

FORMATION CONTINUE-ARTICLE DE SYNTHÈSE

L'apoptose du neutrophile

FIEVEZ L., SEUMOIS G., LEKEUX P., BUREAU F.

Faculté de Médecine Vétérinaire, Service de Physiologie Animale, Département des Sciences Fonctionnelles, Université de Liège – bd de Colonster, B42, 4000 Liège

Correspondance : L. Fievez - tél. : 0032(0)4/366.40.70 – Fax : 0032(0)4/366.29.35 – Email : Laurence.fievez@ulg.ac.be

RÉSUMÉ : La régulation de la vie des neutrophiles par le mécanisme de mort programmée cellulaire qu'est l'apoptose procure un équilibre judicieux entre leur fonction de cellules effectrices dans la défense de l'organisme et le renouvellement sécurisé de ces cellules potentiellement dangereuses. L'apoptose constitue donc un processus nécessaire pour le maintien de l'homéostasie cellulaire dans des conditions physiologiques. Des altérations dans les mécanismes d'apoptose neutrophilique sont associées à certaines maladies telles que des maladies inflammatoires bactériennes ou auto-immunes. La production excessive de facteurs de survie est souvent associée à de telles réponses inflammatoires et la survie du neutrophile peut y être multipliée plusieurs fois. La diminution de la concentration en cytokines, comme elle survient lors de la phase de résolution de l'inflammation, conduit par contre à l'induction de l'apoptose neutrophilique. Des études ont montré l'implication de membres de la famille Bcl-2 et de caspases dans la régulation et l'exécution de l'apoptose neutrophilique. Des récepteurs de surface cellulaire et des protéines kinases jouent également un rôle critique dans la *transduction* des signaux qui mènent à l'apoptose du neutrophile ou à une augmentation de sa survie. Le but de cette revue est de résumer les composants et les mécanismes moléculaires principaux de l'apoptose neutrophilique.

INTRODUCTION

Les neutrophiles constituent la sous-population granulocytaire la plus communément représentée dans le sang. Chez l'homme, le renouvellement quotidien des neutrophiles est d'environ 1.6×10^9 cellules/kg de poids corporel, soit environ 10^{11} neutrophiles par jour (Walker et Willemze, 1980). Ce taux permet de maintenir un nombre de neutrophiles matures dans des limites définies malgré le haut potentiel prolifératif des cellules précurseurs de la moelle osseuse. Ce taux de renouvellement important des neutrophiles est lié au flux sortant continu et unilatéral de ces cellules hors de la circulation; une fois sortie du compartiment circulatoire, elles sont soit éliminées par sécrétion dans les muqueuses ou meurent dans les tissus après 1 ou 2 jours (Weiss, 1989). Sans contexte inflammatoire, les neutrophiles possèdent une demi-vie de durée très courte (6 à 18 h) dans la circulation; cependant, cette longévité peut être fortement augmentée une fois que ces cellules

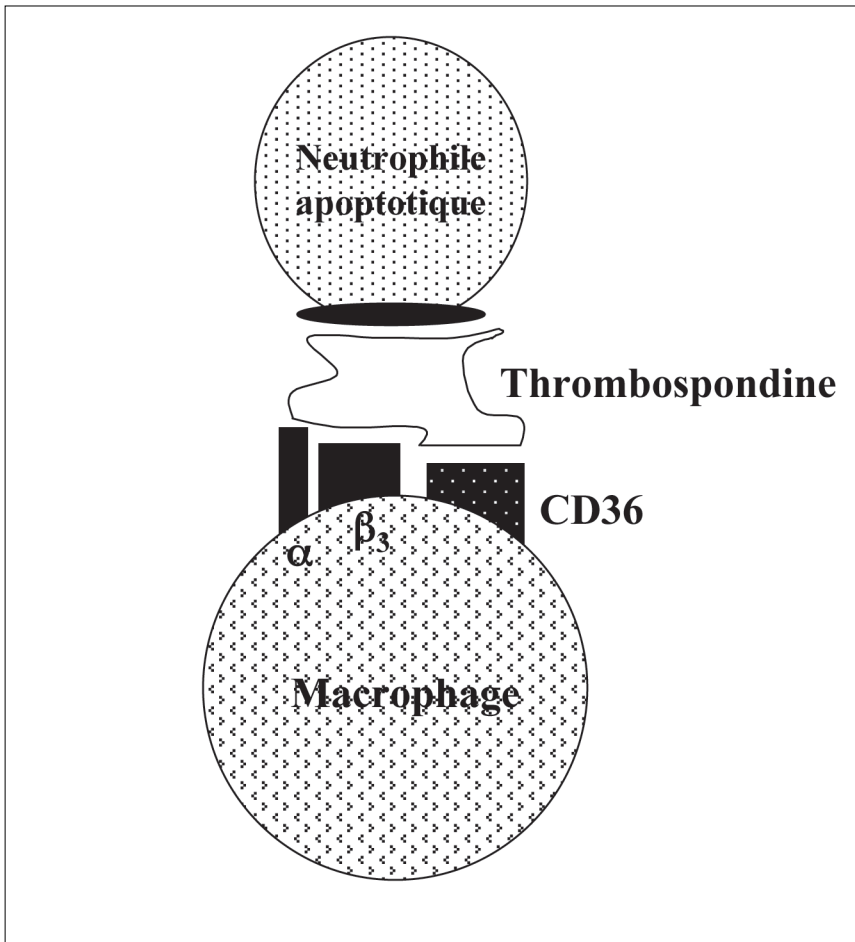
pénètrent dans une zone enflammée. Les neutrophiles âgés entrent spontanément, en l'absence de cytokines ou d'autres agents pro-inflammatoires, dans un processus de mort programmée cellulaire appelé apoptose avant d'être phagocytés par les macrophages (Savill et al., 1989). Ce ramassage phagocytaire des neutrophiles apoptotiques intacts les empêche de libérer leur contenu cytotoxique dans le milieu extra-cellulaire à l'inverse de ce qui se passerait si ces cellules mourraient par nécrose. Dans les inflammations aiguës, le nombre de neutrophiles dans les tissus peut être extrêmement élevé à cause d'une part de l'afflux ciblé de ces cellules provenant de la circulation et d'autre part des voies apoptotiques constitutives retardées sous l'action des médiateurs inflammatoires locaux (Ward *et al.*, 1999). Puisque le potentiel des neutrophiles inflammatoires à induire des dommages tissulaires par le déversement de radicaux oxygénés hautement réactifs et d'enzymes granulaires est très élevé, leur mort par apoptose et leur enlèvement sécurisé par des cel-

lules phagocytaires contribuent à limiter ces dégâts tissulaires lors de la résolution de l'inflammation. La compréhension des processus régulant l'apoptose constitutive des neutrophiles ainsi que le délai de la mort cellulaire induit par les cytokines permettra d'une part, de mieux comprendre les maladies inflammatoires dans lesquelles l'apoptose des neutrophiles est perturbée et d'autre part, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

PHENOTYPE DU NEUTROPHILE APOPTOTIQUE

Les changements morphologiques qui accompagnent l'apoptose du neutrophile sont typiques du scénario apoptotique général. Ainsi, durant l'apoptose, les lobes nucléaires se contractent et la chromatine commence à se fragmenter : l'électrophorèse de l'ADN neutrophilique montre alors une échelle caractéristique comportant des échelons dont les longueurs correspondent à des multiples

Figure 1. Modèle du mécanisme de reconnaissance par lequel le macrophage phagocyte le neutrophile apoptotique.



