

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**RÔLE DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS L'APOPTOSE DES
NEUTROPHILES : RÔLE POTENTIEL DE L'ANNEXINE-1.**

Par
François Binet

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade 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

Examineur externe

M. Marc Pouliot, PhD
Unité de recherche en Rhumatologie et
Immunologie, CHUL, Université Laval.

Directeur de recherche

M. Denis Girard, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

Remerciements

Ces deux années de travail acharné ont passé très rapidement à mes yeux. Avant de commencer, je désire témoigner de mon appréciation et de ma gratitude envers les gens qui m'ont aidé à passer à travers cette belle expérience. Il y a plusieurs moments où leur support a été essentiel.

D'abord, je désire remercier mes collègues de laboratoire présents ou passés, Martin, Valérie, Claude, Éliane, Sonia, Hélène et Amélie qui m'ont beaucoup appris durant ces deux années de maîtrise. J'ai eu du plaisir à partager les longues et moins longues journées de travail avec vous, à faire des blagues, mais aussi (et surtout!) à échanger des conversations d'ordre scientifique.

Aussi, je dois souligner le support indéfectible de mes parents, Réjean et Louise, et de ma soeur, Anne-Renée, tout au long de mes études et pas seulement durant ce deuxième cycle universitaire. Je vous remercie de votre soutien et de votre écoute.

Ensuite, je dois remercier ma compagne depuis 4 ans, Ophélie, qui m'a donné toute la force et toute la motivation pour passer à travers les moments les plus difficiles de cette maîtrise. Tu as su m'offrir une autre perspective et m'as aidé à trouver les solutions de façon rationnelle. Sans ton support, je ne sais où je serais en ce moment.

Enfin, je veux offrir mes remerciements à mon directeur de recherche, Denis, qui m'a donné la motivation nécessaire pour accomplir ces deux années de travail. Je te remercie de m'avoir donné la chance d'effectuer ma maîtrise au sein d'une équipe aussi dynamique.

Table des matières

Remerciements.....	iii
Liste des abréviations.....	vii
Liste des figures et tableaux.....	xi
Résumé.....	xiii
Introduction.....	1
SECTION 1 : Revue de la littérature.....	3
Chapitre 1 : La physiologie du neutrophile.....	5
1.1 L'inflammation.....	5
1.2 Le neutrophile.....	5
1.2.1 La formation du neutrophile dans la moelle osseuse	5
1.2.2 Recrutement, adhésion et migration au site inflammatoire.....	7
1.3 Les mécanismes anti-microbiens.....	9
1.3.1 Les mécanismes dépendants de l'O ₂	11
1.3.2 Les mécanismes indépendants de l'O ₂	11
1.4 L'apoptose du neutrophile.....	13
1.4.1 Les changements moléculaires du neutrophile durant l'apoptose.....	14
1.4.2 La régulation de l'apoptose du neutrophile.....	15
1.4.2 a) Les principales voies apoptotiques.....	15
1.4.2 b) L'implication de Fas/FasL.....	16
1.4.2 c) Les caspases.....	17
1.4.2 d) Les protéines de la famille Bcl-2.....	17
1.4.2 e) Les calpaïnes.....	18
1.4.2 f) Le rôle des ROS.....	19
Chapitre 2 : Les agents modulant l'apoptose des neutrophiles.....	20
2.1 Les agents pouvant retarder l'apoptose des neutrophiles.....	21
2.1.1 Le GM-CSF.....	21
2.1.2 L'IL-15.....	22
2.1.3 La dexaméthasone.....	22
2.2 Les agents pouvant induire l'apoptose des neutrophiles.....	23
2.2.1 La VAA-I, le toxaphène et le TNF- α	24
2.2.2 Le trioxyde d'arsenic.....	25
Chapitre 3 : La synthèse protéique.....	28
3.1 La synthèse protéique chez le neutrophile.....	28
3.2 La synthèse protéique dans l'effet de certains agents pro- ou anti-apoptotiques.....	29
Chapitre 4 : Les annexines.....	33
4.1 La structure des annexines.....	33
4.2 Les fonctions des annexines.....	35
4.3 L'annexine-1.....	37
4.3.1 L'annexine-1, le neutrophile et l'apoptose.....	38
4.3.2 Le rôle global de l'annexine-1 dans l'inflammation.....	42

SECTION 2 : ARTICLE.....	45
Résumé en français de l'article.....	47
Contribution des auteurs de l'article.....	48
Texte original de l'article.....	50
Discussion et conclusion.....	95
Liste des références.....	105
Travaux complémentaires à l'article.....	123

Liste des abréviations

Act.D : actinomycine D

ADN : acide désoxyribonucléique

AIF : facteur induisant l'apoptose ou «apoptosis inducing factor»

APL : leucémie promyélocytaire aiguë ou «acute promyelocytic leukemia»

ARN : acide ribonucléique

AT : trioxyde d'arsenic

BIR : répétitions inhibitrices des baculovirus ou «baculovirus inhibitory repeats»

BOC : butyloxycarbonyl

BPI : protéine d'augmentation de la perméabilité bactérienne ou «bacterial permeability increasing protein»

CGD : granulomatose chronique ou «chronic granulomatous disease»

CHX : cycloheximide

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CR : récepteur du complément ou «complement receptor»

DISC : «death inducing signalling complex»

DPI : diphénylène iodonium

EGFr : facteur de croissance épidermique ou «epidermal growth factor»

Erk : kinase régulée extracellulairement ou «extracellular related kinase»

FACS : cytomètre en flux ou «fluorescence-activated cell sorter»

FADD : «fas associated death domain»

fMLP : N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine

FPR : «formyl peptide receptor»

FPRL1 : «formyl peptide receptor like-1»

G-CSF : «granulocyte colony stimulating factor»

GM-CSF : «granulocyte-macrophage colony stimulating factor»

GRO- α : «growth related protein alpha»

hCAP-18 : cathélicidine-18
HSE : élément de choc thermique ou «heat shock element»
HSF : facteur de choc thermique ou «heat shock factor»
HSP : protéine de choc thermique ou «heat shock proteins»
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
ICAM : molécule d'adhésion cellulaire appartenant à la famille des IgG ou «IgG superfamily cell adhesion molecule»
IAP : inhibiteur d'apoptose
IFN- γ : interféron gamma
JAK : Janus kinase
LPS : lipopolysaccharide
LTB₄ : leucotriène B₄
LXAR : récepteur à la lipoxine A₄
Mcl-1 : «myeloid cell leukemia sequence 1»
MIP-1 α : protéine inflammatoire des macrophages 1 α «macrophage inflammatory protein-1 α »
MMP : métalloprotéases de la matrice ou «matrix metalloprotease»
MPO : myéloperoxydase
NAC : N-acétyl-L-cystéine
NADPH oxydase : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
PA : activateur plasminogène ou «plasminogen activator»
PAF : facteur d'activation plaquettaire ou «platelet activating factor»
PARP : «poly(ADP-ribose) polymerase»
PECAM : «platelet/endothelial cell adhesion molecule-1»
PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase
PLA₂ : phospholipase A₂
PMN : leucocyte polymorphonucléaire
ROS : «reactive oxygen species»
SOD : superoxyde dismutase

STAT : transducteur du signal et activateur de la transcription «signal transducers and activators of transcription

TNF : facteur nécrosant les tumeurs ou «tumor necrosis factor»

VAA-I : *Viscum album* agglutinin-I

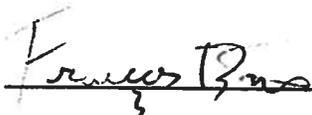
VE-cadhérine : «vascular endothelial- cadherine»

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Différenciation et maturation du neutrophile.....	7
Figure 2 : Schéma de la migration chimiotactique du neutrophile	8
Figure 3 : Évènements dépendants et indépendants de l'O ₂ lors de la phagocytose chez le neutrophile.....	10
Figure 4 : Principales voies apoptotiques.....	16
Figure 5 : Voie de signalisation intracellulaire induite par des agents retardant l'apoptose des neutrophiles.....	21
Figure 6 : Effet de l'arsenic sur l'expression génique.....	31
Figure 7 : Structure et interactions intracellulaires des annexines.....	35
Figure 8 : Zymographie sur gélatine de surnageants de neutrophiles incubés avec le diluant (témoin) ou l'AT à 5µM ou 20µM.....	123
Figure 9 : Effet des surnageants de neutrophiles incubés avec de l'AT (contenant de l'annexine-1) ou avec le diluant (ne contenant pas d'annexine-1) sur l'apoptose des neutrophiles humains.....	124
Figure 10 : Synthèse protéique lors de l'apoptose des éosinophiles et neutrophiles (après 20 h d'incubation).....	126
Tableau I : Contenu des granules et vésicules sécrétoires du neutrophile.....	13
Tableau II : Effets des agents modulant l'apoptose des neutrophiles.....	20
Tableau III : Résumé des différences entre les PMN de souris Anx-1 ^{+/+} et Anx-1 ^{-/-}	43

Résumé

Le trioxyde d'arsenic (AT) est un agent connu pour induire l'apoptose de plusieurs types cellulaires, mais son action sur le neutrophile n'a guère été élucidée à ce jour. Étant donné l'observation de neutropénies chez des patients traités avec de l'AT, nous avons entrepris d'élucider le mode d'action de cet agent sur le neutrophile. Nos résultats ont démontré que l'AT pouvait induire l'apoptose du neutrophile et ce de façon caspases-dépendantes. De plus, cet agent n'activerait pas la formation de *reactive oxygen species* (ROS) par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase) ou par la mitochondrie. Ensuite, contrairement à ce qu'il est généralement établi, cet agent pro-apoptotique pourrait induire la synthèse protéique *de novo*. Une analyse par spectrométrie de masse a révélé qu'une des protéines synthétisées serait de l'annexine-1. Le rôle intracellulaire de l'annexine-1 ne serait pas uniquement pro-apoptotique puisque cette protéine serait également synthétisée en présence d'agents retardant l'apoptose des neutrophiles. Une libération extracellulaire importante d'annexine-1 a été observée en présence d'AT. Selon nos résultats, la forme libérée serait préformée et donc indépendante de la synthèse *de novo*. Cette libération pourrait faire partie d'un mécanisme de dégranulation. Ces résultats ont permis de mieux comprendre le mode d'action de l'AT sur le neutrophile. Également, ceux-ci démontrent que le neutrophile est une cellule active métaboliquement, notamment à l'intérieur du processus d'apoptose.


Étudiant


Directeur de recherche

Introduction

Le neutrophile ou leucocyte polymorphonucléaire est le globule blanc le plus abondant dans la circulation sanguine, représentant pour environ 70% de ce type de cellule. Celui-ci possède une demie-vie très limitée de 8-20 heures dans la circulation. En effet, le neutrophile est éliminé par un processus d'apoptose ou de mort cellulaire programmée. En absence de facteurs de survie, cette cellule peut se diriger spontanément en apoptose. Le neutrophile est une cellule dite mature, car elle a atteint le stade terminal de sa différenciation et ne se divise plus. Ainsi, le neutrophile a longtemps été considéré comme une cellule peu active métaboliquement vu son état mature et la rareté de polyribosome observable à l'intérieur de son cytoplasme. Maintenant, plusieurs résultats démontrent que ce leucocyte peut répondre à différentes stimulations notamment par la production de cytokines. L'apoptose des neutrophiles peut être induite ou retardée par divers agonistes dont des cytokines telles que le *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), l'IL-15, des produits bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS) ou des polluants environnementaux comme le TBT ou l'AT. En général, il est considéré que des agents qui retardent l'apoptose des neutrophiles vont stimuler la synthèse protéique *de novo* des neutrophiles. Les agents qui induisent l'apoptose des neutrophiles, pour leur part, sont plutôt considérés comme ayant une activité inhibitrice ou ayant peu d'effet sur la synthèse protéique du neutrophile. Cependant, la plupart de ces expériences se basent sur l'addition d'un inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide (CHX) ou de transcription, l'actinomycine D (Act.D). Pour conclure, peu d'études ont porté sur l'identification de protéines responsables de l'effet pro- ou anti-apoptotique. Le but de cette étude est d'observer les patrons de synthèse protéique du neutrophile en réponse à différents agonistes qui modulent l'apoptose. Puis, des protéines dont la synthèse *de novo* semble être modulée seront isolées afin d'identifier leur nature exacte. Enfin, le rôle intracellulaire et extracellulaire des protéines isolées à l'intérieur du processus d'apoptose sera déterminé. Cette démarche a comme principal objectif de mieux comprendre le rôle de la synthèse protéique chez le neutrophile. Également, celle-ci pourra permettre d'expliquer le mode d'action de certains agonistes sur le neutrophile.

SECTION 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre 1 : La physiologie du neutrophile

1.1 L'inflammation

Lorsqu'un stress physicochimique inflige un dommage aux tissus, la réponse physiologique engendrée est appelée inflammation. Ce phénomène se caractérise par l'augmentation du flux sanguin par vasodilatation afin de diluer les agents toxiques. Également, une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins facilite le passage de molécules vers la circulation. Du coup, le recrutement ainsi que la migration des cellules inflammatoires de la circulation vers les tissus affligés sont favorisés grâce à cette perméabilisation. Les premières cellules recrutées au site inflammatoire sont des neutrophiles, ce qui engendre une inflammation aiguë, suivis de près par les monocytes, précurseurs de macrophages, puis par les lymphocytes, ce qui forme l'inflammation chronique.

1.2 Le neutrophile

Les leucocytes ont un rôle très important dans la réparation tissulaire et la résolution de l'inflammation. En temps normal, ces cellules constituent environ 1% des cellules totales de la circulation. Le leucocyte prédominant est le neutrophile, totalisant pour environ 70% de ce type cellulaire. Celui-ci joue un rôle primordial dans l'immunité innée car il constitue la première ligne de défense contre les attaques bactériennes et fongiques. Cette cellule possède une demi-vie très variable. En effet, à partir de sa libération de la moelle osseuse jusqu'au moment de sa mort par apoptose, il peut se dérouler quelques heures, parfois même plusieurs jours. Voici un bref résumé des principales étapes du cycle de vie du neutrophile.

1.2.1 La formation du neutrophile dans la moelle osseuse

La maturation du neutrophile débute par la différenciation d'une cellule pluripotente hématopoïétique vers une cellule de lignée myéloïde (CFU-GEMM) (voir

figure 1). Puis, sous l'influence de facteurs tels que le *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) ou le GM-CSF, cette cellule se différencie en myéloblaste puis en promyélocyte. Une cellule promyélocytaire peut produire les trois types de granulocytes, soit le neutrophile, l'éosinophile ou le basophile. La progression du stade myéloblaste jusqu'au neutrophile mature peut être observée d'après l'apparition de différents granules cytoplasmiques contenant une panoplie d'enzymes microbicides. Ainsi, lors de la différenciation du myéloblaste en promyélocyte, il y a formation des granules primaires ou azurophiles parmi lesquels se retrouvent la myéloperoxydase ainsi que d'autres protéines antimicrobiennes telles les défensines, la protéine d'augmentation de la perméabilité membranaire bactérienne (BPI) et la protéinase 3 (voir tableau I et section 1.3.2 pour plus de détails). Au stade myélocytaire, il y a apparition de granules de type spécifique ou secondaire lesquels contiennent la lactoferrine et la collagénase. Puis, des granules tertiaires contenant la gélatinase apparaissent au stade métamyélocytaire, suivi de la formation de vésicules sécrétoires au stade final de la maturation du neutrophile. Ces vésicules seraient d'origine endocytaire puisqu'elles contiennent des protéines plasmatiques comme l'albumine qui ne sont pas synthétisées par le neutrophile. À mesure que progresse la maturation du neutrophile, la capacité des cellules à proliférer diminue. Ainsi, à partir du stade métamyélocyte, le neutrophile est incapable de se diviser. Les étapes subséquentes de maturation impliquent la formation d'un noyau segmenté, lequel est caractéristique du neutrophile mature. La durée de la différenciation du neutrophile, soit du précurseur hématopoïétique jusqu'au neutrophile mature segmenté, est d'environ deux semaines (Roitt, 1992 : 1163-1166 ; Witko-Sarsat *et al*, 2000 : 617 ; Edwards, 1994 : 33-54; Janeway *et al*, 2001 : 3-5 ; Borregaard et Cowland, 1997 : 3503).

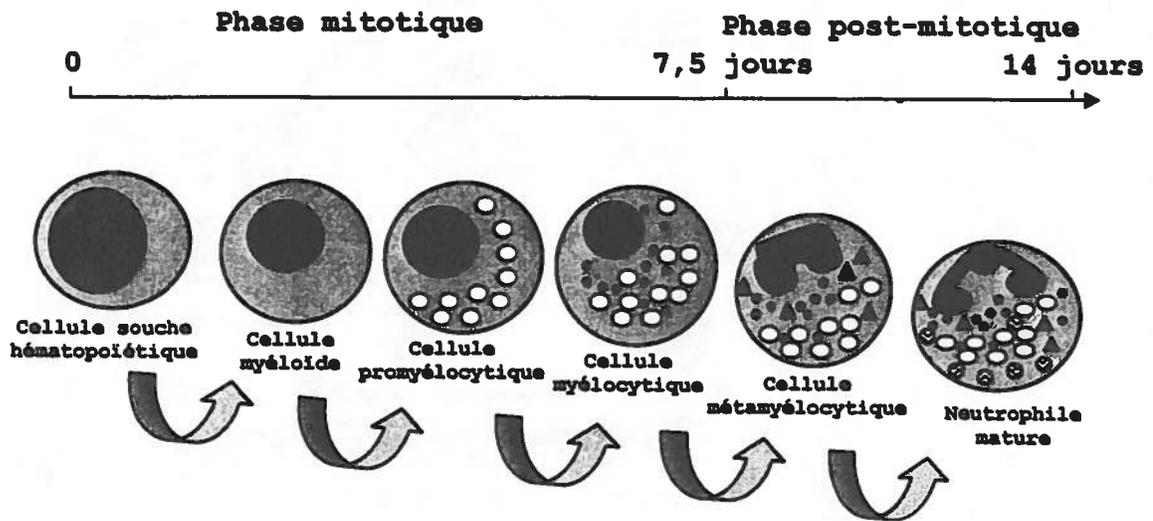


Figure 1 : Différenciation et maturation du neutrophile (d'après Roitt, 1992 : 1163)

1.2.2 Recrutement, adhésion et migration au site inflammatoire

En présence de facteurs comme le G-CSF ou le GM-CSF, le neutrophile quitte la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine (Edwards, 1994 : 33-50). Les neutrophiles peuvent pénétrer à l'intérieur des tissus lorsqu'il y a inflammation. D'abord, avant de traverser l'endothélium vasculaire, le neutrophile doit d'abord adhérer aux cellules endothéliales (voir figure 2). Cette étape comprend deux phases. La première implique le roulement du neutrophile sur l'endothélium grâce à l'interaction des molécules de E et P-sélectines avec les molécules de L-sélectines sur le neutrophile. Puis, le neutrophile vient s'attacher plus solidement à la paroi vasculaire grâce aux intégrines de la sous-famille $\beta 2$ (CD11b/CD18) présentes à sa surface et aux molécules d'adhésion cellulaire appartenant à la famille des IgG-1 (ICAM-1) sur les cellules endothéliales (Burg et Pillinger, 2001 : 7). La libération de médiateurs tels que le C5a (fragment du complément), de peptides formylés (N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP)) ou de leucotriène B₄ (LTB₄) provenant de microorganismes ou de cellules infectées entraîne une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion sur le neutrophile et sur la cellule endothéliale. De plus, la production de chimioattractants tels que le facteur d'activation plaquettaire (PAF), le LTB₄ ou l'interleukine-8 (IL-8) par la cellule

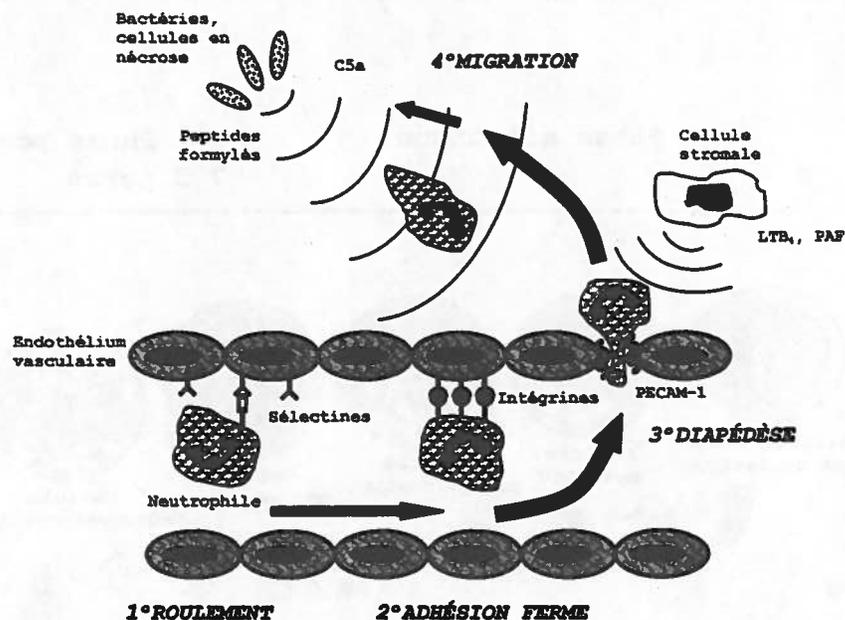


Figure 2 : Schéma de la migration chimiotactique du neutrophile (Adapté de Witko-Sarsat, 2000 : 621)

endothéliale stimulée par l'IL-1 ou le LPS et sa présentation au neutrophile permet un attachement plus ferme à l'endothélium (Witko-Sarsat *et al*, 2000 : 617). En effet, ces agonistes peuvent activer la formation d'agrégats de β_2 -intégrines de haute affinité sur la cellule activée. Ceci permet à la fois d'augmenter la capacité des neutrophiles d'adhérer aux cellules de l'endothélium et prévient l'attachement de neutrophiles non stimulés (Stewart et Hogg, 1996 : 554).

