

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine

**MÉCANISMES D'INDUCTION DE L'APOPTOSE DES
NEUTROPHILES HUMAINS PAR LA *VISCUM ALBUM*
AGGLUTININE-I : CONTRIBUTION DES CASPASES ET
ACTION SUR LE CYTOSQUELETTE**

Par
Valérie Lavastre

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

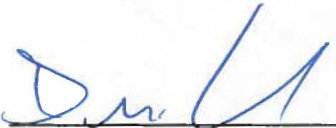
Président du jury et examinateur interne	M. Alain Fournier, PhD INRS-Institut Armand-Frappier/ Santé humaine
Examineur externe	M. Philippe Tessier, PhD Centre de rhumatologie et infectiologie du CHUL
Directeur de recherche	M. Denis Girard, PhD INRS-Institut Armand-Frappier/ Santé humaine

© droits réservés de Valérie Lavastre, 2001

Sommaire

La VAA-I est un puissant immunomodulateur. A forte dose, elle induit l'apoptose des neutrophiles et offre ainsi le potentiel de résoudre l'inflammation. Par contre le mécanisme d'induction de l'apoptose par cette molécule chez les neutrophiles humains n'a pas encore été élucidé. Cette étude nous démontre que la VAA-I déstabilise le potentiel membranaire mitochondriale mais que cette activité ne résout pas son mécanisme d'action. L'utilisation d'un stabilisateur de la membrane mitochondriale n'a pu empêcher la VAA-I d'induire l'apoptose. Par ailleurs, nous démontrons que l'induction de l'apoptose ne dépend pas de la production de radicaux libres. Cette observation a été confirmée par l'utilisation de la catalase, enzyme dégradant les radicaux libres comme le peroxyde d'hydrogène, et aussi par l'utilisation d'une lignée cellulaire promyélocytaire déficiente en une composante de la NADPH-oxydase l'empêchant ainsi de générer des radicaux libres. En effet, la VAA-I peut induire l'apoptose dans ces deux situations. Nous avons découvert que l'action de la VAA-I était complètement bloquée par l'ajout d'un inhibiteur du transport vésiculaire. Finalement, nous avons étudié l'expression de certaines protéines en réponse à l'action de la VAA-I. La lectine diminue l'expression d'une protéine anti-apoptotique, Mcl-1, et induit la dégradation de certaines protéines du cytosquelette, soit la gelsoline, la paxilline ainsi que la vimentine mais pas la vinculine ni l' α - et la β -tubuline. La fragmentation de ces protéines est sous l'influence des caspases puisqu'après l'ajout de l'inhibiteur de caspases-1, -3, -4 et -7, ces protéines ne sont plus dégradées.


Étudiante


Directeur de recherche

Avant-propos et remerciements

Ce mémoire de maîtrise est l'aboutissement d'un an et demi d'effort et de recherche et n'aurait pu être possible sans la participation de certaines personnes.

Je tiens donc à remercier mon directeur de maîtrise, le professeur Denis Girard, pour sa patience, ses nombreux conseils ainsi que sa disponibilité.

J'aimerais également remercier mes collègues de laboratoire, sans qui les nombreuses heures passées au laboratoire auraient été moins dynamiques,

Martin Pelletier,

Anik Savoie,

Marc Gauthier,

Claude Ratthé,

Annie Couture,

ainsi que notre collaboratrice à Zurich, Mme Katarina Hostanska qui nous offre gracieusement sa VAA-I et qui nous fournit des renseignements aussi intéressants qu'essentiels sur cette lectine.

Je voudrais remercier aussi ma famille qui, malgré la distance et les rencontres trop courtes et peu nombreuses, a toujours eu confiance en moi.

Et finalement, je remercie tout particulièrement, François Brassard, qui a toujours été là pour me soutenir dans les moments les plus durs et à m'encourager à faire ce que je veux dans la vie.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos et remerciements	iii
Liste des abréviations	vii
Liste des figures et des tableaux	ix
Sommaire.....	xi
Introduction	xiii
SECTION 1 Synthèse.....	1
1. LE NEUTROPHILE.....	3
1.1 Le système immunitaire.....	3
1.1.1 L'immunité spécifique	4
1.1.2 L'immunité non-spécifique	5
1.2 L'inflammation.....	7
1.2.1 Généralités.....	7
1.2.2 Médiateurs de l'inflammation	10
1.2.3 La résolution de l'inflammation	12
1.2.4 Régulation des fonctions du neutrophile	12
1.2.5 Désordres reliés aux neutrophiles.....	13
2. L'APOPTOSE	16
2.1 Généralités	16
2.2 Régulation intracellulaire de l'apoptose	17
2.2.1 La famille de Bcl-2.....	17
2.2.2 Les caspases	18
2.2.2.1 Les caspases et leurs substrats.....	19
2.2.2.2 Les caspases et les inhibiteurs.....	20
2.2.2.3 La cascade des caspases.....	21
2.3 Molécules affectant l'apoptose.....	22
2.3.1 Inducteurs d'apoptose.....	22
2.3.2 Inhibiteurs d'apoptose	23
2.4 Méthodes de détection de l'apoptose.....	23
3. LE CYTOSQUELETTE.....	25
3.1 Généralités.....	25
3.2 Les microfilaments	26
3.3 Les microtubules.....	28
3.4 Les filaments intermédiaires.....	29
3.5 Inhibiteurs des protéines du cytosquelette	30
4. LA VISCUM ALBUM AGGLUTININE-I.....	32
4.1 Généralités.....	32
4.2 Distribution.....	33
4.3 Structure	33
4.4 Purification de la VAA-I	33
4.5 Activités biologiques de la VAA-I	34
4.6 Réponses cellulaires produites par la VAA-I chez les cellules du système immunitaire	36

SECTION 2	Articles.....	39
1.	ARTICLE 1.....	41
1.1	RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 1.....	43
1.2	TEXTE ORIGINAL DE L'ARTICLE 1.....	45
2.	ARTICLE 2.....	91
2.1	RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 2.....	92
2.2	TEXTE ORIGINAL DE L'ARTICLE 2.....	93
	Conclusion	123
	Références.....	129
ANNEXE	Articles secondaires	155
1.	ARTICLE 3.....	157
1.1	RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 3.....	159
1.2	ARTICLE 3 TEL QUE PUBLIÉ	159
2.	ARTICLE 4.....	169
2.1	RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 4.....	171
2.2	ARTICLE 4 TEL QUE PUBLIÉ	171

Liste des abréviations

Actine-F	actine filamenteuse
Actine-G	actine globulaire
ADN	acide désoxyribonucléique
ANCA	anticorps cytoplasmiques dirigés contre le neutrophile ou « anti-neutrophil cytoplasmic antibodies »
Apaf	« Apoptotic protease activating factor »
ARDS	syndrome adulte de détresse respiratoire ou « adult respiratory distress syndrom »
ATP	adénosine triphosphate
DcR(DcR1)	« Decoy Receptor »
CD	« cluster of differentiation »
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
DD	domaine de mort ou « death domain »
DNA-PK	« DNA-dependent protein kinase catalytic subunit »
DR (DR3)	« Death Receptor »
ERK	« extracellular signal-related kinase »
FasL	ligand de Fas
FcγR	récepteur des Fcγ
FI	filaments intermédiaires
FADD	« Fas-associated deat domain »
FLICE	« FADD like ICE »
fMLP	N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine
G-CSF	facteur stimulant les colonies de granulocytes ou « granulocyte colony-stimulating factor »
GFAP	protéines fibrillaires gliales acides ou « glial fibrillary acidic protein »
GM-CSF	facteur stimulant les colonies de macrophages et granulocytes ou « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »
HNP	protéine humaine du neutrophile ou « human neutrophil protein »
ICE (rel)	enzyme de conversion pour l'interleukine-1β ou « interleukine-1β-converting enzyme » (relatif à l')
IFAPs	protéines associées aux MF ou « intermediate filament-associated proteins »
Ig	immunoglobuline
INF-γ	interféron gamma
IL	interleukine
JNK	« Jun N-terminal kinase »
kDa	Kilodaltons
LAD-I	déficiencia de type 1 dans l'adhésion leucocytaire ou « leukocyte adhesion deficiency-I »
LPS	lipopolysaccharide
LTB, LTC, ...	leukotriènes B, C, ...
MAP(K)	protéine activée mitogénique ou « mitogen activated protein » (kinase)

MAPs	protéines associées aux microtubules ou « microtubule-associated proteins »
MF	microfilaments
MFAPs	protéines associées aux MF ou « MF-associated proteins »
MPO	myéloperoxidase
MT	microtubules
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase
NK	« Natural Killer »
¹ O ₂	singulet d'oxygène
·OH	radical d'hydroxyle
PAF	facteur activateur des plaquettes ou « platelets activating factor »
PARP	polymérase poly(ADP-ribose) ou « poly(ADP-ribose) polymerase »
pb	paire de bases
PM	poids moléculaire
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	polymorphonucléaires
QACXG(R)	acides aminés (glutamine, alanine, cystéine, X, glycine (arginine))
RcT	récepteur des lymphocytes T
R	récepteur
RAIDD	« RIP associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain »
RIP (apoptose)	« Receptor Interacting Protein »
RIP (VAA-I)	protéine inactivatrice des ribosomes ou « ribosome inactivating protein »
ROI	intermédiaires réactifs de l'oxygène ou « reactive oxygen intermediates »
SAPK	« stress activate protein kinase »
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS ou « sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis »
SRC	substrats de réaction lente ou « slow reacting substrates »
T _C	lymphocytes T cytotoxiques
T _H	lymphocytes T auxiliaires ou « helper »
TNF-α	facteur alpha nécrosant des tumeurs ou « tumor necrosis factor alpha »
TRAIL	« TNF-related apoptosis inducing ligand »
T _S	lymphocytes T suppresseurs
U1-70kDa _{sn} RNP	« U1 small nuclear ribonucleoprotein »
VAA-I	<i>Viscum album</i> agglutinine de type I
VIH/HIV	virus d'immunodéficience humain ou « human immunodeficient virus »
(X-)CGD	(relié au chromosome X) désordre chronique granulomateux ou « chronic granulomatous disease »
WAS	syndrome de Wiskott-Aldrich ou « Wiskott-Aldrich Syndrome »
z-VAD-FMK	benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluorométhylcétone

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 Les leucocytes sanguins	5
Figure 2 Étapes de maturation du neutrophile	6
Figure 3 Recrutement des neutrophiles au site inflammatoire.....	9
Figure 4 Destruction d'un micro-organisme par le neutrophile.....	10
Figure 5 Assemblage de la NADPH-oxydase.....	11
Figure 6 Exemples généraux d'amplification des caspases menant à l'apoptose.....	21
Figure 7 Organisation de l'actine et interaction avec les MFAPs.....	27
Figure 8 Mode d'action de la VAA-I sur le ribosome	35
Tableau 1 Composantes de l'inflammation	8
Tableau 2 Cytokines et leurs actions sur le neutrophile	13
Tableau 3 Association de certaines maladies avec un dérèglement de fonctions des neutrophiles	15
Tableau 4 Les caspases et leurs substrats	19
Tableau 5 Destabilisateurs des protéines du cytosquelette	30
Tableau 6 Les protéines du cytosquelette et leurs principales fonctions.....	31
Tableau 7 Les protéines inactivatrices du ribosome.....	33

Introduction

Les neutrophiles sont des cellules grandement impliquées dans la défense de l'organisme. Elles sont les premières cellules qui arrivent au foyer inflammatoire. Elles sont reconnues pour phagocyter les micro-organismes envahisseurs et attirer d'autres types cellulaires. Or, sans le recours à l'apoptose, mort cellulaire programmée, un organisme ne serait pas en mesure de se débarrasser du nombre élevé de cellules présentes au site inflammatoire. C'est pourquoi des stratégies thérapeutiques ont été développées afin de pouvoir accélérer ce phénomène et ainsi limiter la durée de ce désordre immunologique.

La *Viscum album* agglutinine de type-I (VAA-I) est une lectine extraite à partir de la feuille de gui. En Europe, depuis plus de soixante ans, elle est utilisée comme adjuvant afin de lutter contre le cancer. Cette molécule fait partie d'une grande famille de protéines végétales qui inactivent le ribosome. La VAA-I possède plusieurs propriétés modulatrices envers les différentes cellules du système immunitaire. Utilisée à faible concentration, la VAA-I stimule des mécanismes bénéfiques dans la lutte contre les tumeurs. La VAA-I affecte les cellules mononucléées mais elle possède une meilleure affinité pour les granulocytes, incluant les neutrophiles. À plus forte concentration, la VAA-I est en mesure d'induire l'apoptose chez de nombreux types cellulaires comme les cellules mononucléées, les lymphocytes, les cellules NK et les granulocytes.

L'intérêt et l'originalité de cette présente étude résident dans le fait que les mécanismes d'action de la VAA-I chez les neutrophiles humains ne sont pas encore connus. Nous nous sommes donc penchés premièrement sur le mode d'entrée de la lectine chez le neutrophile. Une fois à l'intérieur de la cellule, nous nous sommes demandés par quel mécanisme interne la VAA-I induit l'apoptose. Sachant que la VAA-I stimule la NADPH-oxydase pour produire des radicaux libres et qu'elle déstabilise la membrane mitochondriale, nous avons examiné si l'induction de l'apoptose est dépendante de ces deux phénomènes, étant donné le nombre faible en mitochondries dans le neutrophile.

Lors de l'apoptose, le neutrophile adopte une configuration particulière qui oblige le cytosquelette à se restructurer. Nous avons donc étudié l'effet de la VAA-I sur les protéines du cytosquelette qui est constitué de trois types de filaments : les microfilaments, les microtubules ainsi que les filaments intermédiaires.

La revue de la littérature apparaissant dans ce mémoire exposera en premier lieu, la place que possède le neutrophile à l'intérieur du système immunitaire, ses constituants ainsi que son rôle et celui des médiateurs dans l'inflammation. Nous discuterons par la suite de l'apoptose : ses caractéristiques, ses principaux acteurs, les caspases, ainsi que son importance dans l'inflammation. Après avoir fait un survol de la littérature sur la description et les fonctions des protéines du cytosquelette, nous nous attarderons un peu plus sur celles qui sont affectées lors de l'apoptose, et plus particulièrement chez le neutrophile. Par la suite, nous discuterons de la lectine utilisée dans cette étude, la VAA-I. Nous discuterons de son effet chez les cellules immunitaires en général et finalement chez les neutrophiles humains.

SECTION 1 Synthèse

1. LE NEUTROPHILE

1.1 Le système immunitaire

Le corps humain est exposé tous les jours à des agents étrangers, tels les bactéries, les virus, les parasites et les champignons. Quelques-uns peuvent être inoffensifs et contribuer à la microflore indigène normale de notre corps, comme par exemple certaines bactéries ou levures, tandis que d'autres agents étrangers détiennent malheureusement le potentiel de causer des désordres et des maladies. Afin de faire face à ces derniers envahisseurs, le corps humain possède un système spécialisé dans la défense contre les infections et les agents toxiques, le système immunitaire (Prescott, Harley et Klein, 1995).

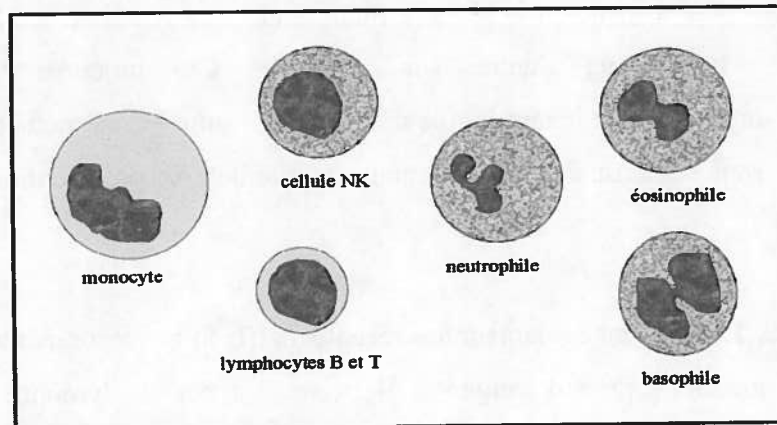


Figure 1 Les leucocytes sanguins (inspirée de Prescott, Harley et Klein, 1995)

Le système immunitaire se compose de deux types d'immunité qui regroupent en tout 7 types de leucocytes. L'immunité spécifique fait appel aux cellules mononucléées soit les lymphocytes B et T ainsi que les cellules NK tandis que l'immunité non-spécifique fait appel principalement aux granulocytes soit les neutrophiles ou polymorphonucléaires (PMN), les éosinophiles, les basophiles et les monocytes (ou macrophages dans les tissus) comme représentés dans la figure 1 (Prescott, Harley et Klein, 1995).

1.1.1 L'immunité spécifique

Les lymphocytes B et T sont produits dans les organes lymphoïdes primaires, respectivement la moelle osseuse et le thymus. Les lymphocytes migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (amygdales, rate, ganglions lymphatiques et tissus lymphoïdes) et sont libérés en cas de besoin, tandis qu'environ 20% circulent à l'intérieur des vaisseaux sanguins avec les granulocytes.

Les lymphocytes B sont caractérisés par la présence d'immunoglobulines (Ig), également appelées anticorps, qui sont présentes à leur surface. Il existe cinq classes d'Ig : IgA, IgD, IgE, IgG, et IgM. Chacune possède des caractéristiques qui lui sont propres. Tout au long de leur différenciation et pendant la réponse immunitaire, les lymphocytes B acquièrent de nouvelles Ig tandis que d'autres sont éliminées. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement un antigène et jouent le rôle de récepteurs solubles ou membranaires. Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale (Abbas, Lichtman et Pober, 1997).

Les lymphocytes T possèdent également des récepteurs (RcT) qui reconnaissent de façon spécifique une grande variété d'antigènes. Il existe 3 types de lymphocytes T : les lymphocytes T auxiliaires ou «helper» (Th), les lymphocytes T cytotoxiques (Tc) et les lymphocytes T suppresseurs (Ts). Selon les molécules de surface associées au RcT, les lymphocytes reconnaissent un antigène présenté en association avec une protéine d'un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) particulier selon la provenance de l'antigène. Les Th possèdent en plus du RcT, la molécule CD4 et reconnaissent les antigènes, phagocytés par la cellule et présentés par le CMH de classe II, tandis que les Tc possèdent en plus du RcT, la molécule CD8 et reconnaissent les antigènes, initialement synthétisés à l'intérieur de la cellule et présentés par le CMH de classe I. Les CMH sont présents à la surface de plusieurs cellules. Celles-ci sont nommées les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CPA qui expriment les CMH de classe II

appartiennent aux deux types d'immunité soit spécifique et non-spécifique, tandis que toutes les cellules nucléées peuvent exprimer le CMH de classe I. Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire puisqu'ils font intervenir plusieurs types cellulaires (Abbas, Lichtman et Pober, 1997).

Après avoir reconnu spécifiquement l'antigène, les lymphocytes, en collaboration avec un bon nombre de cellules, dont les cellules de l'immunité non-spécifique, de médiateurs chimiques solubles (cytokines, interférons, etc.) et autres acteurs de la réponse immunitaire, permettront à l'organisme de se débarrasser de l'agent indésirable (Roitt, Brostoff et Male, 1994).

1.1.2 L'immunité non-spécifique

L'immunité non-spécifique ou générale consiste en quatre barrières : les barrières générales (nutrition, fièvre, âge et facteurs génétiques), les barrières physiques (peau, sébum, muqueuses, conjonctives, etc.), les barrières chimiques (sucs gastriques, hormones, interférons, facteur nécrosant des tumeurs, bactéricides (microflore indigène)) et les barrières biologiques, pour lesquelles nous nous attarderons plus en détail.

Les barrières biologiques sont constituées de toutes les cellules qui reconnaissent l'antigène (ou corps étranger) de façon non spécifique. Contrairement aux lymphocytes, ces antigènes ne seront pas présentés par une molécule de surface. On y retrouve une multitude de cellules comme les granulocytes dont les basophiles, les éosinophiles, les neutrophiles et les monocytes différenciés dans les tissus en macrophages. Les granulocytes ont été nommés selon la réaction de leurs granules avec la coloration Romanowsky. Ainsi, les granules des basophiles sont violets à cause de leur forte affinité pour les complexes azures, ceux des éosinophiles sont plutôt orangés dû à leur affinité pour l'éosine, tandis que ceux des neutrophiles sont petits et roses et détiennent une faible affinité pour les complexes azures (Ogilvie, Askenase et Rose, 1980).

Les granulocytes sont produits à partir de la moelle osseuse. Ils représentent la majorité des leucocytes circulants dans le sang, soit entre 60 et 70% dont 90% sont des neutrophiles.

1.1.2.1 Physiologie du neutrophile

La moelle osseuse d'un adulte en santé peut produire jusqu'à 10^{11} neutrophiles/jour (Cotter *et al*, 1990). Lorsque les neutrophiles ont atteint leur maturité, ils ne se divisent plus. Comparés aux macrophages/monocytes, les neutrophiles possèdent une demi-vie très courte, c'est-à-dire aux alentours de 12 heures. Cette courte durée de vie vient du fait que les neutrophiles sont programmés pour se diriger spontanément en apoptose dès leur sortie de la moelle osseuse (voir chapitre sur l'apoptose) (Haslett, Savill et Meagher, 1989). En effet, lorsque des neutrophiles fraîchement isolés à partir du sang humain sont incubés *in vitro* pendant 24 heures en présence de sérum autologue, on note que près de 50% des neutrophiles sont apoptotiques. Les neutrophiles ont un diamètre de 10 à 20 μM et possèdent un noyau polylobé. Un neutrophile peut détenir entre deux et cinq lobes qui sont reliés entre eux par des brins de chromatine difficilement détectables au microscope. C'est d'ailleurs pourquoi ces cellules sont aisément identifiées à l'aide de leurs « multiples noyaux ». Il peut arriver que l'on retrouve dans un frottis sanguin, un petit nombre de neutrophiles ayant comme caractéristique un noyau plutôt en forme de « C », i.e. qu'aucun segment n'est apparent entre les noyaux. On les appelle des « band-neutrophiles » et ils s'agit de neutrophiles immatures (Edwards, 1994) (voir la figure suivante).

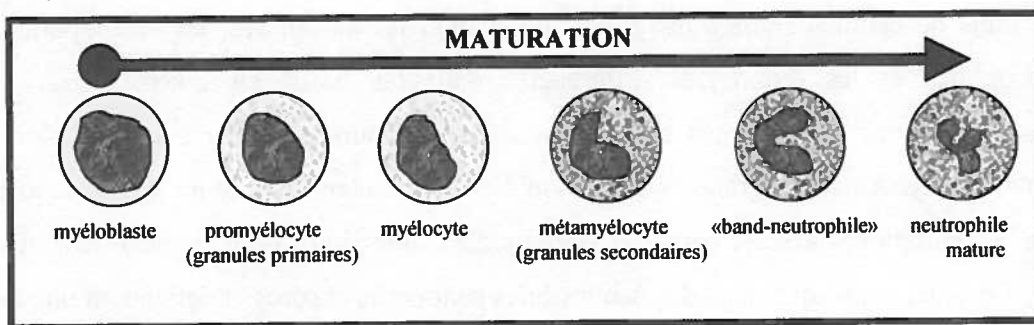


Figure 2 Étapes de maturation du neutrophile (inspirée de Abramson et Wheeler, 1993)

Le cytoplasme des neutrophiles contient trois types de granules : les granules primaires, secondaires et tertiaires. Les granules primaires ou azurophiles (lysosomes) apparaissent les premiers lors de la différenciation du neutrophile. Ils contiennent des hydrolases acides, de la myéloperoxydase (MPO), des lysosymes, des défensines et de la muramidase. Les granules secondaires ou spécifiques, plus petits et moins denses que les granules primaires, sont remplis de lactoferrine, de collagénase et de lysosyme (Roitt, Brostoff et Male, 1994 et Prescott, Harley et Klein, 1995). Les granules tertiaires possèdent en partie le même contenu que les granules spécifiques mais sont moins denses que ces derniers (Abramson et Wheeler, 1993). Les granules ont pour fonction principale de détruire les micro-organismes phagocytés. Ils sont aussi particulièrement susceptibles de relâcher leur contenu et participent activement à la phase initiatrice de l'inflammation. Certains granules, en l'occurrence les granules spécifiques, peuvent aussi être le réservoir de différentes composantes de la membrane plasmique comme c'est le cas du cytochrome b_{558} (composante de la NADPH-oxydase) ou encore de certains récepteurs du complément. Les granules du neutrophile sont très importants dans l'inflammation. En effet, un désordre congénital dans les granules empêche certaines personnes à initier une réponse inflammatoire (syndrome de Chédiak-Higashi dans le cas de granules anormalement gros et syndrome de déficience des granules spécifiques dans le cas d'infection bactérienne de la peau). Une déficience dans la MPO est le désordre génétique le plus prévalent dans la population (une personne sur deux mille). Certains patients atteints de ce désordre peuvent souffrir de maladies bactériennes récurrentes puisqu'ils n'utilisent plus l'activité anti-microbienne dépendante de la MPO (Abramson et Wheeler, 1993).

1.2 L'inflammation

1.2.1 Généralités

L'inflammation est un processus général et non spécifique ayant comme participants principaux les granulocytes. Plusieurs facteurs peuvent déclencher l'inflammation : l'invasion d'un pathogène (bactérie, virus, parasite), un choc physique (ionisation, basse

ou haute température), une lésion ou toute réponse immunologique (tumeur). Ces changements provoquent l'arrivée massive de cellules au foyer inflammatoire. Pour ce faire, les cellules présentes dans la région infectée sécrètent des agents chimiotactiques et en libèrent d'autres (bradykinine) qui augmentent la perméabilité dans les vaisseaux sanguins (Trowbridge et Emling, 1997). Le tableau 1 résume les principaux acteurs de l'inflammation.

PROCÉDÉS		CELLULES EFFECTRICES ET MOLÉCULES
Reconnaissance de l'antigène	Spécifique	Lymphocytes T, anticorps (Ig)
	Non-spécifique	Neutrophiles, éosinophiles, monocytes, macrophages, voie alternative du complément, cascade de coagulation
Amplification		Système du complément, produits de l'acide arachidonique, PAF, bradykinine, sérotonine, cascade de coagulation, cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, chimiokines, facteurs de croissance) contenu lysosomal du neutrophile, mastocytes
Destruction de l'antigène		Neutrophiles, éosinophiles, macrophages, lymphocytes Tc, complément, perforines, radicaux libres, intermédiaires de l'azote

Tableau 1 Composantes de l'inflammation (inspiré de Trowbridge et Emling, 1997)

Les neutrophiles sont les premières cellules à arriver au site inflammatoire. La figure 3 résume les grandes étapes concernant le recrutement du neutrophile au foyer inflammatoire. Premièrement, il y a marginalisation (1) des neutrophiles suivi d'un roulement (2) à l'aide des sélectines, un arrêt puis une adhérence (3) sur les cellules endothéliales suite aux interactions entre les intégrines (majoritairement $\beta 2$ sur les neutrophiles et ICAM sur les cellules endothéliales). Attiré par les agents chimiotactiques, le neutrophile transmigre entre les cellules endothéliales par diapédèse (4) (Burg et Pillinger, 2001).

Ce changement de configuration (rétrécissement puis retour à la forme initiale) oblige inévitablement la cellule à restructurer son cytosquelette. Durant l'attraction, il y a

polymérisation presque immédiate d'actine globulaire (actine-G) (composante principale des microfilaments, voir chapitre sur le cytosquelette) en filaments. D'ailleurs les inhibiteurs qui bloquent la polymérisation d'actine, comme la cytochalasine, provoquent l'inhibition de la migration des neutrophiles (Abramson et Wheeler, 1993)

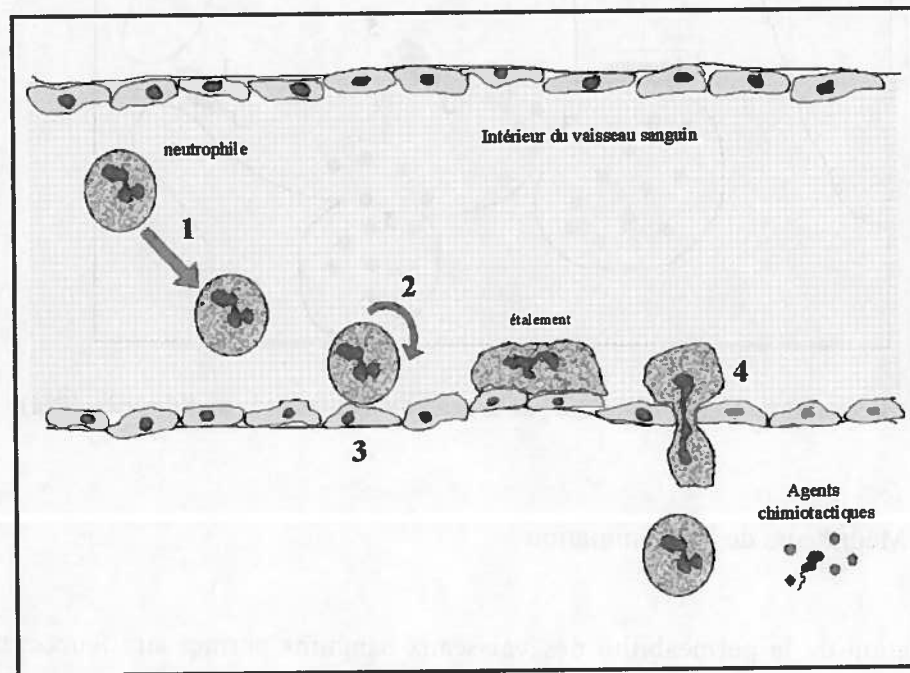


Figure 3 Recrutement des neutrophiles au site inflammatoire (inspirée de Abramson et Wheeler, 1993)

La figure 4 présente les stratégies du neutrophile qui lui permettent de détruire un micro-organisme. Une fois arrivé au site infecté, le neutrophile reconnaît l'agent étranger grâce à ses récepteurs de surface via une fixation non-spécifique. Par la suite, le neutrophile invagine sa membrane autour de l'agent étranger (1). C'est la phagocytose. Il y a alors formation d'un phagosome (2) qui pourra ainsi se fusionner aux granules et former un phagolysosome (3). Le contenu des granules est alors relâché dans le phagolysosome, il y a activation de la NADPH-oxydase (4) puis dégradation du micro-organisme (5) (Prescott, Harley et Klein, 1995).

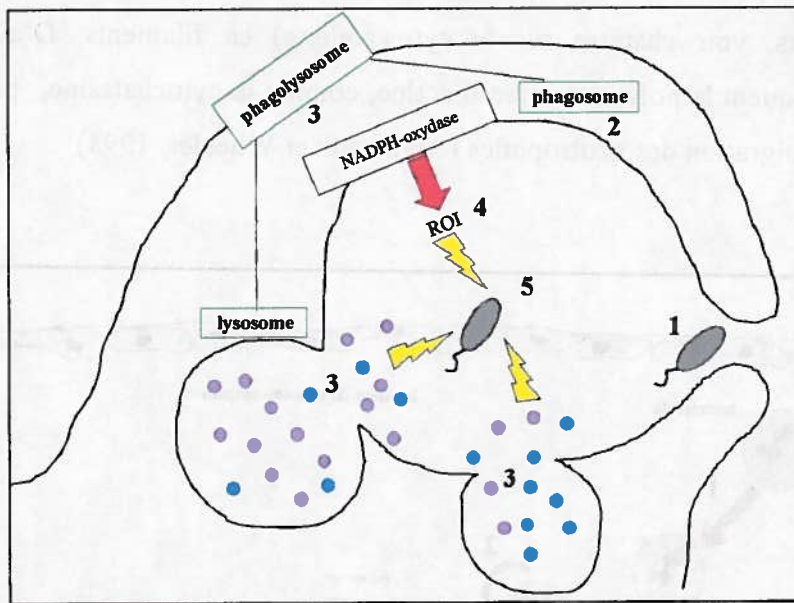


Figure 4 Destruction d'un micro-organisme par le neutrophile (inspirée de Edwards, 1994)

1.2.2 Médiateurs de l'inflammation

L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins permet aux leucocytes et au fluide de pénétrer dans le tissu infecté. La fixation de récepteurs de surface (comme le FcγR) sur les cellules endothéliales stimule le relâchement de plusieurs médiateurs de l'inflammation tels : la bradykinine, évènement déclencheur de la cascade des médiateurs, les leucotriènes (LT), les prostaglandines, les enzymes protéolytiques, glycolytiques et lysosomales, l'IL-1, l'INF-γ, le TNF-α, l'histamine, l'héparine, les tryptases et les facteurs chimiotactiques (NCF, ECF-A et LTB₄) (Abramson et Wheeler, 1993, Roitt, Brostoff et Male, 1994, Prescott, Harley et Klein, 1995) Ces facteurs entraînent une vasodilatation ainsi qu'une perméabilité plus accentuée dans les capillaires ainsi que l'attraction des cellules comme les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les monocytes (Prescott, Harley et Klein, 1995). D'autres molécules qui sont cette fois-ci formées à partir d'un médiateur commun, l'acide arachidonique, sont également relâchées afin d'augmenter encore une fois, la vasodilatation, la bronchoconstriction, la chimiotaxie ainsi que la sécrétion muqueuse comme : la cyclo-oxygénase dont découlent la

thromboxane A_2 et les prostaglandines E_2 et $F_{2\alpha}$ puis la lipoxygénase dont découlent les leucotriènes (LTB_4 , LTC_4 et LTD_4) et les SRC (« Slow reacting substance »). Ces derniers médiateurs permettent l'agrégation des plaquettes ainsi que la formation de l'œdème (Prescott, Harley et Klein, 1995).

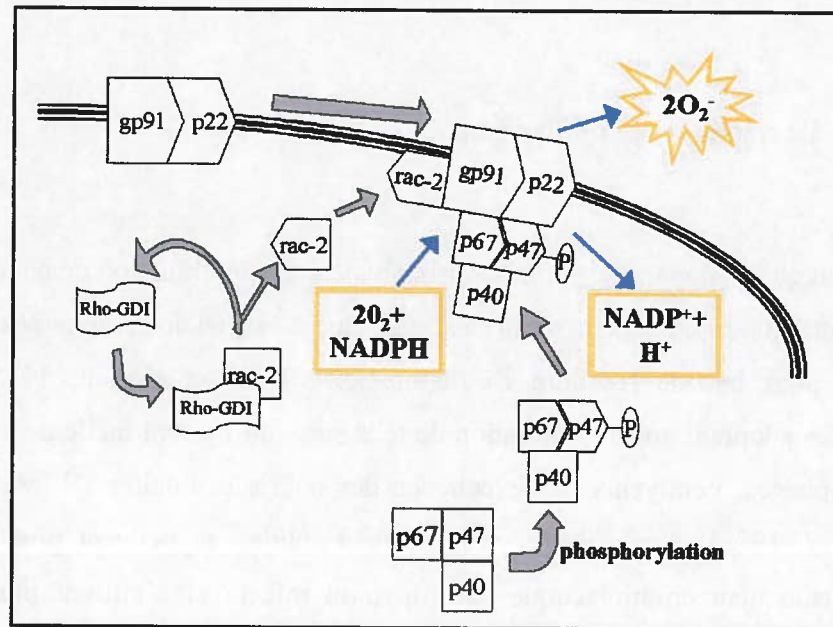


Figure 5 Assemblage de la NADPH-oxydase (inspirée de Burg et Pillinger, 2001)

Lors de la phagocytose, les cellules entrent en dégranulation. Les lysosomes libèrent des hydrolases (lysosymes, phospholipase A_2 , ribonucléase, désoxyribonucléase et des protéases) à l'intérieur du phagolysosome. Ces enzymes provoquent ensemble la destruction de l'agent étranger capturé. Il existe également des hydrolases qui sont dépendantes de l'oxygène. Il y a alors formation d'intermédiaires réactionnels de l'oxygène (« ROI » ou « reactive oxygen intermediates ») tels que le radical superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et les ions hypohalogénés (chlorure, iodure et bromure). Ces radicaux libres, produits à partir de la NADPH-oxydase, constituent l'explosion oxydative (ou « oxidative burst ») qui demande la consommation de la NADPH et de l'oxygène (comme présenté dans la figure 5). Par exemple, en présence de H_2O_2 , de MPO et de chlorure, le neutrophile peut produire des agents anti-microbiens très puissants. Les neutrophiles peuvent aussi former

un autre type de molécules, les défensines. Ces HNP (« Human Neutrophil Protein ») sont emprisonnées dans les granules jusqu'à leur dégranulation afin de permettre leur libération dans les vacuoles phagocytaires (Prescott, Harley et Klein, 1995).