d'unités nucléosomiques. La membrane plasmique, suite à la réorganisation du cytosquelette, apparaît boursoufflée et est entourée par une multitude de corps apoptotiques (Cotter *et al.*, 1992). D'autres changements vont également apparaître à la surface cellulaire et favoriser la reconnaissance des neutrophiles apoptotiques par les cellules phagocytaires (Savill *et al.*, 1993). Ainsi, la membrane plasmique du neutrophile entré en apoptose perd son asymétrie phospholipidique : la phosphatidylsérine, normalement présente sur le feuillet interne de la membrane, est externalisée et permet la reconnaissance de la cellule apoptotique par les macrophages (Savill et Haslett, 1995). Malgré ces changements, la membrane plasmique reste intacte et agit comme une barrière, du moins durant les premières phases de l'apoptose. L'apoptose du neutrophile est accompagnée d'une sous-régulation des membres de la super famille des immunoglobulines (CD31, CD50, CD66acde, CD66b, CD63, CD87) et

de la plupart de ses récepteurs de surface (CD15, CD16, CD32, CD35, CD88, CD120b) (Dransfield *et al.*, 1994 ; Homburg *et al.*, 1995 ; Gasmil *et al.*, 1996). Les neutrophiles apoptotiques sont incapables de réaliser leurs activités habituelles comme la chimiotaxie, la dégranulation, l'adhérence, la phagocytose ou l'activation du burst respiratoire, cette perte de fonctionnalité résultant de son incapacité à induire les voies d'activation cellulaire suite notamment à la perte de ses récepteurs de surface (Haslett *et al.*, 1994 ; Stringer *et al.*, 1996). Ces neutrophiles inactifs, avec leurs épitopes de surface altérés, sont alors phagocytés (Savill *et al.*, 1993 ; Savill et Haslett, 1995). Les macrophages ingérant les neutrophiles apoptotiques utilisent à la fois les récepteurs $\alpha_v\beta_3$ (récepteur à la vitronectine) et à *lectine-like* qui reconnaissent les modifications de la composition en résidus carbohydrateés à la surface des cellules apoptotiques. La molécule d'adhésion phagocytaire CD36 coopère avec $\alpha_v\beta_3$ pour lier la thrombospondine

(TSP) sécrétée par les phagocytes. La TSP peut alors fonctionner comme pont de liaison entre les récepteurs phagocytaires et des structures inconnues à la surface des neutrophiles apoptotiques (Haslett *et al.*, 1994) (figure 1).

LES DIFFERENTES VOIES ET MOLECULES REGULATRICES DE L'APOTOSE CHEZ LE NEUTROPHILE

Les récepteurs de mort

L'apoptose peut être induite suite à la liaison de ligands spécifiques à des récepteurs « de mort » appartenant à la superfamille des récepteurs aux *tumor necrosis factor* (TNF)/*nerve growth factor* (NGF) (Ashkenazi et Dixit, 1998).

Les neutrophiles expriment des récepteurs au Fas Ligand (FasL) fonctionnels (FasR, CD95, APO-1) dans les systèmes *in vitro* (Iwai *et al.*, 1994 ; Liles *et al.*, 1996). Une hypothèse selon laquelle des interactions paracrine et autocrine FasL /FasR pourraient constituer le mécanisme menant le neutrophile à entrer en apoptose a été proposée (Liles et Klebanoff, 1995 ; Liles *et al.*, 1996). Cependant, bien que les neutrophiles expriment à la fois les FasR et les FasL, des études utilisant des anticorps antagonistes anti-FasR et des molécules solubles bloquant ces FasR ne supportent pas cette idée *in vitro* (Brown et Savill, 1999 ; Daigle et Simon, 2001). De plus, augmenter les chances de telles interactions moléculaires donne lieu à une mort cellulaire retardée plutôt qu'augmentée (Hannah *et al.*, 1998). Enfin, l'apoptose des neutrophiles issus de souris déficientes en FasR ou FasL semble normale ce qui tente à suggérer que les interactions FasR/FasL ne constituent pas le mécanisme principal d'induction de mort spontanée dans les neutrophiles (Fecho et Cohen, 1998).

Bien que de nombreuses études aient démontré l'effet pro-apoptotique du TNF- α sur les neutrophiles, des résultats opposés ont également été publiés (Colotta *et al.*, 1992 ; Takeda *et al.*, 1993 ; Watson *et al.*, 1996 ; Keel *et al.*, 1997 ; Murray *et al.*, 1997). Cette controverse peut s'expliquer par le fait que les effets du TNF- α sur la survie des neutrophiles dépendent de la concentration en cytokines ainsi que de la durée de stimulation et de la

capacité fonctionnelle initiale des neutrophiles (Murray *et al.*, 1997 ; Salamone *et al.*, 2001 ; Van den Berg *et al.*, 2001). Ainsi, le TNF- α induit rapidement l'apoptose dans une sous-population de neutrophiles sanguins mais retarde l'apoptose des cellules survivantes (Murray *et al.*, 1997).

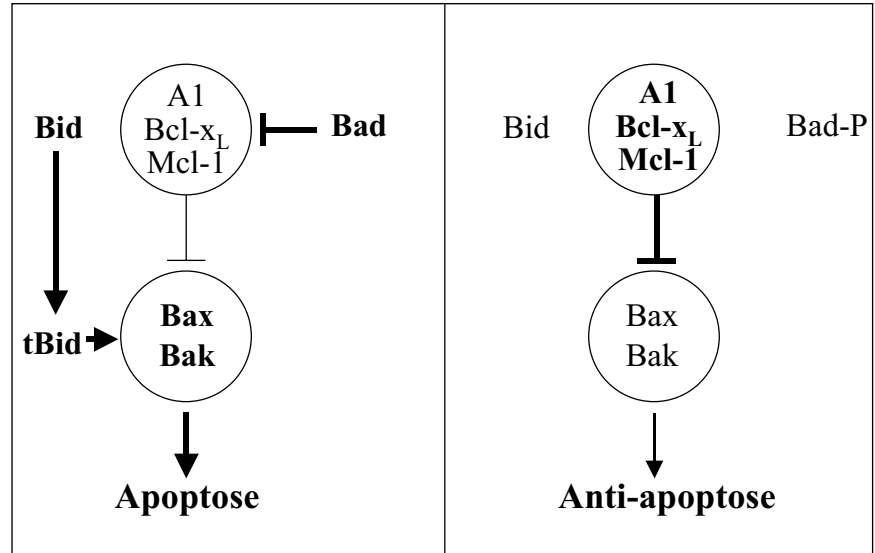
Apparemment, l'induction de l'apoptose neutrophilique par le FasL ou le TNF- α constituerait un mécanisme anti-inflammatoire en réduisant le nombre de neutrophiles sans relâcher le contenu de leurs granules (Savill *et al.*, 2002). Une telle hypothèse peut être aisément acceptée dans le cas du FasL qui est surexprimé dans les sites immunitairement privilégiés pour empêcher les réponses inflammatoires (Green et Ferguson, 2001). Par contre, le TNF- α est communément considéré comme cytokine pro-inflammatoire. Cependant, plusieurs études *in vivo* ont montré des effets anti-inflammatoires du TNF- α . Ainsi, une neutralisation génétique ou fonctionnelle du TNF- α provoque une augmentation des réactions neutrophiliques inflammatoires après des infections (Skerrett, 1994 ; Marino *et al.*, 1997).