Une fois le neutrophile bien adhérent, celui-ci traverse l'endothélium vasculaire aux jonctions intercellulaires, un processus appelé diapédèse. Ce processus impliquerait une désorganisation des jonctions intercellulaires endothéliales composées de *vascular/endothelial cadherine* (VE-cadhérine), β -caténine et plakoglobine (Del Maschio *et al*, 1996 : 497). Le neutrophile peut se déformer pour s'insérer dans un espace d'environ 1 μ m. La diapédèse impliquerait l'interaction de molécules d'adhésion *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) présentes à la fois sur le neutrophile et sur la cellule endothéliale. Un modèle en fermeture éclair PECAM-1/PECAM-1 pourrait permettre la migration du neutrophile à travers les jonctions endothéliales serrées sans perturber la perméabilité de l'endothélium vasculaire (Muller *et al*, 1993 : 449).

Par la suite, la migration des cellules à l'intérieur des tissus se fait via un processus de chimiotaxie, soit à travers un gradient de concentration croissant de chimioattractants. Ainsi, les molécules chimioattractantes produites par des bactéries, des cellules en nécrose ou diverses cellules stromales et endothéliales sont fixées à la matrice extracellulaire par des charges négatives et permettent au neutrophile d'atteindre le site d'infection. La migration à travers divers champs chimiotactiques est un processus multiphasique et dépend de la relation entre les divers récepteurs chimiotactiques. En effet, à l'intérieur du tissu infecté, le neutrophile est davantage attiré vers des signaux produits par des cibles plus éloignées, mais plus proches du site d'infection tels que des peptides formylés (fMLP) libérés par des bactéries. À l'opposé, des signaux comme le LTB₄ ou l'IL-8 provenant de l'endothélium vasculaire seront ignorés par un processus de désensibilisation des récepteurs (Foxman *et al*, 1999 : 537). La migration du neutrophile à l'intérieur du tissu dépend des récepteurs intégrines stockés à l'intérieur de granules et rapidement exprimés à la surface lorsque le neutrophile est stimulé avec des molécules chimioattractives. Les récepteurs à la laminine $\alpha 6\beta 1$, à la fibronectine $\alpha 5\beta 1$ et à la vitronectine $\alpha v\beta 3$ permettent la migration sur la matrice extracellulaire. De même, le mouvement des neutrophiles nécessite une endocytose et un recyclage des intégrines de l'arrière de la cellule vers le devant de celle-ci (Witko-Sarsat *et al*, 2000 : 617). Également, le détachement des cellules en migration est favorisé par la présence de molécules anti-adhésives comme le CD43 à l'arrière de la cellule (Seveau *et al*, 2000 : 2462).

1.3 Les mécanismes anti-microbiens

Dès que le neutrophile a atteint le site d'infection, celui-ci doit reconnaître les cellules à éliminer. Pour ce faire, il existe deux types de récepteurs pouvant reconnaître des microorganismes opsonisés. Il y a les récepteurs Fc γ : Fc γ RIIa CD32 et Fc γ RIIIb CD16 qui se lient aux immunoglobulines G (IgG) et les récepteurs aux fragments du complément CR1 et CR3 qui reconnaissent des cibles opsonisées respectivement par des fragments C3b et iC3b. La liaison de ces deux types de récepteurs engendre une cascade

d'activation distincte à l'intérieur du neutrophile menant à l'extension de pseudopodes autour de la cible et à la formation d'un phagosome. De plus, la reconnaissance d'un microorganisme par des récepteurs Fcγ active la génération de composés oxygénés réactifs et la libération du contenu des granules cytoplasmiques à l'intérieur du phagosome, qui deviendra le phagolysosome (Seely *et al*, 2003 : 291). Cet évènement est appelé dégranulation. La dégranulation peut être accélérée par les mêmes agents qui augmentent l'adhésion et favorisent la chimiotaxie du neutrophile, soit par exemple le TNF, le PAF ou l'endotoxine. Également, lorsque stimulé par des agents comme le fMLP et le GM-CSF, le contenu des granules peut être libéré extracellulairement (Edwards, 1994 : 59). Les deux mécanismes anti-microbiens peuvent être séparés selon leur dépendance à l'O₂ (voir la figure 3 pour un résumé).

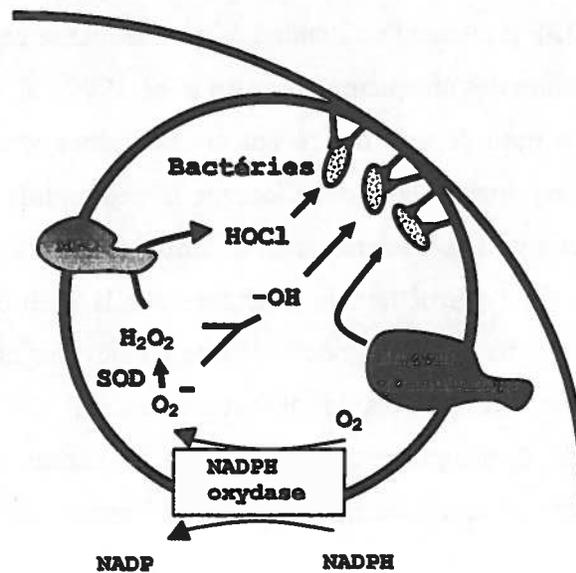


Figure 3 : Évènements dépendants et indépendants de l'O₂ lors de la phagocytose chez le neutrophile (Edwards, 1994 : 11).

1.3.1 Les mécanismes dépendants de l'O₂

L'activation de mécanismes dépendants de l'O₂, phénomène aussi appelé flambée oxydative, nécessite d'abord l'assemblage de la NADPH oxydase. Cette enzyme est un complexe réunissant plusieurs sous-unités provenant à la fois du cytosol (p40phox, p47phox, p67phox et rac1/2) et de la membrane plasmique du neutrophile (p22phox et gp91phox aussi appelé cytochrome b558). Après l'activation du neutrophile et la phosphorylation de p47phox, les sous-unités cytosoliques et membranaires se rejoignent, ce qui permet le transport des électrons. Ainsi, la NADPH oxydase forme d'abord de l'O₂⁻ à la suite du transfert d'un électron du NADPH cytosolique vers une molécule d'O₂ présente à l'intérieur du phagosome. Puis, l'O₂⁻, le superoxyde, est transformé spontanément en H₂O₂ par la superoxyde dismutase (revue : Klebanoff, 2005 : 598). La formation de H₂O₂ permet la génération d'une vaste gamme d'oxydants réactifs. Par exemple, la myéloperoxydase (MPO), une enzyme présente dans les granules primaires du neutrophile et libérée dans le phagosome, peut former du HOCl à partir de l'H₂O₂. L'acide hypochlorique (HOCl) est l'agent le plus bactéricide produit par le neutrophile (Hampton *et al*, 1998 : 3007). Entre autres, il peut réagir avec des acides aminés comme la taurine et former des chloramines très réactives qui possèdent une longue demi-vie. Également, la réaction de l'acide hypochlorique avec le nitrite peut former du NO₂Cl, un agent chlorant très puissant (Arnhold, 2004 : 4).

1.3.2 Les mécanismes indépendants de l'O₂

La stimulation du neutrophile peut entraîner la libération extracellulaire (exocytose) ou intraphagosomique du contenu granulaire suite à sa fusion avec la membrane plasmique ou le phagosome respectivement. Le neutrophile possède trois types de granules contenant chacun une vaste gamme de protéines antimicrobiales (voir le tableau I). Parmi celles-ci, il y a la BPI, une enzyme contenue dans les granules azurophiles (primaires) qui est toxique pour les bactéries Gram-négatives grâce à sa capacité de se lier au LPS, un composant de la paroi de ces bactéries. Ainsi, la BPI augmente la perméabilité de la membrane externe de ces bactéries et l'hydrolyse de la

phospholipase bactérienne. L'activité antimicrobiale de la BPI peut être améliorée en présence d'une autre protéine des granules azurophiles, la défensine. Celle-ci est très abondante chez le neutrophile (5 à 7% des protéines totales) tout comme la BPI (1% des protéines totales) (Elsbach, 1998 : 14), ce qui démontre l'importance de ces protéines dans la fonction bactéricide du neutrophile. Les protéines granulaires possèdent plusieurs autres fonctions autres que l'action microbicide directe. Par exemple, la protéinase-3, une sérine protéase provenant des granules azurophiles, pourrait activer la cathélicidine (hCAP-18), une protéine microbicide des granules spécifiques (secondaires) (Sorensen *et al*, 1997 : 2796). Également, d'autres protéines des granules peuvent amplifier la réponse immunitaire grâce au clivage et à l'activation de certaines cytokines. Par exemple, la protéinase-3 contenue dans les granules azurophiles et les vésicules sécrétoires des neutrophiles pourrait cliver le TNF- α et l'IL-1 β libérés par des cellules monocytiques stimulées au LPS (Coeshott *et al*, 1999 : 6261). Trois métalloprotéases de la matrice (MMP) ont été identifiées chez le neutrophile. Entre autres, il s'agit des MMP-8, -9 et -25 localisées dans les granules spécifiques (secondaires) et les granules gélatinases (tertiaires). Ces enzymes seraient impliquées dans la dégradation des composantes de la matrice extracellulaire telles le collagène, la fibronectine et la gélatine et pourraient donc permettre le passage des neutrophiles à travers l'endothélium vasculaire (Faurischou et Borregaard, 2003 : 1317).

Tableau I : Contenu des granules et vésicules sécrétoires du neutrophile (adapté de Fauschou et Borregaard, 2003 : 1320)

Granules azurophiles	Granules spécifiques	Granules gélatinases	Vésicules sécrétoires
Membranaires			
CD63 CD68 Préséniline 1 Stomatine H ⁺ -ATPase type-V	CD11b/CD18 CD15 CD66 CD67 Cytochrome <i>b₅₅₈</i> fMLP-R Fibronectine-R Sous-unité protéine _s G Laminine R Leukolysine Antigène NB-1 Protéine 19 kDa Protéine 155 kDa Rap1, Rap-2 SCAMP SNAP-23, -25 Stomatine Thrombospondine-R TNF-R uPA-R VAMP-2 Vitronectine-R	CD11b/CD18 Cytochrome <i>b₅₅₈</i> Diacylglycérol déacétylase fMLP-R Leukolysine NRAMP-1 SCAMP SNAR-23, -25 uPA-R VAMP-2 H ⁺ -ATPase type-V	Phosphatase alcaline CD10 CD11b/CD18 CD13 CD14 CD16 CD45 CRI C1q-R Cytochrome <i>b₅₅₈</i> Facteur de dégénérescence rapide (FDR) fMLP-R Leukolysine VAMP-2 H ⁺ -ATPase type-V
Matriciels			
β-glycérophosphatase acide Mucopolysaccharide acide α ₁ -antitrypsine α-mannosidase Azurocidine BPI β-glycérophosphatase β-glucuronidase Cathepsine Défensine Élastase Lysozyme MPO N-acétyle-β-glucosaminidase Protéinase-3 Sialidase Protéine-ubiquitine	β ₂ -microglobuline Collagénase CRISP-3 (SGP-28) Gélatinase hCAP-18 Histaminase Héparanase Lactoferrine Lysozyme NGAL uPA Sialidase Transcobalamine-I	Acétyltransférase β ₂ -microglobuline CRISP-3 Gélatinase Lysozyme	Protéines plasmatiques (ex : albumine)

1.4 L'apoptose du neutrophile

Chez un adulte sain, on a estimé que la moelle osseuse pouvait produire environ 5×10^{10} neutrophiles par jour. Lors d'une infection, ce chiffre peut augmenter d'un ordre de magnitude (Edwards, 1994 : 5). Il est donc essentiel que ces cellules soient éliminées des tissus afin de maintenir un équilibre homéostatique. De plus, cette élimination doit se faire sans que le contenu potentiellement cytotoxique du neutrophile ne soit libéré dans les tissus. En effet, tel que décrit précédemment, le neutrophile possède une vaste gamme

d'enzymes protéolytiques et une machinerie oxydative très efficace qui, une fois libérée au site inflammatoire lors d'une nécrose, peuvent causer des dommages aux tissus environnants (Savill et Haslett, 1995 : 385). Ainsi, le neutrophile est éliminé par un processus d'apoptose ou mort cellulaire programmée. Les cellules apoptotiques peuvent être reconnues par des marqueurs spécifiques et ingérées par des macrophages, un processus qui est accompagné par la génération de médiateurs anti-inflammatoires (Savill, 1997 : 375).

1.4.1 Changements moléculaires du neutrophile durant l'apoptose

L'apoptose s'accompagne d'une perte de plusieurs fonctions du neutrophile, telles que l'adhésion, la phagocytose et la dégranulation et d'une série de changements morphologiques et biochimiques. D'abord, le neutrophile en apoptose exhibe plusieurs signes morphologiques caractéristiques, soit une contraction de la cellule, une condensation de l'hétérochromatine nucléaire et une perte de la forme multilobée du noyau (Savill, 1997 : 375). Par contre, celui-ci ne forme pas de corps apoptotiques. Ensuite, l'expression de plusieurs récepteurs à la surface est diminuée. Par exemple, l'expression des récepteurs de la famille des immunoglobulines (CD31, CD50, CD66acde, CD66b, CD63, et CD87) impliqués dans l'adhésion et la migration est à la baisse. De la même manière, une expression réduite des récepteurs responsables de la phagocytose des microorganismes (FcγRIIa, FcγRIIb, CR1) est observée chez les neutrophiles apoptotiques. Aussi, le neutrophile devient insensible aux chimiokines à la suite de la baisse de récepteurs tels que le CD88 (récepteur au C5a) et le CD120b (récepteur au TNF-α) (Hart *et al*, 2000 : 493). Il est également possible d'observer, au cours de la désorganisation de la symétrie phospholipidique membranaire, le *flip-flop* des phosphatidylsérines, un marqueur moléculaire des cellules apoptotiques. L'externalisation de ces molécules permet la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages. Il existe d'autres molécules permettant l'ingestion spécifique de cellules en apoptose. Par exemple, le macrophage utilise le récepteur vitronectine ($\alpha_v\beta_3$) et le CD36 pour lier la thrombospondine sécrétée par les macrophages et les cellules environnantes. La thrombospondine pourrait servir de molécule de rattachement à un récepteur présent sur

les cellules apoptotiques (Savill, 1997 : 375). Globalement, le neutrophile apoptotique devient non fonctionnel en plus d'exprimer à sa surface des molécules permettant sa reconnaissance et son élimination par des cellules phagocytaires comme le macrophage.

1.4.2 Régulation de l'apoptose du neutrophile

1.4.2a Les principales voies apoptotiques

Il existe deux voies apoptotiques importantes dans l'apoptose (voir figure 4). La première est dite extrinsèque car elle implique des facteurs externes. Une voie extrinsèque est activée suite à la ligature de récepteurs de mort à la surface de la cellule. Cette voie mène à la formation d'un complexe (*death inducing signalling complex* (DISC)) constitué d'un récepteur de mort : Fas/APO-1/CD95 ou TNFR1, d'une protéine adaptatrice (*Fas associated death domain* (FADD)) et de la pro-caspase-8. Cet assemblage provoque l'autoprotéolyse et l'activation de la caspase-8, une caspase initiateur. Celle-ci possède la capacité d'aller activer une seconde enzyme, la caspase-3. Cette dernière est une caspase exécutive, c'est-à-dire qu'elle possède la propriété d'aller cliver plusieurs substrats à l'intérieur de la cellule, tels que des protéines structurales (vimentine, fodrine, lamine B).

Également, il existe une voie intrinsèque ou mitochondriale. Celle-ci implique la dépoliarisation de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome *c*, une protéine membranaire impliquée dans le transport des électrons et la phosphorylation oxydative. Cette protéine, une fois libérée, peut se lier à Apaf-1 et à la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome, un complexe analogue au DISC. L'apoptosome active la caspase-3, laquelle peut cliver plusieurs substrats intracellulaires. Plusieurs éléments pro-apoptotiques et anti-apoptotiques contrôlent l'initiation des voies apoptotiques, notamment les éléments de la famille Bcl-2 (Marsden et Strasser, 2003 : 71 ; Creagh, Conroy et Martin, 2003 : 10). Il semblerait que les deux voies apoptotiques (extrinsèque et intrinsèque) seraient impliquées dans l'apoptose des neutrophiles. Par contre, leur contribution à l'apoptose spontanée du neutrophile pourrait être inégale.

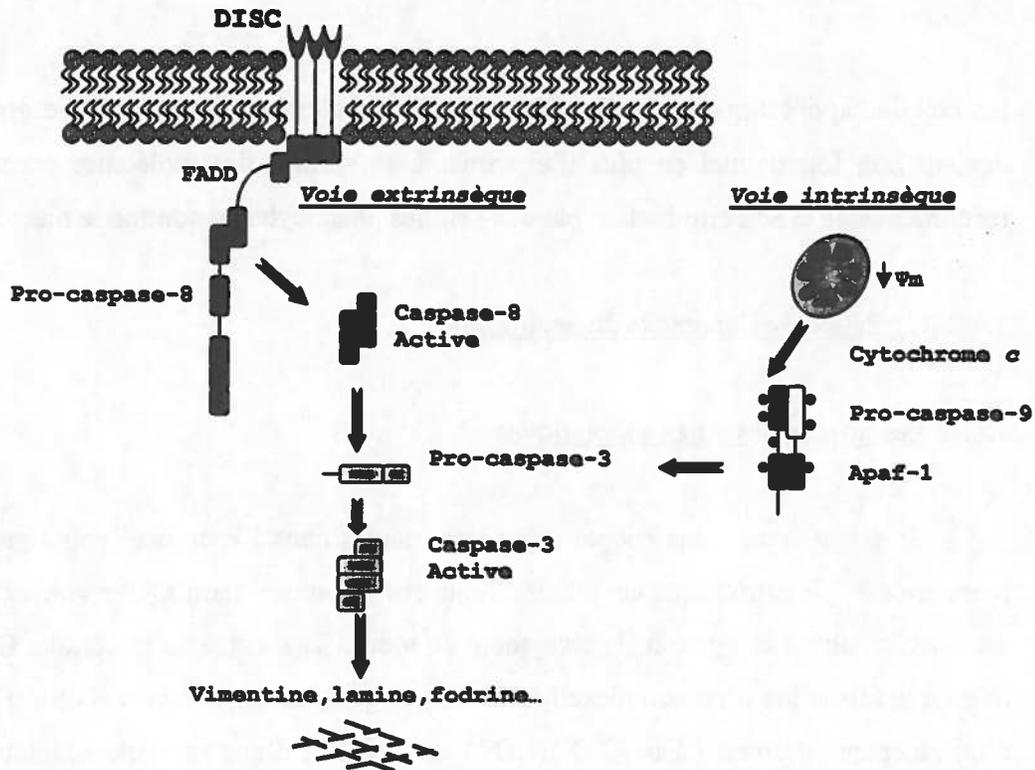


Figure 4 : Principales voies apoptotiques (inspiré de Scheel-Toellner *et al*, 2004 : 461).

1.4.2b L'implication de Fas/FasL

Une des principales voies apoptotiques, entre autres reconnue pour son implication dans l'élimination des cellules T autoréactives (délétion clonale), est la voie de Fas/FasL (voie extrinsèque). C'est pourquoi cette voie a d'abord été suggérée comme pouvant provoquer l'apoptose spontanée des neutrophiles. Fas est un récepteur de la famille des facteurs TNF/*nerve growth* qui induit l'apoptose suite à une interaction avec son agoniste, le FasL (Liles et Klebanoff, 1995 : 3289). Il a été reconnu que l'apoptose du neutrophile pouvait être accélérée par l'ajout d'un anticorps anti-Fas (Iwai *et al*, 1994 : 1201). Néanmoins, plusieurs études ont démontré que cette voie ne serait pas nécessaire à l'apoptose spontanée du neutrophile (Brown et Savill, 1999 : 480 ; Daigle et Simon, 2001 : 147). Par exemple, des souris déficientes en Fas ou FasL ne montrent aucune variation dans leur apoptose (Fecho et Cohen, 1998 : 373), ce qui laisse croire que cette voie serait négligeable en ce qui concerne l'apoptose spontanée.

1.4.2c Les caspases

Le neutrophile, comme bien d'autres cellules, dépend des caspases pour le bon déroulement de son apoptose. Plus particulièrement, la caspase-3 pourrait avoir un rôle critique dans l'apoptose spontanée du neutrophile. En effet, les neutrophiles provenant de souris déficientes en caspase-3 seraient résistants à l'apoptose induite par la cycloheximide (Woo, 1998 : 806). Également, il a été établi qu'il était possible de retarder l'apoptose des neutrophiles en bloquant les caspases -8 et -9 (Daigle et Simon, 2001 : 147), ce qui démontre leur importance dans ce processus moléculaire. Par le fait même, ceci semble prouver que la voie mitochondriale (voie intrinsèque) pourrait être active dans l'induction de l'apoptose chez le neutrophile vu l'implication de la caspase-9.

1.4.2d Les protéines de la famille Bcl-2

La présence de plusieurs protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 a été observée chez le neutrophile. Par exemple, les protéines Bax et Bak ont été détectées chez ces cellules (Weinmann *et al*, 1999 : 3106 ; Moulding *et al*, 2001 : 783). La délétion combinée de ces deux protéines pro-apoptotiques aurait pour effet de retarder significativement l'apoptose des neutrophiles (Lindsten *et al*, 2000 : 1389). De plus, les protéines pro-apoptotiques Bax, Bid, Bak et Bad seraient exprimées de façon constitutive chez le neutrophile et possèderaient une très longue demi-vie à l'intérieur de ce leucocyte, ce qui pourrait expliquer sa courte demi-vie dans la circulation. À l'opposé, l'expression de protéines anti-apoptotiques serait induite et leur demi-vie serait d'une courte durée (Moulding *et al*, 2001 : 783). La présence de ces facteurs dépendrait d'une synthèse continue notamment suite à l'exposition à des agents qui retardent l'apoptose des neutrophiles, tels que l'IL-15 (Bouchard, Rathé et Girard, 2004 : 893). Ainsi, la présence d'ARNm pour les facteurs anti-apoptotiques A1, Bcl-X_L et *myeloid cell leukemia sequence-1* (Mcl-1) a été démontrée chez le neutrophile. Néanmoins, seule la protéine Mcl-1 a été détectée de façon satisfaisante à l'intérieur de ce leucocyte. La quantité de cette protéine a été reliée de façon directe à l'induction de l'apoptose chez le neutrophile.