1.2.3 La résolution de l'inflammation

Il est connu que l'apoptose est le mécanisme majeur de l'élimination de neutrophiles dans les tissus inflammés en plus de limiter le relâchement *in vivo* du contenu des neutrophiles, ce qui a pour but de résoudre l'inflammation (Savill et Haslett, 1995). Ainsi les neutrophiles adoptent une configuration de telle sorte qu'ils sont facilement reconnus par les macrophages, nettoyeurs par excellence des débris cellulaires (Whyte *et al*, 1997, Savill *et al*, 1988). Ainsi phagocytés, les neutrophiles ne peuvent plus relâcher leur contenu hautement chimiotactique dans le tissu infecté et n'attirent plus de cellules supplémentaires au site inflammatoire. Il y a alors une réduction considérable du nombre de cellules totales au site inflammatoire (Haslett, Savill et Meagher, 1989).

1.2.4 Régulation des fonctions du neutrophile

Les cytokines sont des molécules de faible poids moléculaire (généralement autour de 22 kDa). Elles sont la base de la régulation des fonctions de plusieurs cellules du système immunitaire. La majorité des cytokines qui influencent le neutrophile est classée dans l'ensemble des facteurs de croissance hématopoïétique et pyrogène. Certaines cytokines sont produites par le neutrophile et exercent une action autocrine/paracrine tandis que d'autres sont produites par différentes cellules et agissent sur le neutrophile (voir tableau 2) (Trowbridge, Emling et 1997).

GROUPE	CYTOKINES	ACTION	RÉFÉRENCES
Pyrogènes	IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF	Autocrine/paracrine : activation de la NADPH-oxidase	Gabriovich, 1999
Pro-inflammatoires	IL-8, IL-2	Chimiotaxie, activation	Girard <i>et al</i> , 1995
	INF- γ , TNF- α , GM-CSF, G-CSF	Avec IL-8, amplification de fonctions cytotoxiques	Gabrilovich, 1999
Anti-inflammatoires	IL-4, IL-10, IL-13	Inhibe IL-1, IL-8, TNF- α , (inactivation)	Girard <i>et al</i> , 1996

Tableau 2 Cytokines et leurs actions sur le neutrophile (inspiré de Trowbridge et Emling, 1997)

1.2.5 Désordres reliés aux neutrophiles

Certaines personnes peuvent avoir une maladie congénitale les empêchant de produire une grande quantité de neutrophiles. La neutropénie congénitale, dont les manifestations cliniques sont semblables à celles de patients possédant des neutrophiles inefficaces, se caractérise par des infections bactériennes récurrentes et ce, à même leur microflore (Edwards, 1994). Plusieurs maladies découlent des neutropénies congénitales : neutropénie cyclique, neutropénie sévère congénitale (syndrome de Kostmann), neutropénie chronique bénigne ou sévère (Abramson et Wheeler, 1993).

L'arthrite rhumatoïde est l'un des désordres autoimmunitaires le plus commun affectant 1% de la population mondiale. Cette maladie est généralement caractérisée par une inflammation localisée dans le tissu synovial résultant en une perte des fonctions au niveau des articulations (Serhan et Ward, 1999). La présence d'un grand nombre de neutrophiles dans le liquide synovial chez les patients nous démontre toute l'importance de ces cellules au cœur de cette maladie (Pillinger et Abramson, 1995). L'activation des neutrophiles par le complexe immunitaire à cet endroit provoque le relâchement de leur contenu entraînant ainsi une réaction inflammatoire à l'intérieur d'un tissu sain (Kistis et Weissman, 1991).

Différentes maladies reliées à l'inflammation chronique ou des ischémies peuvent également prendre place même si les neutrophiles sont essentiels dans la défense. Par

exemple, une ischémie peut être observée lorsque des substances sont relâchées par les cellules endommagées ou s'il y a une génération de superoxydes par la xanthine oxydase. Ainsi, une production accrue de radicaux libres par les neutrophiles peut être observée chez des patients atteints du syndrome adulte de détresse respiratoire (« adult respiratory distress syndrom » ou ARDS). Les neutrophiles activés se retrouvent à l'intérieur des poumons des patients atteints par ce syndrome et ainsi des tissus sains sont anormalement endommagés.

La maladie granulomateuse chronique (« chronic granulomatous disease » ou CGD) forme un groupe de maladies qui affectent l'activité anti-microbienne dépendante de l'oxygène (production de radicaux libres) chez les phagocytes et résulte en des infections bactériennes récurrentes. Le joueur essentiel dans cette activité est la NADPH-oxydase et une déficience dans l'activité de ce dernier à produire des radicaux libres, soit par l'absence ou la déficience d'une sous-unité du complexe ou du cytochrome b_{558} , entraîne inévitablement une incapacité à détruire le micro-organisme. Ce désordre est souvent relié génétiquement au chromosome-X (X-CGD). Cette maladie génétique récessive, assez rare, atteint environ une personne par million (Abramson et Wheeler, 1993). Il est possible de recréer cette condition en laboratoire en utilisant une lignée cellulaire, PLB-985, déficiente en gp91, sous-unité importante de la NADPH-oxydase. Ces cellules ne possèdent plus la capacité de générer des radicaux libres par leur NADPH-oxydase (Hiraoka *et al*, 1998).

D'un autre côté, les patients atteints de la maladie de LAD-I (« leukocyte adhesion deficiency-I ») possèdent des $\beta 2$ intégrines non-fonctionnelles ou sont absentes et leurs neutrophiles sont dans l'incapacité de migrer au foyer inflammatoire. Ainsi, ils ne peuvent plus adhérer aux cellules endothéliales avant et pendant la diapédèse. Cette maladie autosomale se caractérise encore une fois par des infections bactériennes récurrentes ainsi qu'une production anormalement basse de pus (Burg et Pillinger, 2001).

Le contenu cytoplasmique des neutrophiles peut également causer la formation d'anticorps cytoplasmiques spécifiques dirigés contre le neutrophile (« anti-neutrophil cytoplasmic antibodies » ou ANCA), qui entraîne le développement de vasculites et de glomérulonéphrites systémiques. Chez les individus atteints, on note un taux anormal d'anticorps qui sont dirigés contre des protéines du soi. Ces dernières peuvent aussi bien être de nature cytoplasmique (granules, protéines du cytosquelette comme l'actine) que nucléaire (Hartman *et al*, 1994).

Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est un désordre récessif relié au chromosome X. Cette maladie affecte plus particulièrement les lignées hématopoïétiques (plaquettes, lymphocytes, monocytes et neutrophiles) et se caractérise par des infections bactériennes récurrentes ainsi que par de l'eczéma. Le gène responsable de cette maladie est anormalement muté et affecte les fonctions de l'actine, protéine importante pour l'intégrité du cytosquelette (Rengan *et al*, 2000). Le tableau 3 représente une synthèse des désordres discutés.

DÉSORDRES	CARACTÉRISTIQUE / EFFET
ARDS	Infiltration de neutrophiles dans les tissus pulmonaires
Arthrite rhumatoïde	Activation des PMN dans le liquide synovial
CGD, X-CGD	Déficience dans la NADPH-oxydase
Déficience en MPO	Granules déficients en MPO
LAD-I	Déficience en intégrines (arrêt de la diapédèse)
Neutropénie	Quantité de PMN basse
Syndrome de Chédiak-Higashi	Granules azurophiles anormalement gros
Syndrome de déficience des granules spécifiques	Infection bactérienne de la peau
WAS	Déstabilisation de l'actine

Tableau 3 Association de certaines maladies avec un dérèglement de fonctions des neutrophiles

2. L'APOPTOSE

2.1 Généralités

L'apoptose, mort cellulaire programmée, est un procédé essentiel aux divers systèmes biologiques, l'exemple le plus connu étant le maintien de l'homéostasie cellulaire. Un dérèglement dans le contrôle de l'apoptose amène chez l'humain différents désordres tels que les maladies dégénératives (maladie d'Alzheimer et d'Huntington), les dommages ischémiques, maladies autoimmunes et finalement plusieurs formes de cancer (Cohen, 1997).

Il est important de distinguer la nécrose de l'apoptose puisque les cellules apoptotiques peuvent encore exercer quelques fonctions. On peut distinguer une cellule en nécrose d'une autre apoptotique puisque ces dernières excluent les colorants qui détectent la nécrose, comme le bleu de trypan ou l'iodure de propidium (PI).

L'apoptose possède des caractéristiques morphologiques et biochimiques typiques, suggérant ainsi un fonctionnement commun à la majorité des cellules. Contrairement aux autres cellules, les neutrophiles ne produisent pas de corps apoptotiques. On reconnaît les neutrophiles apoptotiques selon plusieurs caractéristiques : condensation et fragmentation nucléaire de la chromatine, compactage des organelles et réorganisation du cytosquelette dus à un rétrécissement de la taille de la cellule, dilatation du réticulum endoplasmique, altération de la membrane (par expression soudaine des phosphatidylsérines) (Homburg *et al*, 1995), expression réduite (CD32, CD35) ou perte (CD16, CD15, CD120b) de certaines molécules de surface (Hart *et al*, 2000). La déplétion en CD16 serait en partie conduite par une polymérisation de l'actine (Middelhoven *et al*, 1999). L'altération de ces molécules de surface facilite la reconnaissance du neutrophile apoptotique par les macrophages pour résoudre l'inflammation.

L'apoptose des neutrophiles est également associée à une réduction de certaines fonctions cellulaires comme l'adhésion, la chimiotaxie, la phagocytose, la sécrétion d'enzymes et la flambée oxydative (Dransfield *et al*, 1995).

2.2 Régulation intracellulaire de l'apoptose

L'apoptose est un phénomène hautement contrôlé (Santos-Beneit, Mollinedo, 2000). De nombreuses études nous démontrent que l'union entre Fas et Fas ligand (FasL) enclenche des signaux pouvant médier l'apoptose dans plusieurs tissus. Chez les neutrophiles, cette liaison serait en partie responsable du contrôle du nombre de neutrophiles circulant dans la circulation sanguine (Santos-Beneit et Mollinedo, 2000, Liles *et al*, 1996). Fas est aussi appelé APO-1 ou CD95. Il fait partie d'une superfamille, la famille des récepteurs de TNF ou récepteurs de mort, qui regroupe plusieurs membres : TNFR1 et 2, OX40, CD40, CD27, CD30, DR3/Apo3, DcR1, DcR2, DR4 et DR5. Une fois liés à leur ligand (respectivement TNF- α , OX40L, CD40L, CD27L, CD30L, Apo3L et Apo2L/TRAIL pour les 4 derniers) (Ashkenazi et Dixit, 1998), les récepteurs de mort peuvent enclencher des signaux conduisant à l'apoptose. La famille des récepteurs possède des régions conservées et répétées riches en cystéines. Elles sont présentes dans le domaine extracellulaire et sont nommées domaine de mort ou « death domain » (DD) (Denis *et al*, 1998). Suite à la liaison d'un ligand à son récepteur, deux voies majeures de signalisation sont ainsi enclenchées (Evan et Littlewood, 1998) : une voie promouvant la prolifération cellulaire (MAPK/ERK) et une seconde voie résultant d'un stress (SAPK/JNK) (voir figure 6). Le point commun entre ces deux voies est l'activation d'un même proto-oncogène : ras. Une fois le processus d'apoptose enclenché (SAPK/JNK), deux familles de gènes agissent comme régulateurs: les gènes appartenant à la famille de Bcl-2 ainsi que les caspases (Fadeel *et al*, 1998).

2.2.1 La famille de Bcl-2

Initialement découvert dans les cellules T cancéreuses, Bcl-2 a été identifié comme un proto-oncogène qui contrôle la perméabilité mitochondriale régissant le relâchement du

cytochrome C (Ward *et al*, 1999). La famille de Bcl-2 comprend des gènes qui peuvent induire l'apoptose, nommés gènes pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bik, Bad, Bcl-x_S), et d'autres qui l'inhibent, nommés gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1/A1, Mcl-1) (Strausser, Huang et Vaux, 1997). Il a été démontré que le neutrophile acquiert lors de sa maturation certains de ces gènes tandis que d'autres sont perdus. Bax, Bik et Bcl-2 sont totalement absents chez le neutrophile mature tandis que Bcl-X_L est partiellement diminué. La vie du neutrophile est prolongée grâce à la présence des gènes anti-apoptotiques comme Bcl-X_L ou plus particulièrement Mcl-1 (Pryde *et al*, 2000). Ainsi un niveau élevé en Mcl-1 protège le neutrophile de l'apoptose (Moulding *et al*, 1998).

2.2.2 Les caspases

Les caspases, au nombre de 12 jusqu'à présent, exécutent plusieurs mécanismes apoptotiques (Bantel *et al*, 1999) (voir tableau 4). Leur nom vient du fait que ces enzymes sont des protéases cystéines (« C ») et qu'elles possèdent la capacité de couper (« ase ») une protéine après un résidu aspartique (« Asp »). Elles détiennent une certaine homologie entre elles (Cohen, 1997). Les caspases sont synthétisées en pro-enzymes inactives et sont protéolytiquement coupées après des résidus d'acides aspartiques pour former un hétérodimère actif constitué d'une grosse et d'une petite sous-unités (environ 20 et 10 kDa). Toutes les caspases possèdent un site actif constitué de 5 acides aminés (pentapeptide) structurés généralement ainsi QACXG (où X peut être R, Q ou G). Différentes études ont démontré l'importance de chaque caspase, notamment des études avec des souris déficientes en caspase, suggérant que certaines caspases sont essentielles à l'apoptose (comme les caspases-1 et -3) tandis que d'autres le sont moins. Le neutrophile ne possède pas la caspase-2 (Santos-Beneit et Mollinedo, 2001).

Des chercheurs ont produit en laboratoire des souris déficientes en caspase-1. Ces souris sont normales durant la période post-natale mais démontrent une réduction significative (16%) du nombre de motoneurones faciales six semaines après leur naissance. Des études exhaustives seraient nécessaires afin de pouvoir mesurer l'effet de la déficience en

caspase-1 durant l'apoptose. Également, la production de souris déficientes en d'autres caspases serait intéressant afin de caractériser chacune d'entre elles (de Bilbao *et al*, 2000).

2.2.2.1 Les caspases et leurs substrats

Pendant la phase exécutive, plusieurs protéines sont coupées par les caspases. Le tableau 4 représente les substrats principaux des caspases autre que les caspases elles-mêmes.

CLASSE	CASPASES		SUBSTRATS	RÉFÉRENCES
	#	AUTRE NOM		
Inflammatoires	1	ICE	Pro-IL-1 β , PARP, actine	Wang <i>et al</i> , 1997, Mashita <i>et al</i> , 1995, Kalaya <i>et al</i> , 1996
	4	ICE _{rel} II, TX, ICH-2	PARP	Wang <i>et al</i> , 1997
	5	ICE _{rel} III, TY	<i>caspases</i>	Cohen, 1997
	11	ICH-3 (murine)	-	-
	12	TX (murine)	-	-
Exécutrices	3	CPP32, Yama, apopaine	PARP, U1-70 kDa, DNA-PK, Protéine Kinase C γ , inhibiteur de dissociation D4-GDP, Huntingtin, protéine du rétinoblastome, α -fodrine, gelsoline, Gas2	Wang <i>et al</i> , 1997, Rhéaume <i>et al</i> , 1997, Casciola-Rosen <i>et al</i> , 1996, Cryns <i>et al</i> , 1996, Brancolini <i>et al</i> , 1995
	6	Mch2	Lamine A, kératine	Caulin, Salvesen et Oshima, 1997
	7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	PARP	Wang <i>et al</i> , 1997
Membranaires	2	Nedd2, ICH-1	<i>caspases</i>	Denis <i>et al</i> , 1998
	8	MACH, FLICE, Mch5	P28 Bap31	Ng <i>et al</i> , 1997
	10	Mch4	-	-
Mitochondriale	9	ICE-LAP6, Mch6	<i>caspases</i>	Cohen, 1997

Tableau 4 Les caspases et leurs substrats (inspiré de Denis *et al*, 1998)

Certaines caspases peuvent posséder le même substrat (la polymérase poly(ADP-ribose) (PARP) pour les caspases-1, -3, -4 et -7) et d'autres substrats sont spécifiques à une seule caspase (lamine A pour la caspase-6). La caspase-3 fragmente plus spécifiquement des protéines qui sont grandement impliquées dans la réparation cellulaire comme par

exemple PARP qui lie spécifiquement les brins d'ADN (Casciola-Rosen *et al*, 1996). Cet enzyme est d'ailleurs le substrat le plus étudié des caspases et on la retrouve dans plusieurs systèmes, soit les lymphocytes, les HL-60 et certaines lignées cellulaires du cancer du sein. Par contre, la coupure de PARP n'est pas indispensable à l'induction de l'apoptose (Wang *et al*, 1997). D'ailleurs, elle est absente chez les neutrophiles. D'un autre côté, la protéolyse des lamines, qui sont les composantes majeures de l'enveloppe nucléaire, s'observe chez la majorité des cellules nucléées. Cette coupure est grandement responsable des différents changements apportés au noyau, comme la fragmentation et la marginalisation de l'ADN.

Le rétrécissement de la cellule amène certaines protéines du cytosquelette à être fragmentées comme par exemple, l' α -fodrine, la Gas2 ou la kératine (Caulin, Salvesen, Oshima, 1997). Ainsi la dégradation de certaines protéines du cytosquelette, donc l'état apoptotique, peut s'observer grâce aux techniques conventionnelles de visualisation des protéines par SDS/PAGE et immunobuvardages. Récemment, chez le neutrophile, des chercheurs ont démontré que la gelsoline est fragmentée par la caspase-3 (Kothakota *et al* 1997, Geng *et al*, 1998, Kwiatkowski, 1999). Elle est jusqu'à ce jour l'unique protéine associée aux microfilaments affectée chez le neutrophile durant l'apoptose. Le réseau cytosquelettique étant composé de nombreuses protéines, il s'avère important de documenter cet énorme bassin en identifiant de nouveaux substrats de caspases à l'intérieur du neutrophile (Cohen, 1997).

2.2.2.2 Les caspases et les inhibiteurs

Au moyen des souris au génotype modifié (déficientes en caspases) et afin d'élucider le rôle des différentes caspases dans l'induction de l'apoptose, plusieurs inhibiteurs ou peptides ont été produits. Ainsi, il existe plusieurs inhibiteurs dirigés contre une seule ou un groupe de caspases, le plus souvent apparentées. L'inhibiteur Ac-DEVD-CHO est spécifique aux caspase-3 et -7 et empêche entre autres l'activation des protéines kinases C, des protéines phosphatases ainsi que la coupure de PARP (Santoro *et al*, 1998). On retrouve également l'inhibiteur majeur et irréversible z-VAD-FMK (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluorométhylcétone. Ce dernier est un puissant inhibiteur d'apoptose,

parvenant à inhiber les caspases -1, -3, -4 et -7. Son efficacité vient de sa capacité à traverser les membranes grâce entre autre à ses groupements OMe et à la présence du groupe benzyloxycarbonyle. Il inhibe (Cohen, 1997).

2.2.2.3 La cascade des caspases

Afin d'être actives, les caspases doivent nécessairement être coupées à des sites d'acides aspartiques spécifiques. Ainsi, il a été établi que certaines caspases en activent d'autres et ainsi s'installe une hiérarchie. Des modèles d'activation des caspases ont été établis en proposant l'activation de la caspase-8 en tout premier lieu, laquelle prend place de caspase initiatrice. Ainsi activée, elle peut à son tour activer la caspase-1, qui elle-même amplifie la cascade en coupant l'une des caspases exécutrices, soit la caspase-3 ou -7. Ces dernières peuvent alors couper leurs substrats, soit la PARP ou une autre caspase, la 6. Par la suite, la caspase-6 activée peut fragmenter les lamines. La caspase-3 peut aussi activer d'autres caspases, comme la -2, la -6 et la -9, amplifiant ainsi la cascade de signaux apoptotiques (Cohen, 1997). La figure 6 représente l'effet d'amplification que démontrent les caspases lorsqu'elles sont activées successivement et parallèlement par différents mécanismes.

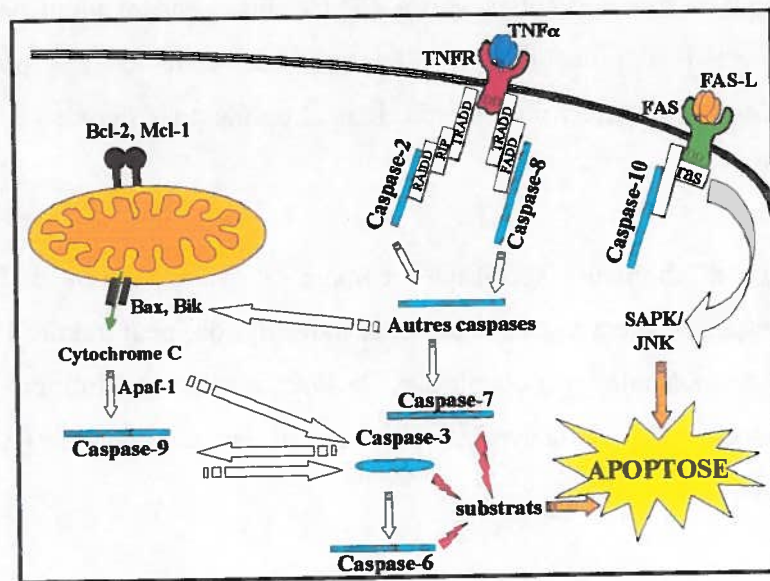


Figure 6 Exemples généraux d'amplification des caspases menant à l'apoptose (inspirée de Denis *et al*, 1998, Hengartner, 2000)

2.3 Molécules affectant l'apoptose

2.3.1 Inducteurs d'apoptose

Comme énoncé précédemment, l'interaction Fas-FasL induit l'apoptose en augmentant l'expression en gènes pro-apoptotiques (Pryde *et al*, 2000) ou en stimulant la production de radicaux libres (Kasahara *et al*, 1997, Hiraoka *et al*, 1998, Fadeel *et al*, 1998). Cette interaction constitue la majorité des signaux induisant l'apoptose. Toutefois il existe d'autres facteurs. Ainsi, des protéines kinases (« p38 mitogen-activated protein kinase », p42/p44 « mitogen-activated protein kinase », « transcription factor nuclear factor- κ B ») peuvent être activées et couper la pro-caspase-3. L'activation de cette caspase peut être directement reliée au relâchement du cytochrome C par la mitochondrie (Zhuang et Cohen, 1998, Kirsch *et al*, 1999, Green, Reed, 1998) ou via l'activation de la caspase-9. Le relâchement de cytochrome C s'effectue à l'aide des gènes pro-apoptotiques (BAX) qui grâce à une configuration spécifique (dimérisation) provoque cet état. Même si une présence de cytochrome C a déjà pu être détectée chez le neutrophile dans un état non physiologique et très particulier, soit à 15° Celsius pendant vingt heures (Pryde *et al*, 2000), il est peu probable que l'apoptose de cette cellule puisse être induite majoritairement par cette voie. En effet, le neutrophile possède très peu de mitochondries (Edwards, 1994).

La présence d'inhibiteurs spécifiques comme la cycloheximide et l'actinomycine D, bloquant respectivement la traduction et la transcription, peut induire l'apoptose. En fait, presque toute molécule (voir chapitre sur la *Viscum album* agglutinine-I) ou facteur (p53 via l'irradiation) bloquant la synthèse protéique provoque l'apoptose (Akgul, Moulding et Edwards, 2001, Cox, 1995).

2.3.2 Inhibiteurs d'apoptose

En plus des gènes anti-apoptotiques décrits ci-haut, plusieurs médiateurs de l'inflammation sont reconnus pour prolonger la durée de vie des neutrophiles, donc de retarder l'apoptose. Ainsi, la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , IL-2 (Pericle *et al*, 1994), TNF- α , IL-15 (Girard *et al*, 1996), IL-4 (Girard et Paquin, Beaulieu, 1997), INF- γ , GM-CSF et G-CSF retarde l'apoptose des neutrophiles, bien que l'action de certaines cytokines semblent être controversée (Colotta *et al*, 1992, Brach *et al*, 1992, Lee, Whyte et Haslett, 1993). Par exemple, le TNF- α peut selon certains chercheurs retarder l'apoptose ou ne pas avoir d'effet sur ce phénomène (Murray *et al*, 1997, van den Berg *et al*, 2001,) tandis que d'autres affirment que cette cytokine joue un rôle critique dans l'induction de l'apoptose chez le neutrophile (Salamone, 2001, Yamashita *et al*, 1999). Toutefois, il semblerait que ce soit dépendant de la dose, i.e. qu'à basse concentration de TNF- α , il y a retard de l'apoptose (van den Berg *et al*, 2001). Certains médiateurs pro-inflammatoires (fMLP et C5a) peuvent aussi augmenter la concentration en calcium intracellulaire et contrairement aux autres cellules, cela a pour effet de retarder l'apoptose chez le neutrophile (Whyte *et al*, 1993). L'ajout de lipopolysaccharides (LPS) retarde ce phénomène et serait dû au fait qu'il y a engagement des intégrines puis de la chimiotaxie (Gabrilovich, 1999). Bloquer l'interaction du FasL avec son ligand (en le couplant au Ig) (Santos-Beneit et Mollinedo, 2001), un état d'hypoxie (Hannah *et al*, 1995) ou la présence d'antioxydant (catalase) peuvent également retarder cette mort cellulaire programmée. Et, bien évidemment, les inhibiteurs de caspases empêchent la progression vers l'état apoptotique.

2.4 Méthodes de détection de l'apoptose

On peut premièrement reconnaître une cellule apoptotique en microscopie optique. Contrairement aux autres cellules, les neutrophiles ne forment pas de corps apoptotiques. Visuellement, c'est plutôt grâce à la condensation de la chromatine, facilement observable, qu'on reconnaît un neutrophile apoptotique. Il est également facile de visualiser l'apoptose grâce à l'ADN spécifiquement fragmenté. L'apparition de brins

d'ADN formant une échelle sur gel d'agarose est caractéristique des cellules en apoptose. Ces coupures sur l'ADN sont effectuées entre chaque nucléosome, formant ainsi des multiples de 180 pb (Wyllie, 1985). L'utilisation des fragments d'ADN peut également servir à la technique du « TUNEL » (« Terminal deoxynucleotidyl transférase-mediated dUTP Nick End-Labeling ») qui consiste à marquer les brins aux extrémités avec des nucléotides spécifiques à l'aide de l'enzyme transférase désoxyribonucléotidyle terminale (Abbas, Lichtman, Pober, 1997). On peut également mesurer l'apoptose à l'aide de la cytométrie en flux en examinant le taux d'expression des phosphatidylsérines transloquées à la surface externe de la membrane en les couplant à l'Annexine-V (Homburg *et al*, 1995, Vermess *et al*, 1995). Chez les neutrophiles, il est couramment possible d'évaluer le taux d'apoptose en mesurant l'expression de CD16 qui se révèle être inversement proportionnelle au phénomène (Hart *et al*, 2000).

3. LE CYTOSQUELETTE

Durant ses différentes fonctions, la cellule adapte sa forme selon les besoins, comme c'est le cas par exemple lors de la chimiotaxie, de la diapédèse, de la phagocytose, de la division cellulaire ou encore de l'apoptose. Grâce aux nombreux filaments dont est constitué le cytosquelette, la cellule est tout à fait en mesure de réorganiser ses protéines convenablement en réaction aux stimuli extérieurs. De plus, le fait que le cytosquelette s'avère être le pilier de plusieurs voies de signalisation lui permet de réaliser des fonctions pléiotropiques indispensables pour une réponse cellulaire appropriée. Son association constante à la membrane cellulaire est importante afin de répondre aux signaux reçus par les récepteurs de surface (Carraway et Carraway, 2000). De ce fait, le cytosquelette joue donc un rôle essentiel dans la cellule : en plus de maintenir l'intégrité structurale de la cellule, il occupe une place importante dans plusieurs fonctions biologiques.

3.1 Généralités

Le cytosquelette est une structure fibrillaire contenue à l'intérieur du cytoplasme des cellules eucaryotes. En plus de jouer un rôle critique dans la détermination de la forme de la cellule, il permet un support interne aux différentes composantes de la cellule lui conférant ainsi son intégrité structurale. Il permet également le positionnement et le mouvement des composantes intracellulaires. C'est donc l'unique structure dans la cellule qui permet de mettre en contact les différentes organelles situées entre le noyau et la membrane externe (Bershadsky et Vasiliev, 1988).

Le cytosquelette participe également à tous les types de mouvements que la cellule peut exécuter comme la contraction musculaire, le battement de cils et de flagelles, le mouvement mitotique des chromosomes et plus encore.

Ainsi, afin de pallier toute éventualité, le cytosquelette se doit d'être une structure très dynamique. Par exemple, lors de la division mitotique ou lors de l'extension d'un pseudopode, certaines structures peuvent être formées *de novo* en une courte période de temps pour ensuite disparaître après avoir effectué leurs fonctions. Il permet ainsi de réguler plusieurs événements biochimiques importants dans les fonctions cellulaires (Bershadsky et Vasiliev, 1988).

Le cytosquelette est constitué principalement de trois types de filament : les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires (Edwards, 1994).

3.2 Les microfilaments

Les microfilaments (MF) forment une structure hautement dynamique composée majoritairement de filaments d'actine et possèdent un diamètre se situant entre 4 et 7 nm. L'actine est l'une des protéines intracellulaires la plus abondante dans les cellules eucaryotes (entre 1 % et 10 % des protéines totales). Cette structure est grandement impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires. En fait, elle semble être impliquée dans presque toute activité cellulaire requérant un mouvement ou des changements dans la forme cellulaire : contraction musculaire, motilité, mitose, intégrité cellulaire, phagocytose, sécrétion des granules, etc (Bershadsky et Vasiliev, 1988).

La forme globulaire (actine-G) peut être polymérisée en forme filamenteuse (actine-F). La présence de calcium, de magnésium ou de potassium est nécessaire à la polymérisation dans une solution faiblement ionique. Ainsi, en présence de sels et d'ATP, un monomère d'actine peut s'ajouter aux filaments d'actine. La polymérisation de l'actine se fait en deux phases : la nucléation qui consiste à former lentement un dimère d'actine puis l'élongation. Cette phase est beaucoup plus rapide que la nucléation et implique l'addition de nouveaux monomères d'actine au site de nucléation (Rogers, Morris et Blake, 1992). L'actine ainsi polymérisée ou dépolymérisée peut interagir avec différentes protéines nommées protéines liant l'actine («actin-binding proteins») ou aussi protéines associées aux MF (MFAPs) (voir figure 7). Ces protéines permettent de stabiliser le degré de polymérisation, la longueur et la distribution des filaments d'actine.

Elles permettent aussi la connexion entre l'actine, le cytoplasme et les composantes membranaires constituant ainsi un complexe tridimensionnel (Bershadsky et Vasiliev, 1988). On retrouve dans ce groupe, plus particulièrement chez le neutrophile, l' α -actinine, l'acumentine, la filamine, la gelsoline, la paxilline, la profiline, la myosine, la taline, la tropomyosine et la vinculine. Le tableau 6 nous renseigne sur leur rôle respectif à l'intérieur de la cellule (Kunze et Rüstow, 1993).

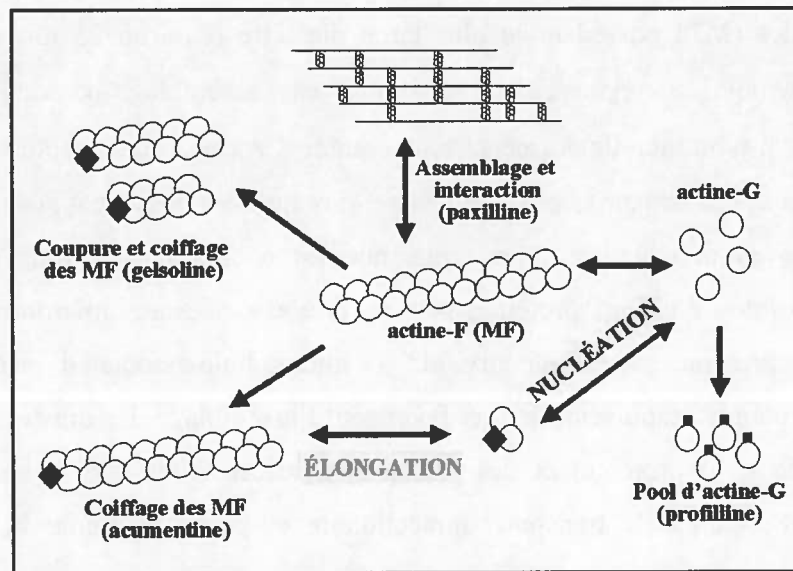


Figure 7 Organisation de l'actine et interaction avec les MFAPs (inspirée de Rogers, Morris et Blake, 1992)

Chez les neutrophiles, la gelsoline a été récemment identifiée comme un substrat de la caspase-3 (Deaton, Guerrero et Howard, 1992, Kwiatkowski, 1999, Kothakota *et al*, 1997). En présence de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et INF- γ), la gelsoline génère un fragment de 41 kD (Geng *et al*, 1998). C'est en présence de ces cytokines que la caspase est activée et qu'elle scinde la gelsoline. Le fragment de gelsoline perturbe le cytosquelette d'actine et ainsi provoque différents changements morphologiques associés à l'apoptose. Des chercheurs ont déjà observé que les cellules issues de tumeurs cancéreuses, déficientes en gelsoline, démontraient une résistance envers l'apoptose (Mielnicki *et al*, 1999, Habeck, 1999). Des expériences effectuées sur des souris

déficientes en gelsoline démontrent toute l'importance de cette protéine dans plusieurs fonctions comme l'apoptose ou la chimiotaxie. Par exemple, les cellules issues de ces souris sont plus réfractaires à l'apoptose et les neutrophiles ont de la difficulté à migrer. Ainsi, cette protéine est essentielle pour la chimiotaxie (Witke *et al*, 1995).

3.3 Les microtubules

Les microtubules (MT) possèdent le plus large diamètre (environ 25 nm) de tous les filaments des cellules eucaryotes. Ils sont formés par l'assemblage de sous-unités d' α -tubuline et de β -tubuline. Ils forment, tout comme l'actine, une structure hautement dynamique et sont des structures polaires, c'est-à-dire qu'elles possèdent des terminaisons inégales (positives et négatives). La croissance est habituellement plus rapide à la terminaison positive. Plusieurs protéines peuvent être associées aux microtubules et sont ainsi appelées protéines associées aux MT (« microtubule-associated proteins » ou MAPs). Ces protéines stabilisent, lient et favorisent l'assemblage des dimères (MAP, tau et isoformes de cette protéine) et des protéines motrices telles que la kinésine et la dynéine afin d'effectuer le transport intracellulaire et peut-être même la dynamique polymérisation/dépolymérisation (Bershadsky et Vasiliev, 1988).