Les caspases

Le délabrement cellulaire caractéristique de l'apoptose est dû à l'activation d'enzymes protéolytiques particulières appartenant à la famille des cystéines protéases et connues sous le nom de caspases (Yuan *et al.*, 1993). Toutes les caspases clivent leurs cibles au niveau des résidus d'acide aspartique. Dans les cellules non apoptotiques, elles existent sous forme de précurseurs monomériques inactifs contenant un pro-domaine associé à une petite et une grande sous-unités monomériques. Suite au clivage protéolytique menant à l'enlèvement du pro-domaine, les monomères s'assemblent pour former un dimère actif avec une activité de protéase. Les caspases actives sont donc formées de 2 petites et de 2 grandes sous-unités comportant 2 sites catalytiques dont la séquence possède un résidu d'acide aspartique (Walker *et al.*, 1994 ; Wilson *et al.*, 1994). Les caspases peuvent donc être activées par d'autres caspases ; certaines sont ainsi appelées caspases régulatrices et d'autres caspases effectrices, ces dernières étant directement impliquées dans la mort par apoptose des neutrophiles entre autres.

La caspase 3 semble jouer un rôle cri-

Figure 2. Expression des membres de la famille Bcl-2 dans les neutrophiles. A gauche : dans des conditions normales, les neutrophiles expriment des taux élevés de protéines pro-apoptotiques Bax, Bak, Bid et Bad. Par contre, les membres anti-apoptotiques A1, Bcl-x_L et Mcl-1 sont exprimés de façon marginale dans les neutrophiles matures. De plus, Bad neutralise leur activité anti-apoptotique. Bid est tronqué dans l'apoptose du neutrophile et peut participer à la libération de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie. A droite : dans les cellules non-apoptotiques, peut-être suite à leur exposition à des facteurs de survie, les niveaux des membres anti-apoptotiques de cette famille sont élevés et Bad, suite à sa phosphorylation, est incapable d'interagir avec eux. De plus, Bid n'est pas clivé.



tique à la fois dans l'apoptose spontanée et l'apoptose induite par le récepteur de mort Fas chez le neutrophile (Khawaja et Tatton, 1999 ; Pongracz *et al.*, 1999 ; Weinmann *et al.*, 1999 ; Daigle et Simon, 2001 ; Maianski *et al.*, 2002 ; Ottonello *et al.*, 2002). Il a en outre été démontré que les neutrophiles issus de souris déficientes pour la caspase 3 n'entraient pas en apoptose après un traitement *in vitro* au cycloheximide contrairement aux neutrophiles issus de souris sauvages (Woo *et al.*, 1998). Les neutrophiles de souris déficientes pour la caspase 1 présentent par contre une apoptose constitutive retardée mais sont sensibles à l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Rowe *et al.*, 2002). En plus et en amont des caspase 1 et 3, l'activation de la caspase 8 a également été démontrée chez le neutrophile et l'inactivation spécifique de cette protéase provoque une inhibition de l'apoptose (Daigle et Simon, 2001). L'inactivation fonctionnelle de la caspase 9 résulte également en une apoptose inhibée (Daigle et Simon, 2001). Etant donné qu'il a également été démontré que la surexpression de Bcl-2 bloquait l'apoptose du neutrophile, on peut supposer un rôle important de la mitochondrie

dans les voies apoptotiques de ces cellules (Lagasse et Weissman, 1994). Ces résultats sont d'autant plus étonnants que de nombreuses études ont démontré l'absence de protéines Bcl-2 dans les neutrophiles et que ceux-ci possèdent de plus un nombre limité de mitochondries (Bainton *et al.*, 1971 ; Clark *et al.*, 1980 ; Moulding *et al.*, 1998).

Les membres de la famille Bcl-2

Les membres de cette famille ont soit une activité anti-apoptotique comme Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 ou A1, soit une activité pro-apoptotique comme Bax, Bik, Bad, Bak, Bid... (figure 2) (Reed, 1997). La principale caractéristique des membres de cette famille est leur capacité à former des homo- et des hétérodimères (Borner *et al.*, 1994 ; Yin *et al.*, 1994 ; Farrow et Brown, 1996). Des niveaux élevés d'expression de membres pro-apoptotiques de cette famille ont été observés dans les neutrophiles normaux ce qui pourrait expliquer leur courte durée de vie. Ainsi, Bax et Bak sont facilement détectables dans ces cellules différenciées (Kasahara *et al.*, 1997 ; Dibbert *et al.*, 1999 ; Weinmann *et al.*, 1999 ; Song *et al.*, 2000 ; Moulding *et al.*, 2001). Les souris déficientes pour Bax

ont un nombre normal de neutrophiles mais une délétion combinée de Bax et Bak donne lieu à une accumulation exagérée de neutrophiles suggérant des fonctions partiellement redondantes de ces deux protéines (Lindsten *et al.*, 2000).

L'apoptose du neutrophile a été associée à la translocation de la protéine Bax cytosolique dans la membrane mitochondriale externe ; cette oligomérisation et insertion de Bax dans la membrane mitochondriale est en outre favorisée par le clivage de Bid (Li *et al.*, 1998) ; cette translocation provoque la libération subséquente du cytochrome c et l'activation de la caspase 3 ; tous ces événements peuvent être inhibés suite à un traitement au *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) (Maianski *et al.*, 2002). De même, en présence de signaux anti-apoptotiques comme le *granulocyte-macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), la protéine Bad est phosphorylée et est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (del Peso *et al.*, 1997 ; Blume-Jensen *et al.*, 1998 ; Harada *et al.*, 1999). Lorsque Bad est déphosphorylé, suite à un stimulus pro-apoptotique, il est libéré et va se relocaliser dans la membrane mitochondriale.

Les neutrophiles expriment également des membres anti-apoptotiques de cette famille comme Mcl-1, A1 et Bcl-x_L bien que ce dernier n'ait pas été détecté à l'état protéique dans toutes les études (Chuang *et al.*, 1998 ; Moulding *et al.*, 1998 ; Dibbert *et al.*, 1999 ; Weinmann *et al.*, 1999 ; Villunger *et al.*, 2000 ; Epling-Burnette *et al.*, 2001 ; Moulding *et al.*, 2001). A1 semble être importante parce que les neutrophiles de souris déficientes pour A1 ont un taux accéléré d'apoptose (Hamasaki *et al.*, 1998). Le GM-CSF induit ou maintient les taux de Mcl-1 et A1 dans les neutrophiles mis en culture (Chuang *et al.*, 1998 ; Moulding *et al.*, 1998 ; 2001 ; Epling-Burnette *et al.*, 2001). Les facteurs de survie augmenteraient donc les taux d'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ce qui expliquerait partiellement leur rôle anti-apoptotique.

Les composés intermédiaires hautement réactifs de l'oxygène

Les patients génétiquement déficients en *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxydase membranaire ne peuvent générer ces com-

posés intermédiaires et leurs neutrophiles ne peuvent donc pas tuer les bactéries ingérées (Kasahara *et al.*, 1997 ; Hampton *et al.*, 2002). Ces individus souffrent d'infections bactériennes et fongiques récurrentes. Les neutrophiles sanguins de ces patients présentent une apoptose constitutive retardée et sont résistants à Fas. De plus, le traitement de ces neutrophiles anormaux avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induit leur apoptose alors que l'ajout de catalase, qui a pour conséquence de réduire les taux intracellulaires d'H₂O₂, retarde l'apoptose de neutrophiles normaux. Ces résultats suggèrent donc un rôle important des intermédiaires oxygénés dans les voies responsables de l'apoptose des neutrophiles. Cependant, la façon dont ces intermédiaires interagissent avec les autres molécules de mort pour induire l'apoptose des neutrophiles n'est pas encore connue.