En d'autres mots, au-dessus d'un seuil critique de Mcl-1, l'apoptose des neutrophiles est retardée tandis qu'une baisse de ce facteur pourrait enclencher la série d'évènements menant à l'induction d'apoptose (Edwards *et al*, 2004 : 489). D'un point de vue mécanistique, les facteurs anti-apoptotiques auraient pour effet de bloquer l'effet des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak et empêcher, par exemple, la translocation de Bax dans la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome *c* qui active la caspase-3 (Simon, 2003 : 101).

1.4.2e Les calpaïnes

Il a été démontré qu'un autre type de protéases, les calpaïnes, pourrait être impliqué dans l'apoptose des neutrophiles. Les calpaïnes sont des enzymes dont le rôle a notamment été reconnu dans la réorganisation du réseau cytosquelettique. Quelques études ont montré que les calpaïnes, plus particulièrement la calpaïne-1, pourraient être activées à la suite d'une baisse de la calpastatine, un inhibiteur de ces protéases, par un mécanisme caspase-dépendant (Altnauer *et al*, 2004 : 5947). Cette activation pourrait engendrer plusieurs conséquences. D'abord, il a été proposé qu'une activation des calpaïnes pourrait modifier la composition et l'association de protéines de liaison à l'actine dont l' α -actinine et l'eitrine. Cette modification impliquerait le détachement de ces protéines de l'actine filamenteuse (F-actine) (Knepper-Nicolai, Savill et Brown, 1998 : 30530). Également, une dégradation de X-inhibiteur d'apoptose (X-IAP) a été démontrée suite à une activation des calpaïnes en condition d'apoptose spontanée ou induite par le TNF- α /CHX (Kobayashi *et al*, 2002 : 33968). Le X-IAP est un régulateur apoptotique endogène capable d'inhiber l'activité des caspases-3, -7 et -9 (Devereaux et Reed, 1999 : 239). Enfin, l'inhibition de l'activation de la calpaïne-1 pourrait prévenir le clivage de Bax et la libération du cytochrome *c*, deux évènements menant à l'activation de la caspase-3 (Altnauer *et al*, 2004 : 5947).

1.4.2f Le rôle des ROS

Le neutrophile peut générer une grande concentration de réactifs oxygénés (ROS) lors de la flambée oxydative. Il y a plusieurs indices qui laissent supposer un rôle important de ses produits dérivés de l'oxygène dans l'induction de l'apoptose du neutrophile. Premièrement, les neutrophiles de patients atteints d'un défaut génétique affectant la production de ROS par la NADPH oxydase (granulomatose chronique (CGD)) démontrent un retard d'apoptose et une résistance à l'induction par Fas. De plus, l'ajout de ROS comme le H₂O₂ induit l'apoptose chez ces cellules (Hampton *et al*, 2002 : 775) tandis que l'ajout d'anti-oxydants comme la catalase produit l'effet contraire (Kasahara *et al*, 1997 : 1748). Un des éléments les plus précoces dans l'induction d'apoptose est une baisse du niveau de glutathion. Le glutathion est un anti-oxydant puissant qui maintient la balance oxydo-réductrice à l'intérieur des cellules. Il a été suggéré qu'une baisse de glutathion pourrait engendrer l'assemblage du DISC et l'activation subséquente de la caspase-8 (Scheel-Toellner *et al*, 2004 : 461).

Chapitre 2 : Les agents modulant l'apoptose des neutrophiles

Les neutrophiles possèdent une durée de vie limitée à l'intérieur des tissus avant d'être éliminés par phagocytose, par des macrophages environnants. Néanmoins, il existe un mécanisme de contrôle qui synchronise l'apoptose de ces cellules et leur élimination afin qu'un minimum de dommages soient infligés aux tissus environnants suite à une éventuelle libération du contenu cytotoxique du neutrophile. De plus, certains agents permettent aux neutrophiles de prolonger leur durée de vie afin de compléter leur tâche efficacement, soit d'éliminer les microorganismes au site inflammatoire. Il existe donc une panoplie d'agents pro- et anti-inflammatoires pouvant induire ou retarder l'apoptose des neutrophiles au site infecté (voir tableau II).

Tableau II : Effets des agents modulant l'apoptose des neutrophiles

	<u>Agents</u>	<u>Effets</u>
Agents retardant l'apoptose des neutrophiles	GM-CSF	↑Mcl-1, ↓Bax-α (Moulding <i>et al.</i> , 1998 : 2495) (Weinmann <i>et al.</i> , 1999 : 3106)
	IL-15	↑Mcl-1 ↓Bax-α ↓ act. caspase-3 et-8 (Pelletier, Rathé et Girard, 2002 : 164);(Otonello <i>et al.</i> , 2002 : 125);(Bouchard, Rathé et Girard, 2004 : 893)
	Glucocorticoïdes (Dexaméthasone)	Via GR ; Inhibition de ROS ; ↑BLT1 (Meagher <i>et al.</i> , 1996 : 4422) ;(Ruiz <i>et al.</i> , 2002 : 215) ; (Stankova <i>et al.</i> , 2002 : 3570)
	Anti-oxydants (Catalase)	Inhibition de ROS par conversion de H ₂ O ₂ en H ₂ O. (Kasahara <i>et al.</i> , 1997 : 1748)
Agents accélérant l'apoptose des neutrophiles	VAA-I	↓Mcl-1 ; ROS-indépendant (Lavastre <i>et al.</i> , 2002 : 1419)
	TBT	Caspase-dépendant (Lavastre <i>et al.</i> , 2002 : 1013)
	AT	Effets non établis sur les neutrophiles, ↑p53, ↑Bax : Δperméabilité mitochondriale, ↓Bcl-2 Dommages aux protéines du cytosquelette (Li et Broome, 1999 : 776) ↑ROS dont H ₂ O ₂ (Zhou <i>et al.</i> , 2005 : 1198; Zheng <i>et al.</i> , 2005 : 3339)

2.1 Les agents pouvant retarder l'apoptose des neutrophiles

De nombreux médiateurs pro-inflammatoires peuvent retarder l'apoptose des neutrophiles. À ce titre, on retrouve des cytokines produites par des cellules au site inflammatoire telles le G-CSF, le GM-CSF, l'IL-1 β , l'IL-15 ou l'interféron gamma (IFN- γ) ainsi que des produits bactériens comme le LPS ou le fMLP (Lee, Whyte et Haslett, 1993 : 283 ; Lee *et al*, 1999 : 2079; Colotta *et al*, 1992 : 2012 ; Girard *et al*, 1996 : 3176 ; Klebanoff *et al*, 1992 : 225).

2.1.1 Le GM-CSF

Le GM-CSF est une cytokine produite par plusieurs types de cellules : des fibroblastes, des macrophages, des cellules endothéliales et des cellules T activées. Il a été démontré que le GM-CSF pouvait augmenter la présence de molécules d'adhésion (CD11b) (Griffin, 1990 : 576) ainsi que le nombre et l'affinité de récepteurs au fMLP sur le neutrophile (Weisbart, Golde et Gasson, 1986 : 3584). De plus, cette cytokine stimule le neutrophile et le rend plus apte à recevoir un deuxième stimulus, lequel produira, par exemple une flambée oxydative (Weisbart, 1987 : 18). Également, le GM-CSF peut retarder l'apoptose des neutrophiles (Brach *et al*, 1992 : 2920). Ce délai serait imputable à la modulation de certains facteurs de la famille Bcl-2 par l'activation de plusieurs cascades de signalisation (voir figure 5).

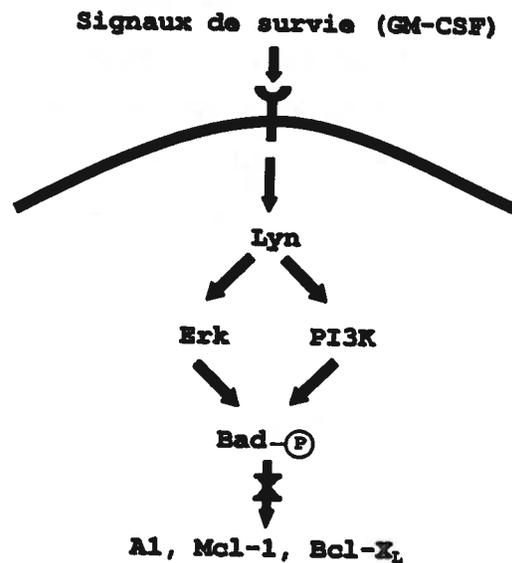


Figure 5 : Voie de signalisation intracellulaire induite par des agents retardant l'apoptose des neutrophiles.

D'abord, il a été démontré que le GM-CSF pouvait induire l'activation des tyrosines kinases. Ainsi, la kinase Lyn pourrait être activée suite à la liaison de cette cytokine aux récepteurs à la surface du neutrophile (Wei *et al*, 1996 : 5155). Cette tyrosine kinase pourrait ensuite activer la voie de la kinase régulée extracellulairement (Erk) et de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), ce qui engendre la phosphorylation de Bad, un facteur pro-apoptotique (Klein *et al*, 2000 : 4286). Lorsque phosphorylé, Bad est incapable d'interagir et de bloquer l'effet des facteurs anti-apoptotiques. Il a également été démontré que le GM-CSF peut maintenir l'expression de Mcl-1 (Moulding *et al*, 1998 : 2495), un facteur anti-apoptotique, et induire une baisse d'expression de Bax (Weinmann, Gaetgens et Walzog, 1999 : 3106), un facteur pro-apoptotique qui, une fois dans la membrane mitochondriale, induit sa dépolarisation et la libération du cytochrome *c*.

2.1.2 L'IL-15

La cytokine pro-inflammatoire IL-15 est produite, entre autres, par des cellules épithéliales et monocytes et possède la propriété de retarder l'apoptose des neutrophiles (Grabstein *et al*, 1994 : 965 ; Girard *et al*, 1996 : 3176). Ce délai serait imputable, tout comme au GM-CSF, à une stabilisation de l'expression de Mcl-1 (Bouchard, Rathé et Girard, 2004 : 893), une baisse de Bax et de l'activité subséquente de la caspase-3 (Ottonello *et al*, 2002 : 125). Par contre, l'IL-15 peut induire différentes voies de signalisation. En effet, l'IL-15, contrairement au GM-CSF, n'active pas la voie janus kinase 2 (Jak2)/transducteur du signal et activateur de la transcription 5 (STAT5) (Al-Shami, Mahanna et Naccache, 1997 : 1058 ; Pelletier, Rathé et Girard, 2002 : 164), ce qui laisse supposer que cette cytokine pourrait avoir des effets différents sur le neutrophile.

2.1.3 La dexaméthasone

En plus des cytokines et des produits bactériens, il a été observé que certains glucocorticoïdes peuvent retarder l'apoptose des neutrophiles. La dexaméthasone, un

glucocorticoïde synthétique, fait partie de ce groupe. Cette dernière pourrait avoir un effet additif lorsque ajoutée en même temps que le GM-CSF, ce qui laisse supposer qu'elle pourrait agir selon un mécanisme différent dans l'apoptose des neutrophiles. Cette action serait dépendante du récepteur aux glucocorticoïdes et nécessiterait une interaction du complexe stéroïde-récepteur avec sa cible nucléaire (Cox, 1995 : 4719). Ensuite, la dexaméthasone pourrait exercer son effet anti-apoptotique via la modulation du LTB₄, un puissant agent chimiotactique qui peut également retarder l'apoptose des neutrophiles. L'ajout du glucocorticoïde stimulerait la synthèse du récepteur à haute affinité au LTB₄ (BLT1). Ainsi, le neutrophile en présence de dexaméthasone serait plus sensible à l'effet du LTB₄ dû à l'augmentation du BLT1. Cette augmentation n'est pas observable en présence de GM-CSF, ce qui explique leur effet additif sur le retard d'apoptose du neutrophile (Stankova *et al*, 2002 : 3570). Une autre étude a démontré pour sa part que la dexaméthasone pouvait renverser l'apoptose induite par les ROS en utilisant un modèle qui imite la flambée oxydative du neutrophile (Ruiz *et al*, 2002 : 215). Cette découverte pourrait expliquer l'effet de la dexaméthasone sur l'apoptose spontanée de cette cellule, en sachant que la production de ROS pourrait constituer un des événements déclencheurs impliqués dans l'apoptose spontanée de ce granulocyte. Il est à noter que la dexaméthasone peut avoir un effet contraire chez d'autres types de cellules. Entre autres, elle peut induire l'apoptose chez les éosinophiles. Cette situation est problématique, car les glucocorticoïdes comme la dexaméthasone sont utilisés pour traiter des cas d'hyperéosinophilie au cours des réactions allergiques ou asthmatiques. Une telle administration résulte en une élimination efficace des éosinophiles, mais en une accumulation excessive de neutrophiles (Meagher *et al*, 1996 : 4422).

2.2 Les agents qui induisent l'apoptose des neutrophiles

L'accélération de l'apoptose et de l'élimination des neutrophiles peut être très utile d'un point de vue thérapeutique. En effet, ces cellules peuvent constituer une menace à l'intégrité tissulaire, car elles possèdent la capacité de générer une large quantité de ROS. Ainsi, lorsque le neutrophile se retrouve en absence de facteurs de survie tels que le GM-CSF, celui-ci peut se diriger spontanément en apoptose, sans

aucune stimulation apparente. Il existe également différents agents capables d'induire l'apoptose des neutrophiles. Parmi ceux-ci, on retrouve l'oxyde nitrique (NO) (Blaylock *et al*, 1998 : 748), le FasL (Iwai, 1994 : 1201), le facteur nécrosant les tumeurs- α (TNF- α) (Murray *et al*, 1997 : 2772), des inhibiteurs de synthèse protéique : l'actinomycine D et la cycloheximide (Whyte *et al*, 1997 : 195), des inhibiteurs de NF- κ B (Ward *et al*, 1999 : 4309) ainsi que divers polluants environnementaux (toxaphène, TBT) (Lavastre *et al*, 2002 : 40 ; Lavastre et Girard, 2002 : 1013). Il est à noter que la phagocytose de bactéries peut également induire l'apoptose des neutrophiles et ceci pourrait dépendre de la stimulation de la flambée oxydative et de la génération de ROS par cette cellule (DeLeo, 2004 : 399).

2.2.1 La VAA-I, le toxaphène et le TNF- α

La *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) est une lectine de plante utilisée dans le traitement des cancers et qui a été reconnue comme un agent accélérant l'apoptose des neutrophiles (Savoie *et al*, 2000 : 845). En effet, cet agent pourrait induire la dépolarisation de la membrane mitochondriale, la production de ROS et la baisse d'expression de Mcl-1 chez ce leucocyte. Cependant la production de ROS et la dépolarisation de la membrane mitochondriale ne seraient pas des événements indispensables à l'action pro-apoptotique de la VAA-I puisque l'ajout d'un anti-oxydant, la catalase, ou d'un stabilisateur mitochondrial, l'acide bongkrekiac n'altère en rien l'effet de cet agent sur le neutrophile (Lavastre *et al*, 2002 : 1419). Tout comme la VAA-I, le toxaphène, un insecticide organochloré, est un produit qui peut accélérer l'apoptose des neutrophiles, mais cet effet est dépendant de la production de ROS (Lavastre *et al*, 2002 : 40). Dans les deux cas, il s'agit d'un processus caspase-dépendant puisque l'addition d'un inhibiteur des caspases (z-VAD-fmk) renverse leur effet. L'effet du TNF- α sur l'apoptose des neutrophiles n'est pas aussi évident que celui induit par la VAA-I ou le toxaphène. En effet, il semble que cet agent pourrait induire à court terme (2 à 8 heures) et retarder à long terme (20 heures) l'apoptose des neutrophiles (Murray *et al*, 1997 : 2772). Le TNF- α pourrait agir via trois voies de signalisation : 1- via les récepteurs de mort membranaires (TRADD et TNFR1) qui activent les caspases ; 2-via les p38/JNK, des MAPK ; 3-via

l'activation d'un facteur de transcription, le NF- κ B. De cette façon, une voie pro-apoptotique caspase-dépendante serait activée à court terme, mais celle-ci serait contrecarrée à long terme par la synthèse de facteurs de survie via l'activité du facteur de transcription NF- κ B. À cet égard, en employant un inhibiteur de NF- κ B, la gliotoxine, il est possible d'empêcher l'effet anti-apoptotique du TNF- α (Ward *et al*, 1999 : 4309).

2.2.2 Le trioxyde d'arsenic (As₂O₃ ou AT)

L'arsenic est un polluant retrouvé dans le sol, l'eau et l'air qui peut provenir de l'industrie métallurgique ou agricole. Les composés de l'arsenic peuvent se retrouver sous forme oxydée, notamment à l'intérieur de l'As₂O₃ (AT) ou de l'arsenite de sodium (AsNaO₂). Depuis quelques années, l'AT est utilisée afin de combattre une forme de leucémie, la leucémie promyélocytaire aiguë (APL). Cet agent serait très efficace et entraînerait d'excellents taux de rémission en plus d'être moins toxique que la chimiothérapie traditionnelle (Miller *et al*, 2002 : 3893). Néanmoins, des études cliniques ont démontré qu'une administration d'AT à des patients atteints de myélomes multiples pouvait entraîner une neutropénie (Hussein *et al*, 2004 : 470). Il est donc fortement suspecté que cet agent pourrait induire l'apoptose du neutrophile. Pour le moment, aucune étude n'a évalué l'effet de l'AT sur la physiologie de ce granulocyte. Par contre, l'impact de l'AT sur l'apoptose chez d'autres types cellulaires et particulièrement sur des lignées cancéreuses a été plus largement étudié. Premièrement, l'AT pourrait intervenir directement sur la machinerie apoptotique, soit sur ses acteurs principaux, les caspases. Les travaux de Soignet *et al* ont démontré qu'en présence d'AT, il y avait induction d'expression des pro-caspases -2 et -3 et augmentation de l'activité des caspases -1 et -3 chez des cellules monocytiques provenant de la moelle osseuse de patients atteints d'APL (Soignet *et al*, 1998 : 1341). Les deux voies apoptotiques (extrinsèque et intrinsèque) ont été démontrées comme pouvant être responsables de l'effet pro-apoptotique de l'AT. D'une part, cet agent est capable d'induire l'apoptose via l'activation de la caspase-8 tel que démontré chez des cellules T leucémiques MT-1 (Ishitsuka *et al*, 1999 : 263) et donc l'activation de la voie extrinsèque. D'autre part, l'activation de la caspase-9 a été constatée chez des cellules de myélomes multiples (Hayashi *et al*, 2002 : 851) et des

cellules cancéreuses de la tête et du cou (Seol *et al*, 2001 : 249), ce qui démontre l'activation de la voie apoptotique mitochondriale par l'AT. Cet effet pourrait se faire directement sur la mitochondrie. En effet, l'AT pourrait constituer un agent mitochondriotoxique, en perturbant la perméabilité membranaire (ψ_m) et en permettant la libération de facteurs intermembranaires solubles tels que le facteur induisant l'apoptose (AIF) qui engendre la fragmentation internucléosomiale de l'ADN et la libération du cytochrome *c*, lequel active la procaspase-9 (Kroemer et de Thé, 1999 : 743). Cette perturbation serait une conséquence de la propriété de l'AT d'aller s'attacher aux protéines constituées de nombreux résidus cystéines aux groupements thiols. Ensuite, il a été reconnu que cet agent pouvait interférer sur la balance oxydo-réductrice intracellulaire. En effet, l'exposition à l'AT pourrait favoriser la formation de ROS tout en empêchant l'activité d'enzymes aux propriétés anti-oxydantes. Par exemple, l'arsenite, un sel inorganique formé par l'AT, peut augmenter l'activité d'une flavoprotéine oxydase comme la NADPH oxydase et favoriser la formation d'anions superoxydes (Chen, Lin-Shiau et Lin, 1998 : 324). L'interaction de l'AT avec la mitochondrie, comme discutée préalablement, peut également générer un lot de ROS lors de l'ouverture du pore de perméabilité membranaire mitochondrial. Ainsi, il semblerait que l'agrégation des mitochondries pourrait constituer l'un des évènements les plus précoces dans l'apoptose induite par l'AT chez des cellules cancéreuses de l'œsophage (Shen *et al*, 2000 : 155). L'implication des ROS dans le mode d'action de l'AT peut également être démontrée par l'effet inhibiteur des antioxydants. En effet, l'équipe de Chen *et al* a démontré que l'ajout de deux anti-oxydants, le N-acétyl-L-cystéine (NAC) et la catalase, pouvait renverser l'effet pro-apoptotique de l'arsenite (Chen, Lin-Shiau et Lin, 1998 : 324). Aussi, les cellules dont le contenu en glutathion peroxydase (un autre anti-oxydant) ou en catalase est plus bas, telles que les cellules NB4 provenant de patients atteints d'APL, seraient plus sensibles à l'effet de l'AT. C'est pourquoi cet agent est aussi efficace pour induire l'apoptose chez ce type de cellules cancéreuses (Jing *et al*, 1999 : 2102). Il est à noter que le contenu en glutathion intracellulaire pourrait constituer un déterminant majeur dans la sensibilité à l'AT chez des lignées cellulaires cancéreuses puisque l'AT et le glutathion peuvent former des complexes transitoires $As(Glu)_3$ à l'intérieur de la cellule (Davison *et al*, 2003 : 931). Comme discuté précédemment, l'AT possède la propriété de réagir

spontanément avec des protéines riches en groupements thiols. Conséquemment, l'AT peut réagir avec une variété de composantes intracellulaires. Par exemple, l'AT peut s'attacher à la tubuline et perturber la polymérisation des microtubules, ce qui empêche la mitose des cellules. Cette interaction pourrait être à l'origine de l'induction de l'apoptose suite à l'exposition à l'AT chez des cellules leucémiques (Li et Broome, 1999 : 776).