Les MT, en association avec les MF, sont essentiels dans une variété de fonctions cellulaires fondamentales comme la motilité, le transport des molécules, la translocation des organelles, l'acquisition et le maintien de l'intégrité cellulaire ainsi que l'établissement de la machinerie mitotique. De part leur haute activité métabolique et leurs associations importantes, les MT sont les cibles de choix de plusieurs agents pharmacologiques (comme la colchicine) dirigés contre les maladies dégénératives et néoplastiques (Bershadsky et Vasiliev, 1988, Atencia, Asumendi et Gardia-Sanz, 2000). Ces médicaments sont en mesure d'induire l'apoptose par contre cette induction ne serait pas sous la garde des caspases mais régie par un autre système protéolytique (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000).

3.4 Les filaments intermédiaires

Le dernier type de filaments, les filaments intermédiaires (FI), possède un diamètre plus large que les MF mais inférieur à celui des MT, i.e. entre 8 et 12 nm. Contrairement aux MF et aux MT, les FI ne sont pas distribués ubiquitairement à l'intérieur des cellules eucaryotes. Par exemple, on n'a jamais démontré leur présence chez les protozoaires ni chez certaines lignées tumorales. Contrairement, aux deux autres types de filaments, les FI possèdent une grande stabilité chimique. Ainsi, lors d'extraction chimique, la plupart des composantes de la cellule, y compris les MF et les MT, sont supprimées laissant derrière elles le réseau de FI intact. Les FI demeurent le plus souvent associés au noyau (Bershadsky et Vasiliev, 1988).

Il existe cinq classes de FI: la vimentine, les protéines fibrillaires gliales acides (glial fibrillary acidic protein, GFAPs), la desmine, les neurofilaments et les kératines. La vimentine se retrouve dans les tissus mésenchymateux incluant les tissus conjonctifs, les os, le cartilage et les cellules sanguines. De tous les FI, seule la vimentine est présente chez les neutrophiles. La desmine est présente dans tous les muscles lisses et striés contrairement aux muscles vasculaires qui eux, contiennent de la vimentine. Les GFAPs sont surtout présentes chez les cellules astrogliales. Comme leur nom l'indique, les neurofilaments sont présents spécifiquement dans les neurones. Finalement, les kératines, qui représentent la plus grande famille, se retrouvent dans la plupart des tissus épithéliaux. Elles maintiennent l'intégrité de l'épithélium et détiennent les interactions protéine-protéine parmi les plus stables (Bershadsky et Vasiliev, 1988, Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000).

Certaines protéines peuvent se retrouver dans des préparations de FI. Ce sont les protéines associées aux FI (« intermediate filament-associated proteins » ou IFAPs). On retrouve donc la fillagrine ainsi que les protéines riches en cystéines qui sont associées aux kératines, de même que la synémine et la paranémine qui sont associées à la desmine et à quelques filaments de vimentine (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000). La plupart des FI sont assemblés en réseau. Les sous-unités nouvellement synthétisées sont rapidement incorporées dans les filaments. La destruction des MT par la colchicine

amène la vimentine à se rétracter et à s'accumuler autour du noyau. Des phosphorylations enzymatiques sur les FI peuvent aussi avoir lieu après activation biologique régulant ainsi les mécanismes d'assemblage. Une forte phosphorylation des neurofilaments semble être mise en corrélation avec une forte association entre les filaments (Bershadsky et Vasiliev, 1988). Des chercheurs ont observé que la vimentine était rapidement fragmentée par les caspases dans plusieurs types cellulaires et induisait l'apoptose (Buyn *et al*, 2001). Par contre, son action dans le neutrophile apoptotique n'a pas encore été investiguée.

3.5 Inhibiteurs des protéines du cytosquelette

Le tableau 5 présente certains déstabilisateurs des protéines du cytosquelette ainsi que leurs différents effets. Quelques-uns peuvent affecter d'autres composantes de la cellule autres que les protéines du cytosquelette. C'est le cas de la colchicine, utilisée pour traiter les désordres inflammatoires. En effet en plus de déstabiliser le réseau de microtubules, des chercheurs ont démontré qu'elle affectait également l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales via l'altération du nombre et/ou de la distribution des sélectines (Cronstein *et al*, 1995).

Drogues	Cibles	Effets	Références
Vinblastine, vincristine	MT	Inhibition de la polymérisation, formation d'agrégats cristallins	Bershadsky et Vasiliev, 1988
Taxol	MT	Stabilisation de la polymérisation	Bershadsky et Vasiliev, 1988
Colchicine	MT, vimentine, MF, myosine, α -actinine	Affecte l'organisation	Keller et Niggli, 1993
Colcémide, podophyllotoxine, nocodazole	MT	Affecte l'organisation, inhibe la polymérisation, bloque le cycle cellulaire et l'apoptose	Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000 Bershadsky et Vasiliev, 1988,
Cytochalasine B	Actine	Coiffe les extrémités aux sites de croissance, fragmente les filaments, inhibe le transport des sucres à travers la membrane	Carraway et Carraway, 2000, Bershadsky et Vasiliev, 1988

Tableau 5 Déstabilisateurs des protéines du cytosquelette

Groupe	Composante	Poids (kDa)	Fonction	Références
MF	Actine-G	42	Base des MF (actine-F)	Edwards, 1994
MFAPs	α -Actinine	220	Aide à la formation, scinde et ancre les MF	Edwards, 1994, Tempel <i>et al</i> , 1995
	Acumentine	65	Coiffe les extrémités d'actine	Edwards, 1994
	Ankirine (Syndéine)	200	Ancrage des MF	Bershadsky et Vasiliev, 1988
	Brévine	92	Coiffe les extrémités d'actine	
	Filamine	240-250	Branchement (ancrage) des MF	Edwards, 1994
	Fimbrine	68	Ancrage des MF	Bershadsky et Vasiliev, 1988
	Fodrine (Calspectine)	235-240	Ancrage des MF	
	Gelsoline	84	Coupe et coiffe les extrémités d'actine	Edwards, 1994
	Paxilline	68	Ancrage des MF	Turner, Glenney et Burridge, 1990
	Profiline	15	Maintient du pool d'actine-G, séquestration	Edwards, 1994
	Myosine	480	Lie l'actine-G et cause la contraction	
	Séverine	40	Coiffe les extrémités d'actine	Bershadsky et Vasiliev, 1988
	Spectrine	220-260	Ancrage des MF (unique chez GR)	
	Taline	47	Ancrage des MF	Beckerle et Yeh, 1990
	Tropomyosine	70	Stabilisation des MF	Edwards, 1994
Villine	92	Coiffe les extrémités d'actine	Bershadsky et Vasiliev, 1988	
Vinculine	130	Ancrage des MF	Edwards, 1994, Otto, 1990	
MT	α et β -Tubuline	50-55	Base des MT	Edwards, 1994
FI	Desmine	52	Intégrité dans les muscles	Bershadsky et Vasiliev, 1988
	GFAPs	50	Intégrité dans les cellules astrogliales	
	Kératines	40 à 70	Maintien de l'intégrité de l'épithélium	
	Neurofilaments	65, 105, 135	Intégrité dans les neurones	
	Vimentine	57-58	Formation d'un réseau dans plusieurs types cellulaires	Edwards, 1994

Tableau 6 Les protéines du cytosquelette et leurs fonctions principales (inspiré de Edwards, 1994)

4. LA *VISCUM ALBUM* AGGLUTININE-I

Bien que la VAA-I soit une agglutinine extraite de la lectine de la plante *Viscum album*, nous utiliserons la terminologie suivante : VAA-I pour *Viscum album* agglutinine-I afin d'alléger le texte.

L'efficacité d'un traitement réside dans l'activité très spécifique des molécules utilisées comme médicament (Sellers et Fischer, 1999). La VAA-I est une lectine de plante qui peut induire l'apoptose chez plusieurs types cellulaires incluant le neutrophile. Grâce à son action inhibitrice, elle pourrait combattre des maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde.

4.1 Généralités

Plusieurs protéines de plante se révèlent nocives en altérant le ribosome des eucaryotes. Ainsi, elle les rend incapables de lier le facteur d'élongation 2 et les empêchent de progresser à l'étape d'élongation dans la synthèse protéique. Ce sont des protéines qui inactivent le ribosome ou « ribosome-inactivating-proteins » (RIP). La plupart des RIP sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique (RIP de type I). Les RIP de types II sont quant à elles synthétisées avec une autre chaîne possédant une affinité pour les galactoses : la chaîne lectine. Les deux chaînes sont reliées ensemble par des ponts hydrogènes ainsi qu'un pont disulfure. Les RIP de type II sont beaucoup plus toxiques que les RIP de type I puisqu'elles peuvent plus aisément pénétrer à l'intérieur de la cellule via leur domaine lectine qui interagissent avec les sucres présents à la surface de la cellule. De récentes découvertes ont ravivé l'intérêt des RIP auprès de la communauté scientifique. En effet, leur activité antivirale a permis aux chercheurs de les utiliser en tant qu'agent potentiel afin de traiter le HIV. La puissante cytotoxicité fait des RIP d'excellents candidats afin de les utiliser comme des immunotoxines ou dans la synthèse de toxines (Stirpe *et al*, 1992).

4°C. Ces réactions servent à isoler la lectine en couplant ses sites d'affinité aux sucres avec les billes. Après chaque immunoprécipitation, une élution se réalise sur une colonne de résine puis de sucre (galactose et lactose). Le dernier éluat est neutralisé afin d'éviter l'inactivation de la lectine. Finalement, une dialyse est nécessaire afin d'enlever tout sucre et tout sel dans la préparation et obtenir une protéine purifiée. Il est possible d'effectuer la séparation *in situ* des deux sous-unités de la protéine en coupant les ponts disulfures avec du β -mercaptoéthanol et en effectuant une séparation chromatographique (Hajto, Hostanska et Gabius, 1989).

4.5 Activités biologiques de la VAA-I

La VAA-I possède deux domaines : un domaine enzymatique (chaîne A) de 29 kD qui contient une activité cytotoxique et un domaine lectine (chaîne B) de 34 kD qui possède deux sites de liaison au galactose (Bantel *et al*, 1999). La séquence en acides aminés dans les deux sous-unités chez la VAA-I est homologue à 61% avec la ricine (*Ricinus communis*) et 54% avec l'abrine (*Abrus precatorius*) (Krauspenhaar *et al*, 1999).

Afin d'inactiver le ribosome, la VAA-I doit être entièrement contenue à l'intérieur de la cellule. Son inclusion est facilitée grâce au domaine lectine qui lie les D-galactoses. Il y a alors agglutination des cellules (*in vitro*) et ceci lui permet de pénétrer à l'intérieur de la cellule par un phénomène d'endocytose. C'est dans l'appareil de Golgi qu'il y a dissociation des deux chaînes par des oxydoréductases. La chaîne A ainsi séparée détient maintenant la capacité de réaliser son action sur le ribosome. La chaîne A possède une activité N-glycosidase hautement spécifique pour l'ARN ribosomale. Elle coupe le lien glycosidique de l'adénosine en position 4323 dans la séquence GAGA à l'intérieur de la boucle en forme d'épingle à cheveux sur la sous-unité 28S de l'ARNr située à l'intérieur de la grosse sous-unité du ribosome (voir figure 8) (Krauspenhaar *et al*, 1999). Cette unique coupure rend l'unité 60S des ribosomes inapte à lier le facteur d'élongation 2 et à pour conséquence d'inactiver immédiatement la synthèse protéique. La présence d'une seule molécule de VAA-I est suffisante pour tuer une cellule puisque l'efficacité du procédé d'inactivation repose sur une base enzymatique.

4.2 Distribution

Les RIP sont présentes dans différentes parties de la plante. (voir tableau). Il est possible de retrouver plusieurs RIP à l'intérieur de la même plante. Il peut s'agir dans ces cas-ci de la même protéine sous des formes différentes (isoformes).

	PLANTE	SOURCE	NOM	RÉFÉRENCES
RIP de type I	<i>Hordeum vulgare</i>	Graines	RIP d'orge	Coleman et Roberts, 1982
	<i>Phytolacca americana</i>	Feuilles, racines, graines	PAP	Irvin, Kelly et Robertus, 1980
	<i>Saponaria officinalis</i>	Graines	Saporin 5,6, et 9	Stirpe <i>et al</i> , 1983
	<i>Triticum aestivum</i>	Germes	Tritine	Roberts et Stewart, 1979
	<i>Zea mais</i>	Graines	Corn RIP	Coleman et Roberts, 1982
RIP de type II	<i>Abrus precatorius</i>	Graines	Abrine	Olsnes et Pihl, 1973
	<i>Adenia digitata</i>	Racines	Modeccine	Barbieri <i>et al</i> , 1980
	<i>Adenia volkensii</i>	Racines	Volkensine	Stirpe <i>et al</i> , 1985
	<i>Ricinus communis</i>	Graines	Ricine	Olsnes et Pihl, 1973
	<i>Viscum album</i>	Feuilles	Viscumine ou VAA-I	Stirpe <i>et al</i> , 1980

Tableau 7 Les protéines inactivatrices du ribosome (inspiré de Stirpe *et al*, 1992)

4.3 Structure

Les RIP sont constituées de glycoprotéines. Les RIP de type I ont généralement un poids moléculaire qui se situe entre 26 et 32 kD, possèdent un point isoélectrique fortement alcalin et montrent une stabilité exceptionnelle vis-à-vis les agents dénaturants et les dégradations protéolytiques.

Les RIP de type II, composées de deux chaînes, sont synthétisées en une forme immature constituée d'une chaîne unique polypeptidique. Afin d'obtenir la forme mature de la protéine, une excision de 12 acides aminés entre les deux chaînes est nécessaire.

4.4 Purification de la VAA-I

La VAA-I est la RIP de type II qui a été utilisée pour le présent travail. Cette protéine est une lectine obtenue à partir d'extraits aqueux de la plante de gui. La purification de la protéine s'effectue en plusieurs étapes. Des étapes d'immunoprécipitations (billes de Sépharoses activées et couplées au lactose) ont lieu pour une période de douze heures à

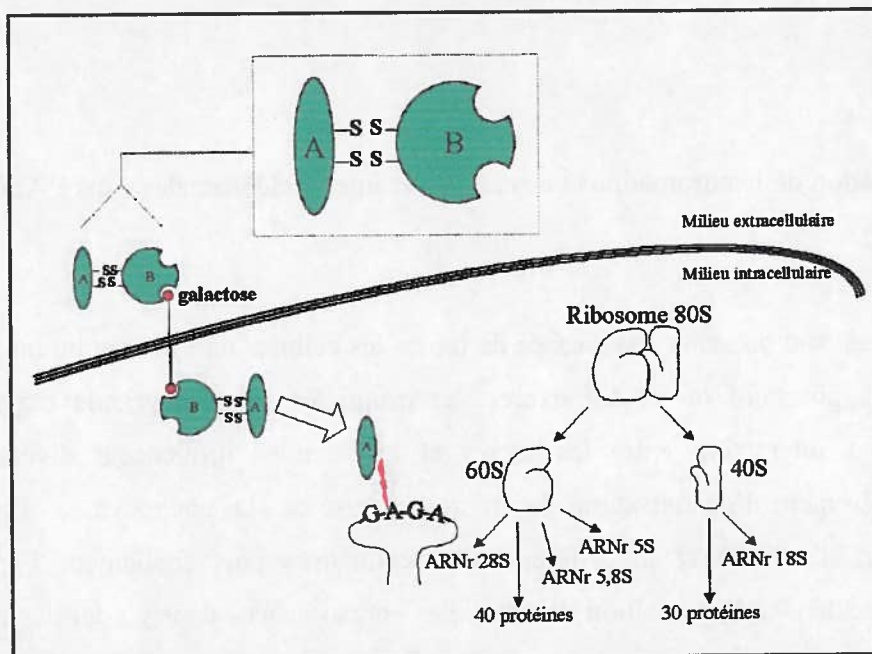


Figure 8 Mode d'action de la VAA-I sur le ribosome (inspirée de Stirpe *et al*, 1992, Horton *et al*, 1994)

En fonction de l'âge, de la source et de l'espèce, on retrouve au moins deux différentes isoformes de lectine chez la plante (Krauspenhaar *et al*, 1999). Dû à son importante action sur les ribosomes eucaryotes, la VAA-I est la RIP la plus utilisée pour lutter contre le cancer en empêchant les métastases. Des études *in vitro* et *in vivo* sur les animaux et les humains ont clairement démontré qu'à des doses non-toxiques la VAA-I augmente significativement le nombre et l'activation des cellules NK tout en augmentant la phagocytose des granulocytes et des monocytes (Krauspenhaar *et al*, 1999). De plus, lorsqu'incubées avec la VAA-I, les cellules monocytaires produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et le GM-CSF. La VAA-I semble également améliorer la qualité de vie des patients puisqu'elle provoque le relâchement de β -endomorphine dans le plasma, reconnue pour diminuer la réponse à la douleur dans le système nerveux central (Bantel *et al*, 1999).

Des études récentes concernant la cytotoxicité de la VAA-I contre les cellules lymphocytaires tumorales suggèrent que cette action puisse être médiée par l'induction de l'apoptose. En effet, lors d'incubations prolongées avec la VAA-I, les cellules adoptaient des caractéristiques typiques de l'apoptose comme un rapetissement de la cellule, une

condensation de la chromatine et des coupures internucléosomales dans l'ADN (Bantel *et al*, 1999).

Les sucres sont présents à la surface de toutes les cellules du système immunitaire. C'est d'ailleurs pourquoi la VAA-I exerce ses propriétés chez la grande majorité de ces cellules. L'interaction entre les sucres et les lectines influencent diverses activités particulièrement l'opsonisation de micro-organismes, la phagocytose, l'adhésion, la migration, l'activité et la différenciation cellulaires puis finalement l'apoptose. Le développement et l'acquisition de nouvelles connaissances dans ce dernier domaine ont permis de découvrir de nouvelles avenues dans le traitement et la prévention de maladies (Ni et Tizard, 1996). C'est ainsi que plusieurs chercheurs ont tenté d'élucider le potentiel modulateur de la VAA-I sur le système immunitaire, sachant que ses propriétés thérapeutiques sont utilisées depuis près d'une soixantaine d'années en Europe et plus particulièrement en Allemagne et en Suisse (Hajto, Hostanska et Gabius, 1989).

4.6 Réponses cellulaires produites par la VAA-I chez les cellules du système immunitaire

Il est possible de classer les réponses cellulaires médiées par la VAA-I en deux catégories distinctes, selon la dose administrée aux cellules. De plus, elle exerce des actions différentes entre les types cellulaires.

À des concentrations entre 1 ng/mL et 10 ng/mL, Hajto et collaborateurs (1990) ont remarqué que la VAA-I stimulait la sécrétion et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, soit l'IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , GM-CSF mais n'affectait pas l'expression de l'IL-2 ni de l'IL-5 chez les cellules mononucléées. L'IL-10 n'était quant elle stimulée qu'à 1 ng/mL tandis que l'IL-6 et l'INF- γ ne l'étaient qu'à 10 ng/mL (Hostanska *et al*, 1995). Cette étude a pu démontrer que la lectine exerce la stimulation de cytokines préférentiellement chez les cellules mononucléées. Des études effectuées sur des cellules NK, monocytes et granulocytes ont pu suggérer que l'effet de la VAA-I n'est pas réservé exclusivement aux cellules mononucléaires. En effet, elle stimule également l'activation

des lymphocytes T CD8⁺ et des NK et qui plus est une interaction encore plus spécifique chez les granulocytes (Hajto *et al*, 1997).

De plus, un traitement à la VAA-I chez des patientes atteintes du cancer du sein stimulait leurs lymphocytes et améliorait la réparation de l'ADN dans leurs lymphocytes (Kovacs, Hajto et Hostanska, 1991). Cela serait dû à plusieurs événements soit : la stimulation de leurs enzymes et aussi une augmentation dans le nombre de lymphocytes T, dans l'expression du récepteur à l'IL-2, ainsi que dans l'expression du HLA-DQ chez les cellules B (Beuth *et al*, 1992) et HLA-DR⁺ chez cellules T *in vitro* (Hostanska *et al*, 1995).

Des études ont également démontré que la VAA-I utilisée à 10 et 50 ng/mL, stimulait la sécrétion de l'IL-12 chez les cellules mononucléaires, les cellules NK et les splénocytes *in vitro* et *in vivo* (Hajto *et al*, 1998). Elle augmentait la migration des lymphocytes T (CD4⁺, CD8⁺) *in vitro* à une concentration allant jusqu'à 2 ug/mL (Werner, Zänker et Nicolai, 1998) tandis qu'à partir de 50 ug/mL elle stimulait la production de radicaux libres par la NADPH-oxydase également chez les granulocytes (Büssing *et al*, 1999) et qu'elle inhibait la synthèse protéique *de novo* chez les lymphocytes et les monocytes (Hostanska *et al*, 1996). Des variations dans le potentiel membranaire des mitochondries chez les lymphocytes ont également été mesurées. Ceci suggère que le cytochrome C relâché par cette déstabilisation ainsi que la production de radicaux libres sont en partie responsable de l'induction d'apoptose chez les lymphocytes puisque la réduction en synthèse protéique ne peut à elle seule conduire à l'apoptose (Büssing *et al*, 1999). En fait le cytochrome C activerait les caspases-8 et -3 via la caspase-9 afin d'induire l'apoptose chez les cellules T Jurkat et les lignées cellulaires B (Bantel *et al*, 1999).

Utilisée *in vitro* pendant 24 heures, la VAA-I induit l'apoptose de manière significative à partir de 10 ng/mL chez les cellules mononucléaires (Hajto *et al*, 1997), les lymphocytes, les cellules monocytaires THP-1 et les thymocytes murins (Hostanska *et al*, 1996-7). Des chercheurs ont pu remarquer cet effet en constatant l'expression diminuée de certaines

molécules de surface comme le CD4, le CD8, le CD19, le CD16 et le CD56 (Schmid, Uittenbogaart et Giorgi, 1994, Seth *et al*, 1997).

Sachant que la VAA-I peut induire l'apoptose chez de nombreuses cellules, et que l'apoptose est le phénomène par excellence qui permet à l'organisme de se débarrasser de l'excès de cellules, un certain intérêt s'est manifesté afin de découvrir les caractéristiques entraînées par l'induction de l'apoptose par la VAA-I chez les neutrophiles, acteurs essentiels dans l'inflammation. Ainsi, avec la VAA-I, il est envisageable d'accélérer la résolution de l'inflammation par l'induction de l'apoptose des neutrophiles.

Ainsi les chercheurs ont tout d'abord examiner l'effet de la VAA-I sur les neutrophiles. À partir de 25 ug/mL, la VAA-stimule certaines fonctions chez les granulocytes : la phagocytose, la respiration oxydative et à partir de 250 ug/mL, la VAA-I induit l'apoptose (Stein *et al*, 1999). A partir de 5 ug/mL et de façon dose-dépendante, il y a une induction de l'agrégation des neutrophiles ainsi qu'une forte production de radicaux libres (Timoshenko, Cherenkevich et Gabius, 1995, Timoshenko et Gabius, 1993) augmentée par l'addition de certaines molécules (FMLP, PMA, digitonine) (Timoshenko et Gabius, 1993).

La présente étude a été réalisée afin d'approfondir le mode d'induction de l'apoptose par la VAA-I chez les neutrophiles humains. Les objectifs étaient de savoir si la production de radicaux libres par la NADPH-oxydase était en partie responsable de l'apoptose et si une déstabilisation de la mitochondrie pouvait également être un acteur essentiel dans son induction via le relâchement de cytochrome C. Finalement des expériences ont été effectuées afin d'établir une meilleure compréhension de l'implication de certaines protéines du cytosquelette, structure très affectée lors de l'apoptose.

SECTION 2 Articles

1. ARTICLE 1

Titre

Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I)-induced human neutrophil apoptosis: VAA-I accelerates the loss of the antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of the cytoskeletal paxilin and vimentin proteins via caspases.

Auteurs

Valérie Lavastre, Martin Pelletier, Reinhard Saller, Katarina Hostanska et Denis Girard

Sous presse dans

Journal of Immunology (2001)

Contribution personnelle

Cet article est mon premier article principal. J'ai contribué à la réalisation de plus de 75% des figures (9/12). J'ai effectué les différentes expériences concernant l'emploi d'inhibiteurs tels l'acide bongkrélique, la catalase et la bréfeldine A. J'ai également travaillé sur l'utilisation de lignées cellulaires (PLB-985 et PLB-985 déficiente en gp91^{phox}) afin de confirmer la non-implication des radicaux libres dans l'induction de l'apoptose des neutrophiles par la VAA-I. Finalement, j'ai réalisé toutes les expériences sur le cytosquelette (cytométrie en flux et migration des protéines suivie d'immunobuvardages) afin d'établir son importance et son implication dans l'induction de l'apoptose. La fragmentation de certaines protéines du cytosquelette a pu nous renseigner davantage sur l'influence des caspases. En effet, l'ajout de l'inhibiteur de caspases clés (caspases-1,-3,-4 et -7), bloquant ainsi la fragmentation, a pu nous convaincre que cette dégradation était attribuable à ces caspases. J'ai aidé à la correction du manuscrit.

Contribution des co-auteurs

Martin Pelletier : Il a évalué l'expression de la protéine Mcl-1 à l'aide du SDS-PAGE et réalisé les analyses de densitométrie. Il a aussi aidé à la correction du manuscrit.

Reinhard Saller, Katarina Hostanska : Ils ont mesuré la déstabilisation mitochondriale à l'aide de fluorochromes (JC-1/DiOC₆) dont l'expression était évaluée par cytométrie en flux. Ils ont mesuré la production de radicaux libres en utilisant le 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate. Ils nous ont également fourni la VAA-I.

Denis Girard : Il a participé à la planification des expériences, aux analyses statistiques ainsi qu'à la réalisation du manuscrit.

1.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 1

La *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) est une lectine de plante qui possède un potentiel de propriétés thérapeutiques et des activités immunomodulatrices. Nous avons récemment démontré que la VAA-I est un puissant inducteur d'apoptose chez les neutrophiles humains mais les mécanismes impliqués dans ce phénomène demeurent encore nébuleux. Dans cette étude, nous avons démontré que la VAA-I altérait le potentiel membranaire des mitochondries et qu'elle augmentait la production intracellulaire de radicaux libres. Malgré ces observations, l'ajout d'un stabilisateur des membranes mitochondriales, l'acide bongkrélique ou l'addition de la catalase, connue pour dégrader les radicaux libres, n'ont pu inhiber l'induction de l'apoptose par la VAA-I. De plus, la VAA-I était en mesure d'induire l'apoptose chez une lignée cellulaire, les PLB-985, qui était déficiente en une sous-unité de la NADPH-oxydase, la gp91^{phox}. Ceci indiquait que la lectine induisait l'apoptose des neutrophiles par un mécanisme indépendant des radicaux libres. Le prétraitement des neutrophiles avec la bréfeldine A, inhibiteur de transport vésiculaire, a réussi à bloquer l'induction de l'apoptose par la VAA-I. L'expression de la protéine Mcl-1 était diminuée chez les neutrophiles apoptotiques. Le rôle des caspases dans la dégradation des protéines du cytosquelette pendant l'apoptose spontanée et induite par la VAA-I a également été étudié. La paxilline et la vimentine étaient grandement dégradées par la VAA-I comparativement aux neutrophiles dont l'apoptose était spontanée. Par contre, la VAA-I n'affectait pas l'expression de trois autres protéines soit, la vinculine, l' α - et la β -tubuline. Les caspases étaient impliquées dans la dégradation des protéines du cytosquelette puisque l'ajout d'un inhibiteur des caspases exécutrices (z-VAD-FMK) a pu rétablir le niveau d'expression des protéines natives. Nous avons donc conclu que la VAA-I doit être endocytée afin de médier l'apoptose et que son activité est indépendante d'un récepteur membranaire. Également, l'induction d'apoptose par la VAA-I est indépendante des mécanismes d'action impliquant les radicaux libres. Finalement, nous pouvons affirmer que les caspases sont impliquées dans la dégradation des protéines du cytosquelette dans l'apoptose spontanée et induite par la VAA-I.

1.2 TEXTE ORIGINAL DE L'ARTICLE 1

Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I)-induced human neutrophil apoptosis: VAA-I accelerates the loss of the antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of the cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases.*

Valérie Lavastre[†], Martin Pelletier[†], Reinhard Saller[‡] Katarina Hostanska[‡], and Denis Girard^{†§}

[†]From INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, Université du Québec, Pointe-Claire, PQ, Canada. [‡]From Department of Internal Medicine, University Hospital Zürich, Switzerland.

***This study was partly supported by Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). MP holds a PhD FRSQ-FCAR-Santé award and DG is a Scholar from FRSQ.**

§Correspondence to: Dr Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6.

Tel/Fax: (514) 630-8847/8850.

e-mail: Denis.Girard@INRS-Sante.Uquebec.ca

Running title: Degradation of cytoskeletal proteins by caspases in apoptotic neutrophils

ABSTRACT

Viscum album agglutinin-I (VAA-I) is a plant lectin that possesses interesting potential therapeutic properties and immunomodulatory activities. We have recently found that VAA-I is a potent inducer of human neutrophil apoptosis, but the mechanism(s) involved require further elucidation. In this study, we found that VAA-I alters mitochondrial transmembrane potential and increases intracellular levels of reactive oxygen species (ROS). Despite these observations, treatment with the mitochondrial stabilizer, bongkreikic acid, or with catalase, known to degrade H₂O₂, fail to reverse VAA-I-induced apoptosis. Moreover, VAA-I was found to induce apoptosis in PLB-985 cells deficient in gp91-phox, indicating that the lectin acts via a ROS-independent mechanism. Pretreatment of neutrophils with brefeldin A, an inhibitor of vesicular transport, was found to reverse VAA-I-induced apoptosis. Protein expression of Mcl-1 was decreased by VAA-I. The role of caspases in the degradation of cytoskeletal proteins during both spontaneous and VAA-I-induced neutrophil apoptosis was also investigated. Paxillin and vimentin were markedly degraded by VAA-I when compared to neutrophils that undergo spontaneous apoptosis, but not vinculin or α - and β -tubulin. Caspases were involved in cytoskeletal protein degradation since pre-incubation with the pan caspases z-VAD-FMK inhibitor was found to reverse protein cleavage. We conclude that VAA-I needs to be internalized to mediate apoptosis and that its activity is not dependent on a cell surface receptor-mediated pathway. Also, we conclude that VAA-I induces apoptosis by ROS-independent and Mcl-1-dependent mechanisms and that caspases are involved in cytoskeletal protein degradation in both spontaneous and VAA-I-induced neutrophil apoptosis.

catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), the small ribonucleoprotein U1-70 kDa and the NuMA protein (nuclear/mitotic apparatus) are not detected (18,19). Because of this, it is important to identify caspase substrates in these cells. Since we have recently demonstrated that gelsolin is fragmented by caspases in VAA-I-induced human neutrophils (16), we hypothesize that several other cytoskeletal proteins may be targets to caspases.

The present study was conducted in order to better elucidate the mechanisms involved during VAA-I-induced human neutrophil apoptosis in comparison with spontaneous apoptosis. We found that VAA-I alters mitochondrial permeability and increases intracellular ROS, and that its ability to induce neutrophil apoptosis requires its internalization, a process not dependent on a cell surface receptor-mediated pathway. We also found that Mcl-1 is an important target of VAA-I and that caspases are involved in the degradation of cytoskeletal proteins in both spontaneous and VAA-I-induced neutrophil apoptosis. In particular, the MFAP paxillin and the intermediate filament vimentin protein are very important in VAA-I-induced neutrophil apoptosis, but vinculin, α - and β -tubulin, are not.

¹**Abbreviations:** VAA-I, Viscum album Agglutinin-I; MFAP, microfilament-associated protein; ROS, reactive oxygen species; O_2^- , superoxide;

INTRODUCTION

Neutrophils are involved in the inflammation process and since clearance of apoptotic neutrophils by cells such as macrophages can lead to the resolution of inflammation (1-3), it is important to develop therapeutic strategies based on the activation of neutrophil apoptosis in order to reverse or attenuate an inflammatory response. In addition to inflammation, deregulation of normal cell turnover via modulation of apoptosis may lead to cancer or autoimmune diseases.

Extracts of mistletoe (*Viscum album*) have been widely used in adjuvant chemotherapy of human cancer. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I)¹ is a 63 kDa galactoside-specific plant lectin that belongs to the family of type II ribosome-inactivating proteins including abrin, modeccin, and ricin. The VAA-I molecule consists of two distinct subunits, the A chain (29 kDa) and the B chain (34 kDa). The A chain confers the property of the protein synthesis inhibitor to the VAA-I molecule by acting as a ribosome inactivating agent. This is due to RNA-glycosidase activity that inhibits N-glycosylation of a single adenine within a universally conserved GAGA sequence on the 28S rRNA (4,5). The B chain allows the VAA-I molecule to bind to terminal galactoside residues on membranes of various cells. VAA-I was recently found to act as a potent immunomodulator by activating different cell types (6-16). However, its interaction with human neutrophils has received little attention. This is intriguing since these cells are potent effectors of inflammation and are becoming increasingly recognized for their roles in anti-tumor reactions (17).

We have recently documented that VAA-I is a potent human neutrophil agonist (16). In particular, we have demonstrated that this lectin is a potent inducer of neutrophil apoptosis acting via inhibition of *de novo* protein synthesis and via activation of caspases that fragment gelsolin, a microfilament-associated protein (MFAP). Factors that modulate apoptosis and the execution phase of apoptosis may vary from cell to cell. In neutrophils, the common caspase substrates such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), the

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and agonists. The plant lectin VAA-I derived from *Viscum album* was isolated and purified as previously published (16). The caspases-1,-3,-4, and -7 inhibitor, z-VAD-FMK, was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). The following monoclonal antibodies to human cytoskeletal proteins were purchased from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO): anti-gelsolin (clone GS-2C4), anti-paxillin (clone PXC-10), anti- α -tubulin (clone B-5-1-2), anti- β -tubulin (clone 2-28-33), anti-vimentin (clone Vim 13.2), and anti-vinculin (clone Vin-11-5).

Culture of PLB-985 cells and human neutrophil isolation. PLB-985 and PLB-985 cells deficient in gp91-phox (X-CGD) (20) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma), at a cell concentration not exceeding 1.5×10^6 cells/ml. Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc, Qc), as previously described (16,21). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Cell viability (>98%) was monitored by Trypan blue exclusion and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Diff-Quick staining (16,21).

Cytofluorometric analysis of mitochondrial transmembrane potential. To evaluate mitochondrial membrane potential, cells (1×10^6 /ml) were incubated with the cationic dye JC-1 (5,5',6,6' -tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolo-carbocyanine iodide) (Molecular Probes, Eugene, USA) at a concentration of 1 μ M for 15 min at 37°C (22) or with the cationic fluorochrome DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) (Molecular Probes) at a concentration of 40 nM for 30 min at 37°C (22,23). The cells were then washed twice with PBS and analyzed by flow cytometry. Cells treated with 50 nM valinomycin (JURO, Lucerne, Switzerland) for 15 min were used as a control. The FACSCalibur was set up to measure forward and side scatters, green fluorescence (525 nm band pass), red fluorescence (FL2,590 nm band pass) for the change from JC-1

aggregate (red fluorescence) to monomer (green fluorescence) or DiOC6(3) green fluorescence (FL1, 530 nm). All flow cytometric analyses (10,000 events) were performed using CellQuest analysis software.

Measurement of intracellular reactive oxygen species. To determine potential intracellular increase levels of ROS induced by VAA-I, cells (1×10^6 cells/ml) were incubated for 3h with 1 or 10 $\mu\text{g/ml}$ VAA-I. Intracellular levels of ROS were detected with the use of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) (Molecular Probes) essentially as previously described (24). In brief, after stimulation, cells were washed with PBS and stained with the non-fluorescent cell permeable H_2DCFDA ($5\mu\text{g/ml}$) for 15 min at 37°C . The H_2DCF oxidizes rapidly to highly fluorescent DCF by ROS. As a positive control, the fluorescence intensity of cells pretreated with H_2DCFDA was measured in the presence of $30 \mu\text{M}$ H_2O_2 .

