- Nishizuka Y (1992). Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Sci*, **58**, 607-614.
- Nishizuka Y (1995). Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J*, **9**, 484-496.
- Nixon BJ and McPhail LC (1999). Protein Kinase C isoforms translocate to Triton-Insoluble fractions in stimulated human neutrophils: Correlation of conventional PKC with activation of NADPH Oxidase. *J Immunol*, **163**, 4574-4582.
- Payraastre P, Missy K, Giuriato S, Bodin S, Plantavid M and Gratacap MP (2001). Phosphoinositides key players in cell signalling, in time and space. *Cell Signal*, **13**, 377-387.
- Philips MR, Feoktistov A, Pillinger MH and Abramson SB (1995). Translocation of p22<sup>rac2</sup> from cytosol to plasma membrane is neither necessary nor sufficient for neutrophil NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*, **270(19)**, 11514-11521.
- Quinn MT and Gauss KA (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leuk Bio*, **76**, 760-781.
- Rane MJ, Coxon PY, Powell DW, Webster R, Klein JB, Pierce W, Ping P and McLeish KR (2001). p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem*, **276(5)**, 3517-3523.
- Regier DS, Greene DG, Sergean S, Jesaitis AJ and McPhail LC (2000). Phosphorylation of p22<sup>phox</sup> is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22<sup>phox</sup> phosphorylation. *J Biol Chem*, **275(37)**, 28406-28412.
- Reichl S, Arnhold J, Knight J, Schiller J and Arnhold K (2000). Reaction of pholasin with peroxidase and hypochlorous acid. *Free Rad Biol Med*, **47**, 89-98.
- Roos D (1991). The respiratory burst of phagocytic leukocytes. *Drug Invest*, **3(2)**, 48-53.
- Roos D and Van Bruggen R (2000). Genetic analysis of patients with chronic granulomatous disease: insights in a clinical situation. *Centr Eur J Immunol*, **25**, 106-112.
- Sasaki T, Iri-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-Dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A and Penninger JM (2000). function of PI3K $\gamma$  in Thymocyte development, T cell activation and Neutrophil migration. *Sci*, **287**, 1040-1046.
- Seely AJE, Pascual JL and Christou NV (2003). Science review: Cell membrane expression

(connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit care*, **7**, 291-307.

Selloum L, Reichl S, Müller M, Sebihi L and Arnhold J (2001). effects of flavonols on the generation of superoxide anion by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys*, **395**, 49-56.

Selvatici R, Falzarano S, Traniello S, Zecchini GP and Spisani S (2003). formyl peptide trigger selective molecular pathways that are required in the physiological functions of human neutrophil. *Cell Signal*, **15**, 377-383.

Sengelov H, Kjeldsen L and Borregaard N (1993). Control of Exocytosis in Early Neutrophil Activation. *J Immunol*, **150(4)**, 1535-1543.

Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJD, Banerjee A and Silliman CC (2005). Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leuko Biol*, **78**, 1025-1042.

Stoyanova S, Bulgarelli-Leva G, Kirsch C, Hanck T, Klinger R, Wetzker R and Wymann MP (1997). Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ : structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem J*, **324**, 489-495.

Strassheim D, Asehnoune K, Park JS, Kim JY, He Q, Richter D, Kuhn K, Mitra S And Abraham E (2004). Phosphoinositide 3-Kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-Like receptor 2-stimulated neutrophils. *J Immunol*, **172**, 5727-5733.

Sue-A-Quan AK, Fialkow L, Vlahos CJ, Schelm JA, Grinstein S, Butler J and Downey GP (1997). Inhibition of neutrophil oxidative burst and granule secretion by Wortmannin: potential role of MAP kinase and renaturable kinases. *J Cell Physiol*, **172**, 94-108.

Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukimaki Y, Nakamura M and Takeshima K (1996). Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, **271(36)**: 22152-22158.

Tarpey MM, Wink D and Grisham MB (2004). Methods for detection of reactive oxygen species and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **286**. 431- 444.

Tithof PK, Peters-Golden M and Ganey PE (1998). Distinct phospholipases A<sub>2</sub> regulated release of arachidonic acid for eicosanoid production and superoxide anion generation in neutrophils. *J Immunol*, **160**, 953-960.