Chapitre 3 La synthèse protéique

3.1 La synthèse protéique chez le neutrophile

Le neutrophile a longtemps été considéré comme une cellule incapable d'activité biosynthétique. En effet, l'observation au microscope de la faible présence de polyribosomes et de réticulum endoplasmique et l'absence de nucléole semblait démontrer que ce leucocyte était presque inactif métaboliquement. Également, on croyait qu'en plus d'être négligeable, la synthèse protéique des neutrophiles était inutile puisque ce leucocyte possédait une courte demi-vie dans la circulation (8-12h) (Edwards, 1994 : 243-259). La phagocytose était également considérée comme un événement ne requérant aucune synthèse d'ARN ou de protéine (Cline, 1966 : 188), ce qui corroborait l'hypothèse que les neutrophiles n'avaient besoin d'aucune synthèse protéique pour effectuer leur rôle. De nouvelles expériences ont permis de renverser cette opinion. Ainsi, les travaux de Jack et Fearon, 1988 : 4286 ont démontré que l'activité biosynthétique du neutrophile variait suite à diverses stimulations. Ces derniers ont observé que le neutrophile pouvait synthétiser *de novo* de l'actine et les récepteurs CR1, CR3 chaîne- α , Fc γ R et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I contrairement à la lactoferrine, une protéine des granules secondaires. Le neutrophile pourrait donc continuer à synthétiser certaines protéines même s'il est considéré comme une cellule mature au stade final de sa différenciation. La modulation de l'expression génique de ce granulocyte pourrait être relativement complexe. En effet, au moins une centaine d'ARNm différents est modulé chez le neutrophile à la suite d'une exposition à des bactéries. Ce niveau de modulation serait comparable à celui observé chez des cellules T activées (Newburger, Subrahmanyam et Weismann, 2000 : 16).

Ensuite, le neutrophile pourrait constituer une source importante de chimiokines. Ainsi, celui-ci pourrait synthétiser *de novo* et sécréter, entre autres, l'IL-8, la *growth related protein alpha* (GRO- α), la protéine inflammatoire des macrophages-1 α (MIP-1 α) et le MIP-1 β . La nature des chimiokines libérées dépend du stimulus. Par exemple, en

présence de LPS, d'IgG ou de TNF- α , le neutrophile peut produire et sécréter de l'IL-8, de la GRO- α et du MIP-1 α . Tandis qu'en présence de GM-CSF ou de fMLP, celui-ci produira essentiellement de l'IL-8. Ces chimiokines peuvent non seulement entraîner le recrutement de neutrophiles supplémentaires mais également favoriser l'accumulation et l'activation d'autres cellules du système immunitaire incluant des monocytes, macrophages, cellules dendritiques immatures et sous-populations de lymphocytes T (Scapini *et al*, 2000 : 195). Cette observation démontre que le neutrophile possède un rôle actif central dans l'inflammation.

Également, le neutrophile a longtemps été vu comme un réservoir de molécules préformées, lesquelles pouvaient être transportées à la surface cellulaire suite à une stimulation. Par exemple, plusieurs résultats ont montré que la fibronectine préformée pouvait être rapidement mobilisée à la surface cellulaire via une dégranulation (Salcedo, Wasserman et Patarroyo, 1997 : 33). Néanmoins, il a été observé que dans certaines conditions pathologiques, par exemple, lors d'infections systémiques, de maladies inflammatoires chroniques ou en présence d'IFN- γ , la fibronectine pouvait être synthétisée *de novo* par le neutrophile et libérée dans le fluide synovial (Beaulieu *et al*, 1987 : 656). Une fois à la surface, cette protéine nouvellement formée pourrait être clivée par des enzymes de surface telles que l'élastase et la cathepsine G. Les fragments générés pourraient être chimiotactiques pour les neutrophiles ainsi que pour les monocytes. La fibronectine intacte à la surface pourrait également avoir un rôle dans l'adhésion en modulant les contacts intercellulaires (Wagner *et al*, 2000 : 337).

3.2 La synthèse protéique dans l'effet de certains agents pro- ou anti-apoptotiques

Les agents anti-apoptotiques ont en général tendance à augmenter la synthèse protéique. En effet, le GM-CSF, le butyrate de sodium et la dexaméthasone sont tous des agents qui possèdent la propriété de retarder l'apoptose des neutrophiles tout en stimulant la synthèse protéique (Brach *et al*, 1992 : 2920 ; Stringer, Hart et Edwards, 1996 : 169 ; Cox et Austin, 1997 : 224). Cette synthèse pourrait permettre le maintien de certains facteurs de survie tels le Mcl-1, un membre de la famille Bcl-2. Également, il a été

démontré que l'expression de certains gènes de protéines de la famille des IAPs pourrait également être augmentée par certains facteurs de survie. Les IAPs, grâce à leurs domaines inhibiteurs des baculovirus (BIR), peuvent s'attacher aux caspases et empêcher leur activation (Deveraux et Reed, 1999 : 239). Ainsi, en présence de LPS, un agent bactérien retardant l'apoptose des neutrophiles, l'expression de c-IAP-1 et de c-IAP-2 serait augmentée (O'Neill *et al*, 2004 : 470). De plus, le retard d'apoptose induit par les interférons de type I et II tout comme celui induit par le G-CSF serait dépendant de la synthèse protéique. En effet, la stimulation avec ces agents pourrait provoquer la synthèse de cIAP2, mais pas de cIAP1 ou de A1, via une voie JAK2-STAT3 (Sakamoto *et al*, 2005 : 301). Il a également été observé qu'une autre protéine de la famille des IAPs, la survivine, serait synthétisée lors d'un retard d'apoptose induit par des cytokines telles que le GM-CSF ou le G-CSF. En effet, le gène de la survivine pourrait être réactivé chez des neutrophiles matures et pourrait inhiber l'apoptose en agissant sur le second activateur mitochondrial des caspases (Smac). Il a été remarqué que cette réactivation était associée à une baisse de l'activité enzymatique de la caspase-3 (Altznauer *et al*, 2004 : 1343). Enfin, l'effet anti-apoptotique du GM-CSF serait indépendant d'une synthèse protéique à court terme (< 9h) et dépendant de cette synthèse à long terme (> 9h) (Sakamoto *et al*, 2003 : 60). L'effet à long terme pourrait être associé à un maintien de la synthèse de Mcl-1 (Moulding *et al*, 1998 : 2495).

Les agents qui induisent l'apoptose des neutrophiles, pour leur part, ont plutôt tendance à inhiber ou à n'avoir aucun effet sur la synthèse protéique des neutrophiles. Par exemple, la VAA-I, lorsque utilisée à une concentration pro-apoptotique (1000 ng/mL), est un agent qui inhibe la synthèse protéique des neutrophiles (Savoie *et al*, 2000 : 845). Le TNF- α est un agent qui peut avoir des effets divergents sur le neutrophile. Ainsi, l'effet anti-apoptotique du TNF- α pourrait être bloqué par la CHX tandis que son effet pro-apoptotique serait indépendant de celle-ci (van den Berg *et al*, 2001 : 467 ; Yamashita *et al*, 1999 : 674). Une seule étude a démontré que la synthèse protéique pouvait être stimulée lors d'une incubation avec un facteur pro-apoptotique. Cet effet a néanmoins été observé chez des cellules cancéreuses, les MM46 (cellules mammaires de souris) (Mikami, Yamazaki et Yui, 1998 : 211). La calprotectine, une protéine cytosolique très

abondante chez le neutrophile, peut à la fois induire l'apoptose et stimuler la synthèse *de novo*.

Les expériences énumérées ci-dessus suggèrent que le retard d'apoptose est dépendant de la synthèse protéique tandis que l'induction pourrait être indépendante de la synthèse protéique. Beaucoup de ces résultats sont basés sur l'addition de cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique ou d'actinomycine D, un inhibiteur de transcription. Très peu d'études, outre quelques expériences d'expression génique, se sont penchées sur l'identification et l'analyse fonctionnelle de protéines responsables de l'effet pro- ou anti-apoptotique d'agonistes du neutrophile. L'AT est un agoniste dont l'effet sur l'apoptose du neutrophile reste méconnu. Par contre, l'impact de l'AT sur l'expression génique totale de nombreux types cellulaires et plus particulièrement de cellules cancéreuses telles que les NB4 est très bien connu. La figure 6 résume les principaux gènes induits par ce métalloïde.

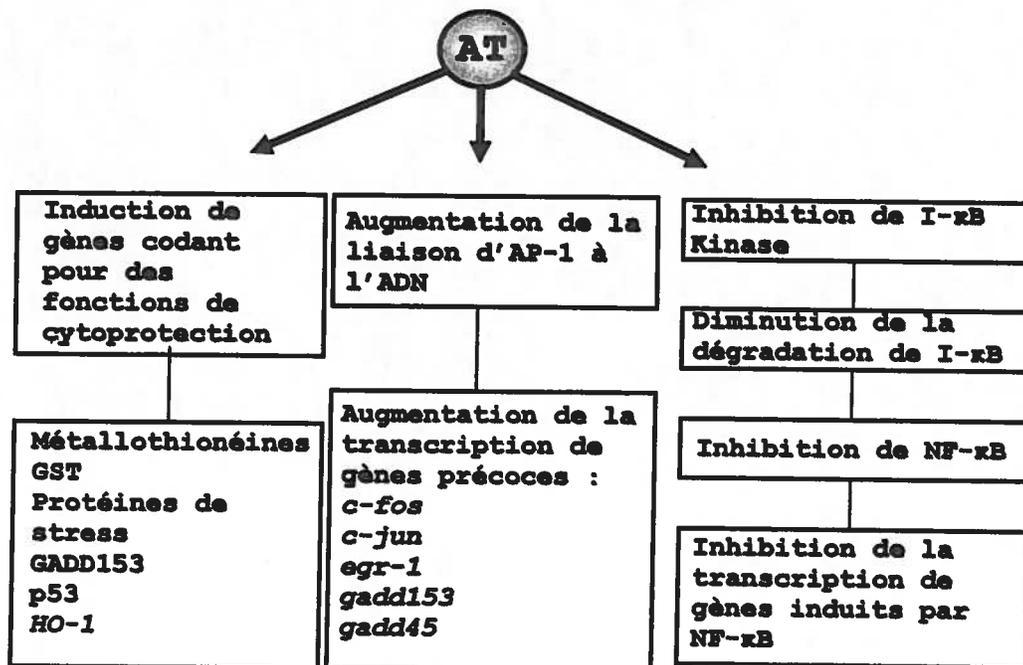


Figure 6 : Effet de l'arsenic sur l'expression génique (selon Beyersmann, 2002 : 63)

Ainsi, l'arsenic peut induire l'expression de nombreux gènes associés à des protéines de stress pouvant conférer une protection à la cellule, mais qui peuvent aussi endommager celle-ci. Par exemple, l'expression de la protéine HO-1 peut être induite à la suite de sa liaison à l'arsenic. Cette protéine peut conférer une protection en formant des pigments comme la biliverdine ou la bilirubine qui possèdent une capacité de neutraliser certains radicaux libres. Par contre, la protéine HO-1 peut aussi promouvoir la séquestration de fer provenant de la mitochondrie et la formation de ROS dépendant du fer (Miller *et al*, 2002 : 3893).

Chapitre 4 : Les annexines

La découverte des annexines remonte à la fin des années 1970. Au départ, ces protéines étaient identifiées selon leurs propriétés distinctes. Par exemple, il y avait les synexines (agrégation des granules), les chromobondines (liaison aux granules de chromaffine) ou les lipocortines (inhibiteurs de la lipase inductible par les stéroïdes). L'avènement de certaines techniques, telles que le clonage moléculaire et le séquençage peptidique, a permis de découvrir que ces protéines possédaient plusieurs propriétés biochimiques communes en plus d'avoir maintes ressemblances au niveau de la structure et de la séquence des gènes. C'est ainsi que le nom annexine a été attribué à cette famille de protéines lesquelles auraient été formées à la suite du phénomène de duplication d'un gène. Plus de 160 protéines différentes ont été identifiées dans la famille des annexines et ce, à l'intérieur de 65 espèces distinctes provenant des règnes fongique, végétal ou animal. Chez les vertébrés, 12 sous-familles d'annexines (A1-A11 et A13) ont été identifiées jusqu'à maintenant (Rescher et Gerke, 2004 : 2631).

4.1 La structure des annexines

La principale caractéristique commune à toutes les annexines est la capacité de s'attacher aux membranes de façon régulée et réversible. Cette liaison est dépendante de la présence de Ca^{2+} . En présence de cet ion, le corps de l'annexine peut se lier à des phospholipides membranaires (voir figure 4). En effet, l'annexine possède deux domaines aux fonctions différentes. Il s'agit du corps C-terminal et du domaine N-terminal. Le corps des annexines est formé de quatre ou huit (pour l'annexine-6) répétitions de 70 acides aminés. Cette partie est composée d'hélices alpha formant un disque compact, légèrement courbé. La face convexe de ce disque s'attache à certains phospholipides membranaires grâce au Ca^{2+} tandis que la face concave pointe vers le cytoplasme et peut donc interagir avec différents éléments cellulaires. La présence de Ca^{2+} peut non seulement permettre l'attachement aux membranes mais celle-ci peut également induire un changement conformationnel. Par exemple, le domaine N-terminal de l'annexine-1 se retrouve enfoui dans le corps de la protéine en absence de Ca^{2+} et est incapable

d'interactions intracellulaires. En présence de Ca^{2+} , le domaine N-terminal peut se dégager du corps de la protéine et interagir avec divers partenaires intracellulaires. Il est connu que le corps de la protéine est conservé chez les sous-classes d'annexines. Le domaine N-terminal, pour sa part, varie pour chaque sous-type, attribuant une fonction biologique distincte pour chaque classe d'annexine (voir section 4.2).

Plusieurs protéines cytosoliques peuvent se lier au domaine N-terminal. Il s'agit souvent de protéines appartenant à la superfamille de ligands au Ca^{2+} *EF-hand-superfamily* caractérisées par un motif hélice-boucle-hélice. Notamment, l'annexine-1 et 2 interagissent avec les protéines S100 A11 (S100C) et A10 (p11) respectivement, lesquelles possèdent deux *EF-hands*. L'annexine-7 se lie à la sorcine, une protéine à quatre *EF-hands* tandis que l'annexine-11 s'attache à la S100A6 qui possède deux *EF-hands*. Les annexines peuvent également se lier à des protéines du cytosquelette. Entre autres, l'annexine-1 pourrait s'attacher à la F-actine et à la profiline, cette dernière étant une protéine de liaison à la G-actine qui régule la polymérisation de l'actine. L'annexine-6 peut aussi se lier à la spectrine lors des événements de bourgeonnement vésiculaire impliquant la clathrine. Il existe d'autres ligands pour les annexines. Parmi ceux-ci, on retrouve la phospholipase A_2 pour l'annexine-1, la protéine d'activation à la p120 Ras GTPase pour l'annexine-6 et les glycosaminoglycans pour les annexines -2, -4, -5 et -6. De plus, il a été montré que certaines protéines de la famille des annexines, dont les annexines -1 et -2, pouvaient se lier à l'ARN ou à l'ADN. Cette liaison pourrait permettre le positionnement d'ARNm à l'intérieur de la cellule grâce à la capacité de ces protéines d'interagir avec les composantes du cytosquelette.

Ensuite, le domaine N-terminal peut également subir des modifications post-transcriptionnelles. Ainsi, l'annexine-13 peut subir une myristoylation et les annexines -1, -2, -4, -6 et -7 sont susceptibles d'être phosphorylées sur leurs résidus tyrosine, sérine ou thréonine. Cette phosphorylation peut modifier les propriétés des annexines. Par exemple, la phosphorylation de l'annexine-1 catalysée par la *epidermal growth factor receptor* (EGFr) *kinase* peut augmenter sa sensibilité à la protéolyse. Aussi, la phosphorylation de l'annexine-2, médiée par une tyrosine kinase de la famille Src, entraîne une perte

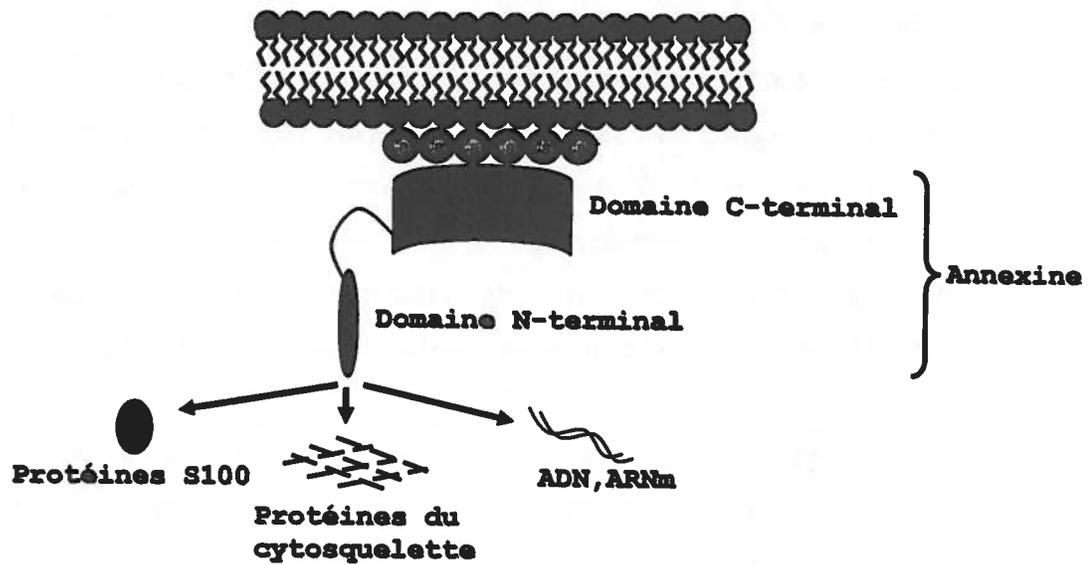


Figure 7 : Structure et interactions intracellulaires des annexines

d'affinité du corps de la protéine envers le Ca^{2+} (Rescher et Gerke, 2004 : 2631 ; Gerke, Creutz et Moss, 2005 : 449).

4.2 Les fonctions des annexines

Les annexines possèdent une variété de fonction à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. D'abord, celles-ci peuvent stabiliser certaines structures de la membrane plasmique ou encore modifier la forme de la cellule en formant des assemblages latéraux. Entre autres, cette fonction est accomplie grâce à la propriété de l'annexine-5 de générer un réseau en deux dimensions sous la membrane phospholipidique. Cet assemblage serait formé de tétramères d'annexine-5. Les annexines -1 et -2 peuvent aussi former des assemblages, mais ceux-ci sont moins organisés et formés d'une seule couche. L'assemblage d'annexines est associé à un recrutement de lipides et à la formation de certains domaines phospholipidiques membranaires. Ces domaines, aussi appelés radeaux lipidiques, seraient composés d'un complexe d'annexines et de dimères de protéines de la famille S100 (S100A11 par exemple).

Également, les annexines pourraient avoir un rôle dans la fusion membranaire impliquée dans l'exocytose régulée par le Ca^{2+} . Cette fonction a été dénotée pour la première fois avec l'annexine-7. En effet, bien que celle-ci ne soit pas une protéine fusogénique (comme les protéines SNARE), l'annexine-7 possède la capacité d'attacher deux membranes ensemble. Des expériences d'ARN interférences ont aussi démontré que des complexes annexine-2/S100A10 sont essentiels à l'exocytose des corps Weibel-Palade. Ensuite, la présence de plusieurs types d'annexines dont les annexines -1, -2 et -6 a été découverte sur des compartiments endosomiques. Ces protéines pourraient avoir un rôle dans la morphologie des endosomes et dans le transport endocytique.

Également, il a été suggéré que les annexines pourraient, en fait, être des canaux ioniques transportant le Ca^{2+} . En effet, celles-ci possèdent plusieurs propriétés qui sont caractéristiques des canaux ioniques. D'abord, elles sont spécifiques au Ca^{2+} , elles sont dépendantes au voltage et leur conductivité est similaire à d'autres canaux Ca^{2+} . De plus, des études de cristallographie ont démontré que ces protéines possèdent un pore central délimité par des résidus spécifiques aux ions Ca^{2+} . Par contre, plusieurs questions subsistent concernant cette hypothèse. D'une part, comment une protéine associée de façon périphérique aux membranes pourrait-elle transporter des ions à travers celle-ci ? Également, le diamètre du pore observé ne correspond pas à la mesure de conductivité mesurée. Un rôle plus logique impliquerait la régulation de canaux ioniques. Par exemple, l'annexine-2 pourrait être un régulateur de canaux Cl^- chez des cellules endothéliales vasculaires.

Les annexines peuvent aussi avoir une panoplie de rôles extracellulaires. Premièrement, plusieurs fonctions ont été découvertes pour l'annexine-1, notamment dans l'inflammation et dans l'apoptose. Ce sujet sera abordé plus en détail dans la prochaine section. L'annexine-2 possède aussi un rôle extracellulaire important. En effet, cette protéine a été retrouvée à la surface de cellules endothéliales vasculaires, associée à l'activateur du plasminogène (PA) comme co-récepteur. Le PA permet la génération de plasmine qui est cruciale pour la dégradation de fibrine et l'homéostasie fibrinolytique. Par ailleurs, des souris déficientes en annexine-2 peuvent présenter des dépôts

importantes de fibrines à l'intérieur des tissus. Ensuite, un rôle anticoagulant a été proposé pour l'annexine-5 extracellulaire. Cette protéine pourrait former des réseaux en deux dimensions à la surface des phospholipides cellulaires. De cette façon, les phospholipides seraient indisponibles pour les facteurs coagulants, ce qui perturberait la cascade de coagulation (Gerke, Creutz et Moss, 2005 : 449 ; Rescher et Gerke, 2004 : 2631).

4.3 L'annexine-1

L'annexine-1 fut la première protéine à être caractérisée dans la grande famille des annexines. Originellement connue sous le nom de lipocortine-1, celle-ci a d'abord été décrite comme une protéine dont l'expression est inductible par les glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone. Par exemple, l'annexine-1 aurait pour effet de transmettre l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes en inhibant la phospholipase A₂ cytosolique (Flower, 1988 : 987). Cette phospholipase fournit de l'acide arachidonique à partir de phospholipides membranaires et ainsi, permet la formation de médiateurs pro-inflammatoires comme les leucotriènes et les prostaglandines. Le contrôle de l'activité de la phospholipase A₂ (PLA₂) cytosolique est donc essentiel à la régulation de la réponse inflammatoire (Parente et Solito, 2004 : 125). Cette action inhibitrice sur l'activité de la PLA₂ cytosolique est caractéristique de l'annexine-1. D'autres types d'annexines (-2 ou -3) ne partagent pas cette capacité (Kim *et al*, 2001 : 15712). D'ailleurs, l'abolition de l'expression de cette protéine en employant des ADN complémentaires antisens peut augmenter l'activité de la PLA₂ chez une lignée monocytique U-937 (Solito *et al*, 1998 : 1675). D'autres enzymes impliquées dans l'inflammation peuvent aussi être ciblées par l'annexine-1. C'est le cas pour l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). En effet, il a été démontré que l'annexine-1, plus précisément le fragment N-terminal, pouvait inhiber l'induction de la iNOS chez des macrophages activés au LPS (Wu *et al*, 1995 : 3473). L'inhibition de la iNOS peut également permettre une résorption de la réponse inflammatoire puisque l'oxyde nitrique est généré par des cellules telles que des macrophages exposés au LPS ou à l'IFN- γ afin de détruire des cellules tumorales ou certains types de microorganismes (Edwards, 1994 : 13-14).