Apoptosis. Assessment of neutrophil apoptosis was performed essentially as previously described (16,21). Briefly, freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 24h in the presence or absence of 1000 ng/ml VAA-I. In order to investigate possible involvement of H_2O_2 during VAA-I-induced apoptosis, catalase (Sigma) was added in cultures. In other experiments, cells were pretreated 30 min with the inhibitor of vesicular transport brefeldin A (Sigma) or for 1h with the mitochondrial stabilizer bongkreikic acid (Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA) before VAA-I treatment. Cytocentrifuged preparations of neutrophils were performed with a Cyto-tek[®] centrifuge (Miles Scientific, IN, USA), as previously described (16,21) and were stained with a Diff-Quick staining kit (Baxter, FL, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were examined by light microscopy at a final 400X magnification, and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristically dark stained pyknotic nuclei. Results were expressed as percentage of cells in apoptosis. PLB-985 and X-CGD cell apoptosis were assessed as above, but cells were incubated at 1×10^6 cells/ml.

Mcl-1 expression. Neutrophils (10×10^6 cells/ml RPMI-Hepes-P/S) were stimulated 24h with buffer, GM-CSF (65 ng/mL) or VAA-I (1000 ng/mL) and were harvested and washed twice with cold PBS. Whole cell lysates were prepared as previously published (16,25). Proteins (1×10^6 cells/well) were separated using 10% SDS-polyacrylamide mini gels and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked overnight with 3% nonfat dry milk (Carnation, Don Mills, ONT) at 4°C in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20). Mcl-1 antibody (K-20 clone from Santa Cruz Biotechnology) was added at a final dilution of 1:200 in TBS-Tween + 3% nonfat dry milk for 1h at room temperature. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated for 1h at room temperature with a goat anti-rabbit-horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1:20,000 in TBS-Tween + 3% nonfat dry milk followed by washes. The Mcl-1 protein was revealed with ECL and quantified using a Fluor-S MultiImager (Bio-Rad) and the Multi-Analyst version 1.1 program (Bio-Rad).

Intracellular staining of neutrophil cytoskeletal proteins by flow cytometry. Freshly isolated cells were incubated in the presence or absence of 1000 ng/ml VAA-I for 24h as for the apoptosis assay. Cells were then washed, and cell concentration was adjusted to 1.5×10^6 cells/150 μ l and simultaneously permeabilized and fixed for 5 min with a mixture of 0.05% digitonin-1.9% paraformaldehyde, a mixture known to preserve cytoskeletal proteins and to allow excellent staining (26,27). Immediately after this incubation, all the corresponding tubes were filled with 4 ml ice cold PBS and washed twice. Cell pellets were suspended in 100 μ l and incubated for 30 min at 4 °C with a specific anti-human cytoskeletal protein mAb at a final concentration of 1:50. Cells were then washed twice and incubated with FITC-goat anti-mouse IgG antibody (1:50) for an additional 30 min at 4 °C, light protected. Cells were then washed and analyzed by flow cytometry (10,000 events) using a FACscan flow cytometer (Becton Dickinson). In preliminary experiments, cells were pre-incubated for 30 min with 20% autologous serum to prevent any possible non specific binding via Fc receptors. We obtained similar results whether cells were pre-treated or not with 20% autologous serum (*data not shown*). This reinforces the choice of our fixation/permeabilization procedure used to ensure suitable

intracellular staining of cytoskeletal proteins. Because of this, we then omitted this step for all other experiments. The mean fluorescence intensity (MFI) obtained for a particular cytoskeletal protein from untreated control cells (from which the MFI obtained with the conjugated alone was deduced) was subtracted to the MFI obtained from VAA-I treated cells. Results are expressed as a decrease of fluorescence (MFI untreated - MFI treated cells).

Degradation of cytoskeletal proteins. Neutrophils (10×10^6 cells/ml in 24 well plate) were incubated with or without 1000 ng/ml VAA-I in the presence or absence of z-VAD-FMK or its diluent (< 1% DMSO) for the indicated period and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer. In some experiments, cells were pre-incubated for 1h with the diluent or z-VAD-FMK prior to an additional 23h of incubation (total period of 24h). Results were similar whether or not cells were pre-treated 1h with z-VAD-FMK (*data not shown*). Therefore, in subsequent analyses, we omitted the pre-incubation step. Aliquots corresponding to 225,000 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred from gel to PVDF membranes (17). Nonspecific sites were blocked with 1% BSA in TBS-Tween overnight at 4 °C. Membranes were incubated with monoclonal anti-human cytoskeletal antibodies [anti-gelsolin (1:1500); anti-vimentin (1:1000); anti-vinculin (1:150); anti-paxillin (1:500); anti- α -tubulin (1:500); or anti- β -tubulin (1:500)], for 1h at room temperature followed by washes, and incubated with a horseradish peroxidase-labeled sheep anti-mouse IgG (1:20,000) (Bio/Can) for 1h at room temperature in fresh blocking solution. Membranes were washed three times with TBS-Tween, and bands were revealed with the enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection system (Amersham, Pharmacia Biotech Inc). Protein loading was verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows Version 2.0 with a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

VAA-I induces a depolarization of mitochondrial membrane. **Fig. 1** illustrates that VAA-I alters mitochondrial membrane since a depolarization was observed by flow cytometry using the JC-1 dye. We have also observed a VAA-I-induced depolarization using the dye DiOC₆(3) (*data not shown*), but its use was recently found to be more reliable for analysis of plasma membrane potential rather than mitochondrial potential. As expected, valinomycin was found to markedly induce a depolarization of mitochondrial membrane. No major changes were observed with the use of a low VAA-I concentration (1-100 ng/ml) (*data not shown*), a condition that does not affect neutrophil apoptosis (16). We have previously reported that VAA-I induces apoptosis in virtually all cells after a 24h incubation period with a concentration of 1000 ng/ml (16). Here, even at a concentration of 10 µg/ml VAA-I, we did not observe a greater mitochondrial membrane depolarization (**Fig 1**). Neutrophils were incubated for 6h in these experiments, based on our previous FITC-annexin-V binding results (16).

Mitochondrial stability does not inhibit VAA-I-induced neutrophil apoptosis. Bongkreik acid (BA) is known to stabilize the mitochondrial membrane, preventing its disruption. This product was recently found to inhibit anti-Fas-induced neutrophil apoptosis when cells were pre-incubated 1h with 62 µM BA (28). We have used BA under the same conditions, and found that it cannot reverse the effect of VAA-I (**Fig. 2**). In two separate experiments, we observed that the anti-Fas antibody-induced apoptosis was reduced from 65 to 38% and from 75 to 62% with the use of BA (*data not shown*). This correlates well with data previously reported (28).

VAA-I increases the production of reactive oxygen species. Because ROS are known to be involved in neutrophil apoptosis (29,30), we then decided to verify if VAA-I can increase ROS. As illustrated in **Fig. 3**, VAA-I can increase intracellular ROS in human neutrophils. However, this was not observed with lowest VAA-I concentrations (*data not shown*), correlating again with the lack of induction of apoptosis at lower concentrations (16).

Production of ROS by VAA-I is not linked to induction of apoptosis. Although we found that VAA-I increased intracellular ROS production, we had previously failed to detect extracellular O_2^- production in VAA-I-induced neutrophils as assessed by a colorimetric method based on the reduction of ferrocytochrome *c* (*unpublished observation*). Therefore, we were interested in determining whether or not intracellular ROS are involved in VAA-I-induced neutrophil apoptosis which we studied by adding catalase to the cultures. Catalase is an inhibitor known to degrade H_2O_2 that is rapidly generated by superoxide dismutase when O_2^- is produced. As illustrated in **Fig. 4A**, addition of a non toxic catalase concentration (2000 U/ml) did not prevent VAA-I-induced apoptosis. In fact, the VAA-I-induced response was completely unaffected. This is in contrast to toxaphene (Sigma), a chlorinated hydrocarbon insecticide, that we recently identified as a potent inducer of human neutrophil apoptosis and a very potent activator of O_2^- production detected colorimetrically as described above (31). Note that, as expected, addition of catalase in normal neutrophils undergoing spontaneous apoptosis was also diminished. This is in agreement with others (29). Addition of catalase up to 5000 U/ml did not cause any reversible effects (*data not shown*).

We then examined whether or not VAA-I could induce apoptosis in PLB-985 and X-CGD cells. As illustrated in **Fig. 4B**, VAA-I induced apoptosis in both types of cells as assessed by cytology and by the degradation of paxillin, known to be fragmented in human neutrophils (this report). This reinforces our conclusion that VAA-I does not induce apoptosis via ROS production.

Brefeldin A reverses the VAA-I-induced neutrophil apoptosis response. VAA-I is a lectin known to be internalized and which inhibits protein synthesis. Because of this, we next decided to use an inhibitor of vesicular transport, brefeldin A, and try to inhibit VAA-I-induced apoptosis. As illustrated in **Fig. 5**, pre-treatment of cells with brefeldin A inhibited the ability of VAA-I to induce neutrophil apoptosis. This indicates that VAA-I needs to be internalized to mediate its effect and that induction of apoptosis by this lectin is not dependent on a cell surface receptor-mediated pathway, but rather is linked to its

ability to inhibit protein synthesis, since the lectin needs to be internalized to dissociate, leading to ligation of the A chain to the ribosome.

VAA-I decreases the expression of the antiapoptotic Mcl-1 protein. In order to better understand how VAA-I induces neutrophil apoptosis, we then investigated the influence of this lectin on the expression of the recently identified new Bcl-2 family member, Mcl-1. This protein is known to protect against apoptosis and was recently found, unlike Bcl-2, to be expressed in human neutrophils (32,33). As illustrated in Fig. 6, VAA-I down-regulates Mcl-1 expression in human neutrophils. As expected, GM-CSF, known to delay apoptosis, was found to prevent the loss of Mcl-1 protein when compared to control cells (33).

Use of flow cytometry to evaluate cytoskeletal protein content. We recently found that the MFAP gelsolin is degraded following VAA-I treatment, via a caspase-dependent mechanism (16). Kothakota *et al* (1997), have clearly identified that the fragmentation of gelsolin is caspase-3-dependent (34). Because VAA-I is known to modulate different neutrophil responses involving cytoskeleton rearrangements, such as those which occurs during apoptosis, we decided to study if other cytoskeletal proteins can be targets of VAA-I. We first evaluated the protein content by a flow cytometric approach in order to answer whether or not VAA-I alters the expression of a particular protein in comparison with normal neutrophils undergoing spontaneous or constitutive apoptosis. Proteins belonging to the MFAP (gelsolin, paxillin and vinculin), intermediate filament (vimentin) or microtubule (α - and β -tubulin) families were selected in the present study based on their importance in neutrophil cell physiology (35-42). As illustrated in Fig. 7, we found that VAA-I-induced neutrophils express less gelsolin, paxillin, and vimentin when compared to 24h-aged cells (or spontaneous apoptosis). Vinculin and both α - and β -tubulin protein expression did not differ between the two treatments. Our results demonstrate that VAA-I induces the degradation of gelsolin, paxillin and vimentin but not vinculin nor α - and β -tubulin.

Degradation of microfilament associated proteins induced by VAA-I. We then confirmed the above flow cytometric results by studying the degradation of the cytoskeletal proteins as well as the possible involvement of caspases in this response. As illustrated in **Fig. 8A**, paxillin was degraded by VAA-I over time. The corresponding Coomassie blue stained membrane, shown in the bottom panel, indicates that equivalent amounts of protein were loaded, reinforcing the disappearance of paxillin. The paxillin antibody used is known to react with at least two paxillin polypeptides with molecular masses of 68 and 40 kDa (43,44). Our results are in agreement with this and VAA-I seems to preferentially degrade the bottom 40 kDa polypeptide. This latter was only barely detectable after 18h despite equivalent protein loading (Coomassie blue staining). Note however, that we also detected two other polypeptides between the 68 and the 40 kDa bands. This may explain why others have detected a smear rather than the two distinct bands (43,44). Interestingly, an unidentified ~10 kDa fragment was detected over time, with maximal staining after 18h, independent of the VAA-I treatment. This is probably a paxillin degradation product, since it was not detected by the other anti-cytoskeletal antibodies used in this study. Curiously, this fragment was still detected when z-VAD-FMK was added to the cultures, suggesting that its fragmentation does not originate from the activity of caspases-1,-3,-4 or-7. However, addition of z-VAD-FMK prevents the degradation of paxillin (68 and 40 kDa bands and those between) in a concentration-dependent manner (**Fig. 8B**). The signal intensity was reestablished near its initial value (lane "1" in **Fig. 8B** vs lane "2" in **Fig. 8A**). Our results indicate that paxillin, as gelsolin (16), is another MFAP degraded by VAA-I via caspases.

Using a similar approach, we found that, unlike paxillin, vinculin was not degraded by VAA-I treatment when compared to normal 24h-aged neutrophils, despite the fact that ~100% of cells were apoptotic after VAA-I treatment (**Fig. 8C**). Addition of z-VAD-FMK to the culture prevents the loss of vinculin expression and reestablishes its expression to near the levels observed in fresh neutrophils (**Fig. 8D**). These results are in agreement with the flow cytometric data obtained (**Fig. 7**).

Major components of microtubules are not degraded by VAA-I. We were then interested in answering whether or not the two major microtubule proteins, α - and β -tubulin were targets of VAA-I. As illustrated in **Fig. 9A**, α -tubulin expression decreases over time at similar rate, whether or not cells were treated with VAA-I. Similar results were obtained for β -tubulin (*data not shown*). Addition of z-VAD-FMK did not prevent α -tubulin degradation under any conditions (**Fig 9B**), and this was also observed with β -tubulin (*data not shown*). Our results indicate that, with respect to α - and β -tubulin, microtubules are not an important target of VAA-I and their progressively decreasing expression is not caspase-dependent. This is in agreement with the results of Atencia *et al* (2000), who reported that cleavage of tubulin is independent of ICE-like proteases (45). Again, our immunoblot results correlate well with those obtained using the flow cytometric approach.

VAA-I induces the degradation of intermediate filament of the vimentin type in neutrophils. We also investigated the role of intermediate filaments in spontaneous and VAA-I-induced neutrophil apoptosis. In human neutrophils, intermediate filaments are of vimentin type (39,40). This explains why we decided to monitor potential degradation of this protein. As illustrated in **Fig. 9C**, vimentin expression was markedly decreased over time by VAA-I treatment and its expression was undetectable after 24h. Addition of z-VAD-FMK in the culture prevents vimentin degradation attesting to the important role of caspases during this process (**Fig. 9D**). These results correlate well with the marked differences in protein content detected by flow cytometry between spontaneous and VAA-I-induced neutrophil apoptosis (**Fig. 7**).

DISCUSSION

This study was performed in order to better understand the mechanisms by which VAA-I can induce neutrophil apoptosis. In addition, since it was previously reported that the MFAP gelsolin was found to be fragmented by caspase-3 during neutrophil apoptosis (34), and because we have recently found that this phenomenon also occurs in VAA-I-induced human neutrophils (16), we were interested in investigating the role of caspases in the degradation of other cytoskeletal proteins during both VAA-I-induced and spontaneous apoptosis.

We found that VAA-I alters mitochondrial potential, induces ROS production and the loss of Mcl-1 protein, and that caspases are involved in the degradation of gelsolin, paxillin and vimentin during apoptosis. However, VAA-I did not accelerate the degradation of α -tubulin, β -tubulin and vinculin when compared to neutrophils undergoing spontaneous apoptosis. Our results have identified two novel caspase substrates, namely, paxillin and vimentin, involved in VAA-I-induced neutrophil apoptosis. It is presently difficult to directly link the ability of VAA-I to induce neutrophil apoptosis with the classical cytochrome c release observed in other cell types, since there is currently no clear evidence that cytochrome c is released in apoptotic neutrophils. We failed to detect cytochrome c release in VAA-I induced neutrophils using a commercially available ELISA kit (*unpublished data*). Recently, using an interesting model, cytochrome c was found to be released in apoptotic neutrophils, but these cells have to be pre-treated at 15 °C for several hours (46), a situation that is unlikely to occur under normal physiological conditions. Involvement of cytochrome c in neutrophil apoptosis is still unclear and requires further investigation. It is well accepted that the proto-oncogene Bcl-2 is thought to control mitochondrial permeability transition, allowing the release of cytochrome c. The fact that mature human neutrophils do not express Bcl-2 could also, in addition to their few number of mitochondria reported, partly explain the poor ability of these cells to release cytochrome c. In recent years, other interesting Bcl-2 related members have been discovered and their expression at the protein and/or gene level has been detected in various cell types, resulting in the classification of a Bcl-2 protein

family. Among these members, some are inhibitors (Bcl-2, Bfl-1, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1) while others are inducers of apoptosis (Bcl-X_s, Bad, Bak, Bax, Bik) (32,33,48,49). In studies of human neutrophils, there are still some ambiguities concerning the expression of some of these Bcl-2 members.

In neutrophil cell physiology, the role of the Bcl-2 family of proteins in regulating the apoptotic rate is gaining increasing attention. Among them, Mcl-1 was recently found to be expressed in human neutrophils and its expression declined as neutrophils underwent apoptosis (32,33). Agents that promote neutrophil survival such as GM-CSF, sodium butyrate, IL-1 β and LPS were found to prevent the loss of Mcl-1 expression (33). Herein, we found that VAA-I accelerates the loss of Mcl-1 protein when compared to neutrophils undergoing spontaneous apoptosis. Our results are in agreement with the fact that VAA-I, like other RIPs, acts as an inhibitor of protein synthesis (5,16). Mcl-1 appears to have a very short half-life due to the presence of PEST sequences and Arg:Arg motifs that favor its proteolysis (47). Recently, the antisense oligonucleotide strategy for reducing Mcl-1 availability in human neutrophils was used and Mcl-1 was found to be necessary for delay of spontaneous or constitutive apoptosis (32). This attests to the importance of this antiapoptotic protein in human neutrophil cell physiology. During hypoxia, Mcl-1 expression is augmented and this was found to correlate with hypoxia-induced inhibition of apoptosis (32). We found that the VAA-I molecule induced such a response when compared to spontaneous apoptosis. This indicates that monitoring Mcl-1 expression in neutrophils is certainly a good marker of apoptosis as a decrease correlates well with induction of apoptosis.

Neutrophils isolated from CD95 deficient mice (lacking Fas) were found to undergo spontaneous apoptosis at the same rate as neutrophils from wild type mice, in contrast to a putative role of Fas during constitutive apoptosis (50,51). In this report, we found that pre-treatment of cells with brefeldin A, an inhibitor of vesicular transport, could inhibit the ability of VAA-I to induce neutrophil apoptosis. This indicates that VAA-I needs to be internalized for mediating its effect and that induction of apoptosis, by this lectin, is not dependent on a cell surface receptor-mediated pathway. This correlates well with our

previous observation that VAA-I does not induce tyrosine phosphorylation (16), a situation which occurs after receptor binding. In addition, recent results from our laboratory indicate that VAA-I does not induce threonine or serine phosphorylation events in human neutrophils (*manuscript accepted for publication*). The ability of VAA-I to induce apoptosis independent of receptor expression has also been reported by others, but only in leukemic T- and B-cell lines (52).

ROS are known to be involved in neutrophil apoptosis (29,53). H_2O_2 was found to increase both spontaneous and Fas-mediated apoptosis in neutrophils isolated from patients with chronic granulomatous disease, a hereditary defect in ROS production (30). The role of intracellular H_2O_2 -induced production by PMA or ionomycin in normal human neutrophils was correlated with induction of apoptosis, whereas the inability of fMLP to induce apoptosis was associated with the extracellular production of H_2O_2 (54). Although we found that VAA-I increases intracellular ROS production in human neutrophils, reduction of ROS by addition of catalase in the culture did not attenuate the ability of VAA-I to induce apoptosis. This suggests that this lectin does not induce neutrophil apoptosis via intracellular ROS production. In addition, VAA-I was found to induce apoptosis in promyelocyte PLB-985 cells as well as in X-CGD cells, confirming that ROS are not involved. We hypothesize that VAA-I accelerates apoptosis by shutting down the synthesis of proteins, including the antiapoptotic Mcl-1.

Caspases are known to be crucial mediators of apoptosis by catalyzing the cleavage of an increasing number of proteins. Among them, some are cytoskeletal proteins such as α -fodrin, gelsolin, Gas2, α II- and β II-spectrin, lamin A, keratins, and vimentin (34,56-61). In human neutrophils, caspases represent a central mechanism for both spontaneous and Fas antibody-induced apoptosis. To date, in human neutrophils, only the MFAP gelsolin was found to be a substrate for caspases (34). Actin is known to be cleaved during spontaneous neutrophil apoptosis, but this protein was not found to be a caspase substrate (55). Similarly, we found that the degradation of vinculin and α - and β -tubulin is not accelerated by VAA-I and that caspases do not seem to play an important role in their degradation during spontaneous apoptosis. In contrast, in addition to gelsolin,

we found that paxillin and vimentin are two other important targets for VAA-I and their degradation is completely blocked by z-VAD-FMK. This indicates that caspases are highly involved in this process. In addition, caspases were also found to be involved in paxillin and vimentin degradation during constitutive apoptosis. Our results demonstrate the existence of a certain selective process for cytoskeletal protein degradation by caspases. Recently, two distinct pathways leading to nuclear apoptosis, one being caspase-dependent and the other being caspase-independent, were established in mouse embryonic fibroblasts (62). Here, we provide further evidence that the pathways involved during spontaneous and VAA-I-induced human neutrophil apoptosis are caspase-dependent. We believe that the degradation of vimentin is more altered than paxillin since, unlike MFAPs, vimentin expression cannot be compensated by other candidates of the intermediate filament since it is the only candidate expressed in neutrophils. In the same vein, probably intermediate filaments are a less dynamic structure than microfilaments known to be composed with several proteins.

In summary, we found that VAA-I induces neutrophil apoptosis via a particular pathway. The lectin does not appear to induce phosphorylation events (16) and this correlates well with the absence of a receptor-induced apoptosis pathway. The lectin needs to be internalized and its ability to inhibit protein synthesis is linked to induction of apoptosis. This correlates well with the loss of Mcl-1 protein expression. Although the lectin induces a depolarization of the mitochondrial membrane and increases intracellular ROS production, it does not induce apoptosis via the mitochondria-cytochrome c release pathway. Finally, we can conclude that the lectin utilizes the caspase-dependent pathway for induction of apoptosis, and that gelsolin, paxillin and vimentin are three important caspase substrates.

The plant lectin VAA-I act as a very potent inducer of neutrophil apoptosis and this offers an interesting potential therapeutic strategy in treatment of inflammatory disorders. Our results allow a better understanding of its mode of action in inducing neutrophil apoptosis. In addition, our results help for elucidate the role of the cytoskeleton and

caspses during spontaneous apoptosis in neutrophils. This is of significant for both general biology and medicine.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Yves Pommier (National Cancer Institute, Bethesda) for donation of the PLB-985 and X-CGD cell lines (20) and Mary Gregory for reading this manuscript.

REFERENCES

1. Savill, J. 1997. Apoptosis in resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 61:375.
2. Ren, Y., and J. Savill. 1998. Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell Death Differ.* 5:563.
3. Savill, J., and C. Haslett. 1995. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol.* 6:385.
4. Endo, Y., K. Tsurugi, and H. Franz. 1988. The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett.* 231: 378.
5. Dietrich, J. B., G. Ribéreau-Gayon, M. L. Jung, H. Franz, J. P. Beck, and R. Anton.. 1992 Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. *Anticancer Drugs* 3: 507.
6. Hostanska, K., T. Hajto, K. Weber, J. Fischer, H. Lentzen, B. Sütterlin, and R. Saller. 1996-97. A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Nat. Immun.* 15: 295.
7. Hostanska, K., T. Hajto, G. C. Spagnoli, J. Fischer, H. Lentzen, and R. Herrmann. 1995. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat. Immun.* 14: 295.

8. Vehmeyer, K., T. Hajto, K. Hostanska, S. Könnemann, H. Löser, R. Saller, and B. Wörmann. 1998. Lectin-induced increase in clonogenic growth of haematopoietic progenitor cells. *Eur. J. Haematol.* 60: 16.
9. Hajto, T., K. Hostanska, K. Frei, C. Rordorf, and H. J. Gabius. 1990. Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 50: 3322.
10. Hajto, T., K. Hostanska, K. Weber, H. Zinke, J. Fischer, U. Mengers, H. Lentzen, and R. Saller. 1998. Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Immun.* 16: 34.
11. Kovacs, E., T. Hajto, and K. Hostanska. 1991. Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscador). *Eur. J. Cancer* 27: 1672.
12. Hajto, T., K. Hostanska, J. Fischer, and R. Saller. 1997. Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anticancer Drugs*, 8 Suppl 1: S43.
13. Timoshenko, A. V., and H. J. Gabius. 1993. Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from *Viscum album*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374: 237.
14. Hajto, T., K. Hostanska, and H. J. Gabius. 1989. Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vivo* in rabbit and patients. *Cancer Res.* 49: 4803.

15. Timoshenko, A. V., S. N. Cherenkevich, and H. J. Gabius. 1995. *Viscum album* agglutinin-I-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. *Biomed. Pharmacother.* 49: 153.
16. Savoie, A., V. Lavastre, M. Pelletier, T. Hajto, K. Hostanska and D. Girard. 2000. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 68:845.
17. Di Carlo, E., G. Forni, P. L. Lollini, M. P. Colombo, A. Modesti, and P. Musiani. 2001. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood*, 97: 339.
18. Sanghavi, D. M., M. Thelen, N. A. Thornberry, L. Casciola-Rosen, and A. Rosen. 1998. Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Let.t.*, 422: 179.
19. Bhatia, M., J. B. Kirkland, and K. A. Meckling-Gill. 1995. Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. *Biochem J.* 308:131.
20. Hiraoka, W., N. Vazquez, W. Nieves-Neira, S. J. Chanock, and Y. Pommier. 1998. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 102:1961.
21. Girard, D., M. E. Paquet, R. Paquin, and A. D. Beaulieu. 1996. 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.* 88:3176.
22. Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, D. Dacaudin, A. Macho, T. Hirsch, S. A. Susin, P. X. Petit, B. Mignotte and G. Kroemer. 1995. Sequential reduction of

- mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182:367.
23. Miccoli, L., A. Beurdeley-Thomas, G. De Pinieux, F. Sureau, S. Oudard, B. Dutrillaux and M. F. Poupon. 1998. Light-induced photoactivation of hypericin Affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria. *Cancer Res.* 58:5777.
24. Miyajima, A., J. Nakashima, M. Tachibana, H. Tazaki and M. Murai. 1997. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br. J. Cancer.* 76:206.
25. Girard, D., R. Paquin, P.H. Naccache, and A. D. Beaulieu. 1996. Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. *J. Leukoc. Biol.* 59: 412.
26. Girard, D, and J. L. Senécal 1996. A Novel anti-microfilament antibody, anti-135 kD, is associated with Raynaud's disease, undifferentiated connective tissue disease and systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity* 24: 167.
27. Girard D, and J. L. Senécal. 1995. Anti-microfilament IgG antibodies in normal adults and in patients with autoimmune diseases: immunofluorescence and immunoblotting analysis of 201 subjects reveals polyreactivity with microfilament-associated proteins. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 74: 193.
28. Watson, R. W., A. O'Neill, A. E. Brannigen, R. Coffey, J. C. Marshall, H. R. Brady, and J. M. Fitzpatrick. 1999. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Lett.* 453: 67.
29. Fadeel, B., A. Ahlin, J. I. Henter, S. Orrenius and M. B. Hampton. 1998. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood.* 92: 4808.

30. Kasahara, Y., K. Iwai, A. Yachie, K. Ohta, A. Konno, H. Seki, T. Miyawaki, and N. Taniguchi. 1997. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood*. 89:1748.
31. Gauthier, M., C. J. Roberge, M. Pelletier, P. A. Tessier, and D. Girard. 2001. Activation of Human Neutrophils by Technical Toxaphene. *Clin Immunol*. 98: 46.
32. Leuenroth, S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala, and H. H. Simms. 2000. The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J. Leukoc Biol*. 68:158.
33. Moulding, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart, and S. W. Edwards. 1998. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood*. 92: 2495.
34. Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Kohts, D. J. Kwiatkowski and L. T. Williams. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 278: 294.
35. Ryu, H., J. H. Lee, K. S. Kim, S. M. Jeong, P. H. Kim and H. T. Chung. 2000. Regulation of neutrophil adhesion by pituitary growth hormone accompanies tyrosine phosphorylation of Jak2, p125FAK, and paxillin. *J. Immunol*. 165:2116.
36. Takubo, T. and N. Tatsumi. 1999. Microscopic co-distributions of myosin, actin, alpha-actinin and vinculin in human neutrophils during movement. *Haematologia (Budap)*. 29:285.
37. Serrander, L., P. Skarman, B. Rasmussen, W. Witke, D. P. Lew, K. H. Krause, O. Stendahl and O. Nusse. 2000. Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils. *J. Immunol*. 165: 2451.

38. Wang, J. S., J. P. Coburn, A. I. Tauber, and K. S. Zaner. 1997. Role of gelsolin in actin depolymerization of adherent human neutrophils. *Mol. Biol. Cell.* 8:121.
39. Wyatt, T. A., T. M. Lincoln, and K. B. Pryzwansky. 1991. Vimentin is transiently co-localized with and phosphorylated by cyclic GMP-dependent protein kinase in formyl-peptide-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266: 21274.
40. Huang, C. K., J. M. Hill, B. J. Bormann, W. M. Mackin and E. L. Becker. 1984. Chemotactic factors induced vimentin phosphorylation in rabbit peritoneal neutrophil. *J. Biol. Chem.* 259:1386.
41. Naik, N., J. P. Rigaut, S. Advani and A. Bhisey. 2000. Differences in the microtubule organization between normal and cml granulocytes after stimulation with chemotactic peptide. *Cell. Biol. Int.* 24:135.
42. Ding, M., J. M. Robinson, B. C. Behrens, and D. D. Vandre. 1995. The microtubule cytoskeleton in human phagocytic leukocytes is a highly dynamic structure. *Eur. J. Cell. Biol.* 66: 234.
43. Fuortes M, M. Melchior, H. Han, G. J. Lyon, and C. Nathan. 1999. Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J Clin Invest.* 104:327.
44. Yan, S. R., and G. Berton. 1998. Antibody-induced engagement of beta2 integrins in human neutrophils causes a rapid redistribution of cytoskeletal proteins, Src-family tyrosine kinases, and p72syk that precedes de novo actin polymerization. *J. Leukoc. Biol.* 64: 401.
45. Atencia, R., A. Asumendi, and M. Garcia-Sanz. 2000. Role of cytoskeleton in apoptosis. *Vitam Horm.* 58: 267.

46. Pryde, J. G., A. Walker, A. G. Rossi, S. Hannah and C. Haslett. 2000. Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of bax insertion into mitochondria at 15 degrees °C prevents the release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 275: 33574.
47. Kozopas K. M., T. Yang, H. L. Buchan, P. Zhou, R. W. Craig. 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:3516.
48. Santos-Beneit, A. M. and F. Mollinedo. 2000. Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J. Leukoc. Biol.* 67: 712.
49. Weinmann, P., P. Gaehtgens and B. Walzog. 1999. Bcl-XL- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood.* 93: 3106.
50. Fecho, K, and P. L. Cohen. 1998. Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 64:373
51. Villunger, A., L. A. O'Reilly, N. Holler, J. Adams, and A. Strasser. 2000. 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.* 192:647.
52. Bantel, H., I. H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff, and S. Wesselborg. 1999. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59: 2083.

53. Rollet-Labelle, E., M. J. Grange, C. Elbim, C. Marquetty, M. A. Gougerot-Pocidalò, and C. Pasquier. 1998. Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 24:563.
54. Lundqvist-Gustafsson, H., and T. Bengtsson. 1999. Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 65:196.
55. Brown, S. B., K. Bailey and J. Savill. 1997. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem. J.* 323 (Pt 1): 233.
56. Cryns, V. L., L. Bergeron, H. Zhu, H. Li, and J. Yuan. 1996. Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J. Biol. Chem.* 271:31277.
57. Sgorbissa, A., R. Benetti, S. Marzinotto, C. Schneider, and C. Brancolini. 1999. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J. Cell. Sci.* 112:4475.
58. Wang, K. K., R. Posmantur, R. Nath, K. McGinnis, M. Whitton, R. V. Talanian, S. B. Glantz, and J. S. Morrow. 1998. Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 273:22490.
59. Takahashi, A., P. Y. Musy, L. M. Martins, G.G. Poirier, R. W. Moyer, and W. C. Earnshaw. 1996. CrmA/SPI-2 inhibition of an endogenous ICE-related protease responsible for lamin A cleavage and apoptotic nuclear fragmentation. *J. Biol. Chem.* 271:32487.
60. Caulin, C., G. S. Salvesen, and R. G. Oshima. 1997. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J. Cell Biol.* 138:1379.

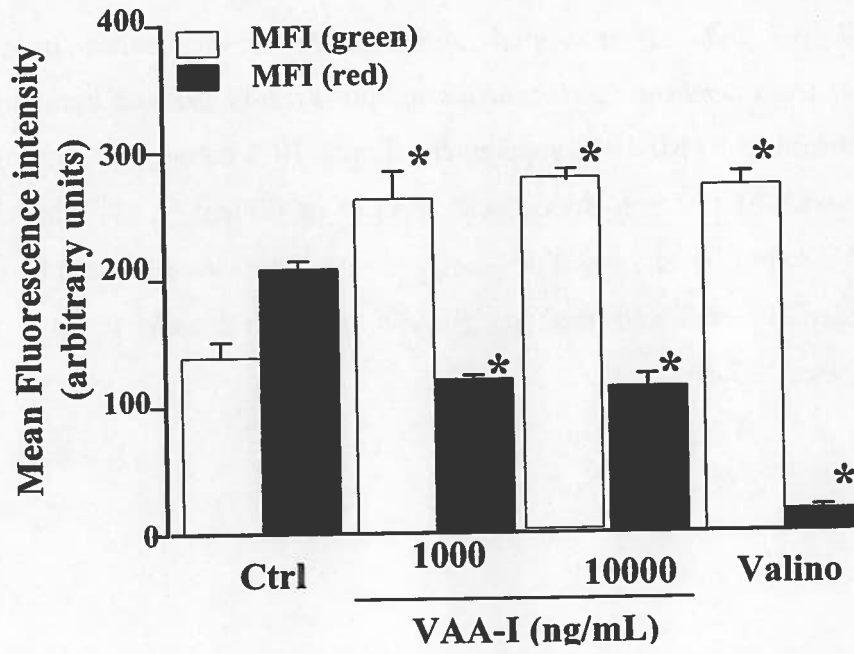
61. Morishima, N. 1999. Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action. *Genes Cells*. 4:401.

62. Susin, S. A., E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prevost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw, and G. Kroemer. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192: 571.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *VAA-I alters mitochondrial transmembrane potential.* Neutrophils were freshly isolated and incubated with buffer (Ctrl), VAA-I for 6h or 50 nM valinomycin (Valino) for 15 min at 37°C and mitochondrial transmembrane potential was assessed by flow cytometry using JC-1 probes as described under Materials and Methods. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) and represent the mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$ vs control by ANOVA. Inset, representative results plotted in the bar graph.