Tuluc F, Garcia A, Bredeteau O, Meshki J and Kunapuli SP (2004). Primary granules release from human neutrophils is potentiated by soluble fibrinogen through a mechanism depending on multiple intracellular signalling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C1264-C1272.

- Ueyama T, Lennartz MR, Noda Y, Kobayashi T, Shirai Y, Rikitake K, Yamasaki T, Hayashi S, Sakai N, Seguchi H, Sawada M, Sumimoto H and Saito N (2004). Superoxide production at phagosomal cup/phagosome through  $\beta$ I protein kinase C during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in microglia. *J Immunol*, **173**, 4582-4589.
- Vines CM and Prossnitz ER (2004). Mechanisms of G protein-coupled receptor-mediated degranulation. *FEMS Microbiol Immunol*, **236**, 1-6.
- Vlahos CJ (1995). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and their effects on cell signalling pathways. *Drugs Future*, **20(2)**, 165-171.
- Vocks A, Petkovic M and Arnhold J (2003). Involvement of phosphatidic acid in both degranulation and oxidative activity in fMet-Leu-Phe stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Cell Physiol Biochem*, **13**, 165-172.
- Wagner JG and Roth RA (2000). Neutrophil migration mechanisms, with emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*, **4**, 509-513.
- Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L and Williams RL (1999). Structure insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature*, **402**, 313-320.
- Ward RA, Nakamura M and McLeish KR (2000). Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome *b*<sub>558</sub>-containing granules. *J Biol Chem*, **275(47)**, 36713-36719.
- Werner E (2004). GTPases and reactive oxygen species : switches for killing and signalling. *J Cell Sci*, **117**, 143-153.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs-Macarelli L (2000). Neutrophils : Molecules, functions and pathological aspects. *Lab invest*, **80**, 617-653.
- Wymann MP and Pirola L (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 127-150.
- Yamaguchi C, Ogita K, Nakamura S and Nishizuka Y (1995). The protein kinase C isoforms leading to MAP-kinase activation in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **210(3)**, 659-647.
- Yum HK, Arcaroli J, Kupfner J, Shenkar R, Penninger JM, Sasaki T, Yang KY, Park JS and Abraham E (2001). Involvement of phosphoinositide 3-Kinases in neutrophil activation and the development of Acute Lung Injury. *J Immunol*. **167**, 6601-6608.
- Zhang H, Garlich CD, Mugge A and Daniel W (1998). Involvement of tyrosine kinases, Ca<sup>2+</sup> and PKC in activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human polymorphonuclear neutrophils. *J Physiol*, **513(2)**, 359-367.
- Zhong B, Jiang K, Gilvary DL, Epling-Burnette PK, Ritchey C, Liu J, Jackson RJ, Hong-Geller E and Wei S (2003). Human neutrophils utilize a Rac/Cdc42-dependent MAPK pathway to direct intracellular granule mobilization toward ingested microbial pathogens. *Blood*, **101**, 3240-3248.

## Résumé :

Dans la présente étude, l'effet de quelques inhibiteurs spécifiques de certaines voies de signalisation impliquées dans la régulation de la dégranulation et de la flambée respiratoire des neutrophiles humains fMLP/CB et PMA-activés, a été étudié. L'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles stimulés est exploitée pour estimer la dégranulation de ces cellules. Tandis que, la chimiluminescence amplifiée par le luminol est utilisée pour évaluer la flambée respiratoire des PMNs stimulés. La dégranulation des neutrophiles fMLP/CB ou PMA-stimulés est significativement inhibée par la chelerythrine chloride, la génistéine et le PD98059. Le wortmannin a exercé une inhibition significative sur la dégranulation des PMNs fMLP/CB-stimulés seulement, sans affecter la dégranulation induite par le PMA. Cependant, tous les inhibiteurs utilisés dans la présente étude ont exercé une inhibition significative sur la flambée respiratoire des neutrophiles stimulés aussi bien par le fMLP/CB que par le PMA. Cette étude fournit une évidence que la PKC, la PI3kinase, les tyrosine kinases et les p42/p44 MAPK sont impliquées dans la signalisation de dégranulation et de la flambée respiratoire au sein du neutrophile. Nos résultats fournissent une évidence que les tyrosine kinases et les p42/p44 MAPK pourraient constituer des effecteurs cytosoliques pour la voie de la PKC au cours de la dégranulation et de la flambée respiratoire au sein des neutrophiles. La voie PI3kinase n'est vraisemblablement pas activée par la voie de signalisation initiée par la PKC au cours de la dégranulation. Cependant, elle peut participer dans la régulation de la signalisation de flambée respiratoire régie par la PKC au sein des neutrophiles PMA-stimulés. La voie de la PKC peut conduire à l'activation des tyrosine kinases aussi bien au cours de la dégranulation que lors de la flambée respiratoire. La PI3kinase peut intervenir, au moins partiellement, dans la signalisation de la flambée respiratoire régie par la PKC au sein des neutrophile. Ces enzymes peuvent constituer des voies communes pour la transduction du signal au cours la dégranulation et de la flambée respiratoire des neutrophiles.