Ensuite, plusieurs expériences tendent à démontrer que l'effet de l'annexine-1 pourrait se faire grâce à une libération d'IL-10. En effet, des macrophages stimulés au LPS et incubés en présence d'annexine-1 libèrent et ce, de façon dose-dépendante, de l'IL-10 dans le milieu extracellulaire. Dans cette même expérience, l'ajout d'annexine-1 ou de son fragment N-terminal (le peptidomimétique Ac2-26 pour être plus précis) a eu pour effet d'inhiber l'expression d'iNOS et d'IL-12. En sachant que l'IL-10 peut justement inhiber l'expression de ces deux protéines, il est possible que l'effet de l'annexine-1 sur ces macrophages serait en fait une conséquence de l'action de cette cytokine (Ferlazzo *et al*, 2003 : 1363).

4.3.1 L'annexine-1, le neutrophile et l'apoptose

Le contenu cytosolique des neutrophiles est constitué de 2 à 4% d'annexine-1. Cette protéine est également présente chez d'autres types de leucocytes, principalement les monocytes et les éosinophiles. Il existe une autre fonction très bien connue de l'annexine-1 à l'intérieur de la réponse inflammatoire outre l'inhibition de la PLA₂ cytosolique. Il s'agit de l'inhibition de la migration des leucocytes. Cet effet serait responsable de l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes. Par exemple, le détachement des leucocytes observé à la suite de l'administration de dexaméthasone à l'intérieur de veinules post-capillaires serait provoqué par l'action de l'annexine-1. En effet, l'immunisation contre cette protéine renverserait le détachement des leucocytes (Mancuso, Flower et Perretti, 1995 : 377). Après que le neutrophile ait traversé l'endothélium vasculaire (extravasation), l'annexine-1 serait relocalisée à sa surface, soit à la membrane plasmique, et libérée dans le milieu extracellulaire (Perretti *et al*, 1996 : 1259). Cette relocalisation serait associée à une activité de protéolyse. Ainsi, l'annexine-1 libérée serait principalement sous forme N-terminale. Une métalloprotéase membranaire (Movitz, Sjölin et Dahlgren, 1999 : 101) ainsi que l'élastase (Tsao *et al*, 1998 : 120) ont été postulées comme pouvant effectuer ce clivage. Le fragment N-terminal serait la partie responsable de l'effet de détachement induit par l'annexine-1 tel que démontré par une expérience employant une protéine chimérique (corps d'annexine-5 + fragment N-

terminal d'annexine-1) (Perretti *et al*, 1996 : 1259). L'extravasation des neutrophiles pourrait également induire la synthèse *de novo* de l'annexine-1 tel que décrit par des expériences d'hybridation *in situ* (Oliani *et al*, 2001 : 603). Il est intéressant de noter que l'annexine-1 ne possède pas de séquence signal pouvant la diriger vers la voie sécrétoire classique (Philip, Flower et Buckingham, 1998 : 133). Celle-ci doit donc emprunter une voie alternative pour être libérée dans le milieu extracellulaire. Cette voie alternative pourrait en fait être une dégranulation puisqu'il a été observé que l'annexine-1 pouvait colocaliser avec des granules de gélatinase chez les neutrophiles (Perretti *et al*, 2000 : 163).

La libération extracellulaire de l'annexine-1 pourrait avoir un effet direct sur le neutrophile (effet autocrine), mais également sur d'autres cellules environnantes (effet paracrine). Cet effet impliquerait la liaison à des récepteurs à la surface du neutrophile. Il a été démontré que l'annexine-1 pourrait se lier à deux types de récepteurs, soit le récepteur au fMLP (*formyl peptide receptor* (FPR)) et le récepteur à la lipoxine A₄ (le récepteur à la lipoxine A₄ (LXAR) ou *formyl peptide receptor like-1* (FPRL1)) (Perretti, 2003 : 574). L'implication du FPR a été mise à jour grâce à une expérience employant des antagonistes du fMLP, soit les butyloxycarbonyls (BOC). Un ajout de BOC pourrait empêcher l'effet inhibiteur de l'annexine-1 (Walther, Riehemann et Gerke, 2000 : 831). Le FPR est un membre de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines-G dont le ligand classique est le fMLP. Il est donc surprenant que le FPR puisse à la fois être lié par un ligand pro-inflammatoire chimiotactique, le fMLP, et un ligand anti-inflammatoire, soit l'annexine-1. Il a été proposé que la concentration d'annexine-1 pourrait influencer ses propriétés inflammatoires. Ainsi, à haute concentration (100-200µM), l'annexine-1, tout comme le fMLP, pourrait induire une flambée oxydative mesurable par la libération d'anions superoxydes et donc, pourrait activer le neutrophile. Par contre, à faible concentration (10-20µM), cette protéine n'induirait pas de flambée oxydative, mais pourrait désensibiliser le FPR, ce qui empêcherait l'activation du neutrophile par le fMLP. Il est à noter que même à faible concentration, l'annexine-1 peut encore inhiber la diapédèse du neutrophile (Walther, Riehemann et Gerke, 2000 : 831). Le second récepteur impliqué dans l'action de cette

protéine est le LXAR. Celui-ci possède une homologie avec le FPR d'environ 60 à 70% au niveau de la séquence en acides aminés et de 70 à 80% pour la séquence nucléotidique. Le LXAR possède plusieurs ligands dont la lipoxine A₄ et la protéine amyloïde sérique A (SAA). La lipoxine A₄, tout comme le fragment N-terminal de l'annexine-1, pourrait empêcher l'adhésion et la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire. De plus, il semblerait que l'effet inhibiteur des BOC pourrait aussi agir sur les récepteurs LXAR, ce qui laisse croire que l'action inhibitrice de l'annexine-1 pourrait fonctionner via deux récepteurs distincts (Perretti *et al*, 2002 : 1296). Néanmoins, les voies de signalisation induites par la ligation de l'annexine-1 au FPR ou au LXAR sont méconnues et devront être éclaircies dans le futur (Perretti, 2003 : 574).

L'effet de l'annexine-1 sur la migration des leucocytes pourrait également provenir d'une perturbation des molécules d'adhésion. Entre autres, il a été observé que l'annexine-1 pouvait colocaliser avec la $\alpha_4\beta_1$ intégrine à la surface de la cellule monocytique (Solito *et al*, 2000 : 1573). Il est connu que la $\alpha_4\beta_1$ intégrine sur le neutrophile et la VCAM-1 sur la cellule endothéliale interagissent ensemble pour permettre l'attachement ferme et la diapédèse du neutrophile. La relation entre la VCAM-1 et l'annexine-1 a donc été investiguée. Ainsi, il a été remarqué que ces deux molécules d'adhésion pourraient compétitionner pour l'attachement à la $\alpha_4\beta_1$ intégrine chez les U-937. Ensuite, la relocalisation de l'annexine-1 à la surface pourrait induire le clivage de la L-sélectine. Cette interaction serait dépendante de la présence de calcium (de Coupade, Solito et Levine, 2003 : 133). La L-sélectine est exprimée constitutivement par les neutrophiles et permet le roulement sur l'endothélium vasculaire.

Un lien entre l'annexine-1 et l'apoptose a été reconnu pour la première fois en 1995 par l'équipe de McKanna. Il a été remarqué que la phase de régression d'une tumeur provenant d'un cancer du sein était associée à une forte expression de l'annexine-1. La régression tumorale est caractéristique d'une augmentation de l'apoptose des cellules en prolifération (McKanna, 1995 : 1). Puis, d'autres expériences ont confirmé le lien entre l'induction de l'apoptose et l'annexine-1. Par exemple, la surexpression de cette protéine chez les U-937 a eu pour effet d'induire l'apoptose chez cette lignée monocytique. Cette

induction d'apoptose serait associée à une augmentation de l'activité de la caspase-3 (Solito *et al*, 2001 : 217). Également, un ajout exogène d'annexine-1, plus précisément le fragment N-terminal, au milieu de neutrophiles induirait l'apoptose et ce, de façon dose-dépendante. Cette induction serait associée à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} et un clivage de la L-sélectine. De même, l'ajout d'annexine-1 pourrait induire la déphosphorylation de Bad, ce qui lui permettrait de s'associer à la mitochondrie, de former un hétérodimère avec Bcl-X_L et de promouvoir l'apoptose. Il a été suggéré que cette déphosphorylation pourrait être le fruit d'une activation de la calcineurine phosphatase suite à l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} (Solito *et al*, 2003 : 1544). La propriété proapoptotique de l'annexine-1 sur les neutrophiles et l'induction de sa synthèse par un agent anti-apoptotique, soit la dexaméthasone, sont contradictoires. Cette situation n'est pas étonnante puisque les glucocorticoïdes ont un effet différent sur les neutrophiles en comparaison avec d'autres types de leucocytes. En effet, ceux-ci retardent l'apoptose des neutrophiles tandis qu'ils induisent l'apoptose chez les éosinophiles et les lymphocytes.

De plus, un lien entre la reconnaissance des cellules apoptotiques et l'annexine-1 a aussi été remarqué. La reconnaissance des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires est un phénomène très important dans l'inflammation car il permet l'élimination sécuritaire des cellules apoptotiques, sans dommages pour les tissus environnants. D'abord, l'expérience de Arur *et al* a démontré que l'annexine-1 pouvait se retrouver à la surface de cellules T apoptotiques et que cette relocalisation était dépendante de l'activité des caspases et de l'augmentation intracellulaire en calcium. De plus, cette annexine colocaliserait avec les phosphatidylsérines à la membrane des cellules apoptotiques et pourrait constituer un signal de reconnaissance des cellules en apoptose (Arur *et al*, 2003 : 587). Les travaux de Fan *et al* ont aussi démontré que l'annexine-1 pouvait constituer un signal de reconnaissance, mais cette fois à la surface de macrophages phagocytaires. Par contre, ces travaux laissent supposer que l'annexine-1 ne serait pas liée aux phosphatidylsérines, ce qui dément l'affirmation que celle-ci agirait comme une protéine-pont entre deux phosphatidylsérines. En effet, il semblerait que l'annexine-1 ne pourrait être soustraite de la surface des macrophages par un traitement à

l'EGTA, un agent chélateur d'ions divalents (Fan *et al*, 2004 : 2863). L'annexine-1 ne possédant aucun domaine transmembranaire, il reste à démontrer comment celle-ci reste accrochée au feuillet externe de la membrane plasmique.

4.3.2 Le rôle global de l'annexine-1 dans l'inflammation : la souris $Anx^{-/-}$

Un modèle de souris annexine-1 négative ($Anx^{-/-}$) a été développé afin de caractériser l'importance de cette protéine dans l'inflammation (voir tableau III). Les résultats obtenus montrent que l'absence d'annexine-1 est compensée par une augmentation d'autres protéines de la même famille telles que les annexines -2, -4, -5 et -6. Ensuite, il semble que les souris déficientes en annexine-1 démontrent une plus forte expression des enzymes PLA_2 cytosoliques et cyclooxygénase-2, ce qui est totalement en accord avec les résultats obtenus *in vitro*. La résolution de l'inflammation observée à la suite de l'application de dexaméthasone aux souris normales n'est pas applicable aux souris $Anx^{-/-}$. Cette observation démontre encore une fois que l'action des glucocorticoïdes passe par un second messager, en l'occurrence l'annexine-1. De plus, le comportement des leucocytes est altéré chez les souris $Anx^{-/-}$. En effet, l'adhérence et la migration des neutrophiles et des monocytes sont augmentées chez ces animaux. Cet effet serait imputable à l'augmentation de l'expression de L-sélectine observée chez les souris déficientes en annexine-1. Enfin, un défaut dans la phagocytose des macrophages provenant des souris $Anx^{-/-}$ a aussi été constaté, ce qui corrobore les hypothèses voulant que l'annexine-1 pourrait être impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. Globalement, la déficience en annexine-1 pourrait provoquer une exacerbation de la réponse inflammatoire menant possiblement à des effets néfastes sur les tissus environnants. Fait à noter, il semblerait que les hormones sexuelles puissent influencer la réponse à l'annexine-1 puisqu'on observe une différence de comportement des leucocytes de sexe opposé chez la souris $Anx^{-/-}$ (Hannon *et al*, 2003 : 253).

Tableau III : Résumé des différences entre les PMN de souris $Anx^{+/+}$ et $Anx^{-/-}$ (d'après Roviezzo *et al.*, 2002 : 541).

Paramètres évalués	Variation chez de la souris Annexine-1^{-/-}	Effets des glucocorticoïdes
<u>Expression tissulaire</u> Cox-2 PLA ₂ cytosolique	Augmentation Augmentation	Non déterminés Non déterminés
<u>Molécules d'adhésion</u> Expression basale : CD11b L-sélectine Stimulés au fMLP/PAF : CD11b	Réduction Augmentation Exagérée	Non déterminés Non déterminés Non déterminés
<u>Génération de superoxyde</u> Stimulés au IgG	Aucune	Abolis
<u>Microscopie</u> Roulement Adhésion Migration <u>Modèle inflammatoire</u> Péritonite induit par le zymosan : Migration Production d'IL-1 β Production de TNF- α	Aucune Augmentation Augmentation Grandement exagérée Réduction Légère augmentation	Non déterminés Non déterminés Non déterminés Diminués Non déterminés Non déterminés

SECTION 2 : ARTICLE

Résumé en français de l'article

Titre : Le trioxyde d'arsenic est un nouvel agent pro-apoptotique des neutrophiles humains : rôle des réactifs oxygénés, des caspases et de la synthèse protéique *de novo*.

Le trioxyde d'arsenic (AT) est connu pour induire l'apoptose chez une variété de lignées cellulaires. Cependant, son action sur des cellules différenciées telles que les neutrophiles a été très peu étudiée jusqu'à maintenant. Une apparition de neutropénie a été constatée à la suite de traitements à l'AT chez certains patients cancéreux. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'AT pourrait induire l'apoptose des neutrophiles. Il a été constaté que l'AT pouvait effectivement induire l'apoptose des neutrophiles et que cette réponse pouvait être empêchée par l'ajout d'un inhibiteur général des caspases. L'AT n'a pas provoqué de libération d'anions superoxydes et a induit l'apoptose, avec la même capacité, chez des cellules PLB-985 et X-CGD (cellules PLB-985 déficientes en gp91^{phox}, analogues aux cellules de patients atteints de granulomatose chronique). Étonnamment, l'AT a induit la synthèse protéique *de novo* chez les neutrophiles et cette synthèse est partiellement bloquée par l'ajout de CHX. Une protéine cytosolique, l'annexine-1, dont l'expression était augmentée en présence d'AT, a été identifiée par spectrométrie de masse. Nous avons observé que cette protéine pouvait également être synthétisée *de novo* en présence de GM-CSF et de dexaméthasone, deux agents anti-apoptotiques des neutrophiles. Une forte augmentation de la libération d'annexine-1 préformée a été observée en présence d'AT contrairement au GM-CSF ou à la dexaméthasone. Cette libération n'a pu être bloquée par l'ajout de CHX. En résumé, l'AT induit l'apoptose des neutrophiles par un mécanisme impliquant les caspases et la synthèse protéique *de novo*, mais indépendant de la synthèse *de novo* d'annexine-1. Il est toutefois possible que l'annexine-1 synthétisée *de novo*, par sa capacité à inhiber la PLA₂ cytosolique, puisse faire partie d'une boucle anti-inflammatoire activée par l'ajout d'AT.

Contribution des auteurs de l'article

Contribution personnelle

J'ai participé à plusieurs expériences mentionnées dans cet article. D'une part, j'ai isolé les neutrophiles, je les ai incubés avec divers agonistes et j'ai mesuré leur apoptose soit par cytologie ou par modulation du CD16 au cytomètre en flux (FACS). J'ai aussi analysé la synthèse *de novo* des neutrophiles en présence d'une solution de marquage métabolique. J'ai réalisé les gels SDS-PAGE 1D et 2D tout comme les résultats de modulation du CD16 en présence d'AT et de plusieurs concentrations de CHX. J'ai également effectué l'analyse, le choix et l'excision des protéines qui ont été envoyées pour être analysées par spectrométrie de masse. Par la suite, l'étude du rôle intracellulaire et extracellulaire de l'annexine-1 m'a été confiée. Ainsi, j'ai effectué l'immunoprécipitation de l'annexine-1 marquée avec une solution radioactive en présence d'agents pro- ou anti-apoptotiques. J'ai aussi effectué un immunobuvardage de type Western dirigé contre l'annexine-1 avec des surnageants de neutrophiles incubés avec divers agonistes. Il est à noter que j'ai aussi exécuté la densitométrie et l'analyse des résultats des gels 2D et des immunobuvardages de type Western. Enfin, j'ai participé à la planification de plusieurs expériences et à la rédaction du manuscrit. Ma contribution a permis de constater que l'AT est un agent pro-apoptotique qui peut induire la synthèse *de novo*. Aussi, mes résultats ont montré que l'effet de cet agent passait en partie par la synthèse protéique. De plus, j'ai démontré que l'annexine-1 était synthétisée *de novo* en présence d'AT mais aussi avec le GM-CSF et la dexaméthasone. J'ai enfin montré que l'annexine-1 est libérée en présence d'AT et que cette libération n'est pas inhibée par l'ajout de CHX.

Contribution des co-auteurs

Mme Cavalli a effectué les immunobuvardages de type Western montrant la dégradation de la gelsoline et les mesures de production d'anions superoxydes par réaction

colorimétrique. Celle-ci a aussi analysé l'effet de l'AT sur des lignées PLB-985 WT et PLB-985 KO par Annexin-V-FITC ou coloration de Hoechst. Mme Moisan a réalisé les expériences mesurant la production de ROS mitochondriaux par FACS à l'aide de la sonde DHR123. M. Girard est le responsable de ce projet. Il a participé à la conception des expériences, à l'analyse des résultats, à l'analyse statistique et à la rédaction du manuscrit.

Texte original de l'article

Arsenic trioxide (As₂O₃) is a new human neutrophil pro-apoptotic agent: role of reactive oxygen species, caspases and de novo protein synthesis.

François Binet[‡], Hélène Cavalli[‡], Éliane Moisan, Denis Girard^{*}

From INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, PQ, Canada.

[‡]*F.B. and H.C. contributed equally to this study.*

^{*}*Correspondence to: Dr Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier
245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6.
Tel/Fax: (514) 630-8847/8850.
e-mail: denis.girard@iaf.inrs.ca*

Categories: Phagocytes or Immunobiology

Keywords: Caspases, reactive oxygen species, de novo protein synthesis,

Running title: Induction of neutrophil apoptosis by arsenic trioxide.

Word counts:

-Abstract: 198 words
-Text: 4987 words

¹*This study was partly supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR)(MOP-89534) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). FB holds a M. Sc. CIHR studentship, EM holds a PhD studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), and DG is a FRSQ scholar.*

ABSTRACT

The anti-cancer drug arsenic trioxide (AT) induces apoptosis in different transformed or proliferating cells. However, little is known regarding its ability to induce apoptosis in terminally differentiated cells such as neutrophils. Because neutropenia has been reported in some cancer patients after AT treatment, we hypothesized that AT could induce neutrophil apoptosis, an issue that has never been investigated. Herein, we found that AT induced apoptosis in neutrophils and this response was reversed by a pan-caspase inhibitor. AT did not increase superoxide production in neutrophils and induced apoptosis in PLB-985 and X-CGD cells (PLB-985 cells deficient in gp91^{phox} mimicking chronic granulomatous disease) at the same potency. Unexpectedly, we found that AT induced de novo protein synthesis and cycloheximide (CHX) partially reversed its pro-apoptotic effect. Using mass spectrometry, we identified one cytosolic protein, annexin-1, which de novo synthesis was increased by AT. However, GM-CSF and dexamethasone, two neutrophil anti-apoptotic agents, also induced de novo synthesis of annexin-1. In contrast to these latter agents, AT markedly increased the release of pre-existing annexin-1, which was unaffected by CHX. We conclude that AT induces neutrophil apoptosis and that caspases and de novo protein synthesis are involved, but probably not via newly synthesized annexin-1.

INTRODUCTION

Arsenic trioxide (As_2O_3 ; AT) is effective in the treatment of various cancers, especially of acute promyelocytic leukemia (APL)^{1,2}. In the last decade, several reports have indicated that AT acts principally by inducing cell apoptosis not only in APL, but in a variety of cells including non-APL acute myeloid leukemia cells, myeloma cells, chronic myeloid leukemia cells and various solid tumor cells³. In addition, AT was found to induce apoptosis in a variety of myeloid cell lines including NB4, HL-60, PLB-985 and U937⁴⁻⁷ and in some immune cells such as B and T lymphocytes^{8,9}. Curiously, the effect of AT on neutrophil apoptosis has never been studied, despite the fact that neutropenia is a common occurrence following cancer therapy, resulting in recurrent infections in patients. Moreover, an immunotoxicological study reported that neutropenia was marked after exposure to arsenic compounds¹⁰. More recently, in a phase II study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, 67% of the patients experienced grade 3 or 4 neutropenia¹¹. Also, in another phase II trial, 11/16 multiple myeloma patients treated with AT developed cytopenia, five associated with infectious complications¹². Taken together, these observations attest to the importance of studying potential pro-apoptotic effects of AT in human neutrophils.

AT is known to induce cell apoptosis via reactive oxygen species and to activate caspases^{2,5,9,13-16}, whereas the involvement of mitochondria in AT-induced apoptosis is still controversial^{4,17}. Also, AT was found to inhibit the release of cytochrome *c*, a component highly involved in caspase activation and cell apoptosis. The cytoskeleton, especially the microtubules, is an important cellular target for arsenic, probably due to the

fact that cytoskeletal components possess a high sulfhydryl protein content¹⁷. The toxicity of AT is partly explained by its ability to bind and inactivate several sulfhydryl-containing proteins and enzyme systems¹⁷. AT was previously found to induce cell differentiation when used at a low concentration (generally 0.5-5 μ M), while it induces cell apoptosis (or necrosis) at concentration greater than 5 μ M in a variety of cell lines^{1,5,7,17-19}. Interestingly, the concentrations used in the majority of in vitro studies are in the range of clinically achievable concentrations^{3,19}.