FIGURE 1



inset

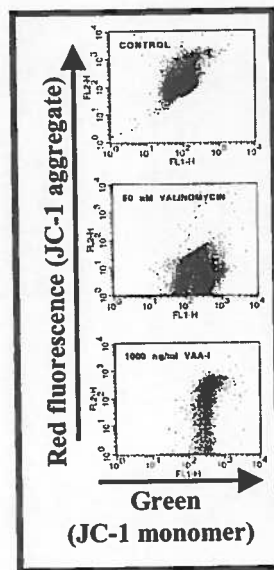


Figure 2. *VAA-I induces neutrophil apoptosis by a mechanism independent of mitochondrial transmembrane potential disruption.* Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum) were pre-incubated 1h with 62 μ M bongkreikic acid (BA) or its diluent (< 1% DMSO) and then 1000 ng/ml VAA-I or buffer was added for 23h. Apoptosis was evaluated by cytology as described under Materials and Methods. Results are mean \pm SEM (n=6). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

FIGURE 2

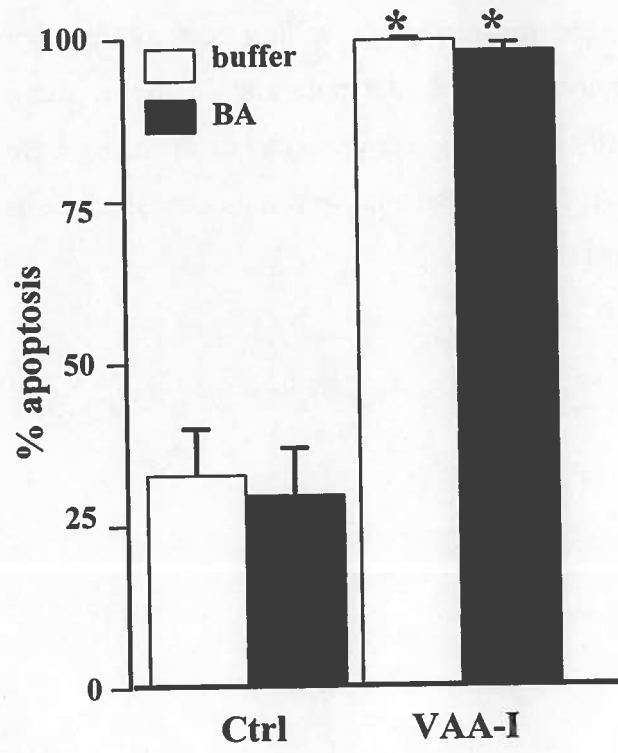


Figure 3. *VAA-I increases ROS production in human neutrophils.* Cells were isolated and incubated with buffer (Ctrl) or VAA-I at a concentration known to induce neutrophil apoptosis. ROS were quantified by a flow cytometric approach using the probe H2DCFDA as described under Materials and Methods. Results are expressed mean fluorescence intensity (MFI) and are presented as the mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$ vs control by ANOVA. Inset, representative results plotted in the bar graph. H₂O₂ was used as a positive control (1457 ± 239 , n=4).

FIGURE 3

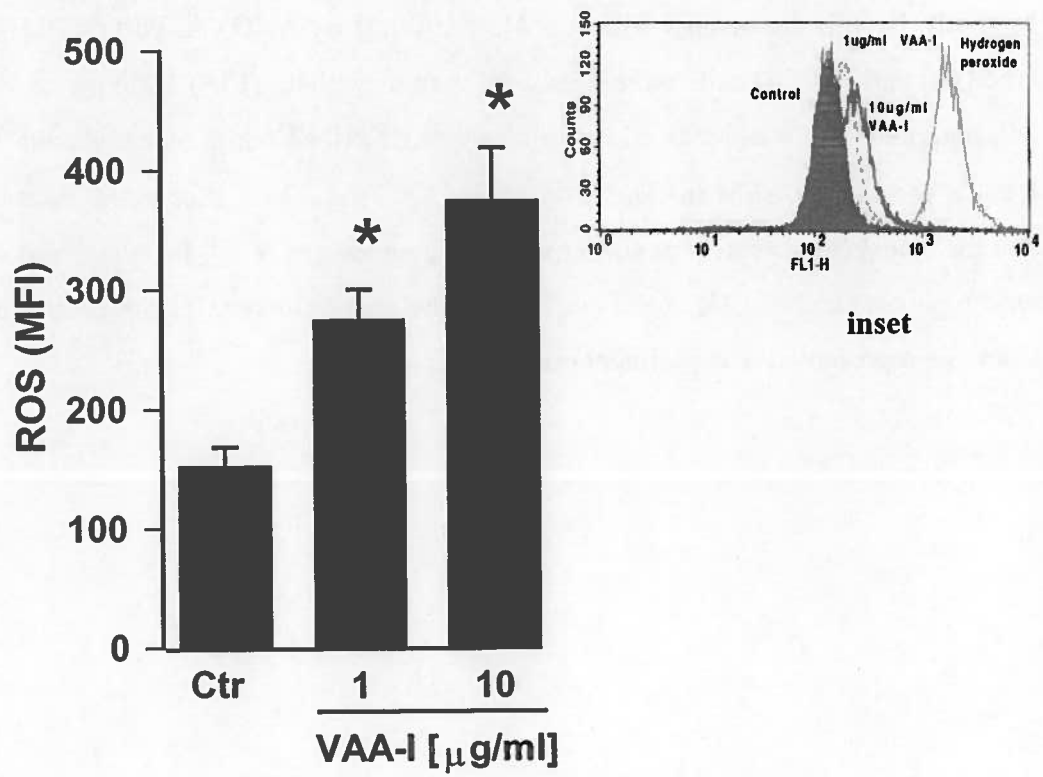


Figure 4. *Production of ROS by VAA-I is not linked to induction of apoptosis.* Part A, cells were incubated with buffer (Ctrl), 1000 ng/ml VAA-I or with 50 µg/ml toxaphene (Tox) used as a positive control (31) in the presence (+) or absence (-) of 2000 U/ml catalase for 24h. Apoptosis was evaluated by cytology as described under Materials and Methods. Results are mean ± SEM (n=4). * $p < 0.05$ by ANOVA. Part B, PLB-985 wild type (wt) and X-CGD cells were incubated with or without (Ctrl) 1000 ng/ml VAA-I for 24h and apoptosis was assessed by cytology as described under Materials and Methods. Results are mean ± SEM (n=3). * $p < 0.05$ by ANOVA. The figure in the inset illustrates that the cytoskeletal protein paxillin (pax) was degraded by VAA-I (lanes 2 and 4) in both wild type (wt) and X-CGD cells confirming the apoptotic state of the cells. Results are from one representative experiment out of two.

FIGURE 4

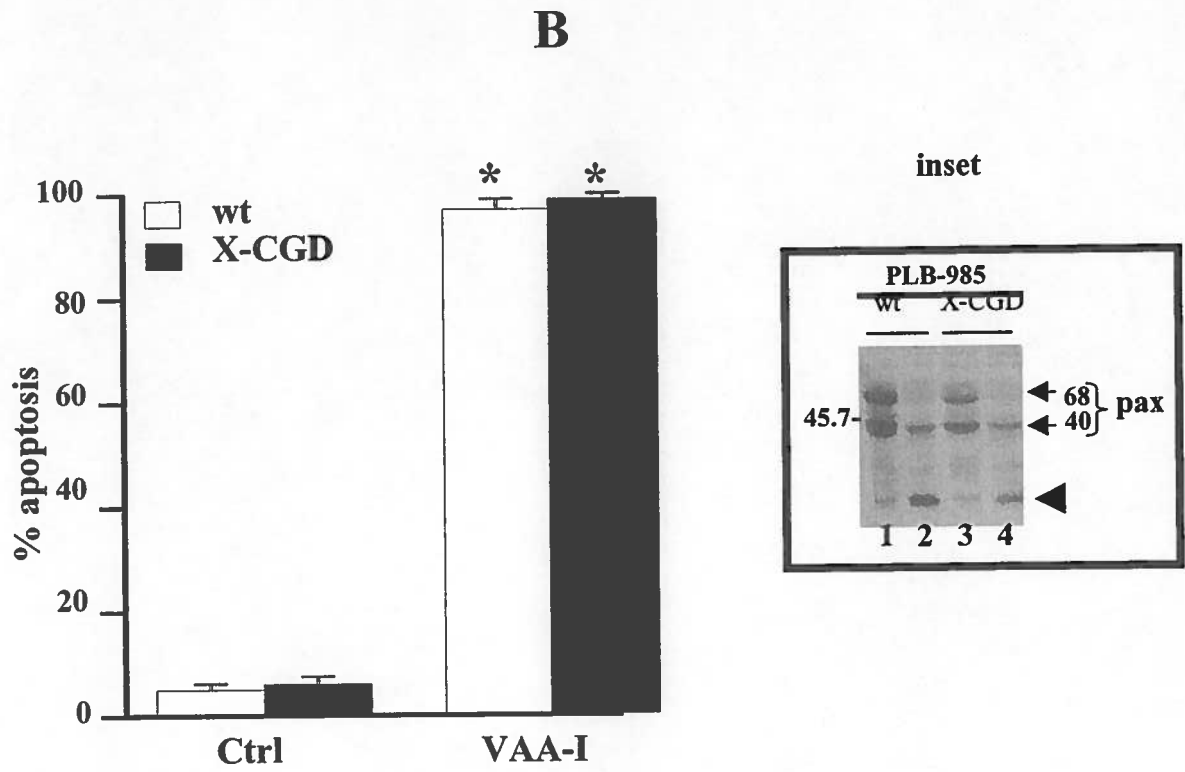
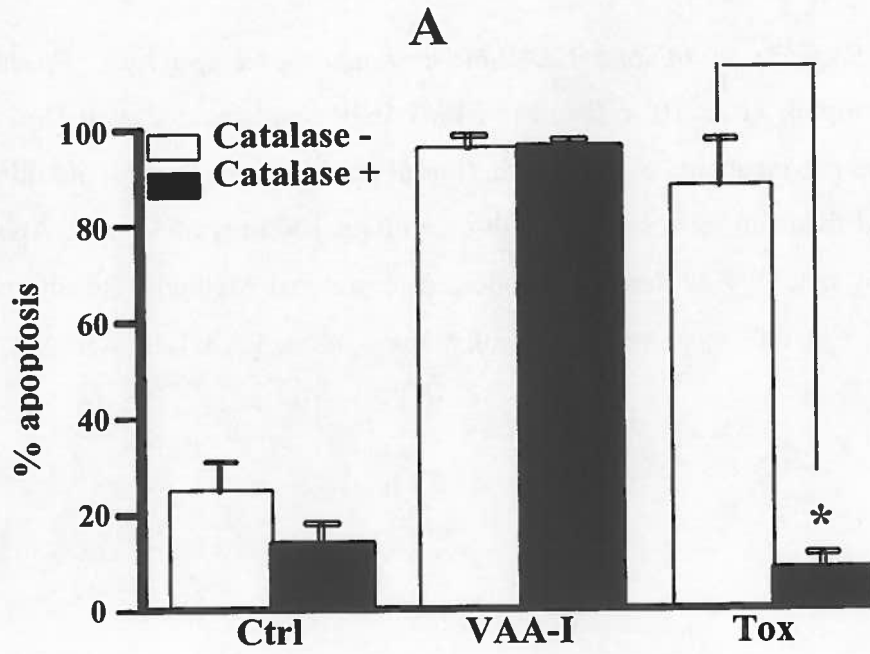


Figure 5. *Brefeldin A inhibits VAA-I-induced neutrophil apoptosis.* Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum) were pre-incubated 30 min with $1 \mu\text{g/ml}$ brefeldin A (Bref) or its diluent ($< 1\%$ DMSO) and then further incubated with or without 1000 ng/ml VAA-I. Apoptosis was evaluated by cytology as described under Materials and Methods. Results are mean \pm SEM ($n=3$). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl) and ** $p < 0.05$ vs VAA-I, by ANOVA.

FIGURE 5

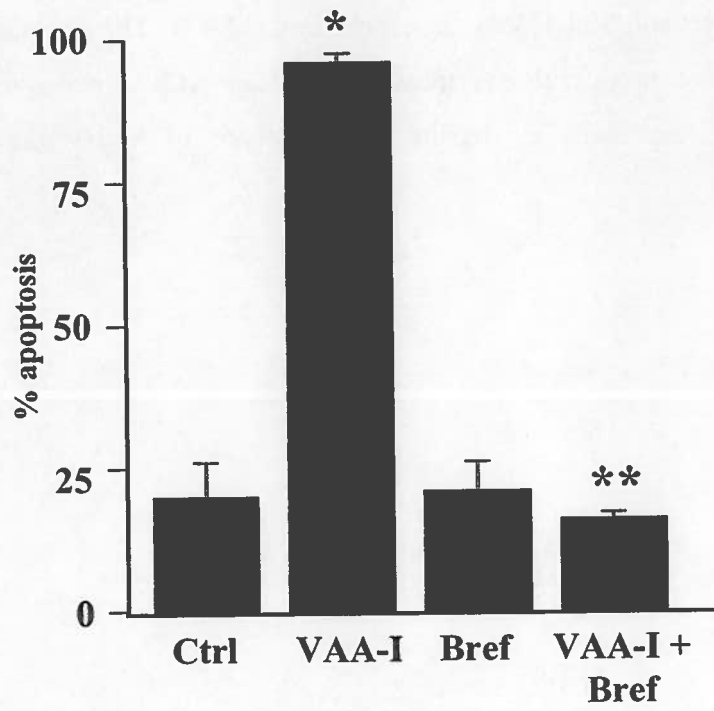


Figure 6. *Neutrophils Mcl-1 expression is decreased by VAA-I.* Cells were incubated in the presence of agonists for 24h and the level of expression of the antiapoptotic p40/42 Mcl-1 protein was detected by immunoblotting as described under Materials and Methods. A, one representative experiment out of 4. Note that Mcl-1 expression is down regulated by VAA-I but up-regulated by GM-CSF, a cytokine known to delay neutrophil apoptosis and to prevent Mcl-1 loss of expression (32,33). The second faint band is probably a degradation product that is occasionally observed by other investigators using the same anti-Mcl-1 antibody. B, densitometric analysis of Mcl-1 protein expression (n=4).

FIGURE 6

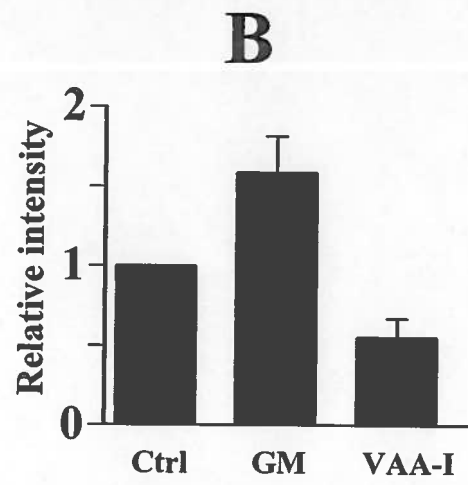
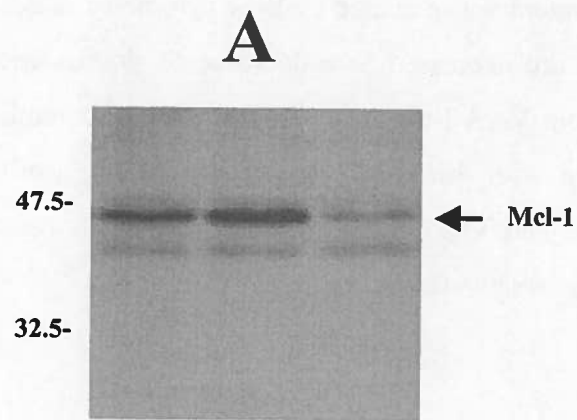
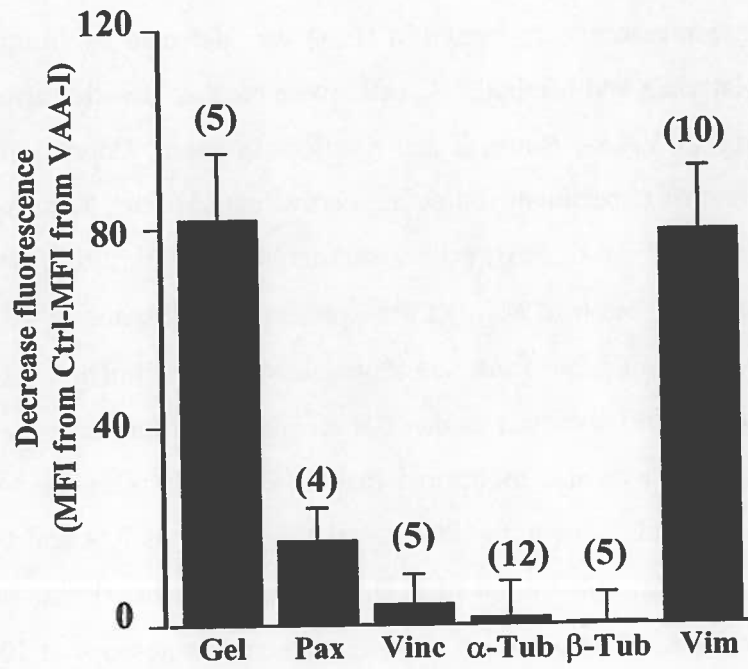


Figure 7. *Use of flow cytometry to study the degradation of cytoskeletal proteins during spontaneous and VAA-I-induced neutrophil apoptosis.* Cells were incubated for 24h and cytoskeletal protein content was detected by flow cytometry as described under Materials and Methods. Results are expressed as a decrease of fluorescence intensity: MFI from control cells – MFI from VAA-I-treated cells. Numbers in parentheses are the number of experiments performed with different blood donor. Gel, gelsolin; Pax, paxillin; Vinc, vinculin; Tub, tubulin; and Vim, vimentin. Inset, representative data plotted in the bar graph. SA, spontaneous apoptosis (or 24h-aged neutrophils).

FIGURE 7



inset

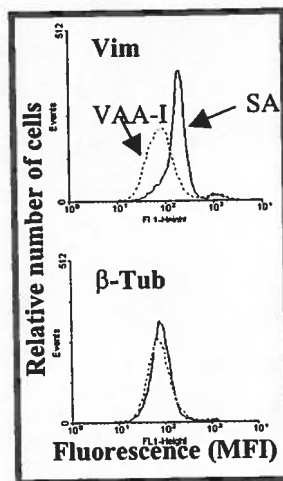


Figure 8. *Degradation of microfilament associated proteins induced by VAA-I.* Cells were incubated for the indicated time and cell lysates were prepared, run on SDS-PAGE and transferred onto membrane and paxillin (Pax) was detected by immunoblotting as described under Materials and Methods. A, cells were incubated with buffer (lanes 1 and 3) or with 1000 ng/ml VAA-I (lanes 2 and 4). Bottom panel, Coomassie blue stained membrane at the end of experiment indicating equivalent loading. Results are from one representative experiment out of 5. B, cells were incubated with buffer (lanes a, c and e) or 1000 ng/ml VAA-I (lanes b, d and f) in the presence or absence of 10 or 50 μ M z-VAD-FMK (z-VAD). Results are from one representative experiment out of 5. Note the degradation product (arrow) observed when cells are incubated for longer periods of time. As for paxillin, vinculin was also monitored (panels C and D). C, cells were incubated with buffer (lanes 1, 3 and 5) or with 1000 ng/ml VAA-I (lanes 2, 4 and 6). Results are from one representative experiment out of 7. D, cells were incubated with buffer (lanes a and c) or 1000 ng/ml VAA-I (lanes b and d) in the presence or absence of 50 μ M z-VAD-FMK (z-VAD). Results are from one representative experiment out of 5.

FIGURE 8

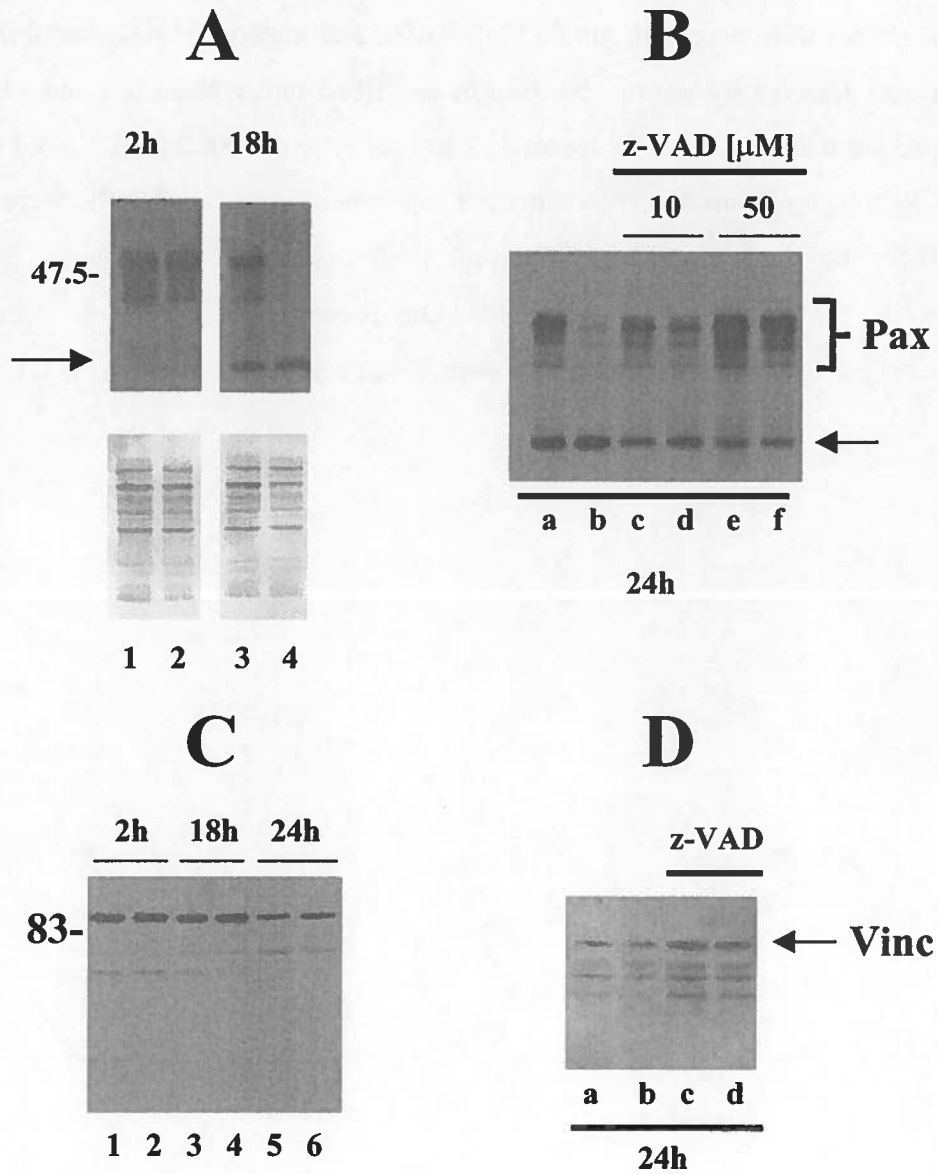
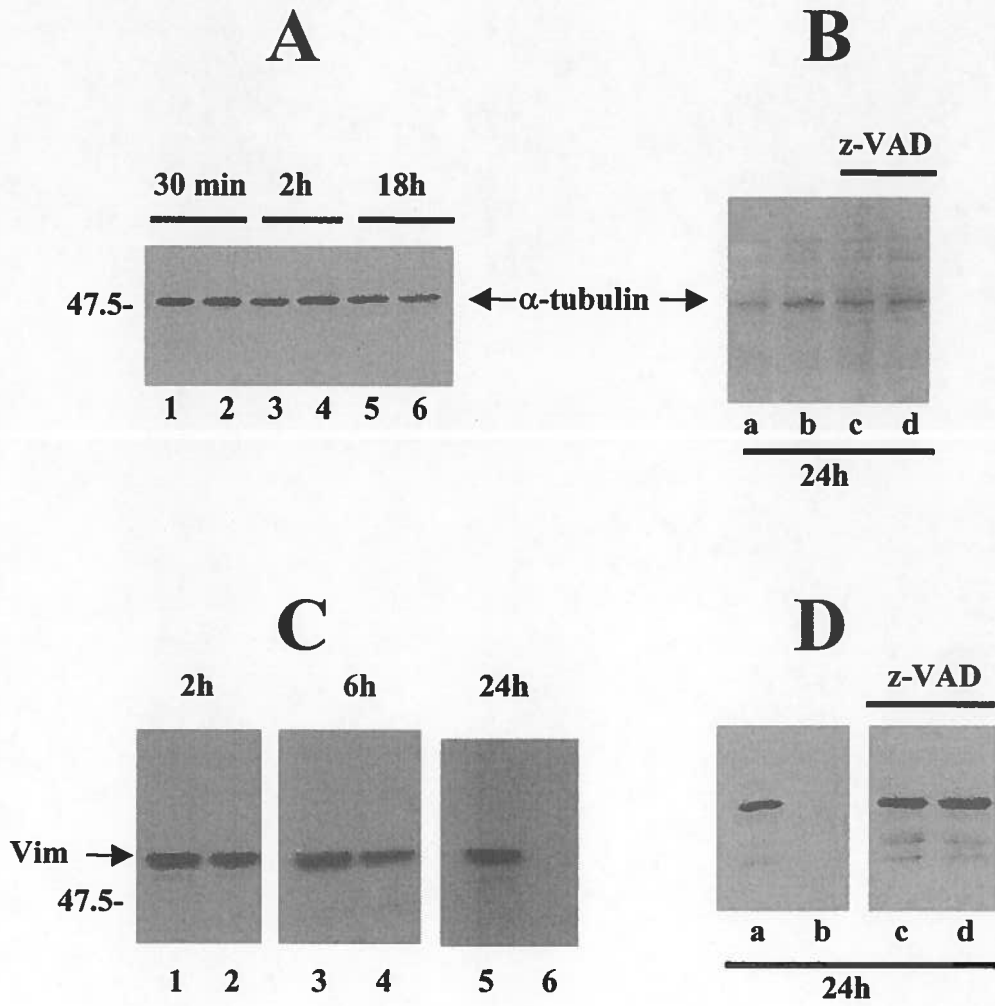


Figure 9. *Effect of VAA-I on the degradation of the major microtubule components and the intermediate filament vimentin protein.* Cells were incubated for the indicated time and cell lysates were prepared, run on SDS-PAGE and transferred onto membrane and α -tubulin was detected by immunoblotting as described under Materials and Methods. A, cells were incubated with buffer (lanes 1, 3 and 5) or with 1000 ng/ml VAA-I (lanes 2, 4 and 6). Results are from one representative experiment out of 6. B, cells were incubated with buffer (lanes a and c) or 1000 ng/ml VAA-I (lanes b and d) in the presence or absence of 50 μ M z-VAD-FMK (z-VAD). Results are from one representative experiment out of 5. As for α -tubulin, vimentin was also monitored (panels C and D).

FIGURE 9



2. ARTICLE 2

Titre

Tributyltin (TBT) induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases

Auteurs

Valérie Lavastre et Denis Girard

Sous presse dans

Journal of Toxicology and Environmental Health

Contribution personnelle

Cet article est mon deuxième article principal. J'ai contribué à la réalisation de tous les résultats présentés. J'ai effectué les expériences concernant les méthodes de détection du taux d'apoptose par microscopie électronique et par déplétion d'un récepteur membranaire, le CD16. Après avoir élaboré les protocoles d'observation des protéines du cytosquelette sur gel d'acrylamide dans l'article précédent, j'ai appliqué ce même modèle (migration des protéines suivie d'immunobuvardage) suite à l'induction d'apoptose par le TBT. J'ai aidé à la correction du manuscrit.

Contribution du co-auteur

Denis Girard : Il a participé à la planification des expériences, aux analyses statistiques ainsi qu'à la réalisation du manuscrit.

2.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 2

Le tributylétain (TBT) a été fréquemment utilisé comme un pesticide et un biocide dans les peintures pour les coques de bateau. Ceci en causait donc sa dispersion dans l'environnement. Récemment, les chercheurs ont constaté que le TBT ciblait le système immunitaire des mammifères et induisait l'apoptose chez différentes cellules par un mécanisme encore nébuleux. Même s'il a été démontré que le TBT affectait le cytosquelette des phagocytes de vers et qu'il pouvait affecter la chimiotaxie, la phagocytose et l'exocytose chez les neutrophiles, son effet sur l'apoptose des neutrophiles demeure incompris. Cette étude nous a permis de vérifier si le TBT induit l'apoptose chez les neutrophiles humains et comment il affecte son cytosquelette. Nous avons donc remarqué que le TBT induisait l'apoptose chez les neutrophiles humains, et ce, par cytologie et en examinant le détachement du CD16 par cytométrie en flux. La capacité du TBT à induire l'apoptose s'est avérée être dépendante des caspases puisque l'ajout du zVAD-FMK (inhibiteur des caspases-1,-3,-4 et -7) prévenait l'induction d'apoptose. Ceci a pu être également observé lors de l'apoptose constitutive ou spontanée (neutrophiles âgés de 24 heures). En plus, nous avons remarqué que des protéines du cytosquelette, soit la gelsoline, la paxilline et la vimentine mais non la vinculine, étaient dégradées par le TBT et que cette dégradation était dépendante des caspases. Ces observations ont pu être établies grâce à la technique d'immunobuvardage. Nous avons conclu que le TBT induisait l'apoptose chez les neutrophiles humains par un mécanisme dépendant des caspases. De plus, nous avons pu découvrir l'existence de deux nouveaux substrats des caspases activées par le TBT lors de l'apoptose chez les neutrophiles humains ou de manière spontanée, la paxilline et la vimentine. Le fait que le TBT ne puisse induire la dégradation de la vinculine, nous démontre clairement que la dégradation des protéines du cytosquelette induite par le TBT est un phénomène hautement régulé.

2.2 TEXTE ORIGINAL DE L'ARTICLE 2

Tributyltin (TBT) induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases.

Valérie Lavastre and Denis Girard

From INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine, Université du Québec, Pointe-Claire, PQ, Canada

Correspondence to: Dr Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier/Santé humaine,
245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6.

Tel/Fax: (514) 630-8847/8850.

e-mail: Denis.Girard@INRS-Sante.Uquebec.ca

Running title: Tributyltin induces the degradation of cytoskeletal proteins

Keywords: Cytoskeleton, Gelsolin, Paxillin, Vimentin, Vinculin

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) has frequently been used as a pesticide and in biocidal paints for marine vessels, leading to its presence in the environment. Although TBT was recently found to induce apoptosis in different immune cells, by a mechanism that is not fully established, its effect on neutrophils is not known. In the present study, it was found that TBT induced apoptosis in human neutrophils as assessed by cytology, flow cytometry and degradation of the microfilament-associated protein gelsolin. Furthermore, data showed that TBT induced neutrophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism, since addition of z-VAD-FMK in the culture prevented the effect of TBT. It was also found that the cytoskeletal proteins gelsolin, paxillin and vimentin, but not vinculin, were degraded by TBT via caspases, as assessed by immunoblotting. Data indicate that gelsolin, paxillin and vimentin are three caspase substrates involved in both spontaneous and TBT-induced neutrophil apoptosis. Cells were not necrotic as assessed by trypan blue dye exclusion and this is in agreement with the absence of vinculin degradation. Evidence indicates TBT-induced fragmentation of cytoskeletal proteins via caspases is a process that is tightly regulated.

Keywords: Neutrophils, Caspases, Cytoskeleton, Gelsolin, Paxillin, Vimentin, Vinculin

INTRODUCTION

Organotin compounds are widely used in various industrial and agricultural applications (Kannan et al., 1998; Karpiak et al., 2001). Among these compounds, tributyltin (TBT)¹, originally used as an antifungal agent and used in marine antifouling paints, is certainly the one that has received the most attention in toxicological or related studies (Chow et al., 1992; Raffray et al., 1993; Corsini et al., 1996; DeLong and Rice, 1997; Gennari et al., 1997; Cima et al., 1998; Cima et al., 1998a; Rice et al., 1998; Whalen et al., 1999; Mizuhashi et al., 2000; Negri and Heyward, 2001; Ogata et al., 2001). This may be explained by the high probability of human exposure to TBT via seafood consumption or dry-dock application procedures. TBT acts by potentiation of halogenated hydrocarbon-induced hepatic microsomal cytochrome P450 induction (DeLong and Rice, 1997; Rice and Roszell, 1998; Kannan et al., 1998). Ingestion of large doses of organotin compounds can lead to acute reproductive, renal and neural damage in mammals (Lin and Hsueh, 1993; Lin et al., 1998; Ogata et al., 2001; Karpiak et al., 2001).

It is widely accepted that exposure to organotin compounds, including TBT, can result in suppression of both innate and acquired immunity, leading to an increased susceptibility to infection. It has been shown that TBT causes thymic atrophy and immunosuppression (Snoeij et al., 1987; Snoeij et al., 1989). In addition, suppression of murine NK cell activity and reduction in cytotoxic activity of peritoneal macrophages induced by TBT has been reported (Kergosien and Rice, 1998). Organotin compounds have also been found to decrease the activity and number of neutrophils (Matsui et al., 1983; Arakawa and Wada, 1984; Miura and Matsui, 1989).

TBT is known to induce apoptosis in several cell types such as T cells (Aw et al., 1990; Zucker et al., 1994; Stridh et al., 1999b; Gennari et al., 2000), PC-12 cells (Viviani et al., 1995; Yamanoshita et al., 2000), MCF-7 mammary carcinoma cells (Heerdt et al., 1999), and in trout hepatocytes (Reader et al., 1999), by a caspase-dependent mechanism (Stridh et al., 1998, 1999b). Curiously, despite the fact that neutrophils are highly involved in the

inflammatory process and in innate immunity, there is a lack of literature concerning the role of TBT on neutrophil apoptosis. In neutrophils, the common caspase substrates such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), the small ribonucleoprotein U1-70 kDa and the NuMA protein (nuclear/mitotic apparatus) were not detected (Bhatia et al., 1995; Sanghavi et al., 1998). Because of this, it is important to identify caspase substrates in these cells. In addition, there is no clear evidence that human neutrophils release cytochrome c and this may be linked to the weak number of mitochondria present in these cells. Consequently, the general reported cytochrome c-induced cell apoptosis mechanism (Nishimura et al., 2002) might not be necessarily transposable to neutrophils.

The cytoskeleton appears to be an important target of organotin compounds (Marinovich et al., 1990). *In vitro* disaggregation of actin filaments and inhibition of tubulin polymerization have been reported (Tan et al., 1978; Bondy and Hall, 1986). Because recent reports have found that numerous neutrophil functions can be altered by TBT, and since it was recently reported that the microfilament-associated protein (MFAP) gelsolin is fragmented in apoptotic neutrophils via caspase-3 (Kothakota et al., 1997; Savoie et al., 2000), it was hypothesized that TBT could induce neutrophil apoptosis and that caspases are involved in cytoskeletal protein degradation.

¹abbreviations: MFAP, microfilament-associated protein; TBT, tributyltin; VAA-I, *Viscum album* agglutinin-I; z-VAD-FMK, z-Val-Ala-Asp(MOe)-CH₂F

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and agonists. Tributyltin chloride (TBT) was purchased from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO), dissolved in ethanol and used at non-necrotic concentrations previously reported in *in vitro* studies (Stridh et al., 1999a; Whalen et al., 1999). The caspases-1,-3,-4, and -7 inhibitor, z-VAD-FMK, was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA) and was dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO) (low levels of endotoxins, Sigma). In all conditions, the final DMSO concentration never exceeded 1%. Preliminary experiments with < 1% DMSO revealed that this diluent did not interfere in the assays. The plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) and the following monoclonal antibodies to human cytoskeletal proteins were purchased from Sigma: anti-gelsolin (clone GS-2C4), anti-paxillin (clone PXC-10), anti-vimentin (clone Vim 13.2) and anti-vinculin (clone Vin-11-5).

Neutrophil isolation. Cells were isolated from venous blood of healthy volunteers (25-35 years old, independently of the gender) by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc, Qc), as previously described (Girard et al., 1996; Savoie et al., 2000). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Cell viability (>98%) was monitored by trypan blue exclusion and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Diff-Quick staining (Girard et al., 1996).