Les protéines inhibitrices de l'apoptose

Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) représentent une autre famille de molécules régulatrices de l'apoptose initialement découvertes chez le baculovirus (Salvesen et Duckett, 2002). La particularité de ces molécules est d'inhiber directement les caspases en s'y liant, principalement les caspases 3, 7 et 9. Contrairement aux membres de la famille Bcl-2 qui agissent en amont ou au niveau de la mitochondrie, ces molécules régulent l'apoptose en aval de celle-ci. Il a été récemment montré que les neutrophiles exprimaient c-IAP-1, c-IAP-2 et x-IAP (Hasegawa *et al.*, 2003). Les mêmes auteurs ont observé une augmentation de l'expression de c-IAP-2 dans les neutrophiles sanguins de patients recevant du G-CSF ainsi que dans des neutrophiles normaux suite à une stimulation in vitro au G-CSF.

Les calpaïnes

Les calpaïnes sont des cystéines protéases n'appartenant pas à la famille des caspases et possédant de nombreuses isoformes (Squier et Cohen, 1996). Plusieurs observations ont permis de conclure que ces protéases jouaient un rôle dans la régulation de l'apoptose des neutrophiles. En effet, une étude a montré que des inhibiteurs de calpaïnes bloquaient l'apoptose des neutrophiles et une autre que des oli-

gonucléotides antisens réduisant les niveaux de calpstatine, un inhibiteur endogène important des calpaïnes, accéléreraient leur apoptose (Knepper-Nicolai *et al.*, 1998 ; Squier *et al.*, 1999). La calpaïne 1 a été identifiée comme l'isoforme critique ayant pour cible Bax (Gao et Dou, 2000 ; Altnauer *et al.*, 2004). Ces événements se passant en amont de la mitochondrie apparaissent être essentiels pour la libération du cytochrome c et de la protéine Smac qui désactive les IAPs et pour l'activation subséquente de la caspase 3 dans les neutrophiles. La calpaïne 1 représente donc un élément précoce important dans la cascade des événements pro-apoptotiques dans les neutrophiles.

LES DIFFERENTES VOIES ET MOLECULES MENANT A UNE APOPTOSE RETARDEE DU NEUTROPHILE

Le neutrophile circulant est la cellule immune possédant la plus courte durée de vie (entre 6 et 18 h). Une fois ces cellules recrutées dans les tissus, elles vont avoir une durée de vie plus longue due à la présence dans leur environnement de facteurs anti-apoptotiques qui vont retarder l'apoptose constitutive de ces cellules. Une variété de cytokines pro-inflammatoires et d'autres facteurs sont capables de retarder l'apoptose des neutrophiles in vitro comme par exemple l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-15, l'interféron- γ (IFN- γ), C5a, fMLP, le leucotriène B₄, le G-CSF, le GM-CSF et le lipopolysaccharide (LPS) (Brach *et al.*, 1992 ; Colotta *et al.*, 1992 ; Klebanoff *et al.*, 1992 ; Lee *et al.*, 1993 ; Pericle *et al.*, 1994 ; Biffl *et al.*, 1995 ; Girard *et al.*, 1996 ; Girard *et al.*, 1997 ; Moulding *et al.*, 1998 ; Dibbert *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 1999). Il n'a pas toujours été montré systématiquement que le LPS retardait l'apoptose des neutrophiles (Dibbert *et al.*, 1999). Ceci peut s'expliquer par les différences existant dans les techniques de purification des neutrophiles et une étude récente a suggéré que le LPS retardait l'apoptose du neutrophile via les monocytes contaminant et non par un effet anti-apoptotique directe (Sabroe *et al.*, 2002). Les glucocorticoïdes, alors qu'ils ont un effet inverse sur les éosinophiles, peuvent retarder l'apoptose des neu-

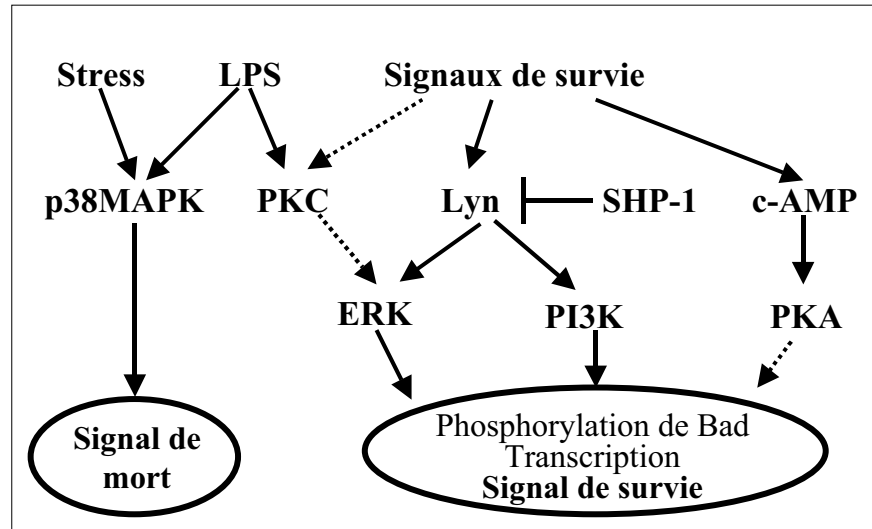
trophiles (Cox, 1995 ; Meagher *et al.*, 1996). Bien que de nombreuses études aient démontré l'effet pro-apoptotique du TNF- α sur les neutrophiles, des résultats opposés ont également été publiés (Colotta *et al.*, 1992 ; Takeda *et al.*, 1993 ; Watson *et al.*, 1996 ; Keel *et al.*, 1997 ; Murray *et al.*, 1997). Cette controverse peut s'expliquer par le fait que les effets du TNF- α sur la survie des neutrophiles dépendent de la concentration en cytokine ainsi que de la durée de stimulation et de la capacité fonctionnelle initiale des neutrophiles (Murray *et al.*, 1997 ; Salamone *et al.*, 2001 ; Van den Berg *et al.*, 2001). Ainsi, le TNF- α induit rapidement l'apoptose dans une sous-population de neutrophiles sanguins mais retarde l'apoptose des cellules survivantes (Murray *et al.*, 1997). Malgré les études contradictoires parfois observées pour certains de ces facteurs concernant la survie des neutrophiles, ceux-ci activeraient l'une ou plusieurs des voies décrites ci-dessous (figure 3).

Les voies de la phosphoinositide 3-kinase et de la mitogen-activated protein kinase

Des travaux récents ont démontré l'importance des tyrosines kinases dans la voie de transduction du GM-CSF dans les neutrophiles. Ainsi, le GM-CSF induit la phosphorylation de certaines protéines intra-cellulaires et il a été montré que la génistéine, un inhibiteur de tyrosine kinase, empêchait cette augmentation de la phosphorylation des tyrosines ainsi que la survie induite par le GM-CSF dans ces cellules (Yousefi *et al.*, 1994). Lyn est une tyrosine kinase importante dans l'induction du signal de survie en réponse au GM-CSF dans les neutrophiles (Wei *et al.*, 1996). La phosphorylation de Jak2 est également induite par le GM-CSF dans les neutrophiles et est suivie par l'activation de plusieurs membres de la famille des signaux transducteurs et activateurs de transcription (STATs) (Brizzi *et al.*, 1996 ; Al-Shami *et al.*, 1998). L'inhibition sélective de Jak2 bloque partiellement la survie induite par le GM-CSF dans ces cellules (Epling-Burnette *et al.*, 2001). L'activation des tyrosines kinases provoque l'activation des voies de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et de la mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Chang et Karin, 2001 ; Cantley, 2002).