We have recently documented that the anticancer agent, *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I), a plant lectin that inhibits protein synthesis, is a potent inducer of human neutrophil apoptosis²⁰. In particular, we found that VAA-I induced apoptosis via caspases and the degradation of different cytoskeletal proteins, including the microfilament-associated protein gelsolin^{20,21}. Such degradation occurred via a caspase-dependent mechanism, since addition of the pan caspase inhibitor z-VAD-FMK markedly reversed the degradation as well as apoptosis. In the present study, we were interested in whether or not AT induced human neutrophil apoptosis. We found that AT induced neutrophil apoptosis by a mechanism that is dependent upon caspase activity and de novo protein synthesis, but independent of ROS generation through NADPH activation and mitochondria. Interestingly, AT induced de novo protein synthesis, and when compared with the cytokine GM-CSF, which delays neutrophil apoptosis via protein synthesis^{22,23}, the profile of newly synthesized polypeptides differed between these two compounds. This indicated that accelerated or delayed neutrophil apoptosis occurred by different set of newly synthesized polypeptides. This is the first study to establish that AT is an

inducer of apoptosis in mature human neutrophils, and this could partly explain occurrence of neutropenia in patient after AT treatment.

MATERIALS AND METHODS

Neutrophils isolation. Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by centrifugation over Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, QC) as previously described^{20,21}. Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion, and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema 3 Stain Set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ)^{20,21}.

Cell lines. Wildtype (WT) human promyelocytic cell lines PLB-985 and PLB-985 deficient (KO) in *gp91^{phox}*, mimicking X-linked chronic granulomatous disease by their inability to generate O_2^- via NADPH oxidase, were a gift from Dr. Y. Pommier (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland). Cell lines were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, in RPMI-1640 complete medium supplemented with 10% FCS and antibiotics; 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY). Cells were grown at a density of 1×10^6 cells/mL and the medium was changed three times/week.

Assessment of apoptosis by cytology or CD16 expression. Freshly isolated human neutrophils (100 μ L of a 10×10^6 cells/mL suspension in RPMI 1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 17-24h in the presence or absence of increasing concentrations of As_2O_3 and apoptosis was evaluated by cytology. Preparations of neutrophils were centrifuged using a Cyto-tek® centrifuge (Miles Scientific, Elkhart, IN), as previously described^{20,21}, and were stained with Hema-Stain staining kit according to the manufacturer's instructions. The cells were examined by light microscopy at 400 \times final magnification. Apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristically dark-stained pyknotic nuclei.

Cell surface expression of CD16 was used to study the potential effects of AT on neutrophil apoptosis^{24,25}. After 17-24 h of incubation in the presence or absence of AT, the cells were washed, and preincubated for 30 min at 4°C with 20% autologous serum to prevent non-specific binding via Fc receptors. The cells were then washed and incubated with 2 μ L of FITC-mouse anti-human CD16 mAb (PharMingen Canada, Mississauga, ON) for 30 min at 4°C (light protected) before fluorescein-activated cell sorter analysis. Flow-cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Degradation of gelsolin. Cells (1×10^6 cells/mL in 24 well plate) were incubated with or without 1000 ng/mL VAA-I in the presence or absence of 50 μ M z-VAD-FMK^{20,21} or the diluent (<1% DMSO) for the indicated period of time and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer and gelsolin cleavage was

monitored as previously described^{20,21}. Protein loading was systematically verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments.

O₂⁻ production. O₂⁻ production was performed by colorimetric assay (reduction of cytochrome *c*), as previously published^{26,27}. Briefly, neutrophils (1 x 10⁶ cells/mL in HBSS supplemented with 1.6 mM CaCl₂) were incubated in the presence or absence of 10 µg/mL superoxide dismutase (SOD) (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON) with 130 µM cytochrome *c* (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON) for 5, 15 or 30 min at 37°C in the presence of buffer, 10⁻⁷ M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), used as positive control, or increasing concentrations of AT. The absorbance of cytochrome *c* was monitored at 550 nm and the number of O₂⁻ anions produced was calculated by the difference between corresponding wells with or without SOD using an extinction coefficient of 21.1.

Measurement of ROS production by DHR 123. Mitochondrial ROS production was assessed with dihydrorhodamine 123 (DHR123) as previously described^{28,29}. Briefly, neutrophils were incubated at a final concentration of 1 x 10⁶ cells/mL in HBSS-0.3% BSA containing 1 µM DHR123 (Molecular Probes) for 5 minutes at 37°C before adding stimuli. Buffer, AT (1-20 µM), PMA (10⁻⁷ M) or a mixture of AT + PMA, was then added and cells were incubated at 37°C for another 15, 30, 45 or 60 minutes. ROS production was analysed by FACScan by detecting fluorescence in the green channel at 530/30 nm (FL1). 10,000 events per sample were analyzed.

Assessment of PLB-985 WT and PLB-985 KO cell apoptosis. Cells (0.2×10^6 cells/mL) were incubated in the presence or absence of AT (2-20 μ M) in 12 well-plates for 6 days (7). Medium was changed every two days, cell density was adjusted at 0.2×10^6 cells/mL and AT was added at the corresponding concentration. After the incubation, cells were harvested and apoptosis was evaluated by flow cytometry using FITC-annexin-V²¹ and by cytology following Hema-Stain or Hoechst staining^{20,21}. In other experiments, PLB-985 WT and KO were incubated for 24h with increasing concentrations of AT and apoptosis was assessed by cytology following Hoechst staining.

Metabolic labeling and de novo protein synthesis assay. Cells (10×10^6 cells/mL in RPMI-1640 supplemented with 1% autologous serum) were metabolically labeled with 125 μ Ci of the Redivue Pro-Mix L-[³⁵S] *in vitro* cell labeling mix (Amersham BioSciences Inc.) in the presence or absence of agonists as indicated in the figure legends, for 22 h as previously published^{21,30}.

Two dimensional gel electrophoresis. Metabolic labeling was performed as described above in the presence or absence of AT (5 μ M), CHX (10 μ g/mL) or GM-CSF (65 ng/mL) for 22h as previously published^{26,30}. For CHX treatment, cells were pre-incubated 30 min before addition of the agonists. Cell lysates were then prepared in lysis buffer (Chaps 4%, Tris 40 mM, urea 8M, aprotinin 20 μ g/mL, pepstatin 20 μ g/mL, leupeptin 20 μ g/mL, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 1%) and isoelectrofocusing was performed (strip pH 3-10 linear, IPGphor Pharmacia Biotech) followed by SDS-PAGE. An equivalent of 2×10^6 cells was loaded per strip. After electrophoresis, gels were stained

with Coomassie blue, dried, and exposed to Kodak film X OMAT-RA at -80 °C for 3-5 days.

Protein identification. To evaluate the nature of selected proteins observed after 2D-SDS-PAGE, spots were identified by NanoLC-MS/MS using the Q-ToF Ultima (Waters) mass spectrometer at the National Research Council of Canada (NRC). Database searching was carried out in batch mode using Mascot Daemon™ (Matrix Science) and against the NCBI protein database.

Immunoprecipitation of radiolabeled annexin-1. Metabolically labeled neutrophils (5×10^6) were centrifuged to separate the cells from the medium. Pellets were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in 100 μ l nondenaturant lysis buffer (1mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% glycerol, 1% NP-40, 0.01 mg trypsin, 1 μ M orthovanadate/2.5 μ M pNPP (o-vanpNPP), 0.01 mg pepstatin A, 0.01 mg leupeptin, 0.01 mg aprotinin and 1 mM PMSF for 30 min on ice. The lysates and supernatants were precleared using 20 μ l protein G-Sepharose (Amersham Biosciences Inc.). After 1 h, samples were briefly centrifuged to remove the Sepharose beads, and incubated with 2.5 μ g/mL of the anti-annexin-1 antibody, with gentle agitation overnight. Protein G-Sepharose (20 μ l) was then added for an additional 2-3h incubation. The solid matrix was collected and washed three times with PBS before suspending it in 30 μ l sample buffer and heating to 100°C for 5 min. Labeled proteins were resolved by gel electrophoresis in a 10% acrylamide/bis-acrylamide gel. After electrophoresis, gels were stained with Coomassie blue (to verify equivalent loading), dried, and exposed with Kodak film X OMAT-RA at -80°C for 3-5 days.

Western blot of annexin-1. Neutrophils (200 μ l of a 10×10^6 cells/mL) were incubated in RPMI 1640-HEPES-penicillin-streptomycin supplemented with 10% autologous serum for 24h at 37°C with buffer, AT (5 μ M), GM-CSF (65 ng/mL), dexamethasone (1 μ M) or cycloheximide (10 μ g/mL). Cells were harvested, centrifuged and cellular debris were discarded. An equivalent volume of 2x Laemmli sample buffer was added to the supernatant. An equivalent of 15 μ l of the supernatant was loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA). Nonspecific sites were blocked with 2% skim milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween 20) overnight at 4°C. The mouse anti-annexin-1 antibody (1 μ g/mL) was added for 1 h at room temperature followed by washes with TBS-Tween. The membrane was then incubated with a HRP-labeled goat anti-mouse secondary antibody at 1:10,000 dilution in TBS-Tween + 1% nonfat dry milk for 45 min at room temperature followed by washes. The annexin-1 protein was revealed as above and quantified using a Fluor-S MultiImager (Bio-Rad) and the Multi-Analyst version 1.1 program (Bio-Rad).

RESULTS

AT induces apoptosis in human neutrophils by a caspase-dependent mechanism. As illustrated in Fig. 1A, AT induced neutrophil apoptosis in a concentration-dependent fashion (1-20 μM) based on CD16 shedding, an event known to occur during neutrophil apoptosis^{24,25}. The pro-apoptotic effect of AT was further confirmed by cytology (Fig. 1B) and by monitoring degradation of the cytoskeletal protein gelsolin (Fig. 1C), an event known to occur by a caspase-3-like-dependent mechanism^{20,31}. Of note, even if cell necrosis never exceeded 10% following AT treatment with the highest dose, the concentration of 5 μM was selected for the rest of this study, since it induced apoptosis in at least 70% of cells with virtually no necrosis (*data not shown*). We next investigated the potential role of caspases in AT-induced cells. As illustrated in Fig. 1D, addition of the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk (z-VAD) reversed the AT-induced degradation of gelsolin. The apoptotic state of these cells was confirmed in parallel by CD16 shedding (*data not shown*). As illustrated in Fig. 1E, addition of z-VAD inhibited the typical morphological aspect of apoptotic neutrophils induced by AT.

AT induces neutrophil apoptosis by a mechanism independent of NADPH activation. Because AT is known to induce ROS production in a variety of cells^{2,9,14} but has never been studied in neutrophils, and since ROS are involved in AT-induced cell apoptosis^{14,18}, we investigated the potential of AT to induce O_2^- in human neutrophils. Unexpectedly, we found that AT, at a concentration of 1, 5, 10 or 20 μM , did not increase O_2^- production after 5-30 min (Fig. 2A). For simplicity, only the results obtained after 15 min of treatment are illustrated. However, cells were responsive, since, as expected²⁷, PMA

significantly increased O_2^- production. In addition, we investigated potential mitochondrial ROS production by flow cytometry using the DHR123 probe in AT-induced neutrophil cells. As illustrated in Fig. 2B, AT, in contrast with the positive control PMA, did not induce ROS production. For simplicity, we illustrated results obtained only after 15 min of stimulation with AT (1-20 μ M), but similar results were obtained after 30, 45, and 60 min (*data not shown*). Interestingly, addition of AT in these experiments did not inhibit the ability of PMA to induce ROS. Although we present data with PMA + AT5, similar results were obtained with all concentrations of AT studied and for the same time-courses (*data not shown*).

To further support the observation that AT does not induce O_2^- production via NADPH activation, we verified the response for up to 24h. O_2^- production was never increased in four different experiments (*data not shown*). These results suggest that ROS generated via NADPH activation are not involved in AT-induced apoptosis. To further support this observation, we next investigated if AT induced apoptosis in human X-CGD cells³² that do not generate ROS via NADPH since they are deficient in gp91^{phox}. As illustrated in Fig. 3, AT induced apoptosis at same potency in both WT PLB-985 and X-CGD (or PLB-985 KO) cells, confirming the hypothesis that generation of ROS via NADPH activation is not involved in AT-induced apoptosis.

AT induces de novo protein synthesis in neutrophils. In order to elucidate the mode of action of AT, and because AT did not increase O_2^- production via NADPH activation or via mitochondria, we next investigated the possibility that this drug inhibited de novo

protein synthesis, an event that we have observed when the plant lectin VAA-I induces neutrophil apoptosis^{20,21}. Unexpectedly, we found that AT is a potent inducer of de novo protein synthesis in neutrophils (Fig. 4A). Despite the fact that an equivalent number of proteins was loaded, as judged by Coomassie blue staining, treatment of cells with the protein synthesis inhibitor CHX completely inhibited de novo protein synthesis. When freshly isolated cells were loaded in parallel, virtually no newly synthesized polypeptide was observed despite the fact that an equivalent amount of proteins was loaded as visualized by Coomassie blue staining. Because several newly synthesized polypeptides were observed in response to AT treatment, we then performed two-dimensional gel electrophoresis in order to get a more detailed analysis of its effect. As illustrated in Fig. 4B, AT induced de novo protein synthesis of numerous polypeptides, as compared to control cells which synthesize some proteins when isolated and cultivated in vitro for more than 18h^{21,26}. Interestingly, the profile of newly synthesized proteins induced by AT was different from the one induced by GM-CSF, a cytokine known to delay neutrophil apoptosis and to induce de novo protein synthesis^{21,23,26}. This attests to the complexity of the mode of action of AT and indicates that the proteins involved in induction of apoptosis are distinct from those involved in delay of neutrophil apoptosis. Next, we decided to answer whether or not CHX treatment inhibited the effect of AT. As illustrated in Fig. 5A, the ability of AT to induce de novo protein synthesis was markedly inhibited by CHX treatment, confirming the specificity of our assay. Moreover, as illustrated in Fig. 5B, addition of CHX in AT-induced neutrophils was found to reverse induction of apoptosis as assessed by monitoring CD16 shedding and cytology (*data not shown*). This

indicates that among the newly synthesized polypeptides induced by AT, some are involved in induction of neutrophil apoptosis.

AT induces de novo protein synthesis of annexin-1 in neutrophils. To elucidate the mode of action of AT, we decided to initiate identification of some proteins modulated by this drug. We selected one spot tentatively identified as actin as an internal control and another unknown spot to be identified. The peptide sequences of the first spot were:

-AVFPSIVGR; -GYSFTTTAER and -SYELPDGQVITIGNER (with a Mascot score of 93), revealing that this protein is effectively actin (3907622-NCBI) (asterisk in Fig. 6A). The other spot (arrow) was randomly selected, but was chosen because its synthesis was reproducibly increased in response to AT treatment. The spot was identified as annexin-1 (442631-NCBI) and the peptide sequences were: -ALYEAGER; -TPAQFDADELRL and -SEDFGVNEDLADSDAR (with a Mascot score of 177). The molecular mass of the spot was ~30 kDa instead of ~38 kDa, or the ~32 kDa cleaved form reported in the literature³³⁻³⁵, with an isoelectric point of ~5. As illustrated, the densitometric analysis revealed that the intensity of actin was slightly decreased with treatment of AT (0.8 ± 0.04 , mean \pm SEM, n=4) when compared with control cells (spontaneous apoptosis). The densitometric analysis demonstrated that AT significantly increased de novo protein of ANXA1 by a factor of 4.7 ± 0.8 , whereas the synthesis of actin was slightly decreased when compared to control cells.

Because the de novo protein synthesis of annexin-1 (ANXA1) has never been reported in metabolically labeled-neutrophils, we next studied its intracellular synthesis in response

to AT or different neutrophil agonists known to modulate the apoptotic rate by immunoprecipitation. Dexamethasone (Dex) was selected, based on the fact that ANXA1 is well-recognized as a glucocorticoid-inducible protein^{34,36}. As illustrated in Fig. 6B, there is a basal level of ANXA1 synthesis in the cytosol of cells undergoing spontaneous apoptosis and AT further increases this synthesis. Of note, 4 bands (denoted a, b, c, and d, in the figure) of molecular masses ranging from ~28-38 kDa were detected. However, we found that both GM-CSF and Dex, two anti-apoptotic agents in neutrophils, also increased de novo synthesis of ANXA1, suggesting that newly synthesized ANXA1 is not involved in AT-induced neutrophil apoptosis. Using the same approach, we failed to detect metabolically-labeled (radioactive) ANXA1 in the extracellular milieu when neutrophils were treated with AT (n=4, *data not shown*).

Because of the above results suggesting that de novo synthesized ANXA is not involved in AT-induced neutrophil apoptosis, we next decided to monitor ANXA1 expression in the external milieu from non-metabolically-labeled AT-induced cells, by western blot, since addition of recombinant human ANXA1 in cultures was previously found to induce neutrophil apoptosis³⁷. As illustrated in Fig. 7A, ANXA1 was barely detected in the external milieu from cell undergoing spontaneous apoptosis (20h-aged), whereas its expression was increased following induction of apoptosis by AT (see arrows in the figure). Interestingly, the levels of expression of ANXA1 remained similar whether cells were incubated with AT alone or in the presence of the protein inhibitor CHX, demonstrating that this release of ANXA1 originates from the pre-existing pool and not via the newly synthesized one. Equivalent loading was verified by monitoring the

presence of plasma gelsolin (bottom panel) as well as by staining the membranes at the end of experiments (*data not shown*). In contrast with intracellular gelsolin, the anti-gelsolin antibody reacts only with a ~80 kDa fragment of plasma gelsolin and not with the p47 fragment (Fig. 1C and Fig. 1D). We next investigated the ANXA1 expression when neutrophil apoptosis was delayed or suppressed by GM-CSF or Dex, expecting to observe a decrease of ANXA1 with GM-CSF and Dex, when compared with control (spontaneous apoptosis). Unexpectedly, treatment with GM-CSF or Dex did not modulate the release of pre-existing ANXA1 differently than control cells (Fig. 7B). Although ANXA1 is barely detectable in the results we illustrated, its intensity varied slightly among donors. The densitometric analysis performed from 4 different experiments clearly illustrated that there was no significant difference among the conditions, except for treatment with AT, where a significant increase of ANXA1 expression was noted after 20h. This suggests that the release of pre-existing ANXA1 observed after AT treatment is not involved in AT-induced neutrophil apoptosis.

DISCUSSION

In this study, we established for the first time that AT was a potent inducer of human neutrophil apoptosis. This was confirmed by cytometry by monitoring CD16 shedding on neutrophil cell surface and by cytology. In addition, the apoptotic state of the cells was confirmed by the ability of AT to induce the degradation of the cytoskeletal protein gelsolin, an event known to occur via activation of caspases^{20,21,31}. We have also demonstrated that AT induced neutrophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism, since addition of the pan caspase inhibitor was found to reverse the morphological changes typical of apoptotic neutrophils, as well as the degradation of gelsolin. These results concur with those published in several reports, attributing a role of caspases in AT-induced cell apoptosis^{2,5,15,17}. With the present results, this role can also be attributed to neutrophils. Although several studies have reported that AT induced ROS production, we demonstrated herein that AT did not induce O₂⁻ production in neutrophils, as assessed by the classical colorimetric assay based on the reduction of ferrocytochrome *c*. Interestingly, using a flow cytometric approach (DHR123) used to measure the mitochondrial ROS production^{28,29}, we also demonstrated that AT did not produce ROS. Therefore, our results imply that mitochondria are not involved in AT-induced neutrophil apoptosis or, at least, they are not involved via ROS generation. Interestingly, it was reported recently that treatment of 4 μM AT inhibited the release of cytochrome *c* from isolated mitochondria¹⁹. In our present study, co-incubation of PMA with 5 μM AT did not decrease ROS production induced by PMA, limiting the role of ROS production through mitochondria in AT-induced neutrophil apoptosis. In order to eliminate the potential involvement of ROS production through NADPH activation, the major route for

production of ROS in neutrophils, we investigated the ability of AT to induce apoptosis in the human promyelocytic PLB-985 cell line deficient in $gp91^{phox}$. This cell line mimics the X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD) a disease characterized by recurrent infections, since neutrophils from these patients cannot generate ROS because of absence of NADPH activation³². AT induced apoptosis in these cells at the same potency as in the wild type. Thus, AT induced apoptosis by a mechanism that is independent of ROS generation through NADPH activation. However, this does not rule out the possibility that ROS, generate by other route(s), are somewhat involved in AT-induced neutrophil apoptosis.

Neutrophils are mature non-dividing cells known to spontaneously undergo apoptosis without any apparent stimulation^{38,39}. In these cells, 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) are not detected^{38,39}. Moreover, the antiapoptotic Bcl-2 and caspases-2 proteins are absent in neutrophils and the release of cytochrome *c* in the cytosol is not evident. These cells are known to possess few mitochondria (^{39,40}). However, it was recently suggested that neutrophils contain barely detectable levels of cytochrome *c* as well as other mitochondrial proteins⁴¹. Moreover, it was demonstrated that these cells have a lowered threshold requirement for cytochrome *c* in the apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1)-dependent cell death pathway, and that low levels of cytochrome *c* are retained for induction of apoptosis rather than for mitochondrial respiration⁴¹. This latter observation is in agreement with our data, which indicate that AT

does not generate mitochondrial ROS production. Also, in preliminary experiments using MitoTracker GreenFM dye in immunofluorescence assays, we failed to detect any significant differences of mitochondrial structure in AT-induced neutrophils when compared with control cells (*data not shown*).