Assessment of neutrophil apoptosis by cytology and by cell surface expression of CD16. Freshly isolated human neutrophils (200 μ l of a 10×10^6 cells/ml suspension in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 22h in the presence or absence of TBT (0.1, 0.5 or 1μ M) and apoptosis was evaluated by cytology. The plant lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) was used as a positive control since it is a potent inducer of neutrophil apoptosis (Savoie et al., 2000). Cytocentrifuged preparations of neutrophils were prepared with a Cyto-tek[®] centrifuge (Miles Scientific,

IN, USA), as previously described (Girard et al., 1996) and were stained with a Diff-Quick staining kit (Baxter, FL, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were examined by light microscopy (400X magnification), and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristically dark stained pyknotic nuclei. Results were expressed as percentage of cells in apoptosis.

CD16 expression is known to be markedly decreased on the cell surface of apoptotic neutrophils (Dransfield et al., 1994). This assay was used to confirm the results obtained by cytology. To do so, following the incubation period, cells were suspended at 1.5×10^6 cells/ml washed and pre-incubated 30 min (4°C, light protected) with 20% autologous serum to prevent non specific binding via Fc receptors. Cells were then washed and incubated with 2 µl of fluorescein isothiocyanate (FITC)-mouse anti-human CD16 mAb (PharMingen Canada) for 30 min (4 °C, light protected). Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton Dickinson).

Degradation of cytoskeletal proteins. Neutrophils (10×10^6 cells/ml in 24 well plate) were incubated with or without TBT in the presence or absence of 50 µM z-VAD-FMK (Savoie et al., 2000) or its diluent (< 1% DMSO) for the indicated period of time and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer (2X Laemmli's sample buffer: 125 nM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl, pH 6.8, 8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 17% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, 5 mM orthovanadate, 24 mg/mL leupeptin, 20 mM paranitrophenylphosphate, 24 mg/mL aprotinin, 2.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), and 0.05% bromophenol blue preheated at 100°C) (Savoie et al. 2000). In some experiments, cells were pre-incubated for 1h with the diluent or z-VAD-FMK prior to an additional 23h of incubation (total period of 24h). Results were similar whether or not cells were pre-treated 1h with z-VAD-FMK (*data not shown*). Therefore, in subsequent analyses, the pre-incubation step was omitted. Aliquots corresponding to 225,000 cells were loaded and run on 10% SDS-PAGE and transferred from gel to PVDF membranes (Savoie et al., 2000). Nonspecific sites were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in TBS-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween-20) overnight at 4 °C. Membranes were incubated

with monoclonal anti-human cytoskeletal antibodies (anti-gelsolin (1:1500); anti-vimentin (1:1000); anti-vinculin (1:150) or anti-paxillin (1:500)), for 1h at room temperature followed by three washes, and incubated with a horseradish peroxidase-labeled sheep anti-mouse IgG (1:20,000) (Bio/Can) for 1h at room temperature in fresh blocking solution. Membranes were washed three times with TBS-Tween, and bands were revealed with the enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection system (Amersham, Pharmacia Biotech Inc). Protein loading was verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments (*data not shown*).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows Version 2.0 with a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Involvement of caspases in tributyltin-induced human neutrophil apoptosis. As illustrated in **Fig.1**, TBT did not induce neutrophil apoptosis at a concentration of 0,1 or 0,5 μM as assessed by morphological examinations. However, at a concentration of 1 μM , TBT was found to significantly induce human neutrophil apoptosis. These cells were found to possess a characteristic apoptotic morphology. Addition of z-VAD-FMK in the cultures was found to block this effect of TBT. Note that caspases were also found to be involved in constitutive or spontaneous apoptosis (Kothakota et al., 1997; Savoie et al., 2000), explaining why addition of z-VAD-FMK also prevents apoptosis in this condition. The pro-apoptotic effect of TBT was confirmed with another assay based on the loss of CD16 cell surface expression monitored by flow cytometry. As illustrated in **Fig. 2**, significant CD16 shedding was observed when cells were incubated with a concentration of 1 μM , but not at lower concentrations of 0.1 or 0.5 μM .

The degradation of the MFAP gelsolin was recently found to occur in human neutrophil via caspase-3 (Kothakota et al., 1997; Savoie et al., 2000). As illustrated in **Fig 3A**, TBT induces the fragmentation of gelsolin only at the concentration that induces apoptosis as assessed by cytology and by flow cytometry (CD16 shedding). This confirms its ability to induce neutrophil apoptosis. At lower concentrations, TBT did not induce degradation. Addition of z-VAD-FMK in the culture was found to block gelsolin degradation (**Fig 3B**). This attests to the involvement of caspases in TBT-induced human neutrophil apoptosis. The degradation of gelsolin was also observed in neutrophils that undergo spontaneous

apoptosis and this was also blocked by the addition of z-VAD-FMK in the culture, again attesting to the involvement of caspases under these conditions.

The microfilament associated protein paxillin, but not vinculin, is degraded by tributyltin. TBT induced the degradation of paxillin and that this was also caspase-dependent (**Fig. 4**). The disappearance of the two 68 and 40 kDa paxillin fragments, observed in apoptotic neutrophils, correlated with the appearance of the fragment of ~20 kDa (see arrowhead in **Fig. 4**). Interestingly, the level of expression of vinculin was unaffected by TBT or by VAA-I (**Fig 5**). In addition, vinculin was not degraded in neutrophils undergoing spontaneous apoptosis since addition of z-VAD-FMK did not increase its expression, unlike gelsolin (**Fig. 3**) or paxillin (**Fig. 4**). The apoptotic state of cells, however, was confirmed by cytology, attesting that vinculin levels were unaffected by the treatments (*data not shown*).

The intermediate filament protein vimentin is fragmented in apoptotic neutrophils. Proteins of the intermediate filament family are of the vimentin type in human neutrophils (Pryzwansky et al., 1995; Morishima, 1999). Based on this, it was decided to study the potential effects of TBT on vimentin expression. As illustrated in **Fig. 6**, TBT induced vimentin fragmentation and caspases were also involved in this process. This degradation was not specific to TBT, since it was also observed with VAA-I. Addition of z-VAD-FMK prevented its loss, as a pattern of protein expression after 22h was similar to the one observed after only 1h of treatment (**Fig 6**).

DISCUSSION

Our results are in agreement with others reporting the involvement of caspases in TBT-induced apoptosis in the human Hut-78 and Jurkat T-lymphocyte cell lines (Stridh et al., 1999a) as well as in rat thymocytes (Aw et al., 1990). However, to our knowledge, this is the first time caspase substrates have been identified in TBT-induced cell apoptosis. The fact that cytoskeletal proteins were identified as caspase substrates correlates with a recent study reporting cytoskeletal alterations induced by TBT in tunicate phagocytes (Cima et al., 1998a). In particular, this study reported that the microfilaments were assembled in clusters around the peripheral cytoplasm, with the exception of unaltered adhesion plaques. In rabbits, micromolar concentrations of TBT and other organotin compounds were found to inhibit neutrophil phagocytosis and the concomitant release of enzymes (Elferink et al., 1986). In the same vein, inhibition of neutrophil chemotaxis was also observed following organotin exposure (Arakawa and Wada, 1984). These functions necessitate important cytoskeletal rearrangements.

Gelsolin, paxillin and vinculin are three well known MFAP, while vimentin is a protein of the intermediate filament family. The importance of gelsolin in neutrophil cell physiology was recently established. Neutrophils isolated from gelsolin deficient mice ($Gsn^{-/-}$) were found to have a reduced rate of cell death, and this could explain the moderate neutrophilia observed in $Gsn^{-/-}$ mice. These mice have about twice the number of circulating neutrophils when compared with wild-type mice (Morishima, 1999). In addition, the ability of neutrophils to exert IgG-mediated phagocytosis was found to be decreased in $Gsn^{-/-}$ neutrophils (Serrander et al., 2000). This function is known to require a dynamic reorganization of the cytoskeleton. There is no reported data from paxillin-deficient animals. However, its function has been studied in neutrophils *in vitro*. Paxillin has been found to play an important role during neutrophil adhesion to plastic substratum (Ryu et al., 2000). In addition, paxillin may be an important cytoskeletal protein involved in different intracellular signaling pathways, since it was found to be tyrosine-phosphorylated in activated human neutrophils (Ryu et al., 2000). Intriguingly, vimentin knock-out mice develop and reproduce without any apparent defects (Colucci-Guyon et

al., 1994). No compensatory expression of another intermediate filament was demonstrated in these mice. However, this does not rule out the possibility that the expression of other proteins (not limited to cytoskeletal proteins) may be modulated in these animals. As with paxillin, no data are available from vinculin knock-out mice. *In vitro*, vinculin was found to co-localize with other cytoskeletal proteins such as myosin, alpha-actinin and actin, during neutrophil movement (Yuruker and Niggli, 1992; Takubo and Tatsumi, 1999). Results from one study suggest an unknown specialized function of vinculin in adhesion sites of human neutrophils (Yuruker and Niggli, 1992).

The results of the present study indicate that TBT is toxic to human neutrophils, since it can induce apoptosis. This is in agreement with the decreased number of neutrophils previously observed in TBT-exposed rabbits (Elferink et al., 1986). In addition, results from this study allow us to conclude that the cytoskeleton is an important target for TBT-mediated toxicity. Moreover, the cytoskeletal proteins gelsolin, paxillin and vimentin are important caspase substrates involved in this mechanism. Furthermore, our results attest to the importance of caspases-1,-3,-4, and -7, some of which are known as executioners (caspases-3 and -7) and are highly involved in the demolition phase of apoptosis (Slee et al., 2001). The fact that TBT did not induce the degradation of vinculin indicates that the degradation of cytoskeletal proteins via caspases is a tightly regulated process.

The procedure described here could be applied to numerous studies in different fields. It can provide information not only on the apoptotic state of cells, but also on caspase involvement during apoptosis. It can also lead to the identification of new caspase substrate(s). This will be of great help for elucidating the mode of action of a particular molecule.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR). VL holds a studentship award from Fondation Armand-Frappier and is DG is a Scholar from FRSQ. We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

REFERENCES

Arakawa, Y. and Wada, O., 1984. Inhibition of neutrophil chemotaxis by organotin compounds. *Biochem Biophys Res Commun.* **123**, 543-548

Aw, T.Y., Nicotera, P., Manzo, L. and Orrenius, S., 1990. Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys.* **283**, 46-50

Bhatia, M., J.B. Kirkland, and K.A. Meckling-Gill., 1995. Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. *Biochem J.* **308**,131-137

Bondy, S.C. and Hall, D.L., 1986. The relation of the neurotoxicity of organic tin and lead compounds to neurotubule disaggregation. *Neurotoxicology.* **7**, 51-55

Chow, S.C., Kass, G.E., McCabe, M.J. Jr and Orrenius, S., 1992. Tributyltin increases cytosolic free Ca²⁺ concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca²⁺, activating a Ca²⁺ entry pathway, and inhibiting Ca²⁺ efflux. *Arch Biochem Biophys.* **298**, 143-149

Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G. and Burighel, P., 1998. Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.* **40**, 160-165

Cima, F., Marin, M.G., Matozzo, V., Da Ros, L. and Ballarin, L., 1998a. Immunotoxic effects of organotin compounds in Tapes philippinarum. *Chemosphere.* **37**, 3035-3045

Colucci-Guyon. E., Portier, M.M., Dunia, I., Paulin, D., Pournin, S. and Babinet, C., 1994. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell.***79**, 679-694

Corsini, E., Bruccoleri, A., Marinovich, M., Galli, C.L., 1996. Endogenous interleukin-1 alpha associated with skin irritation induced by tributyltin. *Toxicol Appl Pharmacol.* **138**, 268-274

DeLong, G.T. and Rice, C.D., 1997. Tributyltin potentiates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced cytochrome P-4501A-related activity. *J. Toxicol. Environ. Health.* **51**, 131-148.

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

Elferink, J.G., Deierkauf, M., and Van Steveninck, J., 1986. Toxicity of organotin compounds for polymorphonuclear leukocytes: the effect on phagocytosis and exocytosis. *Biochem Pharmacol.* **35**, 3727-3732

Fadeel, B., Ahlin, A., Henter, J.I., Orrenius, S. and Hampton, M.B., 1998. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood.* **92**, 4808-4818

Gennari, A., Potters, M., Seinen, W. and Pieters, R., 1997. Organotin-induced apoptosis as observed in vitro is not relevant for induction of thymus atrophy at antiproliferative doses. *Toxicol Appl Pharmacol.* **147**, 259-266

Gennari, A., Viviani, B., Galli, C.L., Marinovich, M., Pieters, R. and Corsini, E., 2000. Organotins induce apoptosis by disturbance of (Ca²⁺)(i) and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* **169**, 185-190

Girard, D., Paquet, M.E., Paquin, R. and Beaulieu, A.D., 1996. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: Modulation of phagocytosis, cytoskeletal rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood*. **88**, 3176-3184

Heerd, B.G., Houston, M.A., Anthony, G.M. and Augenlicht, L.H., 1999. Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity. *Cancer Res*. **59**, 1584-1591

Kannan, K., Villeneuve, D.L., Blankenship, A.L. and Giesy, J.P. 1998. Interaction of tributyltin with 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced ethoxyresorufin O-deethylase activity in rat hepatoma cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 1998 **55**, 373-384.

Karpiak, V.C., Bridges, R.J., and Eyer, C.L., 2001. Organotins disrupt components of glutamate homeostasis in rat astrocyte cultures. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2001 **63**, 273-287.

Kergosien, D.H. and Rice, C.D., 1998. Macrophage secretory function is enhanced by low doses of tributyltin-oxide (TBTO), but not tributyltin-chloride (TBTCI). *Arch Environ Contam Toxicol*. **34**, 223-228

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A, Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W, Koths, K, Kwiatkowski, D.J. and Williams, L.T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. **278**, 294-298

Lin, J.L. and Hsueh, S., 1993. Acute nephropathy of organotin compounds. *Am J Nephrol*, **13**, 124-128

Lin, T.J., Hung, D.Z., Kao, C.H., Hu, W.H. and Yang, D.Y., 1998. Unique cerebral dysfunction following triphenyltin acetate poisoning. *Human Exp Toxicol*. **17**, 403-405

Marinovich, M., Sanghvi, A., Colli, S., Tremoli, E. and Galli, C.L., 1990. Cytoskeletal modifications induced by organotin compounds in human neutrophils. *Toxicol. In vitro.* **4**, 109-114

Matsui, H., Wada, O., Ushijima, Y. and Mizuta, T., 1983a. Inhibition of oxidative metabolism in rabbit polymorphonuclear leukocytes by triphenyltin chloride. *Arch Toxicol.* **54**, 227-233

Miura, Y. and Matsui, H., 1989. Inhibition by triphenyltin chloride of cytosolic free calcium mobilization in human neutrophils stimulated by a chemotactic factor. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **64**, 331-341

Mizunashi, S., Ikegaya, Y. and Matsuki, N., 2000. Cytotoxicity of tributyltin in rat hippocampal slice cultures. *Neurosci Res.* **38**, 35-42

Morishima, N., 1999. Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action. *Genes Cells.* **4**, 401-414

Negri, A.P. and Heyward, A.J., 2001. Inhibition of coral fertilisation and larval metamorphosis by tributyltin and copper. *Marine Environ Res.* **51**, 17-27

Nishimura, G., Proske, R.J., Doyama, H. and Higuchi M., 2002. Regulation of apoptosis by respiration: cytochrome c release by respiratory substrates. *FEBS Lett.* **505**, 399-404.

Ogata, R., Omura, M., Shimasaki, Y., Kubo, K., Oshima, Y., Aou, S. and Inoue, N. 2001. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **63**, 127-144.

Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A. and Lincoln, T.M., 1995. Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils. *Blood*. **85**, 222-230

Raffray, M., McCarthy, D., Snowden, R.T. and Cohen, G.M., 1993a. Apoptosis as a mechanism of tributyltin cytotoxicity to thymocytes: relationship of apoptotic markers to biochemical and cellular effects. *Toxicol Appl Pharmacol*. **119**, 122-130

Reader, S., Moutardier, V. and DenizEAU, F., 1999. Tributyltin triggers apoptosis in trout hepatocytes: the role of Ca²⁺, protein kinase C and proteases. *Biochim Biophys Acta*. **1448**, 473-478

Rice, C.D. and Roszell, L.E., 1998. Tributyltin modulates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126)-induced hepatic CYP1A activity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Toxicol. Environ. Health A*. **55**, 197-212.

Ryu, H., Lee, J.H., Kim, K.S., Jeong, S.M., Kim, P.H. and Chung, H.T., 2000. Regulation of neutrophil adhesion by pituitary growth hormone accompanies tyrosine phosphorylation of Jak2, p125FAK, and paxillin. *J. Immunol*. **165**, 2116-2123

Sanghavi, D.M., Thelen, M., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L., and Rosen, A., 1998. Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Lett*, **422**, 179-184

Savoie, A., Lavastre, V., Pelletier, M., Hajto, T., Hostanska, K. and Girard, D., 2000. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J. Leukoc. Biol*. **68**, 845-853

Serrander, L., Skarman, P., Rasmussen, B., Witke, W., Lew, D.P., Krause, K.H., Stendahl, O. and Nusse, O., 2000. Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils. *J Immunol.* **165**, 2451-2457

Slee, E.A., Adrain, C. and Martin, S.J., 2001. Executioner caspases-3, -6 and -7 perform distinct, non-redundant, roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* **276**, 7320-7326

Snoeij, N.J., Penninks, A.H. and Seinen, W., 1987. Biological activity of organotin compounds--an overview. *Environ Res.* **44**, 335-353

Snoeij, N.J., Penninks, A.H. and Seinen, W., 1989. Thymus atrophy and immunosuppression induced by organotin compounds. *Arch Toxicol Suppl.* **13**, 171-174

Stridh, H., Gigliotti, D., Orrenius, S. and Cotgreave, I., 1999a. The role of calcium in pre- and postmitochondrial events in tributyltin-induced T-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **266**, 460-465

Stridh, H., Orrenius, S. and Hampton, M.B., 1999b. Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin. *Toxicol Appl Pharmacol.* **156**, 141-146

Stridh, H., Kimland, M., Jones, D.P., Orrenius, S. and Hampton, M.B., 1998. Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **429**, 351-355

Takubo, T. and Tatsumi, N., 1999. Microscopic co-distributions of myosin, actin, alpha-actinin and vinculin in human neutrophils during movement. *Haematologia (Budap).* **29**, 285-294

Tan, L.P., Ng, M.L. and Kumar Das, V.G., 1978. The effect of trialkyltin compounds on tubulin polymerisation. *J Neurochem.* **31**, 1035-1041

Viviani, B., Rossi, A.D., Chow, S.C. and Nicotera, P., 1995. Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology.* **16**, 19-25

Whalen, M.M., Loganathan, B.G. and Kannan, K., 1999. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. *Environ Res.* **81**, 108-116

Yamanoshita, O., Kurasaki, M., Saito, T., Takahasi, K., Sasaki, H., Hosokawa, T., Okabe, M., Mochida, J. and Iwakuma, T., 2000. Diverse effect of tributyltin on apoptosis in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **272**, 557-562

Yuruker, B. and Niggli, V., 1992. Alpha-actinin and vinculin in human neutrophils: reorganization during adhesion and relation to the actin network. *J Cell Sci.* **101**, 403-414

Zucker, R.M., Elstein, K.H., Thomas, D.J. and Rogers, J.M., 1994. Tributyltin and dexamethasone induce apoptosis in rat thymocytes by mutually antagonistic mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* **127**, 163-170

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Tributyltin induces human neutrophil apoptosis via a caspase-dependent mechanism.* Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml) were incubated for 24h in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum in the presence or absence of stimuli. Apoptosis was assessed by cytology as described under Materials and Methods. Results are means \pm SEM (n=3). * $p < 0.05$, vs control (Ctrl) and **, $p < 0.05$ vs 1 μ M TBT. Inset, representative cytocentrifuged preparations. Cells were incubated with: a, the corresponding buffer + 50 μ M z-VAD-FMK; b, 1 μ M TBT; and c, 1 μ M TBT + 50 μ M z-VAD-FMK. Black arrows, typical normal neutrophil; open arrows, apoptotic neutrophil.

FIGURE 1

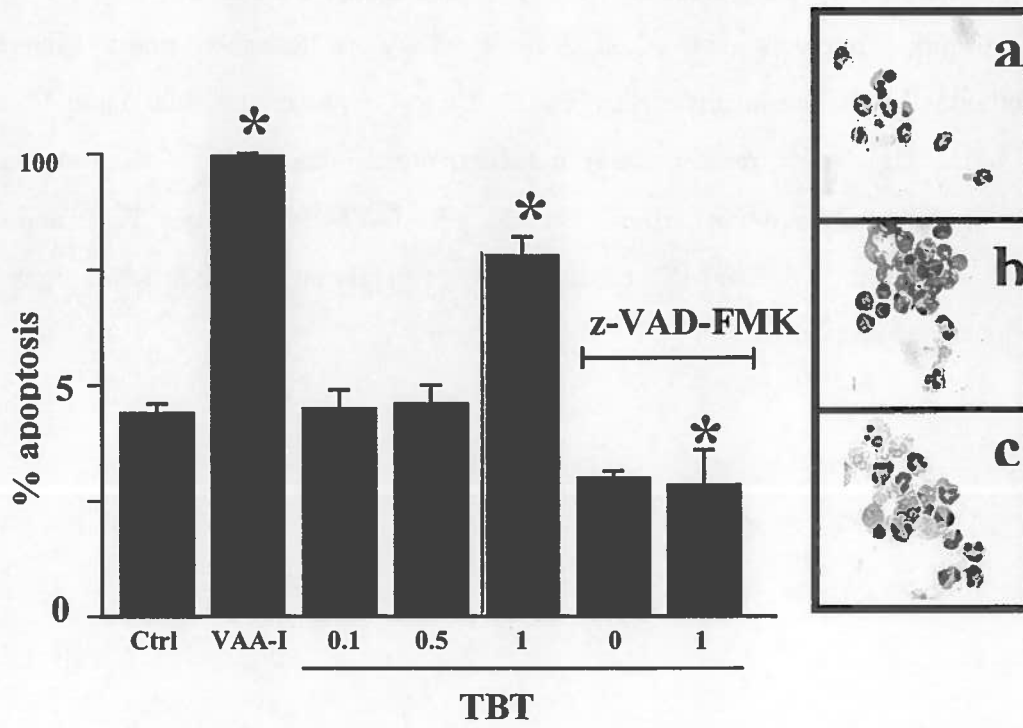


Figure 2. Tributyltin induces CD16 shedding. Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml) were incubated for 24h in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum in the presence of buffer (Ctrl), 1000 ng/ml VAA-I, or an increasing concentration of TBT. Results are means \pm SEM (n=3). Insert, representative data plotted in the bar graph. Number in parentheses represents the percentage of apoptotic cells, the left population expressing low levels of CD16 (Dransfield et al., 1994). *, significant from control (Ctrl) ($p < 0.05$).

FIGURE 2

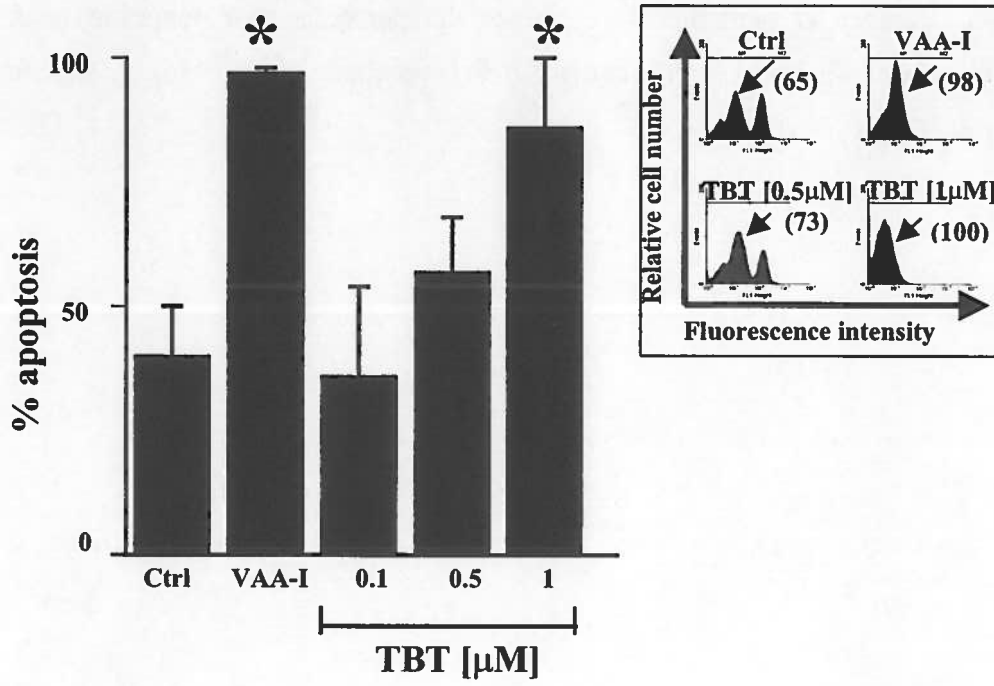


Figure 3. *Tributyltin induces the degradation of the human neutrophil microfilament-associated protein gelsolin by a caspases-dependent mechanism.* Freshly isolated human neutrophils were incubated for the indicated periods of time as described in legend of **Figure 2**. Cell lysates were prepared, and run on 10% SDS-PAGE, and transferred from gel to PVDF membranes and native gelsolin (~90 kDa) was detected as described under Materials and Methods. A, cells were incubated with buffer (lane 1); 1000 ng/ml VAA-I (lane 2); TBT at 0.1 (lane 3), 0.5 (lane 4), or 1 μ M (lane 5). B, cells were incubated with buffer (lane a); 1000 ng/ml VAA-I (lane b); TBT at 0.8 (lane c) or 1 μ M (lane d) in the presence or absence of 50 μ M z-VAD-FMK, the pan caspases inhibitor. ns, cell lysate prepared from non stimulated cells incubated for 1h. Results are from one representative experiment out of 4.

FIGURE 3

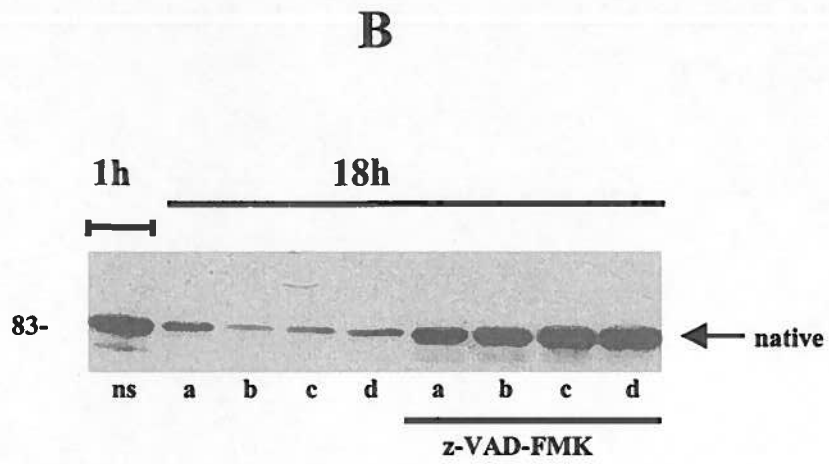
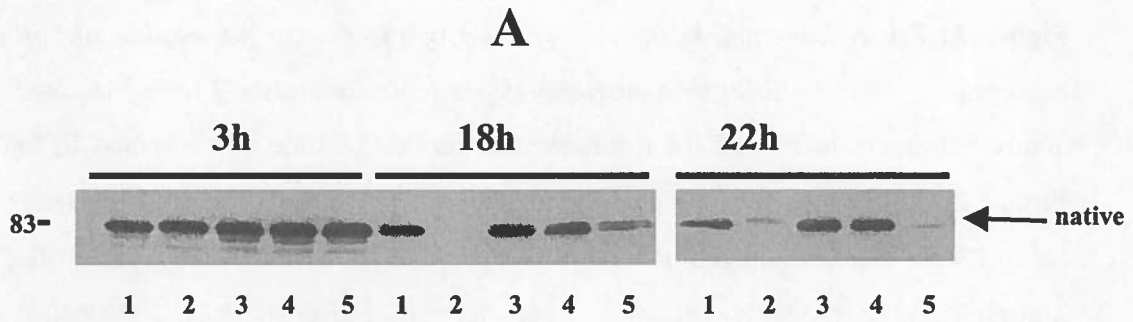


Figure 4. *Involvement of caspases in the degradation of the microfilament associated protein paxillin induced by tributyltin in human neutrophils.* Cells were incubated for 22h in the presence or absence of 50 μ M z-VAD-FMK as described in the legend of **Figure 3**, and paxillin (Pax) was detected as described under Materials and Methods. Cells were treated with buffer (lane 1); 1000 ng/ml VAA-I (lane 2); or 1 μ M TBT (lane 3). Note the 68 and 40 kDa fragments of paxillin known to be recognized by the mAb (Ryu et al., 2000), and the appearance of another fragment (arrowhead) that is markedly reduced by the addition of z-VAD-FMK. Results are from one representative experiment out of 4.

FIGURE 4

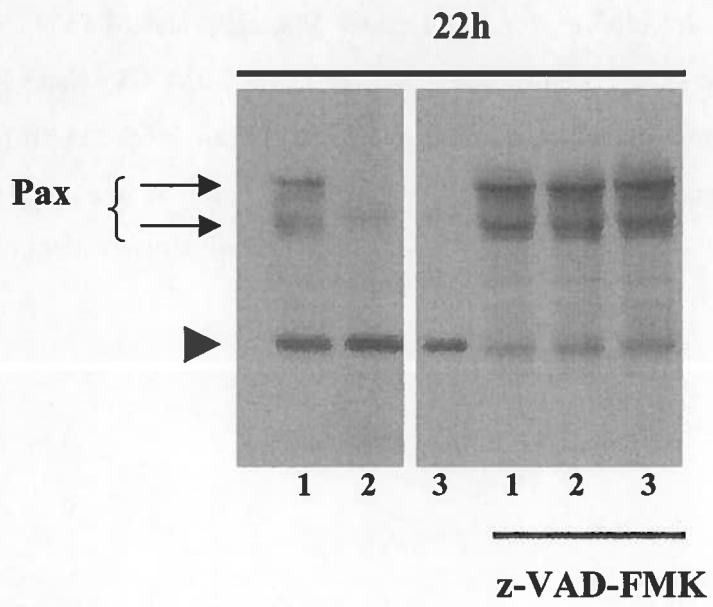


Figure 5. *Tributyltin does not induce the degradation of the human neutrophil microfilament-associated protein vinculin.* Cells were incubated for 22h in the presence or absence of 50 μ M z-VAD-FMK as described in the legend of **Figure 4**, and vinculin (vinc) was detected as described under Materials and Methods. Cells were treated with buffer (lane 1); 1000 ng/ml VAA-I (lane 2); or 1 μ M TBT (lane 3) in the presence or absence of 50 μ M z-VAD-FMK. Results are from one representative experiment out of 3.

FIGURE 5

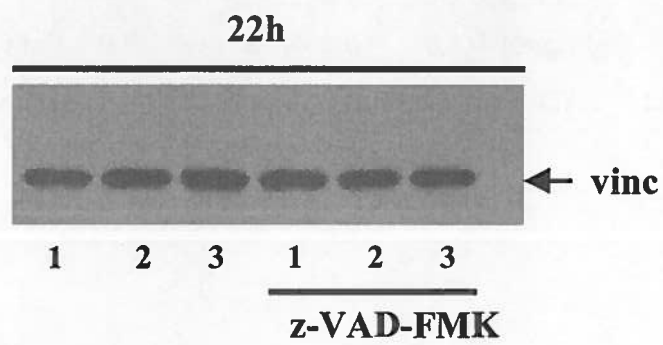
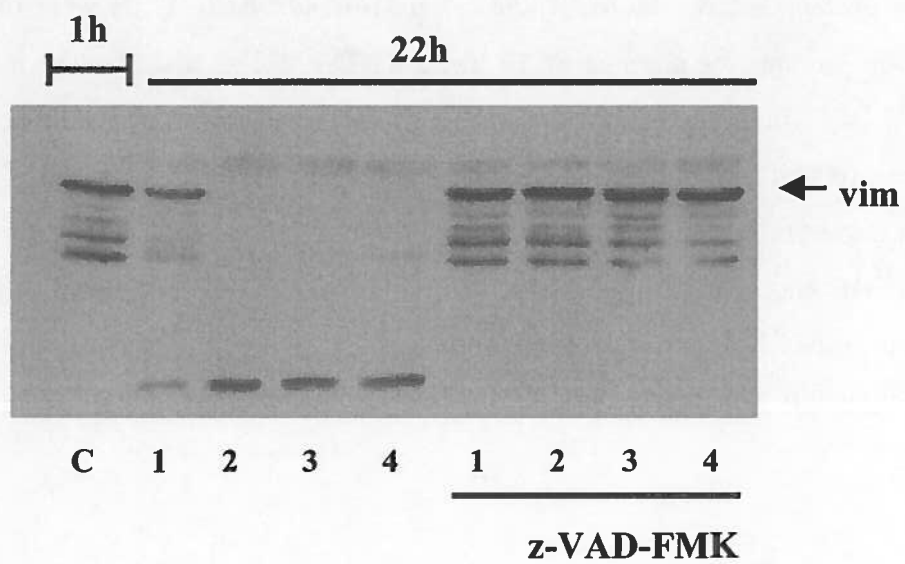


Figure 6. *Involvement of caspases in the degradation of the intermediate filament vimentin protein induced by tributyltin in human neutrophils.* Cells were incubated for 22h in the presence or absence of 50 μ M z-VAD-FMK as described in the legend of **Figure 5**, and vimentin (vim) was detected as described under Materials and Methods. Cells were treated with buffer (lane 1); 1000 ng/ml VAA-I (lane 2); TBT at 0.8 (lane 3) or at 1 μ M (lane 4). Note the appearance of the fragment (arrowhead) that disappears when z-VAD-FMK was added to the culture and its absence in non stimulated cells incubated for 1 hour (1h) . Note also that the mAb recognized some minor bands under the native form of vimentin. Results are from one representative experiment out of 3.

FIGURE 6



Conclusion

Les expériences conduisant à l'élaboration du premier article cité dans ce mémoire (**article 1**), ont permis de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la VAA-I peut induire l'apoptose chez les neutrophiles humains. Sachant qu'une protéine associée aux MF, la gelsoline, est dégradée par la caspase-3 lors de l'apoptose et puisque nous savons que ce phénomène est présent chez le neutrophile (**article 3**), nous nous sommes intéressés au rôle des caspases dans la dégradation d'autres protéines du cytosquelette pendant l'apoptose spontanée ou induite par la VAA-I.

Avec l'aide de nos collègues de Zurich, nous avons démontré que lorsque la VAA-I induit l'apoptose, déstabilise le potentiel membranaire de la mitochondrie et induit légèrement la production de radicaux libres par la NADPH-oxydase. La VAA-I diminue l'expression d'un gène anti-apoptotique, MCL-1 et active des caspases. Ces dernières sont impliquées dans la dégradation de trois protéines du cytosquelette, la gelsoline, la paxilline ainsi que la vimentine. La vinculine ainsi que l' α - et la β -tubuline sont réfractaires à l'action de la VAA-I.

Un prétraitement avec la bréfeldine A, inhibiteur des transports vésiculaires, réduit significativement l'induction de l'apoptose par la VAA-I. Cette observation suggère fortement que la molécule doit être endocytée puis a besoin d'être transportée à l'aide d'une vésicule jusqu'aux ribosomes afin d'y effectuer son inactivation. En d'autres termes, la VAA-I n'agit pas via un récepteur de surface pour induire l'apoptose comme c'est le cas du TNF- α et Fas-L. D'ailleurs cette observation corrèle bien avec des observations effectuées sur la phosphorylation des tyrosine (**article 3**), thréonine et sérine kinases (**article 4**). Afin de valider cette observation, une augmentation de la phosphorylation de ces mêmes kinases a été observée avec un contrôle positif, le GM-CSF. La VAA-I n'induit donc aucun événement de phosphorylations, situation qui survient normalement lorsqu'une molécule est liée à un récepteur membranaire.