Le rôle de la PI3K comme molécule

Figure 3. Rôles possibles des mitogen-activated protein kinases (MAPK) et de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dans l'apoptose et la survie des neutrophiles. Une accélération de l'apoptose du neutrophile, via le stress par exemple, peut générer des signaux de mort via l'activation de la p38MAPK. En présence de signaux de survie, la p38MAPK peut encore être active mais les signaux générés par l'extracellular regulated kinase (ERK) et la PI3K activés peuvent contrebalancer ou inhiber le signal de mort généré par la p38MAPK, et l'apoptose du neutrophile est donc retardée. Les signaux qui activent la cascade des MAPK et/ou élèvent l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) phosphorylent Bad. La Src homology domain-containing tyrosine phosphatase-1 (SH-1) peut bloquer cette phosphorylation en déphosphorylant Lyn. Ces voies peuvent activer également des facteurs de transcription qui peuvent modifier le ratio d'expression des protéines anti- et pro-apoptotiques dans les neutrophiles.



clé dans la voie anti-apoptotique induite par le G-CSF et le GM-CSF dans les neutrophiles n'a été suggérée que très récemment (Klein *et al.*, 2000 ; Epling-Burnette *et al.*, 2001 ; Cowburn *et al.*, 2002). Des études ont montré qu'un inhibiteur de la PI3K bloquait la survie ainsi que la phosphorylation de Bad induites par le GM-CSF.

Les études utilisant un inhibiteur de mitogen-induced extracellular kinase (MEK) 1/2 ont montré des résultats contradictoires ; en effet, alors que certains ne montrent aucun effet ou alors seulement des effets marginaux, d'autres observent que cet inhibiteur atténue la survie induite par le GM-CSF dans les neutrophiles (Klein *et al.*, 2000 ; Cowburn *et al.*, 2002). Des études ont également montré qu'un inhibiteur de la p38MAPK bloquait l'apoptose constitutive dans des neutrophiles humains et murins mais qu'il n'avait aucun effet sur les effets anti-apoptotiques induits par le GM-CSF dans ces cellules (Frasch *et al.*, 1998 ; Aoshiba *et al.*, 1999 ; Villunger *et al.*, 2000).

La voie de l'adénosine monophosphate cyclique et de la protéine kinase A

Dans les neutrophiles, il a été montré

que l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) retardait l'apoptose (Parvathani *et al.*, 1998). Un inhibiteur sélectif de la protéine kinase A (PKA) bloque l'effet induit par la cAMP mais pas celui du GM-CSF et n'a de plus aucun effet sur l'apoptose constitutive ou induite par le FasR dans les neutrophiles (Parvathani *et al.*, 1998 ; Cowburn *et al.*, 2002). Des études ont montré que des agonistes provoquant une élévation des taux de cAMP retardent l'apoptose neutrophilique (Rossi *et al.*, 1995). Les cibles potentielles de la PKA pourraient impliquer Bad, la caspase 9 ou l'inhibiteur de NF- κ B mais ces études n'ont pas encore été menées dans les neutrophiles (Cardone *et al.*, 1998 ; Downward, 1999 ; Castro-Alcaraz *et al.*, 2002).

La voie de la protéine kinase C

Les neutrophiles expriment plusieurs isoenzymes de la protéine kinase C (PKC). Des études ont démontré que la PKC- δ était activée durant l'apoptose neutrophilique et que l'inhibition pharmacologique de celle-ci retardait cette apoptose (Khawaja et Tatton, 1999 ; Pongracz *et al.*, 1999). La PKC- δ est localisée au niveau du noyau pendant l'apoptose du neutrophile et elle pourrait dès lors participer

au désassemblage de la lamina nucléaire ; cependant rien n'a encore réellement été démontré et les mécanismes l'impliquant dans le processus de mort de ces cellules restent encore obscures (Pongracz *et al.*, 1999 ; Webb *et al.*, 2000).

MECANISMES LIMITANT LA SURVIE PROLONGEE DES NEUTROPHILES

De nombreux mécanismes contrôlent l'accumulation neutrophilique au site inflammatoire en limitant la synthèse des facteurs de survie des neutrophiles par les cellules inflammatoires et structurelles mais nous nous focalisons ici sur les mécanismes survenant directement suite à l'activation cellulaire.

Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1

Des études ont montré que l'inhibition de la survie induite par le GM-CSF en activant simultanément les FasR était significativement réduite dans les neutrophiles des souris déficientes en *Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1* (SHP-1), ce qui suggère un rôle important de cette phosphatase dans la limitation des signaux anti-apoptotiques (Daigle *et al.*, 2002). Ceci peut également expliquer le fait que ces souris déficientes présentent une inflammation neutrophilique persistante (Siminovitch et Neel, 1998). De plus, cette phosphatase est surexprimée chez les patients atteints de neutropénie sévère (Tidow *et al.*, 1999).

Suite à l'activation des récepteurs de mort, SHP-1 interagit avec Lyn et est vraisemblablement responsable de sa déphosphorylation (Daigle *et al.*, 2002). De plus, les thymocytes déficients en SHP-1 présentent une hyperactivation de Lck et Fyn, ce qui suggère que les kinases de la famille des Src sont des cibles de cette phosphatase (Lorenz *et al.*, 1996). Par contre, contrairement à d'autres systèmes cellulaires, SHP-1 n'est pas associé à la déphosphorylation de Jak2 (Daigle *et al.*, 2002).

Lyn n'est pas la seule cible de SHP-1 dans les neutrophiles. Ainsi, SHP-1 agit également sur la sous-unité régulatoire p85 de la PI3K, Tyk2, Vav et Grb2 (Yetter *et al.*, 1995 ; Kon-Kozlowski *et al.*, 1996 ; Yu *et al.*, 1998). SHP-1 apparaît donc induire

l'apoptose en déphosphorylant et en inactivant des molécules anti-apoptotiques importantes.

Cytokine-inducible src homology domain 2-containing protein 1

Cytokine-inducible src homology domain 2-containing protein 1 (CIS1) est le premier membre d'une grande famille de protéines également appelée famille des SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) (Kovanen et Léonard, 1999 ; Krebs et Hilton, 2000). CIS1 se lie aux récepteurs de l'IL-2, l'IL-3, l'IL-5 et du GM-CSF et peut réguler négativement la transduction de signal induite par ces cytokines dans des lignées cellulaires et des souris transgéniques (Yoshimura *et al.*, 1995 ; Aman *et al.*, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 1999). La transcription de CIS1 est initiée par STAT5 qui lui-même est activé par les cytokines citées précédemment ce qui suggère que CIS1 est un régulateur de feedback négatif de la transduction de signal induite par ces cytokines (Matsumoto *et al.*, 1999). La plupart des données liées aux protéines CIS quant à la régulation négative des voies induites par les cytokines sont issues de modèles de surexpression *in vitro* ou *in vivo*. Cependant, il a été démontré que CIS1 était induit par le GM-CSF dans les neutrophiles, ce qui suggère qu'il joue un rôle majeur dans la sous-régulation des réponses induites par l'IL-3 et le GM-CSF dans ces cellules (Yousefi *et al.*, 2000). La surexpression de CIS1 n'empêche pas totalement l'effet anti-apoptotique du GM-CSF dans les neutrophiles, ce qui veut dire que cette boucle de feedback négatif n'est pas suffisante pour bloquer la voie de signallement induite par le GM-CSF. De plus, le mécanisme par lequel CIS1 inhibe les signaux induits par les cytokines n'est pas encore compris car bien qu'il se lie aux récepteurs des cytokines citées ci-dessus, il n'inactive pas Jak2 (Aman *et al.*, 1999).