**Mots clés :** Neutrophile, Dégranulation, Flambée respiratoire, Chimiluminescence, Signalisation

## ملخص:

تم في هذه الدراسة اختبار تأثير بعض المثبطات النوعية لبعض مسارات نقل الإشارة المتدخلة في تنظيم إفراز الحبيبات والشعلة التنفسية لدى الخلايا المتعادلة للإنسان المحفزة بـ fMLP/CB و PMA. تم استغلال نشاطية إنزيم elastase كمؤشر لتحرير الحبيبات، في حين تم استعمال تقنية الوميض الكيميائي (Chemiluminescence) لـ luminol لتقدير الشعلة التنفسية. بينت النتائج أن لكل من chelerythrine chloride و genistein و PD98059 تأثيراً مثبطاً معنوياً على إفراز الحبيبات مع كلا المحفزين. في حين أبدى wortmannin نشاطية مثبّطة لإفراز حبيبات الخلايا المحفزة بـ fMLP/CB فقط. كما أبدت كل المثبطات المستعملة في هذه الدراسة، تثبيطاً معنوياً للشعلة التنفسية للخلايا المتعادلة المحفزة بكل من fMLP/CB و PMA. أظهرت هذه الدراسة إمكانية تدخل إنزيمات PKC، PI3kinase، tyrosine kinases و p42/44 MAPK في نقل الإشارة المؤدية إلى كلٍّ من إفراز الحبيبات وتحفيز الشعلة التنفسية لدى الخلايا المتعادلة. بإمكان مسار PKC تحفيز tyrosine kinases و p42/44 MAPK أثناء كلتا الإستجابتين الخلويتين. كما يمكن أن تتدخل PI3kinase، ولو جزئياً على الأقل، في تنظيم الشعلة التنفسية المحفزة عبر مسار PKC في الخلايا المتعادلة. يمكن أن تشكل مختلف هذه الإنزيمات مسارات مشتركة لنقل الإشارة المتدخلة في تنظيم وظائف الخلايا المتعادلة للإنسان.

**الكلمات المفاتيح:** الخلية المتعادلة، إفراز الحبيبات، الشعلة التنفسية، الوميض الكيميائي، نقل الإشارة.

## Abstract:

The effects of some specific inhibitors of certain signaling pathways involved in both fMLP/CB- and PMA-stimulated human neutrophils degranulation and respiratory burst were studied. Neutrophil degranulation was measured using elastase release as marker. While, Luminol-enhanced chemiluminescence was used to evaluate neutrophil respiratory burst. Results revealed that degranulation was effectively inhibited by chelerythrine chloride, genistein and PD98059 in both fMLP/CB and PMA-stimulated neutrophils. wortmannin showed no effect on PMA-stimulated neutrophil degranulation. On the other hand, all inhibitors used in this study were able to inhibit both fMLP/CB and PMA-induced neutrophil respiratory burst. The present study revealed that PKC, PI3kinase, tyrosine kinases and p42/44 MAPK take part into the intracellular signalling network involved in both neutrophil responses. PKC may activate tyrosine kinases and p42/44 MAPK in PMA-stimulated neutrophils. Whereas, PI3kinase may be partially involved in neutrophil respiratory burst triggered by PKC signalling pathway. These enzymes may constitute a common signalling pathways implied in both neutrophil degranulation and respiratory burst.

**Keywords:** Neutrophil, Degranulation, Respiratory burst, Chemiluminescence, Signalling pathways.