Même si des radicaux libres ont été détectés à l'extérieur du neutrophile par notre collègue Hostanska, nous avons démontré que l'induction de l'apoptose par la VAA-I est indépendante de ce phénomène. En effet, l'ajout de la catalase, inhibiteur des intermédiaires de l'oxygène, n'a pas affecté l'induction d'apoptose. Nous avons pu ainsi confirmer cette indépendance en utilisant une lignée promyélocytaire, PLB-985, dont la NADPH-oxydase est déficiente en une sous-unité, soit la gp91. Cette lignée cellulaire mime les cellules issues de patients atteints de X-CGD. La VAA-I induit l'apoptose aussi bien chez les PLB-985 de type sauvage que les PLB-985 déficientes, démontrant ainsi l'indépendance de la production de radicaux libres dans l'induction de l'apoptose par la VAA-I.

Par la suite, nous avons pu écarter la possibilité que la mitochondrie puisse jouer rôle principal lors de l'induction de l'apoptose par la VAA-I. En effet, l'ajout de l'acide bongkréique, stabilisateur de la membrane mitochondriale, nous a permis de le démontrer. La VAA-I induit donc l'apoptose chez les neutrophiles indépendamment de la déstabilisation de la membrane mitochondriale. En fait, en présence ou en absence de cytochrome C (si relâché), la VAA-I peut toujours induire l'apoptose chez les neutrophiles. Même si le relâchement de cytochrome C est souvent responsable de l'induction de l'apoptose chez certains types cellulaires, plusieurs observations nous portent à croire que ce n'est pas le cas chez le neutrophile. En effet, sachant qu'aucune observation n'a jusqu'à ce jour fait état du relâchement de cytochrome C (à l'exception d'une observation réalisée sous conditions non-physiologiques) et sachant que le nombre de mitochondries dans le neutrophile est restreint, il s'avère justifié de supposer que l'induction de l'apoptose ne peut reposer uniquement que sur une déstabilisation mitochondriale. De plus, l'absence du proto-oncogène Bcl-2 chez le neutrophile mature appuie cette observation et pourrait expliquer la quasi-absence de cytochrome C. Par contre, cette observation n'exclue pas l'implication de la caspase-9, activée généralement par le cytochrome C, puisque son activation pourrait contourner le cytochrome C et serait activée par la caspase-3 (voir figure 6), opérationnelle lors de l'induction de l'apoptose par la VAA-I. L'utilisation d'un inhibiteur de caspase-9 dans des expériences futures pourrait ainsi nous renseigner sur la nécessité de cette caspase dans l'induction de

l'apoptose par la VAA-I. De plus, des expériences du même type pourraient être utiles afin d'évaluer le rôle de chaque caspase dans ce phénomène.

Parmi les autres gènes issus de la famille de Bcl-2, nos recherches indiquent que Mcl-1 pourrait jouer un rôle important dans l'induction de l'apoptose. En effet, la VAA-I diminue l'expression de cette protéine anti-apoptotique, libérant le neutrophile de cette protection contre l'apoptose. D'un autre côté, l'ajout d'agents qui retardent l'induction de l'apoptose comme les cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF et l'IL-1 β) ou le LPS, empêche justement cette diminution d'expression. Mcl-1 est donc une protéine importante dans la physiologie du neutrophile et s'avère être un excellent marqueur d'apoptose puisque son expression diminue à mesure que l'apoptose augmente et inversement.

Finalement, les caspases sont des médiateurs essentiels à l'activation de l'apoptose et fragmentent différentes protéines. Parmi celles-ci, nous retrouvons certaines protéines du cytosquelette, comme l' α -fodrine, la gelsoline, la Gas2, α II- β II-spectrine, la lamine A, les kératines et la vimentine. Or, chez le neutrophile, seule la gelsoline était reconnue comme étant un substrat des caspases. Nos études dans l'**article 1** démontrent que la paxilline et la vimentine s'avèrent être de nouveaux substrats pour les caspases chez ces cellules. En effet, l'ajout d'un inhibiteur de caspases (caspases-1, -3, -4 et -7) nous a amené à faire cette observation. Toutefois, la VAA-I n'affecte pas l'expression de l' α -tubuline, de la β -tubuline ainsi que de la vinculine (autres protéines examinées dans cette étude) lorsque leur expression est comparée à celle obtenue en apoptose spontanée. Cela nous a donc permis de conclure que la VAA-I possède une sélectivité importante envers les différentes protéines du cytosquelette puisque certaines protéines sont affectées tandis que d'autres sont réfractaires à l'action de la VAA-I. Cette sélectivité est d'autant plus précise que la VAA-I affecte différemment des protéines issues d'un même groupe, comme c'est le cas des protéines associées aux MF. Ainsi, la VAA-I dégrade la gelsoline, la paxilline mais non la vinculine.

D'ailleurs, nous avons pu remarquer cette même sélectivité lors de l'induction de l'apoptose par un autre xénobiotique, le tributylétain (TBT). En effet, utilisé à 1 μ M, le TBT induit l'apoptose chez la très grande majorité des neutrophiles humains après une incubation de 24 heures. Cette étude, dont les conclusions sont décrites dans ce mémoire (**article 2**), a en effet tiré profit des observations obtenues avec la VAA-I concernant la dégradation de certaines protéines du cytosquelette. De plus, une tendance générale semble se dégager puisque quel que soit l'agent utilisé pour induire l'apoptose, VAA-I, TBT ou même le toxaphène (résultats non présentés), les mêmes protéines sont affectées et leur dégradation est dépendante des caspases. Ces observations sont d'autant plus importantes puisqu'elles révèlent l'identité de nouveaux marqueurs d'apoptose à l'intérieur des protéines du cytosquelette. Puisque le cytosquelette renferme une multitude de protéines, il serait intéressant d'examiner l'expression d'autres protéines chez le neutrophile et d'établir leur importance de chacune d'entre elles face à l'apoptose. Puisque le neutrophile ne possède pas les substrats habituellement reconnus par les caspases et présents chez les autres types cellulaires, il serait important de tenir compte du cytosquelette et d'approfondir les recherches dans ce domaine. D'ailleurs, des études *in vivo* sur des souris déficientes en protéines du cytosquelette pourraient être utiles afin d'évaluer l'importance de chacune d'entre elles dans l'apoptose.

L'évaluation de l'expression de certaines protéines du cytosquelette, comme la gelsoline, la paxilline ou la vimentine, s'avère une nouvelle approche scientifique peu complexe et pourrait être utilisée afin d'évaluer à la fois l'apoptose et le rôle des caspases dans d'autres types cellulaires.

La VAA-I agit ici comme un puissant inducteur d'apoptose chez les neutrophiles et cela nous offre donc un potentiel intéressant dans la venue de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des observations ont d'ailleurs été effectuées afin d'établir l'effet de cette molécule en relation avec une cytokine, l'IL-15 (**article 4**). Nos observations ont démontré que l'IL-15, cytokine reconnue pour retarder l'apoptose, n'influence pas la fragmentation de la gelsoline induite par la VAA-I.

Des études *in vivo*, présentement en cours dans notre laboratoire, nous permettront d'établir l'effet de la VAA-I sur le phénomène inflammatoire. Ces expériences pourront en effet nous renseigner sur les différents mécanismes impliqués lors de l'inflammation notamment la chimiotaxie de certaines cellules, incluant le neutrophile.

Collectivement, les résultats de ce présent mémoire démontrent l'importance de l'utilisation de la VAA-I et s'avère une étape essentielle dans le processus aboutissant vers une application thérapeutique. L'acquisition de nouvelles connaissances sur le mécanisme d'action de la VAA-I à l'intérieur du neutrophile pourrait aider à la commercialisation de cette molécule en territoire américain et ainsi faire bénéficier les patients atteints de maladies graves, tels l'arthrite rhumatoïde et autres désordres inflammatoires, et souvent incurables comme le cancer.

Références

- ABBAS, A. K., A. H. Lichtman et J. S. Pober. 1997. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia : Pennsylvania, 494 p.
- ABRAMSON J. S. et Wheeler J. G. 1993. The Natural Immune System : The Neutrophil. New York : IRL Press, 306 p.
- ACUTO, O. et D. Cantrell. 2000. "T cell activation and the cytoskeleton". Annual Review of Immunology, vol. 18, p. 165-184.
- AKGUL, C., D. A. Moulding et S. W. Edwards. 2001. "Molecular control of neutrophil apoptosis". FEBS Letters , vol. 487, p. 318-322.
- ALENCAR, N. M., E. H. Teixeira, A. M. Assreuy, B. S. Cavada, C. A. Flores et R. A. Ribeiro. 1999. "Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment". Mediators of Inflammation, vol. 8, p. 107-113.
- ALTUN-GULTEKIN, Z. F., S. Chandriani, C. Bougeret, T. Ishizaki, S. Narumiya, P. de Graaf, P. Van Bergen en Henegouwen, H. Hanafusa, J. A. Wagner et R. B. Birge. 1998. "Activation of Rho-dependent cell spreading and focal adhesion biogenesis by the v-Crk adaptor protein". Molecular and Cellular Biology, vol. 18, p. 3044-3058.
- AMOS, L. A. 2000. "Focusing-in on microtubules". Current Opinion in Structural Biology, vol. 10, p. 236-241.
- ANTONY, S., R. Kuttan et G. Kuttan. 1999. "Inhibition of lung metastasis by adoptive immunotherapy using Iscador". Immunological Investigations, vol. 28, p. 1-8.
- ARCARO, A. 1998. "The small GTP-binding protein Rac promotes the dissociation of gelsolin from actin filaments in neutrophils". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 805-813.
- ASEFFA, A., M. A. Dietrich et E. J. Shannon. 1997. "Effect of thalidomide on apoptosis of lymphocytes and neutrophils". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 19, p. 313-326.
- ASHKENAZI, A. et V. M. Dixit. 1998. "Death receptors: signaling and modulation". Science, vol. 281, p. 1305-1308.
- ATENCIA, R., A. Asumendi et M. Garcia-Sanz. 2000. "Role of cytoskeleton in apoptosis". Vitamins and Hormones, vol. 58, p. 267-297.
- AZUMA, T., K. Kohts, L. Flanagan et D. Kwiatkowski. 2000. "Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 3761-3766.

BANNERMAN, D. D., M. Sathyamoorthy et S. E. Goldblum. 1998. "Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 35371-35380.

BANTEL, H., I. H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff et S. Wesselborg. 1999. "Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis". Cancer Research, vol. 59, p. 2083-2090.

BARBIERI, L., M. Zamboni, L. Montanaro, S. Sperti et F. Stirpe. 1980. "Purification and properties of different forms of modeccin, the toxin of *Adenia digitata*. Separation of subunits with inhibitory and lectin activity". Biochemical Journal, vol. 185, p. 203-210.

BARKALOW, K., W. Witke, D. J. Kwiatkowski et J. H. Hartwig. 1996. "Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein". Journal of Cell Biology, vol. 134, p. 389-399.

BEAULIEU, A. D., R. Paquin, P. Rathanaswami et S. R. McColl. 1992. "Nuclear signaling in human neutrophils. Stimulation of RNA synthesis is a response to a limited number of proinflammatory agonists". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 426-432.

BECKERLE, M. C. et R. K. Yeh. 1990. "Talin: role at sites of cell-substratum adhesion". Cell Motility and the Cytoskeleton, vol. 16, p. 7-13.

BERGSTRAND, H., T. Eriksson, A. Hallberg, B. Johansson, K. Karabelas, P. Michelsen et A. Nybom. 1992. "Modulation of neutrophil superoxide generation by inhibitors of protein kinase C, calmodulin, diacylglycerol and myosin light chain kinases, and peptidyl prolyl cis-trans isomerase". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 263, p. 1334-1346.

BERSHADSKY A. D. et J. M. Vasiliev. Cytoskeleton. New York : Plenum Press, 298 p.

BEUTH, J., H. L. Ko, H. J. Gabius, H. Burchter, K. Oette et G. Pulverer. 1992. "Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients". Clinical Investigator, vol. 70, p. 658-661.

DE BILBAO, F., P. Giannakopoulos, A. Srinivasan et M. Dubois-Dauphin. 2000. "In vivo study of motoneuron death induced by nerve injury in mice deficient in the caspase 1/ interleukin-1 beta-converting enzyme". Neuroscience, vol. 98, p. 573-583.

BRACH, M. A., S. deVos, H. J. Gruss et F. Herrmann. 1992. "Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death". Blood, vol. 80, p. 2920-2924.

- BRANCOLINI, C., M. Benedetti et C. Schneider. 1995. "Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases". EMBO Journal, vol. 14, p. 5179-5190.
- BROWN, S. B., K. Bailey et J. Savill. 1997. "Actin is cleaved during constitutive apoptosis". Biochemical Journal, vol. 323 (Pt 1), p. 233-237.
- BURG, N. D. et M. H. Pillinger. 2001. "The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity". Clinical Immunology, vol. 99, p. 7-17.
- BÜSSING, A. 1996. "Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: A review on the mechanisms of the cytotoxicity mediated by *Viscum album* L.". Apoptosis, vol. 1, p. 25-32.
- BUSSING, A., G. Schaller et U. Pfüller. 1998. "Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L". Anticancer Research, vol. 18, p. 4291-4296.
- BUSSING, A. et M. Schietzel. 1999. "Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins". Anticancer Research, vol. 19, p. 23-28.
- BUSSING, A., G. M. Stein et U. Pfüller. 1998. "Selective killing of CD8+ cells with a 'memory' phenotype (CD62Llo) by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Viscum album* L". Cell Death and Differentiation, vol. 5, p. 231-240.
- BUSSING, A., G. M. Stein, M. Wagner, B. Wagner, G. Schaller, U. Pfüller et M. Schietzel. 1999. "Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L". European Journal of Biochemistry, vol. 262, p. 79-87.
- BYUN, Y., F. Chen, R. Chang, M. Trivedi, K. J. Green et V. L. Cryns. 2001. "Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis". Cell Death and Differentiation, vol. 8, p. 443-450.
- CAIN, K., D. G. Brown, C. Langlais et G. M. Cohen. 1999. "Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 22686-22692.
- CALDERWOOD, S., L. Kilpatrick, S. D. Douglas, M. Freedman, K. Smith-Whitley, M. Rolland et J. Kurtzberg. 2001. "Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor therapy for patients with neutropenia and/or neutrophil dysfunction secondary to glycogen storage disease type 1b". Blood, vol. 97, p. 376-382.
- CAMPBELL, M. S., M. A. Lovell et G. J. Gorbsky. 1995. "Stability of nuclear segments in human neutrophils and evidence against a role for microfilaments or microtubules in their genesis during differentiation of HL60 myelocytes". Journal of Leukocyte Biology, vol. 58, p. 659-666.

CARRAWAY K. L. et C. A. C. Carraway. 2000. Cytoskeleton : Signaling and Cell Regulation. New York : Oxford University Press, 287 p.

CASCIOLA-ROSEN, L., D. W. Nicholson, T. Chong, K. R. Rowan, N. A. Thornberry, D. K. Miller et A. Rosen. 1996. "Apoptain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death". Journal of Experimental Medicine, vol. 183, p. 1947-1951.

CAULIN, C., G. S. Salvesen et R. G. Oshima. 1997. "Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis". Journal of Cell Biology, vol. 138, p. 1379-13794.

CHARP, P. A., W. G. Rice, R. L. Raynor, E. Reimund, J. M. Kinkade Jr, T. Ganz, M. E. Selsted, R. I. Lehrer et J. F. Kuo. 1988. "Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils". Biochemical Pharmacology, vol. 37, p. 951-956.

CHEN, D. B., L. Wang et P. H. Wang. 2000. "Insulin-like growth factor I retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes". Life Sciences, vol. 67, p. 1683-1693.

COHEN, G. M. 1997. "Caspases: the executioners of apoptosis". Biochemical Journal, vol. 326 (Pt 1), p. 1-16.

COLEMAN, W. H. et W. K. Roberts. 1982. "Inhibitors of animal cell-free protein synthesis from grains". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 696, p. 239-244.

COLOTTA, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani et A. Mantovani. 1992. "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products". Blood, vol. 80, p. 2012-2020.

CORREIA, I., D. Chu, Y. H. Chou, R. D. Goldman et P. Matsudaira. 1999. "Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages". Journal of Cell Biology, vol. 146, p. 831-842.

COTTER, T. G., S. V. Lennon, J. G. Glynn et S. J. Martin. 1990. "Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells". Anticancer Research, vol. 10, p. 1153-1159.

COX, G. 1995. "Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes". Journal of Immunology, vol. 154, p. 4719-4725.

CRONSTEIN, B. N., Y. Molad, J. Reibman, E. Balakhane, R. I. Levin et G. Weissmann. 1995. "Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils". Journal of Clinical Investigation, vol. 96, p. 994-1002.

- CRYNS, V. L., L. Bergeron, H. Zhu, H. Li et J. Yuan. 1996. "Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor- induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 31277-31282.
- DAY, B. W. 2000. "Mutants yield a pharmacophore model for the tubulin-paclitaxel binding site". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 21, p. 321-324.
- DEATON, J. D., T. Guerrero et T. H. Howard. 1992. "Role of gelsolin interaction with actin in regulation and creation of actin nuclei in chemotactic peptide activated polymorphonuclear neutrophils". Molecular Biology of the Cell, vol. 3, p. 1427-1435.
- DENIS, F., E. Rheaume, S. M. Aouad, A. Alam, R. P. Sekaly et L. Y. Cohen. 1998. "The role of caspases in T cell development and the control of immune responses". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 54, p. 1005-1019.
- DI CARLO, E., G. Forni, P. Lollini, M. P. Colombo, A. Modesti et P. Musiani. 2001. "The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions". Blood, vol. 97, p. 339-345.
- DIETRICH, J. B., G. Ribereau-Gayon, M. L. Jung, H. Franz, J. P. Beck et R. Anton. 1992. "Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins". Anti-Cancer Drugs, vol. 3, p. 507-511.
- DING, M., J. M. Robinson, B. C. Behrens et D. D. Vandre. 1995. "The microtubule cytoskeleton in human phagocytic leukocytes is a highly dynamic structure". European Journal of Cell Biology, vol. 66, p. 234-245.
- DINTER, A. et E. G. Berger. 1998. "Golgi-disturbing agents". Histochemistry and Cell Biology, vol. 109, p. 571-590.
- DOWNEY, G. P., S. Grinstein, A. Sue-A-Quan, B. Czaban et C. K. Chan. 1995. "Volume regulation in leukocytes: requirement for an intact cytoskeleton". Journal of Cellular Physiology, vol. 163, p. 96-104.
- DOWNEY, G. P., A. Takai, R. Zamel, S. Grinstein et C. K. Chan. 1993. "Okadaic acid-induced actin assembly in neutrophils: role of protein phosphatases". Journal of Cellular Physiology, vol. 155, p. 505-519.
- DOWNING, K. H. et E. Nogales. 1998. "Tubulin and microtubule structure". Current Opinion in Cell Biology, vol. 10, p. 16-22.

DOWNING, K. H. et E. Nogales. 1998. "Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions". Current Opinion in Structural Biology, vol. 8, p. 785-791.

DRANSFIELD, I., A. M. Buckle, J. S. Savill, A. McDowall, C. Haslett et N. Hogg. 1994. "Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression". Journal of Immunology, vol. 153, p. 1254-1263.

DRANSFIELD, I., S. C. Stocks et C. Haslett. 1995. "Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis". Blood, vol. 85, p. 3264-3273.

EDDY, R. J., L. M. Pierini, F. Matsumura et F. R. Maxfield. 2000. "Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration". Journal of Cell Science, vol. 113 (Pt 7), p. 1287-1298.

EDWARDS S. W. 1994. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. New York : Cambridge University Press. 299 p.

ELSASSER-BEILE, U., S. Lusebrink, T. Grussenmeyer, U. Wetterauer et W. Schultze-Seemann. 1998. "Comparison of the effects of various clinically applied mistletoe preparations on peripheral blood leukocytes". Arzneimittel-Forschung, vol. 48, p. 1185-1189.

ENARI, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu et S. Nagata. 1998. "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD". Nature, vol. 391, p. 43-50.

ERNST, E. et B. R. Cassileth. 1999. "How useful are unconventional cancer treatments?". European Journal of Cancer, vol. 35, p. 1608-1613.

ERWIG, L. P., S. Gordon, G. M. Walsh et A. J. Rees. 1999. "Previous uptake of apoptotic neutrophils or ligation of integrin receptors downmodulates the ability of macrophages to ingest apoptotic neutrophils". Blood, vol. 93, p. 1406-1412.

EVAN, G. et T. Littlewood. 1998. "A matter of life and cell death". Science, vol. 281, p. 1317-1322.

FADEEL, B., A. Ahlin, J. I. Henter, S. Orrenius et M. B. Hampton. 1998. "Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species". Blood, vol. 92, p. 4808-4818.

FERNANDEZ, R., L. A. Boxer et S. J. Suchard. 1997. "Beta2 integrins are not required for tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils". Journal of Immunology, vol. 159, p. 5568-5575.

FERNANDEZ, R. et S. J. Suchard. 1998. "Syk activation is required for spreading and H₂O₂ release in adherent human neutrophils". Journal of Immunology, vol. 160, p. 5154-5162.

FRANZ, H., A. Kindt, P. Ziska, H. Bielka, R. Benndorf et L. Venker. 1982. "The toxic A-chain of mistletoe lectin I: isolation and its effect on cell-free protein synthesis". Acta Biologica et Medica Germanica, vol. 41, p. K9-K16.

FUORTES, M., W. W. Jin et C. Nathan. 1994. "Beta 2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor". Journal of Cell Biology, vol. 127, p. 1477-1483.

FUORTES, M., M. Melchior, H. Han, G. J. Lyon et C. Nathan. 1999. "Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF". Journal of Clinical Investigation, vol. 104, p. 327-335.

GABIUS, H. J., H. Walzel, S. S. Joshi, J. Kruij, S. Kojima, V. Gerke, H. Kratzin et S. Gabius. 1992. "The immunomodulatory beta-galactoside-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells". Anticancer Research, vol. 12, p. 669-675.

GABRIOLOVICH D. I. 1999. The Neutrophils : New Outlook for old cells, London : Imperial College Press, 362 p.

GAUTHIER, M., C. J. Roberge, M. Pelletier, P. A. Tessier et D. Girard. 2001. "Activation of human neutrophils by technical toxaphene". Clinical Immunology, vol. 98, p. 46-53.

GENG, Y. J., T. Azuma, J. X. Tang, J. H. Hartwig, M. Muszynski, Q. Wu, P. Libby et D. J. Kwiatkowski. 1998. "Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines". European Journal of Cell Biology, vol. 77, p. 294-302.

GIRARD, D. et A. D. Beaulieu. 1997. "Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that gamma(c) expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses". Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 83, p. 264-271.

GIRARD, D., N. Boiani et A. D. Beaulieu. 1998. "Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component". Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 88, p. 232-240.

GIRARD, D., J. Gosselin, D. Heitz, R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1995. "Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils". Blood, vol. 86, p. 1170-1176.

GIRARD, D., M. E. Paquet, R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1996. "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, vol. 88, p. 3176-3184.

GIRARD, D., R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1997. "Responsiveness of human neutrophils

to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis". Biochemical Journal, vol. 325 (Pt 1), p. 147-153.

GIRARD, D., R. Paquin, P. H. Naccache et A. D. Beaulieu. 1996. "Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions". Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, p. 412-419.

GIRARD, D. et J. L. Senecal. 1995. "Anti-microfilament IgG antibodies in normal adults and in patients with autoimmune diseases: immunofluorescence and immunoblotting analysis of 201 subjects reveals polyreactivity with microfilament-associated proteins". Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 74, p. 193-201.

GOECKELER, Z. M., R. A. Masaracchia, Q. Zeng, T. L. Chew, P. Gallagher et R. B. Wysolmerski. 2000. "Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 18366-18374.

GOLDMAN, R. D., S. Khuon, Y. H. Chou, P. Opal et P. M. Steinert. 1996. "The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity". Journal of Cell Biology, vol. 134, p. 971-983.

GOTO, H., H. Kosako, K. Tanabe, M. Yanagida, M. Sakurai, M. Amano, K. Kaibuchi et M. Inagaki. 1998. "Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 11728-11736.

GRAY, A. M. et P. R. Flatt. 1999. "Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe)". Journal of Endocrinology, vol. 160, p. 409-414.

GREEN, D. R. et J. C. Reed. 1998. "Mitochondria and apoptosis". Science, vol. 281, p. 1309-1312.

GREGOLI, P. A. et M. C. Bondurant. 1999. "Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors". Journal of Cellular Physiology, vol. 178, p. 133-143.

HABECK, M. 1999. "Gelsolin: a new marker for breast cancer?". Molecular Medicine Today, vol. 5, p. 503.

HAJTO, T., K. Hostanska, J. Fischer et R. Saller. 1997. "Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity". Anti-Cancer Drugs, vol. 8 Suppl 1, p. S43-S46.

HAJTO, T., K. Hostanska, K. Frei, C. Rordorf et H. J. Gabius. 1990. "Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract". Cancer Research, vol. 50, p. 3322-3326.

- HAJTO, T., K. Hostanska et H. J. Gabius. 1989. "Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients". Cancer Research, vol. 49, p. 4803-4808.
- HAJTO, T., K. Hostanska, K. Weber, H. Zinke, J. Fischer, U. Mengers, H. Lentzen et R. Saller. 1998. "Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo". Natural Immunity, vol. 16, p. 34-46.
- HALL, S. E., J. S. Savill, P. M. Henson et C. Haslett. 1994. "Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin". Journal of Immunology, vol. 153, p. 3218-3227.
- HANNAH, S., K. Mecklenburgh, I. Rahman, G. J. Bellingan, A. Greening, C. Haslett et E. R. Chilvers. 1995. "Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro". FEBS Letters, vol. 372, p. 233-237.
- HARAKAWA, N., M. Sasada, A. Maeda, K. Asagoe, M. Nohgawa, K. Takano, Y. Matsuda, K. Yamamoto et M. Okuma. 1997. "Random migration of polymorphonuclear leukocytes induced by GM-CSF involving a signal transduction pathway different from that of fMLP". Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 500-506.
- HART, S. P., J. A. Ross, K. Ross, C. Haslett et I. Dransfield. 2000. "Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes". Cell Death and Differentiation, vol. 7, p. 493-503.
- HARTMAN, K. R., M. K. Mallet, J. Nath et D. G. Wright. 1990. "Antibodies to actin in autoimmune neutropenia". Blood, vol. 75, p. 736-743.
- HASLETT, C., J. S. Savill et L. Meagher. 1989. "The neutrophil". Current Opinion in Immunology, vol. 2, p. 10-18.
- HENGARTNER, M. O. 2000. "The biochemistry of apoptosis". Nature, vol. 407, p. 770-776.
- HERRMANN, H. et U. Aebi. 2000. "Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics". Current Opinion in Cell Biology, vol. 12, p. 79-90.
- HEYWORTH, P. G., R. W. Erickson, J. Ding, J. T. Curnutte et J. A. Badwey. 1995. "Naphthalenesulphonamides block neutrophil superoxide production by intact cells and in a cell-free system: is myosin light chain kinase responsible for these effects?". Biochemical Journal, vol. 311 (Pt 1), p. 81-87.

HIRAOKA, W., N. Vazquez, W. Nieves-Neira, S. J. Chanock et Y. Pommier. 1998. "Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells". Journal of Clinical Investigation, vol. 102, p. 1961-1968.

HOMBURG, C. H., M. de Haas, A. E. von dem Borne, A. J. Verhoeven, C. P. Reutelingsperger et D. Roos. 1995. "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro". Blood, vol. 85, p. 532-540.

HOMBURG, C. H. et D. Roos. 1996. "Apoptosis of neutrophils". Current Opinion in Hematology, vol. 3, p. 94-99.

HORTON H. R., L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn et K. G. Scrimgeour. 1994. Principes de biochimie. Bruxelles : DeBoeck Université, 720 p.

HOSTANSKA, K., T. Hajto, G. C. Spagnoli, J. Fischer, H. Lentzen et R. Herrmann. 1995. "A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells". Natural Immunity, vol. 14, p. 295-304.

HOSTANSKA, K., T. Hajto, K. Weber, J. Fischer, H. Lentzen, B. Sutterlin et R. Saller. 1996-1997. "A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes". Natural Immunity, vol. 15, p. 295-311.

HOWARD, T., C. Chaponnier, H. Yin et T. Stossel. 1990. "Gelsolin-actin interaction and actin polymerization in human neutrophils". Journal of Cell Biology, vol. 110, p. 1983-1991.

HUANG, C. K., J. F. Devanney et S. P. Kennedy. 1988. "Vimentin, a cytoskeletal substrate of protein kinase C". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 150, p. 1006-1011.

HUGHES, J., Y. Liu, J. Van Damme et J. Savill. 1997. "Human glomerular mesangial cell phagocytosis of apoptotic neutrophils: mediation by a novel CD36-independent vitronectin receptor/thrombospondin recognition mechanism that is uncoupled from chemokine secretion". Journal of Immunology, vol. 158, p. 4389-4397.

IRVIN, J. D., T. Kelly et J. D. Robertus. 1980. "Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca americana* which inactivates eukaryotic ribosomes". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 200, p. 418-425.

ITO, M., F. Tanabe, A. Sato, E. Ishida, Y. Takami et S. Shigeta. 1989. "Possible involvement of microfilaments in protein kinase C translocation". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 160, p. 1344-1349.

- IWIG, M., E. Czeslick, A. Muller, M. Gruner, M. Spindler et D. Glaesser. 1995. "Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton". European Journal of Cell Biology, vol. 67, p. 145-157.
- IYER, S. S. et D. J. Kusner. 1999. "Association of phospholipase D activity with the detergent-insoluble cytoskeleton of U937 promonocytic leukocytes". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 2350-2359.
- JACOBSON, P. B., S. L. Kuchera, A. Metz, C. Schachtele, K. Imre et D. J. Schrier. 1995. "Anti-inflammatory properties of Go 6850: a selective inhibitor of protein kinase C". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 275, p. 995-1002.
- JANECZEK, A. H., P. J. Van Alten, H. M. Reyes et R. J. Walter. 1993. "Modulation of the cytoskeleton and intracellular calcium in leukocytes exhibiting a cancer-associated chemotaxis defect". Journal of Leukocyte Biology, vol. 54, p. 351-359.
- JANICKE, R. U., P. Ng, M. L. Sprengart et A. G. Porter. 1998. "Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 15540-15545.
- JANMEY, P. A. et C. Chaponnier. 1995. "Medical aspects of the actin cytoskeleton". Current Opinion in Cell Biology, vol. 7, p. 111-117.
- KASAHARA, Y., K. Iwai, A. Yachie, K. Ohta, A. Konno, H. Seki, T. Miyawaki et N. Taniguchi. 1997. "Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils". Blood, vol. 89, p. 1748-1753.
- KAYALAR, C., T. Ord, M. P. Testa, L. T. Zhong et D. E. Bredesen. 1996. "Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 2234-2238.
- KELLER, H. et V. Niggli. 1995. "Effects of cytochalasin D on shape and fluid pinocytosis in human neutrophils as related to cytoskeletal changes (actin, alpha-actinin and microtubules)". European Journal of Cell Biology, vol. 66, p. 157-164.
- KELLER, H. U. et V. Niggli. 1993. "Colchicine-induced stimulation of PMN motility related to cytoskeletal changes in actin, alpha-actinin, and myosin". Cell Motility and the Cytoskeleton, vol. 25, p. 10-18.
- KIRSCH, D. G., A. Doseff, B. N. Chau, D. S. Lim, N. C. de Souza-Pinto, R. Hansford, M. B. Kastan, Y. A. Lazebnik et J. M. Hardwick. 1999. "Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 21155-21161.
- KITSIS, E. et G. Weissmann. 1991. "The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis". Clinical Orthopaedics and Related Research, vol. 63-72.

KLUT, M. E., B. A. Whalen et J. C. Hogg. 1997. "Activation-associated changes in blood and bone marrow neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 62, p. 186-194.

KOJIO, S., H. Zhang, M. Ohmura, F. Gondaira, N. Kobayashi et T. Yamamoto. 2000. "Caspase-3 activation and apoptosis induction coupled with the retrograde transport of shiga toxin: inhibition by brefeldin A". FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 29, p. 275-281.

KOOK, S., S. R. Shim, S. J. Choi, J. Ahnn, J. I. Kim, S. H. Eom, Y. K. Jung, S. G. Paik et W. K. Song. 2000. "Caspase-mediated cleavage of p130cas in etoposide-induced apoptotic Rat-1 cells". Molecular Biology of the Cell, vol. 11, p. 929-939.

KOTHAKOTA, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Koths, D. J. Kwiatkowski et L. T. Williams. 1997. "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis". Science, vol. 278, p. 294-298.

KOVACS, E., T. Hajto et K. Hostanska. 1991. "Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscador)". European Journal of Cancer, vol. 27, p. 1672-1676.

KOYA, R. C., H. Fujita, S. Shimizu, M. Ohtsu, M. Takimoto, Y. Tsujimoto et N. Kuzumaki. 2000. "Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 15343-15349.

KRAMMER, P. H. 2000. "CD95's deadly mission in the immune system". Nature, vol. 407, p. 789-795.

KRAUSPENHAAR, R., S. Eschenburg, M. Perbandt, V. Kornilov, N. Konareva, I. Mikailova, S. Stoeva, R. Wacker, T. Maier, T. Singh, A. Mikhailov, W. Voelter et C. Betzel. 1999. "Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 257, p. 418-424.

KUNZE, D. et B. Rustow. 1993. "Pathobiochemical aspects of cytoskeleton components". European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, vol. 31, p. 477-489.

KWIATKOWSKI, D. J. 1999. "Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer". Current Opinion in Cell Biology, vol. 11, p. 103-108.

KWIATKOWSKI, D. J., P. A. Janmey et H. L. Yin. 1989. "Identification of critical functional and regulatory domains in gelsolin". Journal of Cell Biology, vol. 108, p. 1717-1726.

LAUDANNA, C., J. J. Campbell et E. C. Butcher. 1996. "Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins". Science, vol. 271, p. 981-983.

- LAUDANNA, C., D. Mochly-Rosen, T. Liron, G. Constantin et E. C. Butcher. 1998. "Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 30306-30315.
- LEE, A., M. K. Whyte et C. Haslett. 1993. "Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators". Journal of Leukocyte Biology, vol. 54, p. 283-288.
- LEID, J. G., D. A. Steeber, T. F. Tedder et M. A. Jutila. 2001. "Antibody binding to a conformation-dependent epitope induces l-selectin association with the detergent-resistant cytoskeleton". Journal of Immunology, vol. 166, p. 4899-4907.
- LEVKAU, B., B. Herren, H. Koyama, R. Ross et E. W. Raines. 1998. "Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis". Journal of Experimental Medicine, vol. 187, p. 579-586.
- LILES, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo et S. J. Klebanoff. 1996. "Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils". Journal of Experimental Medicine, vol. 184, p. 429-440.
- LIU, X. H., J. C. Castelli et R. J. Youle. 1999. "Receptor-mediated uptake of an extracellular Bcl-x(L) fusion protein inhibits apoptosis". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 9563-9567.
- LOFGREN, R., J. Ng-Sikorski, A. Sjolander et T. Andersson. 1993. "Beta 2 integrin engagement triggers actin polymerization and phosphatidylinositol trisphosphate formation in non-adherent human neutrophils". Journal of Cell Biology, vol. 123, p. 1597-1605.
- LUECK, A., D. Brown et D. J. Kwiatkowski. 1998. "The actin-binding proteins adseverin and gelsolin are both highly expressed but differentially localized in kidney and intestine". Journal of Cell Science, vol. 111 (Pt 24), p. 3633-3643.
- MANSFIELD, P. J., J. A. Shayman et L. A. Boxer. 2000. "Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase". Blood, vol. 95, p. 2407-2412.
- MARIGGIO, M. A., V. Minunno, S. Riccardi, R. Santacroce, P. De Rinaldis et R. Fumarulo. 1998. "Sulfide enhancement of PMN apoptosis". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 20, p. 399-408.
- MARKS, P. W., M. Arai, J. L. Bandura et D. J. Kwiatkowski. 1998. "Advillin (p92): a new member of the gelsolin/villin family of actin regulatory proteins". Journal of Cell Science, vol. 111 (Pt 15), p. 2129-2136.