CONCLUSIONS

L'apoptose est un processus de mort programmée cellulaire. Le nombre de neutrophiles est régulé *in vivo* à la fois au niveau de leur production dans la moelle osseuse mais également par le biais de leur apoptose. Au site inflammatoire, l'apoptose des neutrophiles est retardée suite à la génération de facteurs de survie par les cellules environnantes ou par la production

autocrine de cytokines pro-inflammatoires. De nombreux mécanismes sont impliqués dans l'apoptose spontanée ou induite de ces cellules mais ceux-ci sont encore loin d'être totalement élucidés. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes menant à l'induction ou au délai de l'apoptose des neutrophiles pourrait permettre le développement de nouveaux composés utilisables dans le traitement des maladies liées aux granulocytes (Simon, 1996 ; Chilvers *et al.*, 1998).

Summary

Neutrophil apoptosis

Regulation of the neutrophil life span by apoptosis provides a fine balance between their function as effector cells of host defence and a safe turnover of these potentially harmful cells. Apoptosis is thus necessary to keep cellular homeostasis under physiologic conditions.

Alterations of neutrophil apoptosis are associated with diseases such as bacterial and autoimmune inflammatory diseases where neutrophil apoptosis is delayed. Excessive production of survival factors is often observed in such inflammatory responses and neutrophil survival can be increased several fold. Cytokines withdrawal, as it occurs in the resolution phase of inflammation, leads to the induction of neutrophil apoptosis. Recent studies have shown the involvement of members of the Bcl-2 protein family and caspases in the regulation and execution of neutrophil apoptosis. Cell surface receptors and protein kinases also play critical roles in transducing the signals that result in neutrophil apoptosis or extended survival. The aim of this review is to summarise the principal molecular mechanisms and components of neutrophil apoptosis.

BIBLIOGRAPHIE

- AL-SHAMI A., MAHANNA W., NACCACHE P.H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils: selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 1058-1063.
- ALTZNAUER F., CONUS S., CAVALLI A., FOLKERS G., SIMON H.U. Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 5947-5957.
- AMAN M.J., MIGONE T.S., SASAKI A., ASCHERMAN D.P., ZHU M., SOLDAINI E., IMADA K., MIYAJIMA A., YOSHIMURA A., LEONARD W.J. CIS associates with the interleukin-2 receptor beta chain and inhibits interleukin-2-dependent signaling. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 30266-30272.
- AOSHIBA K., YASUI S., HAYASHI M., TAMAOKI J., NAGAIA. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils. *J. Immunol.*, 1999, **162**, 1692-1700.
- ASHKENAZI A., DIXIT V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, **281**, 1305-1308.
- BAINTON D.F., ULLYOT J.L., FARQUHAR M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow : origin and content of azurophil and specific granules. *J. Exp. Med.*, 1971, **134**, 907-934.
- BIFFL W.L., MOORE E.E., MOORE F.A., BARNETT C.C. JR. Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J. Leukoc. Biol.*, 1995, **58**, 582-584.
- BLUME-JENSEN P., JANKNECHT R., HUNTER T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.*, 1998, **8**, 779-782.
- BORNER C., OLIVIER R., MARTINOU I., MATTMANN C., TSCHOPP J., MARTINOU J.C. Dissection of functional domains in Bcl-2 alpha by site-directed mutagenesis. *Biochem. Cell. Biol.*, 1994, **72**, 463-469.
- BRACH M.A., DEVOS S., GRUSS H.J., HERRMANN F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*, 1992, **80**, 2920-2924.
- BRIZZI M.F., ARONICA M.G., ROSSO A., BAGNARA G.P., YARDEN Y., PEGORARO L. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 3562-3567.
- BROWN S.B., SAVILL J. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J. Immunol.*, 1999, **162**, 480-485.
- CANTLEY L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, **296**, 1655-1657.
- CARDONE M.H., ROY N., STENNICKE H.R., SALVESEN G.S., FRANKE T.F., STANBRIDGE E., FRISCH S., REED J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 1998, **282**, 1318-1321.
- CASTRO-ALCARAZ S., MISKOLCI V., KALASAPUDI B., DAVIDSON D., VANCUROVA I. NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J. Immunol.*, 2002, **169**, 3947-3953.
- CHANG L., KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001, **410**, 37-40.
- CHILVERS E.R., ROSSI A.G., MURRAY J., HASLETT C. Regulation of granulocyte apoptosis and implications for anti-inflammatory therapy. *Thorax*, 1998, **53**, 533-534.
- CHUANG P.I., YEE E., KARSAN A., WINN R.K., HARLAN J.M. A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, **249**, 361-365.
- CLARK J.M., VAUGHAN D.W., AIKEN B.W., KAGAN H.M. Elastase-like enzymes in human neutrophils localized by ultrastructural cytochemistry. *J. Cell. Biol.*, 1980, **84**, 102-119.
- COLOTTA F., RE F., POLENTARUTTI N., SOZZANI S., MANTOVANI A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 1992, **80**, 2012-2020.
- COTTER T.G., LENNON S.V., GLYNN J.M., GREEN D.R. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.*, 1992, **52**, 997-1005.
- COWBURN A.S., CADWALLADER K.A., REED B.J., FARAHI N., CHILVERS E.R. Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival. *Blood*, 2002, **100**, 2607-2616.
- COX G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils: separation of survival and activation outcomes. *J. Immunol.*, 1995, **154**, 4719-4725.
- DAIGLE I., SIMON H.U. Critical role for caspase 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2001, **126**, 147-156.
- DAIGLE I., YOUSEFI S., COLONNA M., GREEN D.R., SIMON H.U. Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat. Med.*, 2002, **8**, 61-67.
- DEL PESO L., GONZALEZ-GARCIA M., PAGE C., HERRERA R., NUNEZ G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 1997, **278**, 687-689.
- DIBBERT B., WEBER M., NIKOLAIZIK W.H., VOGT P., SCHONI M.H., BLASER K., SIMON H.U. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 13330-13335.
- DOWNWARD J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat. Cell. Biol.*, 1999, **1**, E33-E35.
- DRANSFIELD I., BUCKLE A.M., SAVILL J.S., MCDOWALL A., HASLETT C., HOGG N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J. Immunol.*, 1994, **153**, 1254-1263.