Knowing that several agents, such as GM-CSF, IL-4, IL-15, heme, fibronectin and sodium butyrate, which suppress or delay human neutrophil apoptosis, require de novo protein synthesis^{26,30,42-44}, and that we have recently documented that, inversely, the anticancer agent VAA-I, an inhibitor of protein synthesis, induces neutrophil apoptosis^{20,21}, the results of our present study are paradoxical, since AT simultaneously induced de novo protein synthesis and apoptosis. The role of de novo protein synthesis in AT-induced neutrophil apoptosis is supported by the fact that treatment of cells with CHX partially reversed AT-induced CD16 shedding (**Fig. 5B**) and apoptosis as assessed by cytology (*data not shown*). Interestingly, the profiles of the newly synthesized polypeptides observed in response to GM-CSF or AT are quite different, indicating that distinct sets of proteins are involved in either delay of neutrophil apoptosis or induction of apoptosis by various agents. Clearly, as judged by the results obtained following 2D-SDS-PAGE, the mode of action of AT is complex, since numerous proteins are synthesized. Among the proteins we identified, annexin-1 or ANXA1, was newly synthesized in response to AT treatment. Although few studies have reported de novo synthesis of ANXA1, there was no previous evidence until now to support de novo synthesis of ANXA1 at the polypeptide level in human neutrophils. ANXA1 is known to possess powerful anti-inflammatory activities that are largely due to its ability to inhibit

cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂), which plays a key role in the production of the potent inflammatory mediators prostaglandins and leukotrienes³⁶. ANXA1 is expressed in large amounts in the cytosol of human neutrophils, where a large proportion is localized in the cytoplasmic (gelatinase) granules³⁶. Of note, ANXA1 does not possess a signal peptide and is therefore not exported through the classical secretory pathway, but rather is externalized from the cells to the cell surface via exocytosis. Herein, we demonstrated that AT increased de novo synthesis of ANXA1 in the cytosol. Interestingly, four polypeptides were detected by immunoprecipitation with the anti-ANXA1 antibody. This suggests that newly synthesized ANXA1 is cleaved over time. Cleavage of the ~38 kDa form of ANXA1 to a 32 kDa form has been reported in several studies, and these appear to be the two classical forms. However, other studies, not necessarily performed in neutrophils, have reported different ANXA1 polypeptides of 31, 33, 36, 37, 38 kDa and also a form of ~50 kDa. Moreover, different spots of ANXA1 have been observed in 2D-SDS-PAGE in fragile X syndrome harboring pI in the range of 5-7⁴⁵. The spot which we identified had a Mr of ~30 kDa with an unconventional pI of ~5.2. We speculate that this represents a fragment of native newly synthesized ANXA1. It is important to mention that we performed our experiments following 20-24h of culture. Of note, we detected the more conventional 38 kDa polypeptide by western blot and several fragments by immunoprecipitation. The lysis buffers differ when we perform 2D-SDS-PAGE vs 1D-SDS-PAGE. Several years ago, a study reported proteolysis of lipocortin (ancient terminology of ANXA1) with elastase generating more than 10 fragments ranging from 8-38 kDa⁴⁶. Nevertheless, the significant point is that this newly synthesized pool of ANXA1 was not released into the external milieu. In contrast, we found that AT

increased the release of pre-existing ANXA1 into the external milieu, and this was not inhibited by CHX. Furthermore, expression of ANXA1 in the external milieu did not vary, whether neutrophils underwent spontaneous apoptosis or if this process was delayed by GM-CSF or Dex. In addition to the fact that we did not observe necrotic cells by the trypan blue exclusion assay under any conditions, inhibiting cell death with GM-CSF and Dex further supports the notion that the released ANXA1 was not due to cell necrosis. One would imagine that ANXA1 expression would decrease in response to the two anti-apoptotic agents, but this was not the case. Knowing that exogenous addition of recombinant human ANXA1 to human neutrophils induced apoptosis after 6h³⁷, it is tempting to speculate that AT induced neutrophil apoptosis via the release of ANXA1. However, no one has reported this. We were unable, in four separate experiments, to induce neutrophil apoptosis by treating them with undiluted collected supernatants from 24h-aged or AT-induced neutrophils (François Binet, *unpublished observations*). Despite the above results, and even if ANXA1 is known to possess pro-apoptotic effect in neutrophils^{47,48}, we cannot conclude whether or not ANXA1 is involved in the ability of AT to induce neutrophil apoptosis. According to the several spots that were detected by 2D-SDS PAGE, we believe that it is probably the participation of several proteins that, at a particular threshold of expression, govern the neutrophil life-span.

We conclude that AT is a potent inducer of neutrophil apoptosis and that this may be responsible for the neutropenia reported in cancer patients treated with this drug. Its mode of action is certainly very complex and we provide evidence here that AT induces neutrophil apoptosis by a mechanism that is caspase-dependent, but independent of ROS

production via NADPH activation and mitochondria. We propose also that newly synthesized polypeptides are involved in AT-induced apoptosis, an identification of these proteins in future will shed light on the mode of action of AT. Finally, our results provide new information on the potential role of AT as an anti-inflammatory drug, based at least on its ability to increase ANXA1 production. The role of ANXA1 in inflammation was recently clearly established using ANXA1 KO mice; these mice exhibited an exaggerated response to pro-inflammatory stimuli and a partial or complete resistance to the anti-inflammatory effects of glucocorticoids^{49,50}.

ACKNOWLEDGEMENTS.

We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Arsenic trioxide induces apoptosis in human neutrophils via caspases. Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/mL) were incubated with buffer (Ctrl) or with arsenic trioxide (AT) at a concentration of 1 (AT1), 5 (AT5), 10 (AT10) or 20 μ M (AT20), for 17h and apoptosis was assessed by flow cytometry by monitoring CD16 shedding (A) or by cytology (B) as described in Materials and Methods. Results are from one representative experiment out of 4 (A) and are means \pm SEM (n=6) (B). A, arrows indicate the apoptotic cell population (CD16⁻) and the number within parenthesis represent the % of apoptotic cells. B, inset, typical results plotted in the bar graph. *, $p < 0.05$ by ANOVA. Panels C-D, cells were incubated as above but in the presence or absence (Ctrl) of the pan caspase inhibitor z-VAD-FMK (z-VAD). Cell lysates were prepared and the detection of gelsolin was performed by western blot (C and D) and apoptosis was evaluated by cytology (E). Results are from one representative experiment out of at least 5 V, VAA-I; GM, GM-CSF; p47, a fragment of 47 kDa known to be recognized by the anti-gelsolin antibody^{20,21}.

Figure 2. *AT does not induce superoxide production and other reactive oxygen species in neutrophils.* Cells were isolated and incubated in the presence of an increasing concentration of AT (1-20 μ M), with PMA (used as a positive control) or with buffer (Ctrl), and superoxide production (O_2^-) (A) and ROS generation (B) were assessed by a colorimetric reaction and flow cytometry, respectively, as described in Materials and Methods. A, results are means \pm SEM (n=5). B, two separate experiments (exp #1 and exp #2) were performed. Arrows indicated the production of ROS induced by PMA (shift of the fluorescence to the right). *, $p < 0.05$ by ANOVA.

Figure 3. *AT induces apoptosis in PLB-985 and X-CGD cells.* Human promyelocytic wild type (WT) and gp91^{phox} deficient (KO) PLB-985 cells were cultivated and treated with AT for 6 days (Panels A-C) as described in Materials and Methods, at a concentration of 5 μ M. Apoptosis was evaluated by flow cytometry by measuring the number of FITC-annexin-V positive cells (A) or by cytology following Hema-Stain (B) or Hoechst staining (C). Results are from one representative experiment out of n \geq 6. A, arrows indicate the population of FITC-annexin-V positive cells. D, cells were incubated for 24h in the presence of the indicated concentration of AT and apoptosis was assessed by cytology following Hoechst staining. Results are from one representative experiment out of 4.

Figure 4. *AT induces de novo protein synthesis in human neutrophils.* Freshly isolated human neutrophils were metabolically labeled with 125 μ Ci of the Redivue Pro-Mix L- $[^{35}\text{S}]$ *in vitro* cell labeling mix and incubated with buffer (Ctrl), 65 ng/mL GM-CSF (GM), 5 μ M AT, 10 μ g/mL CHX for 22h and cell lysates were prepared for 1D and 2D SDS-PAGE, accordingly, as described in Materials and Methods. A, the left part is the corresponding Coomassie blue stained gel of the autoradiograph illustrated in the right part. Note the increased intensity of several bands (newly synthesized polypeptides) when neutrophils were treated with AT when compared to buffer or the protein inhibitor CHX, despite the fact that equivalent amount of proteins were loaded (Coomassie blue). Results are from one representative experiment out of 4. B, Representative results obtained in one experiment out of 3, after running 2D SDS-PAGE. Note the intensity of several different spots representing each a newly synthesized polypeptide. F, freshly isolated cells that have not been incubated.

Figure 5. *Role of protein synthesis in AT-induced neutrophil apoptosis.* A, cells were metabolically labeled as in legend of Figure 5 and CHX was added with AT (5 μ M) in order to inhibit AT-induced de novo protein synthesis. Results are from one representative experiment out of 3. B, Cells were pre-incubated for 30 min with CHX at 1, 2, or 5 μ g/mL and then incubated with 5 μ M AT. Apoptosis was evaluated by monitoring CD16 cell surface expression by flow cytometry as described in Materials and Methods. Note that CHX treatment reversed the ability of AT to induce neutrophil apoptosis. Numbers within parentheses are the percentage of apoptotic cells. Results are from one representative experiment out of 4.

Figure 6. Arsenic trioxide induces de novo protein synthesis of annexin-1 in human neutrophils. A, freshly isolated human neutrophils were incubated for 22h with buffer (Ctrl or spontaneous apoptosis) or with 5 μ M of the pro-apoptotic drug arsenic trioxide (As₂O₃ or AT) in the presence of 125 μ Ci of the Redivue Pro-Mix L-[³⁵S] in vitro cell labeling mix, and 2D-SDS-PAGE and identification of annexin-1 (arrow) was performed as detailed in Materials and Methods. *, actin; box, a group of unidentified polypeptides newly synthesized in response to AT. The densitometric analysis (right part of the figure) was performed as described in Materials and Methods. B, immunoprecipitation was performed with the anti-ANXA1 antibody using metabolically-labeled cell lysates, in order to monitor de novo synthesis of ANXA1 in response to buffer (Ctrl), the anti-apoptotic agents GM-CSF (GM) and dexamethasone (Dex), the pro-apoptotic agents arsenic trioxide (AT5) and VAA-I (VA), or the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). The letters a, b, c, and d illustrate four fragments of ANXA1 of about 38, 33, 30 and 28 kDa, respectively. Results are from one representative experiment out of 4.

Figure 7. Arsenic trioxide (AT) induces the release of pre-existing ANXA1. A. Freshly isolated neutrophils were incubated for the indicated period of times with buffer (Ctrl), AT5 in the presence or absence of cycloheximide (CHX) and the supernatants were harvested as described in Materials and Methods in order to detect the presence of ANXA1 (arrows) by western blot. In parallel, the plasma gelsolin was monitor in order to verify protein loading. Note that treatment with CHX did not alter ANXA1 release. Results are from one representative experiment out of 4. B, Cells were treated as above in the presence of buffer GM-CSF, AT or dexamethasone (Dex) and the release of ANXA1 was assessed by western blot as well as the level of expression of plasma gelsolin. Results are from one representative experiment out of 4. Bottom, results of the densitometric analysis indicating that AT significantly induced the release of ANXA1. Results are means \pm SEM (n=4).