MASHIMA, T., M. Naito, N. Fujita, K. Noguchi et T. Tsuruo. 1995. "Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 217, p. 1185-1192.

MEIER, P., A. Finch et G. Evan. 2000. "Apoptosis in development". Nature, vol. 407, p. 796-801.

MELAMED, I. et E. W. Gelfand. 1999. "Microfilament assembly is involved in B-cell apoptosis". Cellular Immunology, vol. 194, p. 136-142.

MIDDELHOVEN, P. J., J. D. van Buul, M. Kleijer, D. Roos et P. L. Hordijk. 1999. "Actin polymerization induces shedding of Fc γ RIIIb (CD16) from human neutrophils". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 255, p. 568-574.

MIELNICKI, L. M., A. M. Ying, K. L. Head, H. L. Asch et B. B. Asch. 1999. "Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells". Experimental Cell Research, vol. 249, p. 161-176.

MINESHITA, M., T. Kimura, H. Murai, C. Moritani, S. Ishioka, M. Kambe et M. Yamakido. 1997. "Whole-blood incubation method to study neutrophil cytoskeletal dynamics". Journal of Immunological Methods, vol. 202, p. 59-66.

MOULDING, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart et S. W. Edwards. 1998. "Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival". Blood, vol. 92, p. 2495-2502.

MUELLER, G. A., W. M. Quinlan, N. A. Doyle et C. M. Doerschuk. 1994. "The role of cytoskeletal proteins in neutrophil emigration during pneumonia in rabbits". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 150, p. 455-461.

MURRAY, J., J. A. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. Van Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett et E. R. Chilvers. 1997. "Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor- α : requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro". Blood, vol. 90, p. 2772-2783.

NATH, J., A. Powledge et D. G. Wright. 1989. "Studies of signal transduction in the respiratory burst-associated stimulation of fMet-Leu-Phe-induced tubulin tyrosination and phorbol 12-myristate 13-acetate-induced posttranslational incorporation of tyrosine into multiple proteins in activated neutrophils and HL-60 cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 848-855.

NG, F. W., M. Nguyen, T. Kwan, P. E. Branton, D. W. Nicholson, J. A. Cromlish et G. C. Shore. 1997. "p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum". Journal of Cell Biology, vol. 139, p. 327-338.

- NI, Y. et I. Tizard. 1996. "Lectin-carbohydrate interaction in the immune system". Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 55, p. 205-223.
- NICHOLSON, D. W. 2000. "From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents". Nature, vol. 407, p. 810-816.
- OGILVIE, B. M., P. W. Askenase et M. E. Rose. 1980. "Basophils and eosinophils in three strains of rats and in athymic (nude) rats following infection with the nematodes *Nippostrongylus brasiliensis* or *Trichinella spiralis*". Immunology, vol. 39, p. 385-389.
- OHTA, T., T. Kinoshita, M. Naito, T. Nozaki, M. Masutani, T. Tsuruo et A. Miyajima. 1997. "Requirement of the caspase-3/ CPP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 23111-23116.
- OKUYAMA, M., Y. Ohta, J. Kambayashi et M. Monden. 1996. "Fluid shear stress induces actin polymerization in human neutrophils". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 63, p. 432-441.
- OLSNES, S. et A. Pihl. 1973. "Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis". Biochemistry, vol. 12, p. 3121-3126.
- OLSNES, S. et A. Pihl. 1973. "Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains". European Journal of Biochemistry, vol. 35, p. 179-185.
- OLSNES, S., F. Stirpe, K. Sandvig et A. Pihl. 1982. "Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)". Journal of Biological Chemistry, vol. 257, p. 13263-13270.
- OMANN, G. M., R. A. Allen, G. M. Bokoch, R. G. Painter, A. E. Traynor et L. A. Sklar. 1987. "Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil". Physiological Reviews, vol. 67, p. 285-322.
- ONDA, H., A. Lueck, P. W. Marks, H. B. Warren et D. J. Kwiatkowski. 1999. "Tsc2(+/-) mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background". Journal of Clinical Investigation, vol. 104, p. 687-695.
- OTTO, J. J. 1990. "Vinculin". Cell Motility and the Cytoskeleton, vol. 16, p. 1-6.
- PARK, J. H., C. K. Hyun et H. K. Shin. 1999. "Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (*Viscum album*)". Cancer Letters, vol. 139, p. 207-213.
- PAVALKO, F. M. et S. M. LaRoche. 1993. "Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin". Journal of Immunology, vol. 151, p. 3795-3807.

- PELLETIER, M., A. Savoie et D. Girard. 2000. "Activation of human neutrophils by the air pollutant sodium sulfite (Na(2)SO(3)): comparison with immature promyelocytic HL-60 and DMSO- differentiated HL-60 cells reveals that Na(2)SO(3) is a neutrophil but not a HL-60 cell agonist". Clinical Immunology, vol. 96, p. 131-139.
- PERICLE, F., J. H. Liu, J. I. Diaz, D. K. Blanchard, S. Wei, G. Forni et J. Y. Djeu. 1994. "Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils". European Journal of Immunology, vol. 24, p. 440-444.
- PESTONJAMASP, K. N., R. K. Pope, J. D. Wulfkühle et E. J. Luna. 1997. "Supervillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily". Journal of Cell Biology, vol. 139, p. 1255-1269.
- PIAZZOLLA, G., C. Tortorella, M. Serrone, E. Jirillo et S. Antonaci. 1998. "Modulation of cytoskeleton assembly capacity and oxidative response in aged neutrophils". Immunopharmacology and Immunotoxicology, vol. 20, p. 251-266.
- PILLINGER, M. H. et S. B. Abramson. 1995. "The neutrophil in rheumatoid arthritis". Rheumatic Diseases Clinics of North America, vol. 21, p. 691-714.
- POSEY, S. C., M. P. Martelli, T. Azuma, D. J. Kwiatkowski et B. E. Bierer. 2000. "Failure of gelsolin overexpression to regulate lymphocyte apoptosis". Blood, vol. 95, p. 3483-3488.
- PRESCOTT L. J. P. Harley et D. A. Klein. 1995. Microbiologie. Bruxelles : DeBoeck Université, 1014 p.
- PRYDE, J. G., A. Walker, A. G. Rossi, S. Hannah et C. Haslett. 2000. "Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 33574-33584.
- PRYZWANSKY, K. B. et E. P. Merricks. 1998. "Chemotactic peptide-induced changes of intermediate filament organization in neutrophils during granule secretion: role of cyclic guanosine monophosphate". Molecular Biology of the Cell, vol. 9, p. 2933-2947.
- PRYZWANSKY, K. B., T. A. Wyatt et T. M. Lincoln. 1995. "Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils". Blood, vol. 85, p. 222-230.
- REDMOND, T., M. Tardif et S. H. Zigmond. 1994. "Induction of actin polymerization in permeabilized neutrophils. Role of ATP". Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 21657-21663.
- RENGAN, R., H. D. Ochs, L. I. Sweet, M. L. Keil, W. T. Gunning, N. A. Lachant, L. A. Boxer et G. M. Omann. 2000. "Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells". Blood, vol. 95, p. 1283-1292.

- RHEAUME, E., L. Y. Cohen, F. Uhlmann, C. Lazure, A. Alam, J. Hurwitz, R. P. Sekaly et F. Denis. 1997. "The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas- mediated apoptosis". EMBO Journal, vol. 16, p. 6346-6354.
- ROBERTS, W. K. et T. S. Stewart. 1979. "Purification and properties of a translation inhibitor from wheat germ". Biochemistry, vol. 18, p. 2615-2621.
- ROBINSON, J. M. et D. D. Vandre. 1997. "Efficient immunocytochemical labeling of leukocyte microtubules with FluoroNanogold: an important tool for correlative microscopy". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 45, p. 631-642.
- ROBINSON, R. C., M. Mejillano, V. P. Le, L. D. Burtnick, H. L. Yin et S. Choe. 1999. "Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch". Science, vol. 286, p. 1939-1942.
- ROGERS, K. R., C. J. Morris et D. R. Blake. 1992. "The cytoskeleton and its importance as a mediator of inflammation". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 51, p. 565-571.
- ROITT I. M., J. Brostoff et D. K. Male. 1994. Immunologie. Bruxelles : DeBoeck Université, 406 p.
- ROTHWELL, S. W., J. Nath et D. G. Wright. 1989. "Interactions of cytoplasmic granules with microtubules in human neutrophils". Journal of Cell Biology, vol. 108, p. 2313-2326.
- ROTHWELL, S. W., J. Nath et D. G. Wright. 1993. "Rapid and reversible tubulin tyrosination in human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide, fMet-Leu-Phe". Journal of Cellular Physiology, vol. 154, p. 582-592.
- RYU, H., J. H. Lee, K. S. Kim, S. M. Jeong, P. H. Kim et H. T. Chung. 2000. "Regulation of neutrophil adhesion by pituitary growth hormone accompanies tyrosine phosphorylation of Jak2, p125FAK, and paxillin". Journal of Immunology, vol. 165, p. 2116-2123.
- SAHA, A. K., J. N. Dowling, N. K. Mukhopadhyay et R. H. Glew. 1989. "Legionella micdadei protein kinase catalyzes phosphorylation of tubulin and phosphatidylinositol". Journal of Bacteriology, vol. 171, p. 5103-5110.
- SALAMONE, G., M. Giordano, A. S. Trevani, R. Gamberale, M. Vermeulen, J. Schettinni et J. R. Geffner. 2001. "Promotion of neutrophil apoptosis by TNF-alpha". Journal of Immunology, vol. 166, p. 3476-3483.
- SALGIA, R., N. Uemura, K. Okuda, J. L. Li, E. Pisick, M. Sattler, R. de Jong, B. Druker, N. Heisterkamp, L. B. Chen et a. l. et. 1995. "CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 29145-29150.

SAMEJIMA, K., P. A. Svingen, G. S. Basi, T. Kottke, P. W. Mesner Jr, L. Stewart, F. Durrieu, G. G. Poirier, E. S. Alnemri, J. J. Champoux, S. H. Kaufmann et W. C. Earnshaw. 1999. "Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 4335-4340.

SANCHEZ-MADRID, F. et M. A. del Pozo. 1999. "Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions". EMBO Journal, vol. 18, p. 501-511.

SANTORO, M. F., R. R. Annand, M. M. Robertson, Y. W. Peng, M. J. Brady, J. A. Mankovich, M. C. Hackett, T. Ghayur, G. Walter, W. W. Wong et D. A. Giegel. 1998. "Regulation of protein phosphatase 2A activity by caspase-3 during apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 13119-13128.

SANTOS-BENEIT, A. M. et F. Mollinedo. 2000. "Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells". Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 712-724.

SARND AHL, E., M. Lindroth, T. Bengtsson, M. Fallman, J. Gustavsson, O. Stendahl et T. Andersson. 1989. "Association of ligand-receptor complexes with actin filaments in human neutrophils: a possible regulatory role for a G-protein". Journal of Cell Biology, vol. 109, p. 2791-2799.

SAVILL, J. et V. Fadok. 2000. "Corpse clearance defines the meaning of cell death". Nature, vol. 407, p. 784-788.

SAVILL, J. et C. Haslett. 1995. "Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation". Seminars in Cell Biology, vol. 6, p. 385-393.

SAVILL, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson et C. Haslett. 1989. "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages". Journal of Clinical Investigation, vol. 83, p. 865-875.

SAVOIE, A., V. Lavastre, M. Pelletier, T. Hajto, K. Hostanska et D. Girard. 2000. "Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 845-853.

SCHAEFERMEYER, G. et H. Schaefermeyer. 1998. "Treatment of pancreatic cancer with *Viscum album* (Iscador): a retrospective study of 292 patients 1986-1996". Complementary Therapies in Medicine, vol. 6, p. 172-177.

SCHMID, I., C. H. Uittenbogaart et J. V. Giorgi. 1994. "Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry". Cytometry, vol. 15, p. 12-20.

SELLERS, W. R. et D. E. Fischer. 1999. "Apoptosis and cancer drug targeting". Journal of Clinical Investigation, vol. 104, p. 1655-1661.

SERHAN C. N. et P. A. Ward. 1999. Molecular and Cellular Basis of Inflammation. New Jersey : Humana Press, 338 p.

SERRANDER, L., P. Skarman, B. Rasmussen, W. Witke, D. P. Lew, K. H. Krause, O. Stendahl et O. Nusse. 2000. "Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils". Journal of Immunology, vol. 165, p. 2451-2457.

SERVANT, G., O. D. Weiner, E. R. Neptune, J. W. Sedat et H. R. Bourne. 1999. "Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis". Molecular Biology of the Cell, vol. 10, p. 1163-1178.

SETH, A., C. Zhang, N. L. Letvin et S. F. Schlossman. 1997. "Detection of apoptotic cells from peripheral blood of HIV-infected individuals using a novel monoclonal antibody". AIDS, vol. 11, p. 1059-1061.

SHARMA, V. et A. Surolia. 1997. "Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity". Journal of Molecular Biology, vol. 267, p. 433-445.

SIEBERT, H. C., C. W. von der Lieth, R. Kaptein, J. J. Beintema, K. Dijkstra, N. van Nuland, U. M. Soedjanaatmadja, A. Rice, J. F. Vliegenthart, C. S. Wright et H. J. Gabius. 1997. "Role of aromatic amino acids in carbohydrate binding of plant lectins: laser photochemically induced dynamic nuclear polarization study of hevein domain-containing lectins". Proteins, vol. 28, p. 268-284.

SIMON, M. M., P. Waring, M. Lobigs, A. Nil, T. Tran, R. T. Hla, S. Chin et A. Mullbacher. 2000. "Cytotoxic T cells specifically induce Fas on target cells, thereby facilitating exocytosis-independent induction of apoptosis". Journal of Immunology, vol. 165, p. 3663-3672.

SLOAND, E. M., J. Maciejewski, P. Kumar, S. Kim, A. Chaudhuri et N. Young. 2000. "Protease inhibitors stimulate hematopoiesis and decrease apoptosis and ICE expression in CD34(+) cells". Blood, vol. 96, p. 2735-2739.

SNOEIJ, N. J., A. H. Penninks et W. Seinen. 1987. "Biological activity of organotin compounds--an overview". Environmental Research, vol. 44, p. 335-353.

STEIN, G. M., U. Pfuller et P. A. Berg. 1999. "Recognition of different antigens of mistletoe extracts by anti- mistletoe lectin antibodies". Cancer Letters, vol. 135, p. 165-170.

STEIN, G. M., G. Schaller, U. Pfuller, M. Schietzel et A. Bussing. 1999. "Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes". Anticancer Research, vol. 19, p. 1037-1042.

STEIN, G. M., G. Schaller, U. Pfüller, M. Wagner, B. Wagner, M. Schietzel et A. Bussing. 1999. "Characterisation of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1426, p. 80-90.

STIRPE, F., L. Barbieri, A. Abbondanza, A. I. Falasca, A. N. Brown, K. Sandvig, S. Olsnes et A. Pihl. 1985. "Properties of volkensin, a toxic lectin from *Adenia volkensii*". Journal of Biological Chemistry, vol. 260, p. 14589-14595.

STIRPE, F., L. Barbieri, M. G. Battelli, M. Soria et A. L. Douglas. 1992. "Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects". Bio/technology, vol. 10, p. 404-412.

STIRPE, F., A. Gasperi-Campani, L. Barbieri, A. Falasca, A. Abbondanza et W. A. Stevens. 1983. "Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree)". Biochemical Journal, vol. 216, p. 617-625.

STIRPE, F., R. F. Legg, L. J. Onyon, P. Ziska et H. Franz. 1980. "Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)". Biochemical Journal, vol. 190, p. 843-845.

STIRPE, F., K. Sandvig, S. Olsnes et A. Pihl. 1982. "Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture". Journal of Biological Chemistry, vol. 257, p. 13271-13277.

STOEVA, S., T. Maier, M. H. Soler et W. Voelter. 1999. "Carbohydrate Chains and Their Binding Sites in Mistletoe Lectin I". Polish J Chem, vol. 73, p. 125-133.

STOSS, M. et R. W. Gorter. 1999. "No evidence of IFN-gamma increase in the serum of HIV-positive and healthy subjects after subcutaneous injection of a non-fermented *viscum album* L. extract". Natural Immunity, vol. 16, p. 157-164.

STRASSER, A., D. C. Huang et D. L. Vaux. 1997. "The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1333, p. F151-F178.

SUN, X. M., M. MacFarlane, J. Zhuang, B. B. Wolf, D. R. Green et G. M. Cohen. 1999. "Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 5053-5060.

SURIA, H., L. A. Chau, E. Negrou, D. J. Kelvin et J. Madrenas. 1999. "Cytoskeletal disruption induces T cell apoptosis by a caspase-3 mediated mechanism". Life Sciences, vol. 65, p. 2697-2707.

SUZUKI, K., T. Hasegawa, C. Sakamoto, Y. M. Zhou, F. Hato, M. Hino, N. Tatsumi et S. Kitagawa. 2001. "Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines". Journal of Immunology, vol. 166, p. 1185-1192.

SVITKINA, T. M., A. B. Verkhovsky et G. G. Borisy. 1996. "Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton". Journal of Cell Biology, vol. 135, p. 991-1007.

SZASZI, K., K. Kurashima, A. Kapus, A. Paulsen, K. Kaibuchi, S. Grinstein et J. Orlowski. 2000. "RhoA and rho kinase regulate the epithelial Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. Role of myosin light chain phosphorylation". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 28599-28606.

TABOR, B., B. Geissler, R. Odell, B. Schmidt, M. Blumenstein et K. Schindhelm. 1998. "Dialysis neutropenia: the role of the cytoskeleton". Kidney International, vol. 53, p. 783-789.

TAKAI, Y., T. Sasaki, K. Tanaka et H. Nakanishi. 1995. "Rho as a regulator of the cytoskeleton". Trends in Biochemical Sciences, vol. 20, p. 227-231.

TEMPEL, M., W. H. Goldmann, G. Isenberg et E. Sackmann. 1995. "Interaction of the 47-kDa talin fragment and the 32-kDa vinculin fragment with acidic phospholipids: a computer analysis". Biophys Journal, vol. 69, p. 228-241.

THORNBERRY, N. A. et Y. Lazebnik. 1998. "Caspases: enemies within". Science, vol. 281, p. 1312-1316.

TIMOSHENKO, A. V., S. N. Cherenkevich et H. J. Gabius. 1995. "Viscum album agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function". Biomedicine and Pharmacotherapy, vol. 49, p. 153-158.

TIMOSHENKO, A. V., L. V. Dubovskaya, O. D. Karvatskaya, V. V. Zharkov, S. Andre et H. J. Gabius. 1999. "NO-dependent regulation of lectin- and menadione-induced H₂O₂ production by cells from pleural effusions of lung cancer patients and by immune cells". International Journal of Oncology, vol. 14, p. 793-798.

TIMOSHENKO, A. V. et H. J. Gabius. 1993. "Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from *Viscum album*". Biological Chemistry Hoppe-Seyler, vol. 374, p. 237-243.

TIMOSHENKO, A. V., I. V. Gorudko, S. N. Cherenkevich et H. J. Gabius. 1999. "Differential potency of two crosslinking plant lectins to induce formation of haptenic-sugar-resistant aggregates of rat thymocytes by post-binding signaling". FEBS Letters, vol. 449, p. 75-78.

TORRES, M. et T. D. Coates. 1999. "Function of the cytoskeleton in human neutrophils and methods for evaluation". Journal of Immunological Methods, vol. 232, p. 89-109.

TROWBRIDGE H. O. et R. C. Emling. 1997. Inflammation : A Review of the Process. Illinois : Quintessence Publishing Co Inc., 236 p.

TSUJIMURA, K., M. Ogawara, Y. Takeuchi, S. Imajoh-Ohmi, M. H. Ha et M. Inagaki. 1994. "Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 31097-31106.

TURNER, C. E., J. R. Glenney Jr et K. Burridge. 1990. "Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions". Journal of Cell Biology, vol. 111, p. 1059-1068.

VAN DEN BERG, J. M., S. Weyer, J. J. Weening, D. Roos et T. W. Kuijpers. 2001. "Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 69, p. 467-473.

VAN WELY, M., M. Stoss et R. W. Gorter. 1999. "Toxicity of a standardized mistletoe extract in immunocompromised and healthy individuals". American Journal of Therapeutics, vol. 6, p. 37-43.

VEHMEYER, K., T. Hajto, K. Hostanska, S. Konemann, H. Loser, R. Saller et B. Wormann. 1998. "Lectin-induced increase in clonogenic growth of haematopoietic progenitor cells". European Journal of Haematology, vol. 60, p. 16-20.

VERMES, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken et C. Reutelingsperger. 1995. "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V". Journal of Immunological Methods, vol. 184, p. 39-51.

VOLZ, A. 1993. "Regulation of CD18 expression in human neutrophils as related to shape changes". Journal of Cell Science, vol. 106 (Pt 2), p. 493-501.

WADE, R. H. et A. A. Hyman. 1997. "Microtubule structure and dynamics". Current Opinion in Cell Biology, vol. 9, p. 12-17.

WALCZAK, C. E. 2000. "Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins". Current Opinion in Cell Biology, vol. 12, p. 52-56.

WANG, J. S., N. Pavlotsky, A. I. Tauber et K. S. Zaner. 1993. "Assembly dynamics of actin in adherent human neutrophils". Cell Motility and the Cytoskeleton, vol. 26, p. 340-348.

WANG, R., G. Alam, A. Zagariya, C. Gidea, H. Pinillos, O. Lalude, G. Choudhary, D. Oezatalay et B. D. Uhal. 2000. "Apoptosis of lung epithelial cells in response to TNF-alpha requires angiotensin II generation de novo". Journal of Cellular Physiology, vol. 185, p. 253-259.

- WANG, Z. Q., L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff et E. F. Wagner. 1997. "PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis". Genes and Development, vol. 11, p. 2347-2358.
- WARD, I., I. Dransfield, E. R. Chilvers, I. Haslett et A. G. Rossi. 1999. "Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 20, p. 503-509.
- WATSON, R. W., A. O'Neill, A. E. Brannigen, R. Coffey, J. C. Marshall, H. R. Brady et J. M. Fitzpatrick. 1999. "Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent". FEBS Letters, vol. 453, p. 67-71.
- WATTS, R. G. 1995. "Role of gelsolin in the formation and organization of triton-soluble F- actin during myeloid differentiation of HL-60 cells". Blood, vol. 85, p. 2212-2221.
- WATTS, R. G., J. D. Deaton et T. H. Howard. 1995. "Dynamics of triton-insoluble and triton-soluble F-actin pools in calcium-activated human polymorphonuclear leukocytes: evidence for regulation by gelsolin". Cell Motility and the Cytoskeleton, vol. 30, p. 136-145.
- WATTS, R. G. et T. H. Howard. 1994. "Role of tropomyosin, alpha-actinin, and actin binding protein 280 in stabilizing Triton insoluble F-actin in basal and chemotactic factor activated neutrophils". Cell Motility and the Cytoskeleton, vol. 28, p. 155-164.
- WEINMANN, P., P. Gaehtgens et B. Walzog. 1999. "Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3". Blood, vol. 93, p. 3106-3115.
- WEN, L. P., K. Madani, J. A. Fahrmi, S. R. Duncan et G. D. Rosen. 1997. "Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN- gamma and Fas". American Journal of Physiology, vol. 273, p. L921-L929.
- WERNER, M., K. S. Zänker et G. Nikolai. 1998. "Stimulation of T-cell locomotion in an *in vitro* assay by various *Viscum album* L. preparations (Iscador)". Int J Immunotherapy, vol. XIV, p. 135-142.
- WHEELER, J. G., L. S. Winkler, M. Seeds, D. Bass et J. S. Abramson. 1990. "Influenza A virus alters structural and biochemical functions of the neutrophil cytoskeleton". Journal of Leukocyte Biology, vol. 47, p. 332-343.
- WHITE, J. R., P. H. Naccache et R. I. Sha'afi. 1983. "Stimulation by chemotactic factor of actin association with the cytoskeleton in rabbit neutrophils. Effects of calcium and cytochalasin B". Journal of Biological Chemistry, vol. 258, p. 14041-14047.
- WHYTE, M. K., S. J. Hardwick, L. C. Meagher, J. S. Savill et C. Haslett. 1993. "Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils *in vitro*". Journal of Clinical Investigation, vol. 92, p. 446-455.

WHYTE, M. K., J. Savill, L. C. Meagher, A. Lee et C. Haslett. 1997. "Coupling of neutrophil apoptosis to recognition by macrophages: coordinated acceleration by protein synthesis inhibitors". Journal of Leukocyte Biology, vol. 62, p. 195-202.

WILES, M. E., J. A. Dykens et C. D. Wright. 1994. "Regulation of polymorphonuclear leukocyte membrane fluidity: effect of cytoskeletal modification". Journal of Leukocyte Biology, vol. 56, p. 192-199.

WILLIAMS, D. S., S. Park, C. L. Schlamp et A. C. Newton. 1994. "Protein kinase C association with the retinal cytoskeleton and phosphorylation of vimentin". Experimental Eye Research, vol. 58, p. 747-759.

WINKLER, H. H. et H. E. Neuhaus. 1999. "Non-mitochondrial ATP transport". Trends in Biochemical Sciences, vol. 24, p. 64-68.

WITKE, W., A. H. Sharpe, J. H. Hartwig, T. Azuma, T. P. Stossel et D. J. Kwiatkowski. 1995. "Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin". Cell, vol. 81, p. 41-51.

WYATT, T. A., T. M. Lincoln et K. B. Pryzwansky. 1991. "Vimentin is transiently colocalized with and phosphorylated by cyclic GMP-dependent protein kinase in formyl-peptide-stimulated neutrophils". Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 21274-21280.

WYLLIE, A. H. 1985. "The biology of cell death in tumours". Anticancer Research, vol. 5, p. 131-136.

XIE, M. H., S. Aggarwal, W. H. Ho, J. Foster, Z. Zhang, J. Stinson, W. I. Wood, A. D. Goddard et A. L. Gurney. 2000. "Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 31335-31339.

YAMASHITA, K., A. Takahashi, S. Kobayashi, H. Hirata, P. W. Mesner Jr, S. H. Kaufmann, S. Yonehara, K. Yamamoto, T. Uchiyama et M. Sasada. 1999. "Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production". Blood, vol. 93, p. 674-685.

YAN, S. R. et G. Berton. 1998. "Antibody-induced engagement of beta2 integrins in human neutrophils causes a rapid redistribution of cytoskeletal proteins, Src-family tyrosine kinases, and p72syk that precedes de novo actin polymerization". Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, p. 401-408.

YUAN, J. et B. A. Yankner. 2000. "Apoptosis in the nervous system". Nature, vol. 407, p. 802-809.

YURUKER, B. et V. Niggli. 1992. "Alpha-actinin and vinculin in human neutrophils: reorganization during adhesion and relation to the actin network". Journal of Cell Science, vol. 101 (Pt 2), p. 403-414.

ZHANG, J. H., A. Ferrante, A. P. Arrigo et J. M. Dayer. 1992. "Neutrophil stimulation and priming by direct contact with activated human T lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 148, p. 177-181.

ZHELEV, D. V. et R. M. Hochmuth. 1995. "Mechanically stimulated cytoskeleton rearrangement and cortical contraction in human neutrophils". Biophysical Journal, vol. 68, p. 2004-2014.

ZHU, X., C. Deng, R. Kuick, R. Yung, B. Lamb, J. V. Neel, B. Richardson et S. Hanash. 1999. "Analysis of human peripheral blood T cells and single-cell-derived T cell clones uncovers extensive clonal CpG island methylation heterogeneity throughout the genome". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 8058-8063.

ZHUANG, J. et G. M. Cohen. 1998. "Release of mitochondrial cytochrome c is upstream of caspase activation in chemical-induced apoptosis in human monocytic tumour cells". Toxicology Letters, vol. 102-103, p. 121-129.

ZHUANG, J., Y. Ren, R. T. Snowden, H. Zhu, V. Gogvadze, J. S. Savill et G. M. Cohen. 1998. "Dissociation of phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis from other features of the apoptotic program". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 15628-15632.

ANNEXE Articles secondaires

1. ARTICLE 3

Titre

Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: Modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis

Auteurs

Anik Savoie, Valérie Lavastre, Martin Pelletier, Tibor Hajto, Katarina Hostanska et Denis Girard

Publié dans

Journal of Leukocyte Biology (Décembre 2000), volume 68, pages 845 à 853.

Contribution personnelle

Cet article est le premier article secondaire. J'ai contribué à la réalisation d'une figure. Cette figure est la première évidence qu'au moins une protéine du cytosquelette, la gelsoline, qui est une protéine associée aux microfilaments (actine), est affectée par l'induction de l'apoptose par la VAA-I. La gelsoline subit une fragmentation évidente puisque que la gelsoline native (90 kD) est complètement dégradée en fragments plus légers à l'ajout de la VAA-I. On a ensuite remarqué que cette dégradation était dépendante des caspases. Ces observations ont pu être réalisées grâce à la visualisation de cette protéine sur gel d'acrylamide. J'ai de nouveau aidé à la correction du manuscrit.

Contribution des co-auteurs

Anik Savoie : Elle a mesuré le taux d'apoptose des neutrophiles suite à l'ajout de différentes concentrations de VAA-I et à différents temps par cytologie. Elle a mesuré la

synthèse protéique *de novo* intracellulaire et extracellulaire par incorporation de S³⁵. Elle a aussi réalisé les expériences reliées à la phosphorylation des tyrosines par SDS-PAGE. Elle a évalué l'implication des caspases à l'ajout de la z-VAD-fmk, en observant le taux d'apoptose par cytologie. Elle a également aidé à la correction du manuscrit.

Martin Pelletier : Il a confirmé les résultats obtenus par Anik Savoie, puis effectué les analyses statistiques de densitométrie. Il a également aidé à la correction du manuscrit.

Tibor Hajto et Katarina Hostanska : Ils ont mesuré le taux d'apoptose par cytométrie en flux (Annexine-V et PI) de la VAA-I à différents temps. Ils nous ont fourni la VAA-I.

Denis Girard : Il a participé à la planification des expériences, aux analyses statistiques ainsi qu'à la réalisation du manuscrit.

1.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 3

La *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) a récemment été reconnue pour moduler la synthèse des protéines et induire l'apoptose dans différentes cellules du système immunitaire. Nous avons découvert que la VAA-I induit la synthèse protéique *de novo* par marquage au ^{35}S quand elle est utilisée à basse concentration (moins de 100 ng/mL) mais qu'elle agit comme inhibiteur à plus forte concentration. En utilisant conjointement la cytométrie en flux (marquage à l'annexine-V-FITC) et la cytologie, nous avons remarqué que la VAA-I ne module pas l'apoptose des neutrophiles lorsqu'utilisée à basse concentration mais qu'à 500 et 1000 ng/mL, elle l'induit chez plus de 98% des cellules. La VAA-I peut également renverser l'effet retardant du GM-CSF sur l'induction d'apoptose et bloquer la synthèse protéique *de novo* induit par cette même cytokine. Contrairement au GM-CSF, le VAA-I n'induit aucun événement de phosphorylations des tyrosines et n'altère pas les réponses induites par le GM-CSF. Parmi les différents inhibiteurs utilisés, la génistéine, la toxine pertussis, la staurosporine, le H7, le calphostin C, la manoalide, le BpB, la quinacrine HA-1077 et la z-VAD-FMK, seulement ce dernier (inhibiteur des caspases-1,-3,-4 et -7) a pu inhiber l'induction d'apoptose par la VAA-I en diminuant le pourcentage de cellules apoptotiques de 98 \pm 1,3% à 54 \pm 3,2% (n=4). De plus, nous confirmons que les caspases sont impliquées dans l'induction de l'apoptose des neutrophiles par la VAA-I par l'observation de la fragmentation d'une protéine du cytosquelette, la gelsoline, protéine dont la dégradation est connue comme étant dépendante de la caspase-3. D'ailleurs, cette dégradation était prévenue par l'ajout de la zVAD-FMK. Nous concluons que la VAA-I induit l'apoptose des neutrophiles humains par un mécanisme dépendant des caspases et n'implique pas les événements de phosphorylation des tyrosines, les protéines G, les PKC ainsi que les PLA₂. La corrélation entre l'induction de l'apoptose par la VAA-I et l'inhibition de la synthèse protéique *de novo* est discutée dans cette étude.

1.2 ARTICLE 3 TEL QUE PUBLIÉ

Pour des raisons de droits d'auteur, les pages de l'article ont été retirées de ce document.
L'article se trouve à l'adresse URL suivante : <http://www.jleukbio.org/content/68/6/845.long>

2. ARTICLE 4

Titre

Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I

Auteurs

Martin Pelletier, Anik Savoie, Valérie Lavastre, Claude Ratthé, Reinhard Saller, Katarina Hostanska et Denis Girard

Publié dans

Clinical immunology (Novembre 2001), volume **101**, no. 2, pages 229 à 236.

Contribution personnelle

Cet article est le deuxième article secondaire. J'ai contribué à la réalisation d'une figure. Cette figure démontre clairement que l'ajout de l'interleukine-15 n'affecte en rien la dégradation de la gelsoline, protéine du cytosquelette, induite par la VAA-I, comme décrit dans l'article précédent. Ceci est tout à fait nouveau puisque cette interleukine est une cytokine qui permet de retarder l'apoptose contrairement à la VAA-I, qui elle, induit fortement l'apoptose. Cette observation a pu être réalisée encore une fois grâce à la visualisation de cette protéine sur gel d'acrylamide. J'ai également aidé à la correction du document.

Contribution des co-auteurs

Martin Pelletier : Il a mesuré la phosphorylation des thréonines en fonction du temps. Il a réalisé les expériences de phagocytose, de synthèse protéique *de novo*. Il a réalisé les expériences avec l'IL-15. Il a aidé à la correction du manuscrit.

Anik Savoie : Elle a réalisé les expériences de phosphorylation des thréonines, des sérines et des tyrosines. Elle a aidé à la correction du manuscrit.

Claude Ratthé : Elle a réalisé les expériences avec les inhibiteurs. Elle a aidé à la correction du manuscrit.

Reinhard Saller et Katarina Hostanska : Ils nous ont fourni la VAA-I.

Denis Girard : Il a participé à la planification des expériences, aux analyses statistiques ainsi qu'à la réalisation du manuscrit.

2.1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 4

La *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) et l'interleukine-15 (IL-15) sont deux molécules qui possèdent des propriétés à potentiel thérapeutique connues pour moduler les fonctions du neutrophile lorsqu'elles sont utilisées séparément. Cette étude nous a permis de mieux comprendre le mode d'action de la VAA-I et d'élucider comment la VAA-I peut moduler les réponses du neutrophile induites par l'IL-15. Nous avons trouvé que la VAA-I n'induit aucun événement de phosphorylation chez les neutrophiles humains. Par contre, elle augmente la phagocytose par elle-même sans altérer la phagocytose induite par l'IL-15. La VAA-I affecte l'habileté de l'IL-15 à retarder l'apoptose et inhibe la synthèse protéique *de novo* induite par cette cytokine. De plus, nous avons démontré que l'IL-15 ne peut renverser ou atténuer la fragmentation de la gelsoline observée pendant l'apoptose par immunobuvardage. Nous concluons que la VAA-I peut moduler certaines réponses induites par l'IL-15 chez le neutrophile et que ceci s'effectue indépendamment des événements de phosphorylation.

2.2 ARTICLE 4 TEL QUE PUBLIÉ

Pour des raisons de droits d'auteur, les pages de l'article ont été retirées de ce document.
L'article se trouve à l'adresse URL suivante : <http://dx.doi.org/10.1006/clim.2001.5105>