- EPLING-BURNETTE P.K., ZHONG B., BAI F., JIANG K., BAI-LEY R.D., GARCIA R., JOVE R., DJEU J.Y., LOUGHRAN T.P. JR., WEI S. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.*, 2001, **166**, 7486-7495.
- FARROW S.N., BROWN R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1996, **6**, 45-49.
- FECHO K.L., COHEN P.L. Fas ligand (gld) and Fas (lpr) deficient mice do not show alterations in the extravasation of apoptosis of inflammatory neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, **64**, 373-383.
- FRASCH S.C., NICK J.A., FADOK V.A., BRATTON D.L., WORTHEN G.S., HENSON P.M. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 8389-8397.
- GAO G., DOU Q.P. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J. Cell. Biochem.*, 2000, **80**, 53-72.
- GASMI L., MCLENNAN A.G., EDWARDS S.W. The diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil-platelet interactions during inflammation. *Blood*, 1996, **87**, 3442-3449.
- GIRARD D., PAQUET M.E., PAQUIN R., BEAULIEU A.D. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood*, 1996, **88**, 3176-3184.
- GIRARD D., PAQUIN R., BEAULIEU A.D. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem. J.*, 1997, **325**, 147-153.
- GREEN D.R., FERGUSON T.A. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2001, **2**, 917-924.
- HAMASAKI A., SENDO F., NAKAYAMA K., ISHIDA N., NEGISHI I., NAKAYAMA K., HATAKEYAMA S. Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J. Exp. Med.*, 1998, **188**, 1985-1992.
- HAMPTON M.B., VISSERS M.C., KEENAN J.I., WINTERBOURN C.C. Oxidant-mediated phosphatidylserine exposure and macrophage uptake of activated neutrophils: possible impairment in chronic granulomatous disease. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, **71**, 775-781.
- HANNAH S., NADRA I., DRANSFIELD I., PRYDE J.G., ROSSI A.G., HASLETT C. Constitutive neutrophil apoptosis in culture is modulated by cell density independently of b2 integrin-mediated adhesion. *FEBS Lett.*, 1998, **421**, 141-146.
- HARADA H., BECKNELL B., WILM M., MANN M., HUANG L.J., TAYLOR S.S., SCOTT J.D., KORSMEYER S.J. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol. Cell.*, 1999, **3**, 413-422.
- HASEGAWA T., SUZUKI K., SAKAMOTO C., OHTA K., NISHIKI S., HINO M., TATSUMI N., KITAGAWA S. Expression of the inhibitor of apoptosis (IAP) family members in human neutrophils: up-regulation of cIAP2 by granulocyte colony-stimulating factor and overexpression of cIAP2 in chronic neutrophilic leukemia. *Blood*, 2003, **101**, 1164-1171.
- HASLETT C., SAVILL J.S., WHYTE M.K., STERN M., DRANSFIELD I., MEAGHER L.C. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.*, 1994, **345**, 327-333.
- HOMBURG C.H., DE HAAS M., VON DEM BORNE A.E., VERHOEVEN A.J., REUTELINGSPERGER C.P., ROOS D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*, 1995, **85**, 532-540.
- IWAI K., MIYAWAKI T., TAKIZAWA T., KONNO A., OHTA K., YACHIE A., SEKI H., TANIGUCHI N. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood*, 1994, **84**, 1201-1208.
- KASAHARA Y., IWAI K., YACHIE A., OHTA K., KONNO A., SEKI H., MIYAWAKI T., TANIGUCHI N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood*, 1997, **89**, 1748-1753.
- KEEL M., UNGETHUM U., STECKHOLZER U., NIEDERER E., HARTUNG T., TRENTZ O., ERTEL W. Interleukin-10 counter-regulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood*, 1997, **90**, 3356-3363.
- KHWAJAA., TATTON L. Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase C delta plays a central role in neutrophil apoptosis. *Blood*, 1999, **94**, 291-301.
- KLEBANOFF S.J., OLSZOWSKI S., VAN VOORHIS W.C., LEDBETTER J.A., WALTERSDORF A.M., SCHLECHTE K.G. Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage. *Blood*, 1992, **80**, 225-234.
- KLEIN J.B., RANE M.J., SCHERZER J.A., COXON P.Y., KETRITZ R., MATHIESEN J.M., BURIDI A., MCLEISH K.R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Immunol.*, 2000, **164**, 4286-4291.
- KNEPPER-NICOLAI B., SAVILL J., BROWN S.B. Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 30530-30536.
- KON-KOZLOWSKI M., PANI G., PAWSON T., SIMINOVITCH K.A. The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 3856-3862.
- KOVANEN P.E., LEONARD W.J. Inhibitors keep cytokines in check. *Curr. Biol.*, 1999, **9**, R899-R902.
- KREBS D.L., HILTON D.J. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J. Cell. Sci.*, 2000, **113**, 2813-2819.
- LAGASSE E., WEISSMAN I.L. Bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages. *J. Exp. Med.*, 1994, **179**, 1047-1052.
- LEE A., WHYTE M.K.B., HASLETT C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.*, 1993, **54**, 283-289.

- LEE E., LINDO T., JACKSON N., MENG-CHOONG L., REYNOLDS P., HILL A., HASWELL M., JACKSON S., KILFEATHER S. Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B(4) receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, 2079-2085.
- LI H., ZHU H., XU C.J., YUAN J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, **94**, 491-501.
- LILES W.C., KLEBANOFF S.J. Regulation of apoptosis in neutrophils-Fas track to death. *J. Immunol.*, 1995, **155**, 3289-3291.
- LILES W.C., KIENER P.A., LEDBETTER J.A., ARUFFO A., KLEBANOFF S.J. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes : implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J. Exp. Med.*, 1996, **184**, 429-440.
- LINDSTEN T., ROSS A.J., KING A., ZONG W.X., RATHMELL J.C., SHIELS H.A., ULRICH E., WAYMIRE K.G., MAHAR P., FRAUWIRTH K., CHEN Y., WEI M., ENG V.M., ADELMAN D.M., SIMON M.C., MA A., GOLDEN J.A., EVAN G., KORSMEYER S.J., MACGREGOR G.R., THOMPSON C.B. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell.*, 2000, **6**, 1389-1399.
- LORENZ U., RAVICHANDRAN K.S., BURAKOFF S.J., NEEL B.G. Lack of SHPTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, **93**, 9624-9629.
- MAIANSKI N.A., MUL F.P.J., VAN BUUL J.D., KUIJPERS T.W. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood*, 2002, **99**, 672-679.
- MARINO M.W., DUNN A., GRAIL D., INGLESE M., NOGUCHI Y., RICHARDS E., JUNGBLUTH A., WADA H., MOORE M., WILLIAMSON B., BASU S., OLD L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 8093-8098.
- MATSUMOTO A., SEKI Y., KUBO M., OHTSUKA S., SUZUKI A., HAYASHI I., TSUJI K., NAKAHATA T., OKABE M., YAMADA S., YOSHIMURA A. Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, **19**, 6396-6407.
- MEAGHER L.C., COUSIN J.M., SECKL J.R., HASLETT C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J. Immunol.*, 1996, **156**, 4422-4428.
- MOULDING D.A., QUAYLE J.A., HART C.A., EDWARDS S.W. Mcl-1 expression in human neutrophils : regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood*, 1998, **92**, 2495-2502.
- MOULDING D.A., AKGUL C., DEROUET M., WHITE M.R.H., EDWARDS S.W. Bcl-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, **70**, 783-792.
- MURRAY J., BARBARA J.A., DUNKLEY S.A., LOPEZ A.F., VAN OSTADE X., CONDLIFFE A.M., DRANSFIELD I., HASLETT C., CHILVERS E.R. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood*, 1997, **90**, 2772-2783.
- OTTONELLO L., FRUMENTO G., ARDUINO N., BERTOLLO M., DAPINO P., MANCINI M., DALLEGRI F. Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, **72**, 125-132.
- PARVATHENANI L.K., BUESCHER E.S., CHACON-CRUZ E., BEEBE S.J. Type I cAMP-dependent protein kinase delays apoptosis in human neutrophils at a site upstream of caspase-3. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 6736-6743.
- PERICLE F., LIU J.H., DIAZ J.I., BLANCHARD D.K., WEI S., FORNI G., DJEU J.Y. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.*, 1994, **24**, 440-444.
- PONGRACZ J., WEBB P., WANG K.Q., DEACON E., LUNN O.J., LORD J.M. Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3 mediated activation of PKC-d. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 37329-37334.
- REED J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 1997, **387**, 773-776.
- ROSSI A.G., COUSIN J.M., DRANSFIELD I., LAWSON M.F., CHILVERS E.R., HASLETT C. Agents that elevate cAMP inhibit human neutrophil apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **217**, 892-899.
- ROWE S.J., ALLEN L., RIDGER V.C., HELLEWELL P.G., WHYTE M.K.B. Caspase-1-deficient mice have delayed neutrophil apoptosis and a prolonged inflammatory response to lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J. Immunol.*, 2002, **169**, 6401-6407.
- SABROE I., JONES E.C., USHER L.R., WHYTE M.K., DOWER S.K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol.*, 2002, **168**, 4701-4710.
- SALAMONE G., GIORDANO M., TREVANI A.S., GAMBERALE R., VERMEULEN M., SCHETTINNI J., GEFFNER J.R. Promotion of neutrophil apoptosis by TNF-alpha. *J. Immunol.*, 2001, **166**, 3476-3483.
- SALVESEN G.S., DUCKETT C.S. IAP proteins : blocking the road to death's door. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, **3**, 401-410.
- SAVILL J.S., WYLLIE A.H., HENSON J.E., WALPORT M.J., HENSON P.M., HASLETT C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.*, 1989, **83**, 865-875.
- SAVILL J., FADOK V., HENSON P., HASLETT C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, 1993, **14**, 131-136.
- SAVILL J., HASLETT C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin. Cell. Biol.*, 1995, **6**, 385-393.

- SAVILL J., DRANSFIELD I., GREGORY C., HASLETT C. A blast from the past : clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, **2**, 965-975.
- SIMINOVITCH K.A., NEEL B.G. Regulation of B cell signal transduction by SH2-containing protein-tyrosine phosphatases. *Semin. Immunol.*, 1998, **10**, 329-347.
- SIMON H.U. Novel therapeutic strategies via the apoptosis pathways to resolve chronic eosinophilic inflammation. *Cell Death Differ.*, 1996, **3**, 349-356.
- SKERRETT S.J. Host defenses against respiratory infection. *Med. Clin. North Am.*, 1994, **78**, 941-966.
- SONG K., CHEN Y., GOKE R., WILMEN A., SEIDEL C., GOKE A., HILLIARD B., CHEN Y. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J. Exp. Med.*, 2000, **191**, 1095-1104.
- SQUIER M.K.T., COHEN J.J. Calpain and cell death. *Cell Death Differ.*, 1996, **3**, 275-283.
- SQUIER M.K.T., SEHNERT A.J., SELLINS K.S., MALKINSON A.M., TAKANO E., COHEN J.J. Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J. Cell. Physiol.*, 1999, **178**, 311-319.
- STRINGER R.E., HART C.A., EDWARDS S.W. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br. J. Haematol.*, 1996, **92**, 169-175.
- TAKEDA Y., WATANABE H., YONEHARA S., YAMASHITA T., SAITO S., SENDO F. Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Int. Immunol.*, 1993, **5**, 691-694.
- TIDOW N., KASPER B., WELTE K. SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are dramatically increased at the protein level in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia (Kostmann's syndrome). *Exp. Hematol.*, 1999, **27**, 1038-1045.
- VAN DEN BERG J.M., WEYER S., WEENING J.J., ROOS D., KUIJPERS T.W. Divergent effects of tumor necrosis factor-alpha on apoptosis of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, **69**, 467-473.
- VILLUNGER A., O'REILLY L.A., HOLLER N., ADAMS J., STRASSER A. Fas ligand, Bcl-2, granulocyte-colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase : regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes. *J. Exp. Med.*, 2000, **192**, 647-657.
- WALKER N.P., TALANIAN R.V., BRADY K.D., DANG L.C., BUMP N.J., FERENZ C.R., FRANKLIN S., GHAYUR T., HACKETT M.C., HAMMILL L.D., HERZOG L., HUGUNIN M., HOUY W., MANKOVICH J.A., MCGUINNESS L., ORLEWICZ E., PASKIND M., PRATT C.A., REIS P., SUMMANIA., TERRANOVA M., WELCH J.P., XIONG L., MÖLLER A., TRACEY D.E., KAMEN R., WONG W.W. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, 1994, **78**, 343-352.
- WALKER R.I., WILLEMZE R. Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. *Rev. Infect. Dis.*, 1980, **2**, 282-292.
- WARD I., DRANSFIELD I., CHILVERS E.R., HASLETT I., ROSSIA.G. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1999, **20**, 503-509.
- WATSON R.W., REDMOND H.P., WANG J.H., BOUCHIER-HAYES D. Bacterial ingestion, tumor necrosis factor-alpha, and heat induce programmed cell death in activated neutrophils. *Shock*, 1996, **5**, 47-51.
- WEBB P.R., WANG K.Q., SCHEEL-TOELLNER D., PONGRACZ J., SALMON M., LORD J.M. Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apoptosis*, 2000, **5**, 451-458.
- WEI S., LIU J.H., EPLING-BURNETTE P.K., GAMERO A.M., USSERY D., PEARSON E.W., ELKABANI M.E., DIAZ J.I., DJEU J.Y. Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 1996, **157**, 5155-5162.
- WEINMANN P., GAEHTGENS P., WALZOG B. Bcl-xL and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood*, 1999, **93**, 3106-3115.
- WEISS S.J. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, 1989, **320**, 365-376.
- WILSON K.P., BLACK J.A., THOMSON J.A., KIM E.E., GRIFFITH J.P., NAVIA M.A., MURCKO M.A., CHAMBERS S.P., ALDAPE R.A., RAYBUCK S.A., LIVINGSTON D.J. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 1994, **370**, 270-275.
- WOO M., HAKEM R., SOENGAS M.S., DUNCAN G.S., SHAHNIAN A., KAGI D., HAKEM A., MCCURRACH M., KHOO W., KAUFMAN S.A., SENALDI G., HOWARD T., LOWE S.W., MAK T.W. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.*, 1998, **12**, 806-819.
- YETTER A., UDDIN S., KROLEWSKI J.J., JIAO H., YI T., PLATANIAS L.C. Association of the interferon-dependent tyrosine kinase Tyk-2 with the hematopoietic cell phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 18179-18182.
- YIN X.M., OLTVAI Z.N., KORSMEYER S.J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 1994, **369**, 321-323.
- YOSHIMURA A., OHKUBO T., KIGUCHI T., JENKINS N.A., GILBERT D.J., COPELAND N.G., HARA T., MIYAJIMA A. A novel cytokine-inducible gene *CIS* encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.*, 1995, **14**, 2816-2826.
- YOUSEFI S., GREEN D.R., BLASER K., SIMON H.U. Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 10868-10872.
- YOUSEFI S., COOPER P.R., MUECK B., POTTER S.L., JARAI G. cDNA representational difference analysis of human neutrophils stimulated by GM-CSF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **277**, 401-409.
- YU Z., SU L., HOGLINGER O., JARAMILLO M.L., BANVILLE D., SHEN S.H. SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 3687-3694.
- YUAN J., SHAHAM S., LEDOUX S., ELLIS H.M., HORVITZ H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 1993, **75**, 641-652.