FIGURE 1

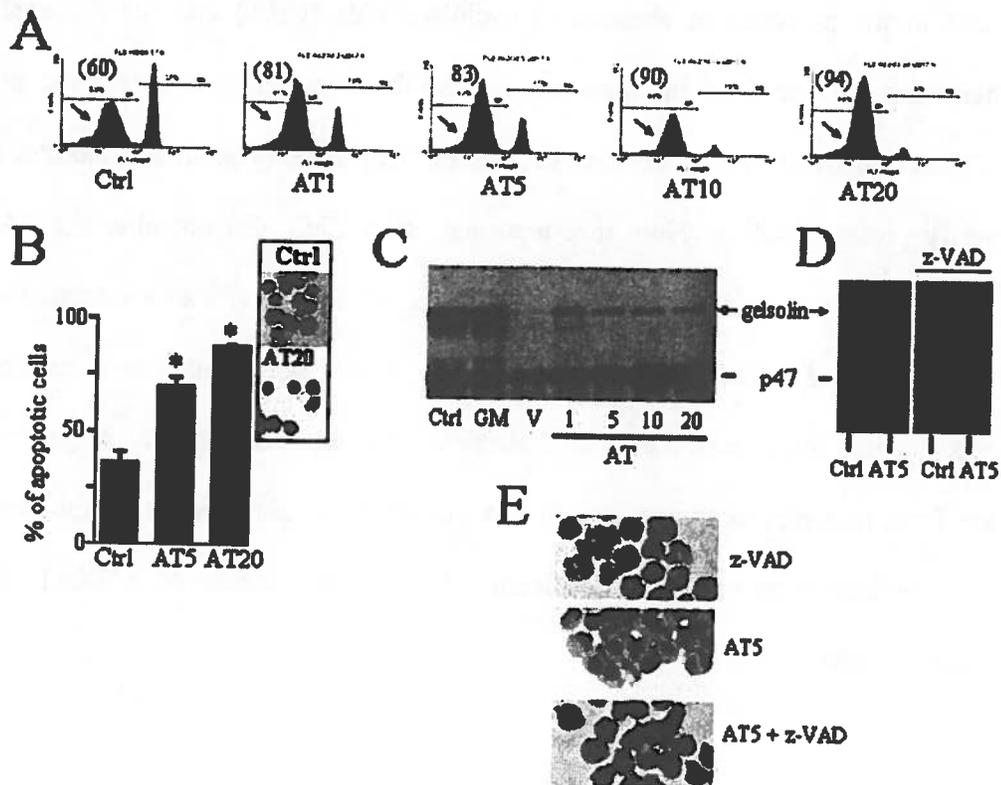


FIGURE 2

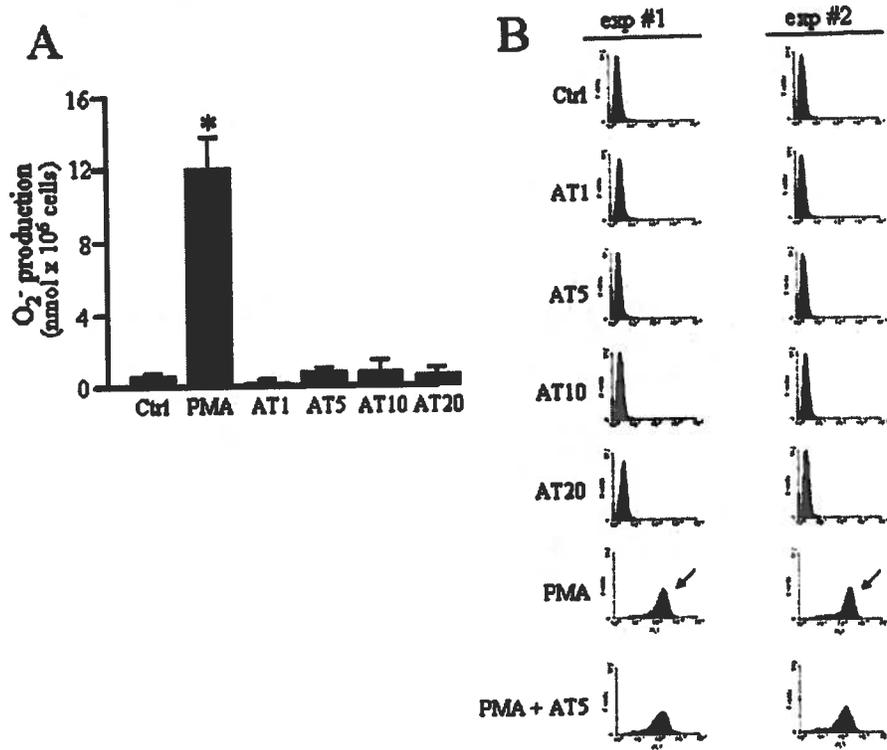


FIGURE 3

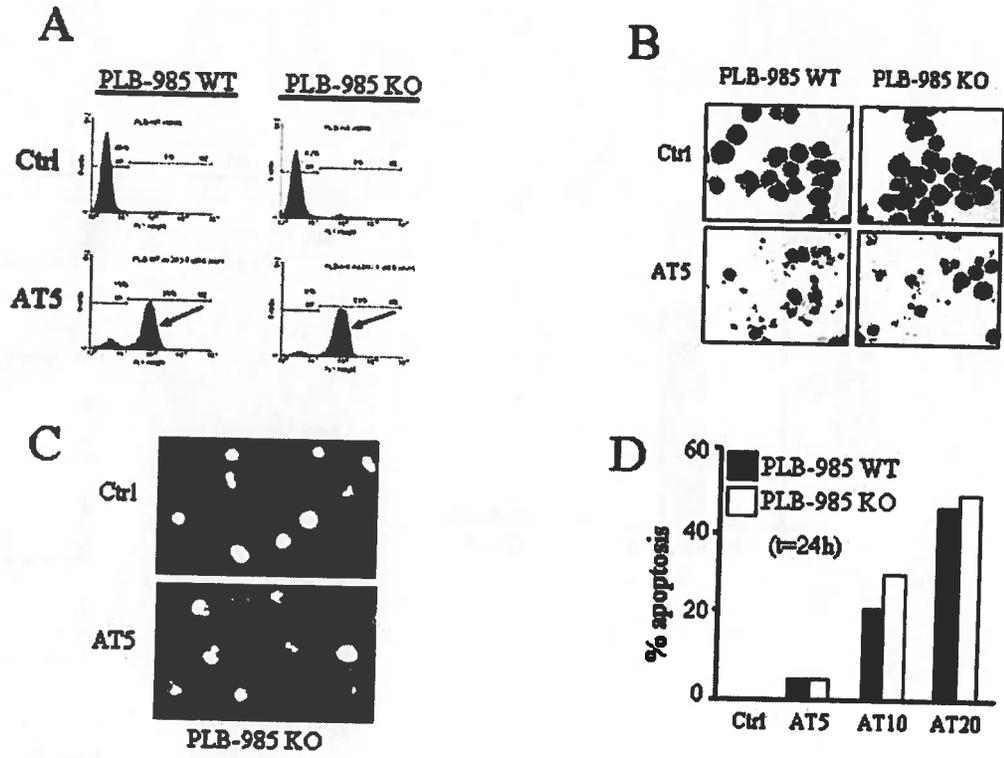


FIGURE 4

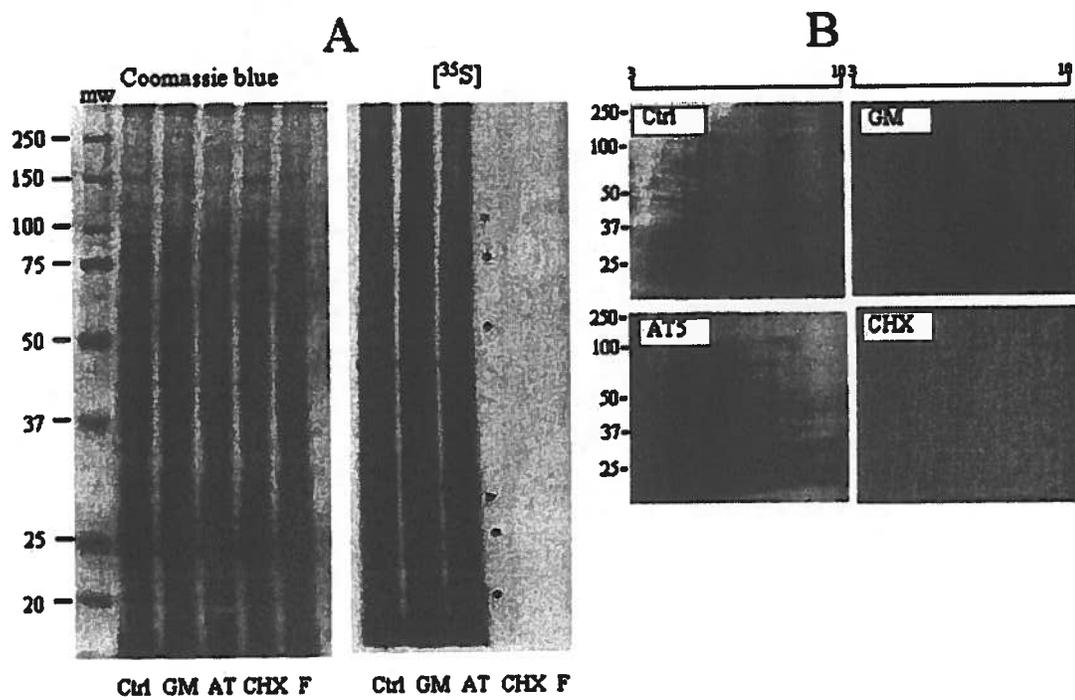


FIGURE 5

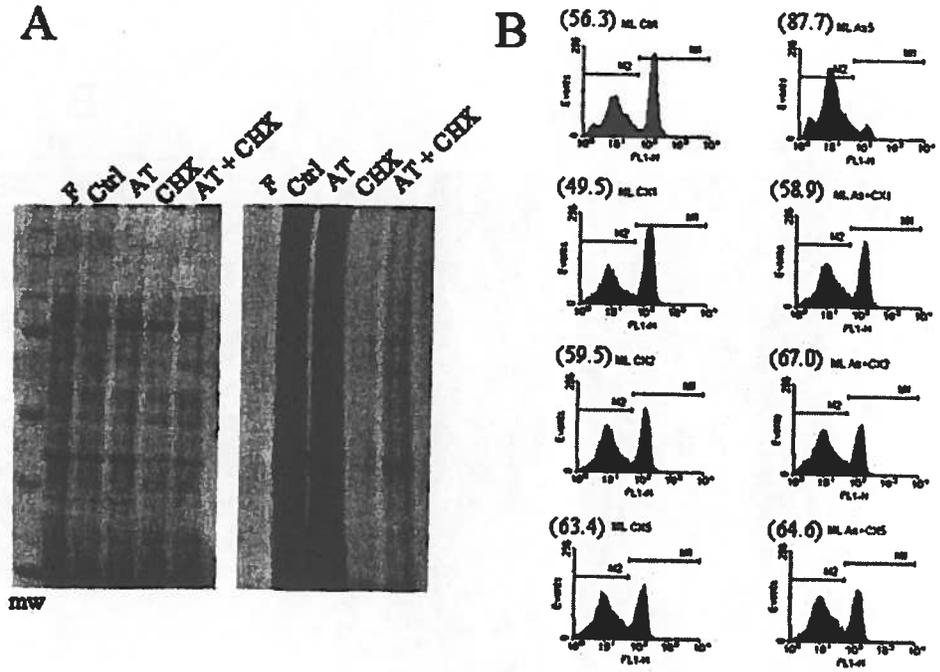


FIGURE 7

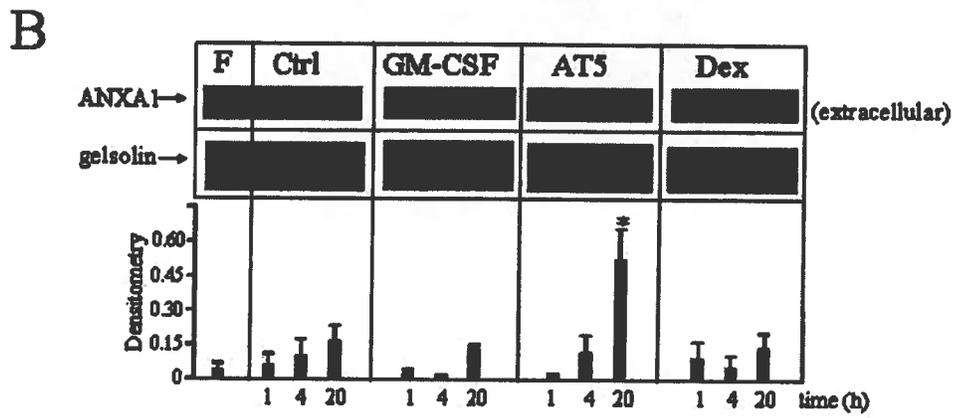
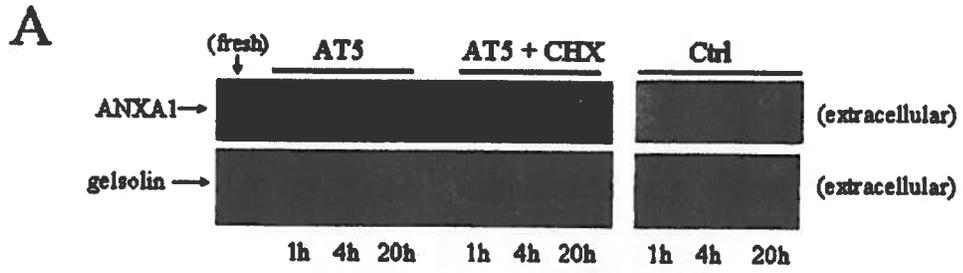
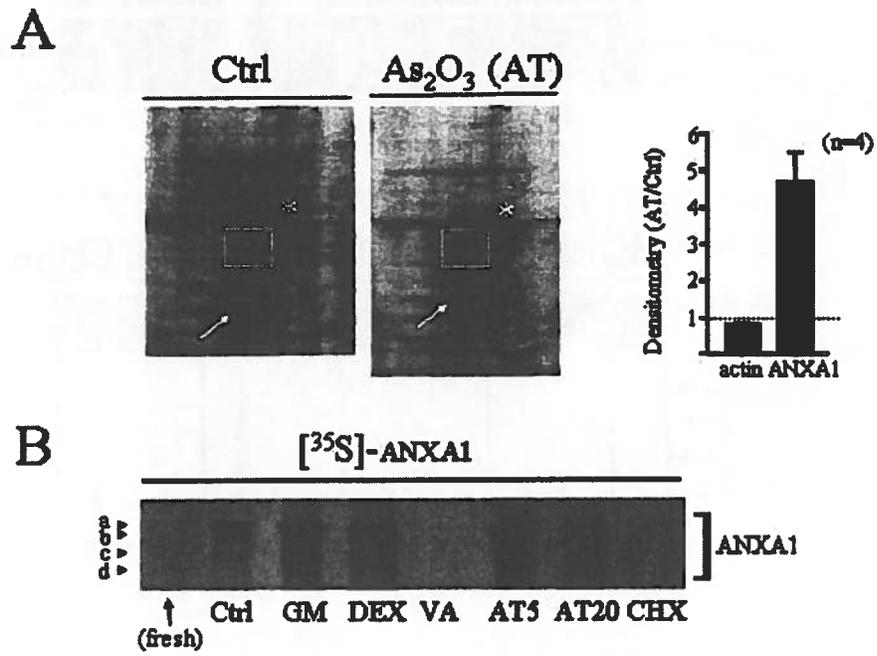


FIGURE 6



REFERENCES

1. Wang HY, Liu SX, Zhang M. Gene expression profile changes in NB4 cells induced by arsenic trioxide. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24: 646-650.
2. Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 2002; 62: 3893-3903.
3. Sturlan S, Baumgartner M, Roth E, Bachleitner-Hofmann T. Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells. *Blood.* 2003; 101: 4990-4997.
4. Korper S, Nolte F, Thiel E, Schrezenmeier H, Rojewski MT. The role of mitochondrial targeting in arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloid cell lines. *Br. J. Haematol.* 2004; 124: 186-189.
5. Zuo L, Li J, Yang Y, Wang X, Shen T, Xu CM, Zhang ZN. Sodium selenite induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia-derived NB4 cells by a caspase-3-dependent mechanism and a redox pathway different from that of arsenic trioxide. *Ann Hematol.* 2004 Oct 6 [Epub ahead of print]
6. Fernandez C, Ramos AM, Sancho P, Amran D, de Blas E, Aller P. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate may both potentiate and decrease the generation of

- apoptosis by the antileukemic agent arsenic trioxide in human promonocytic cells. Regulation by extracellular signal-regulated protein kinases and glutathione. *J Biol Chem.* 2004; 279: 3877-3884.
7. Rojewski MT, Baldus C, Knauf W, Thiel E, Schrezenmeier H. Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Br. J. Haematol.* 2002;116: 555-563.
8. Rousselot P, Labaume S, Marolleau JP, Larghero J, Noguera MH, Brouet JC, Fermand JP. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Res.* 1999; 59: 1041-1048.
9. Gupta S, Yel L, Kim D, Kim C, Chiplunkar S, Gollapudi S. Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2: 711-719.
10. Lisiewicz J. Immunotoxic and hematotoxic effects of occupational exposures. *Folia Med Cracov.* 1993; 34: 29-47.
11. Hussein MA, Saleh M, Ravandi F, Mason J, Rifkin RM, Ellison R. Phase 2 study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2004 ; 125: 470-476.

12. Munshi NC, Tricot G, Desikan R et al. Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2002; 16: 1835-1837.
13. Park IC, Park MJ, Woo SH et al. Tetraarsenic oxide induces apoptosis in U937 leukemic cells through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Int. J. Oncol.* 2003; 23: 943-948.
14. Woo SH, Park IC, Park MJ et al. Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells. *Int. J. Oncol.* 2002; 21: 57-63.
15. Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. *Cancer Invest.* 2004; 22: 389-400.
16. Sordet O, Liao Z, Liu H et al. Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2004;279: 33968-33975.
17. Li YM, Broome JD. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 1999; 59: 776-780.

18. Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Zeng Y. Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As₂O₃. *Int. J. Mol. Med.* 2003;11: 479-484.
19. Carre M, Carles G, Andre N et al. Involvement of microtubules and mitochondria in the antagonism of arsenic trioxide on paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 63: 1831-1842.
20. Lavastre V, Pelletier M, Saller R, Hostanska K, Girard D. Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J. Immunol.* 2002; 168: 1419-1427.
21. Savoie A, Lavastre V, Pelletier M, Hajto T, Hostanska K, Girard D. 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.* 2000; 68: 845-853.
22. Stringer RE, Hart CA, Edwards SW. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br. J. Haematol.* 1996; 92: 169-175.

23. Sakamoto C, Suzuki K, Hato F et al. Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway. *Int. J. Hematol.* 2003; 77: 60-70.
24. Moulding DA, Hart CA, Edwards SW. Regulation of neutrophil FcγRIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *J Leukoc Biol.* 1999; 65: 875-882.
25. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc γ RIII) expression. *J. Immunol.* 1994; 153: 1254-1263.
26. Girard D, Paquet ME, Paquin R, Beaulieu AD. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood.* 1996; 88: 3176-3184.
27. Pelletier M, Roberge CJ, Gauthier M, Vandal K, Tessier PA, Girard D. Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 2001; 70: 367-373.

28. Stocks SC, Ruchaud-Sparagano MH, Kerr MA, Grunert F, Haslett C, Dransfield I. CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 2924-2932.
29. Falcone FH, Rossi AG, Sharkey R, Brown AP, Pritchard DI, Maizels RM. *Ascaris suum*-derived products induce human neutrophil activation via a G protein-coupled receptor that interacts with the interleukin-8 receptor pathway. *Infect Immun.* 2001; 69: 4007-4018.
30. Bouchard A, Ratthe C, Girard D. Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 893-900.
31. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997; 278: 294-298.
32. Hiraoka W, Vazquez N, Nieves-Neira W, Chanock SJ, Pommier Y. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 1961-1968.

33. Rhee HJ, Kim GY, Huh JW, Kim SW, Na DS. Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 3220-3225.
34. Croxtall JD, Flower RJ. Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 3571-3575.
35. Solito E, de Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol.* 2001; 133: 217-228.
36. Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res.* 2004; 53: 125-132.
37. Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J.* 2003; 17: 1544-1546.
38. Sanghavi DM, Thelen M, Thornberry NA, Casciola-Rosen L, Rosen A. 1998. Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Lett.* 1998; 422: 179-184.

39. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001; 487: 318-322.
40. Simon HU. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences. *Immunol Rev.* 2001;179: 156-162.
41. Murphy BM, O'Neill AJ, Adrain C, Watson RW, Martin SJ. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 625-632.
42. Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graca-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol.* 2004; 173: 2023-2030.
43. Wagner C, Pioch M, Meyer C, Iking-Konert C, Andrassy K, Hansch GM. Differentiation of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic infections and chronic inflammatory diseases: evidence of prolonged life span and de novo synthesis of fibronectin. *J. Mol. Med.* 2000;78: 337-345.
44. Girard D, Paquin R, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J.* 1997; 325: 147-153.

45. Sun HT, Cohen S, Kaufmann WE. Annexin-1 is abnormally expressed in fragile X syndrome: two-dimensional electrophoresis study in lymphocytes. *Am J Med Genet.* 2001; 103: 81-90.
46. Huang KS, McGray P, Mattaliano RJ et al. Purification and characterization of proteolytic fragments of lipocortin I that inhibit phospholipase A2. *J Biol Chem.* 1987; 262: 7639-7645.
47. Perretti M, Solito E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32: 507-510.
48. Perretti M, Flower RJ. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J Leukoc Biol.* 2004; 76:25-29.
49. Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ et al. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{-/-} mouse. *FASEB J.* 2003;17: 253-255.
50. Roviezzo F, Getting SJ, Paul-Clark MJ, The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53: 541-553.

Discussion et conclusion

Les résultats obtenus à la suite de cette étude nous démontrent clairement, dans un premier temps, que l'AT est un agent qui induit l'apoptose des neutrophiles. En effet, les résultats obtenus par FACS, suite à la modulation d'un marqueur de surface (CD16) ou par observation de la morphologie nucléaire du neutrophile (cytologie) en viennent à cette même conclusion. Cette observation est en accord avec quelques expériences montrant l'effet pro-apoptotique de l'AT sur d'autres leucocytes tels que des cellules B plasmatisques (Rousselot *et al*, 1999 : 1041) ou des cellules T (Gupta *et al*, 2003 : 711). Également, il est intéressant de noter que, chez des patients atteints de myélomes multiples traités à l'AT, il y a apparition de neutropénies. Ensuite, il semble que l'induction d'apoptose générée par l'AT serait un phénomène caspase-dépendant. En effet, il a été observé que l'ajout d'un inhibiteur spécifique à ces protéases, le Z-VAD-fmk, renverse la dégradation d'une protéine du cytosquelette, la gelsoline. La dégradation des protéines du cytosquelette est un marqueur de l'activité des caspases. La plupart des études montrent que la mort cellulaire provoquée par l'AT passe par l'activation des caspases, ce qui implique l'activation des voies apoptotiques (Hayashi *et al*, 2002 : 851 ; Woo *et al*, 2002 : 57 ; Park *et al*, 2001 : 726). Cette drogue peut également engendrer une forme de nécrose, soit une mort cellulaire caspase-indépendante, chez certains types de cellules telles que les cellules cancéreuses cervicales. Ces voies impliqueraient la perte de perméabilité membranaire de la mitochondrie et la libération de cytochrome c mais sans activation subséquente des caspases (Kang *et al*, 2004 : 8960 ; Scholz *et al*, 2005 : 1904).

Ensuite, il a été observé que l'AT pouvait induire l'apoptose des cellules cancéreuses suite à la formation de ROS. Par exemple, chez des cellules APL, un ajout d'AT a provoqué une accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). De plus, l'ajout d'anti-oxydants comme le NAC ou la catalase a renversé l'apoptose des cellules APL (Woo *et al*, 2002 : 57), ce qui démontre l'importance des ROS dans l'effet de l'AT. En sachant que le H_2O_2 est généré par l'action de la SOD à partir d' O_2^- , la quantité d' O_2^- a d'abord été mesurée chez des neutrophiles incubés en présence d'AT. Les résultats obtenus dans cette expérience montrent qu'il n'y a pas eu de génération d' O_2^- par le

neutrophile stimulé avec de l'AT. Ces résultats ont été obtenus en utilisant une réaction colorimétrique (par réduction du cytochrome c en présence d'O₂⁻). La génération de ROS a ensuite été observé en utilisant le FACS (avec une sonde DHR123) afin de vérifier l'implication de la mitochondrie dans la formation de ROS. En effet, lorsque le potentiel membranaire de la mitochondrie (ψ_m) et de ce fait, la chaîne de transport des électrons est affectée par des agents chimiothérapeutiques il peut y avoir génération de ROS. Les résultats de cette expérience montrent qu'il n'y aurait pas de formation de ROS à partir de la mitochondrie. Cette observation propose que l'AT ne serait pas un agent directement mitochondriotoxique contrairement à certains modèles avancés (Kroemer et de Thé, 1999 : 743). De plus, ceci semble confirmer l'assertion selon laquelle les neutrophiles possèdent peu de mitochondries fonctionnelles. Aussi, les neutrophiles utiliseraient surtout la glycolyse comme source d'énergie et beaucoup moins la respiration mitochondriale selon cette proposition (Edwards, 1994 : 50). De ce fait, la quantité de ROS pouvant être générés par les mitochondries de neutrophile serait négligeable. Néanmoins, il a été montré que la flambée oxydative du neutrophile pouvait être compromise en utilisant un inhibiteur de l'ATPase mitochondriale, soit l'oligomycine, ce qui pourrait démontrer que cet organe serait en partie responsable de la formation de ROS chez le neutrophile (Fossati *et al*, 2003 : 1964).

L'implication de la NADPH oxydase dans le mécanisme d'action de l'AT a été investiguée à l'aide d'une seconde expérience (en plus de la réduction du cytochrome c). La NADPH oxydase est responsable de la réponse microbicide O₂-dépendante générée par les neutrophiles. Ainsi, la sensibilité à l'effet de l'AT a été testée, en parallèle, sur deux types de lignées cellulaires, soit une lignée PLB-985 *wild-type* et une lignée PLB-985 déficiente pour la sous-unité gp91phox de la NADPH oxydase. Il a été constaté que les deux lignées sont sensibles à l'effet de l'AT, ce qui tend à démontrer que la NADPH oxydase ne serait pas une cible obligatoire pour l'effet pro-apoptotique de l'AT chez le neutrophile. D'autres expériences ont pourtant démontré que l'AT pouvait cibler cette enzyme. Par exemple, chez une lignée cellulaire NIH3T3, l'administration d'un inhibiteur de la NADPH oxydase, le diphenylène iodonium (DPI), peut renverser l'effet de l'arsenite, le sel formé par l'AT (Chen, Lin-Shiau et Lin, 1998 : 324). Globalement, les

résultats obtenus semblent démontrer que l'AT ne provoque pas de génération de ROS. Par contre, il est connu que cet agent anti-cancéreux peut affecter une panoplie de protéines intracellulaires telles que des protéines structurales comme la tubuline (Li et Broome, 1999 : 776) dû à sa capacité à se lier aux groupements thiols. Il est donc fort probable que d'autres enzymes capables de détoxifier les ROS intracellulaires soient affectées. D'ailleurs, il a été reconnu que des cellules résistantes à l'AT contenaient une grande quantité de glutathion et qu'une déplétion de cette protéine antioxydante pouvait conférer une sensibilité à cet agent chimiothérapeutique (Davison *et al*, 2003 : 931). Également, il se pourrait que d'autres systèmes puissent former des ROS à l'intérieur du neutrophile. Par exemple, l'enzyme de détoxification, le cytochrome P450, plus particulièrement l'isoforme 2E1, pourrait former des ROS comme de l'OH⁻, lequel est connu pour induire des dommages aux tubules rénaux (Al-Ghamdi *et al*, 2004 : 103). Aussi, la réaction du CYP450 2E1 avec différents xénobiotiques pourrait former des composés nucléophiles très réactifs. Il est possible que l'AT puisse constituer l'un de ces xénobiotiques et que la formation de composés nucléophiles, ou tout simplement de ROS suite à la réaction avec le cytochrome P450, puisse être responsable de l'action pro-apoptotique de cet agent.

Afin de mieux saisir le mode d'action de l'AT sur l'apoptose du neutrophile, nous avons entrepris de dresser le patron électrophorétique des protéines synthétisées par le neutrophile. Les résultats obtenus démontrent que la synthèse protéique *de novo* est stimulée par l'AT. En effet, l'expression de plusieurs protéines est augmentée par rapport à l'apoptose spontanée ou retardée par la cytokine GM-CSF. Cette synthèse disparaît en présence d'un inhibiteur, la CHX et n'est pas observée au temps 0 (avec des neutrophiles non-stimulés). Cette observation est tout à fait nouvelle. En effet, il s'agit du premier cas relevé d'un agent pro-apoptotique capable de stimuler la synthèse *de novo* des neutrophiles. Il a été observé qu'un agent pro-apoptotique, la calprotectine, pouvait induire l'apoptose tout en stimulant la synthèse *de novo* mais cette expérience a été effectuée sur des cellules MM46 (Mikami, Yamazaki et Yui, 1998 : 211). En général, il est bien connu que les agents qui retardent l'apoptose des neutrophiles induisent la synthèse protéique. Cette synthèse peut être associée à une activation de la cellule au site

inflammatoire. Par exemple, il a été observé que le GM-CSF pouvait augmenter la synthèse de récepteurs CR, ce qui permet au neutrophile de prolonger son activité phagocytaire. La synthèse de certains facteurs anti-apoptotiques serait également augmentée en présence d'agents retardant l'apoptose. Par exemple, il a été démontré qu'il y avait induction de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 suite à une stimulation avec du GM-CSF (Moulding *et al*, 1998 : 2495) ou avec de l'IL-15 (Bouchard, Ratthé et Girard, 2004 : 893). À court terme (< 9h), le retard d'apoptose induit par le GM-CSF serait synthèse-indépendant mais à plus long terme (24h), celui-ci serait dépendant de la synthèse protéique (Sakamoto *et al*, 2003 : 60). Contrairement aux agents retardant l'apoptose des neutrophiles, des produits qui induisent l'apoptose des neutrophiles sont reconnus pour inhiber ou avoir peu d'effet sur la synthèse protéique. Par exemple, la VAA-I peut induire l'apoptose des neutrophiles et a pour effet d'inhiber la synthèse protéique. Il est donc particulier que l'AT puisse à la fois induire l'apoptose et induire l'expression de plusieurs protéines. En effet, il est généralement reconnu que l'apoptose est un phénomène qui ne requiert aucune synthèse protéique. Les facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bak et Bid) étant présent de façon constitutive en forte proportion par rapport aux facteurs anti-apoptotiques (Mcl-1, A1, Bcl-X_L) chez le neutrophile. Ces derniers auraient une demi-vie très courte. Ces facteurs anti-apoptotiques nécessiteraient donc d'être continuellement synthétisés pour que le neutrophile puisse persister dans la circulation. Ce modèle pourrait être inapplicable à certaines situations telles qu'en présence d'AT ou de complexes immuns. En effet, il a été reconnu que l'apoptose induite par des complexes immuns entraînait une forte augmentation (3x par rapport au témoin) de l'expression de Bax chez le neutrophile (Ottonello *et al*, 2002 : 125). Cette dernière expérience semble montrer que l'expression de protéines pro-apoptotiques pourrait être induite dans certaines situations. Il est donc possible que certaines protéines dont l'expression est augmentée par l'AT soient des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ensuite, l'incubation avec l'AT chez différents types cellulaires semble démontrer que plusieurs gènes, autres que ceux de la famille Bcl-2, sont induits en présence de cet agoniste. Parmi ceux possiblement retrouvés chez le neutrophile, il y aurait des gènes de cytoprotection. Ceux-ci permettraient la synthèse de protéines de stress telles que la protéine de choc thermique 70 (HSP70) dont l'ARNm est

augmenté chez des fibroblastes exposés à de l'AT (Burnichon *et al*, 2003 : 155). La synthèse d'ARNm pour des métallothionéines et de la glutathion S-transférase serait aussi stimulée par cet agent chimiothérapeutique (Beyersmann, 2002 : 63). Ensuite, l'effet stimulant de l'AT sur la synthèse protéique pourrait être indirect. En effet, il est généralement accepté que cet agent puisse induire la production de ROS. De plus, les ROS peuvent provoquer l'activation de la synthèse de plusieurs types de protéines dont les HSPs. En présence de certains types de ROS dont le H₂O₂, le ·OH ou les peroxy-nitrites (mais pas le O₂⁻ ou le NO·), il y aurait activation du facteur de choc thermique (HSF). Chez des cellules non-stressées, le HSF existe sous forme cytoplasmique, lequel ne peut se lier à l'ADN. Mais, lorsque activé, le HSF s'oligomérisse et est transporté vers le noyau où il peut s'attacher à l'ADN pour induire la transcription de protéines HSP (Polla *et al*, 1998 : 75). Il semblerait que l'incubation à long terme (de 6 à 16h) de cellules promonocytiques U-937 avec de l'H₂O₂ peut induire la synthèse *de novo* de HSP70 et 90 (Jacquier-Sarlin et Polla, 1996 : 187). Ainsi, l'augmentation de la synthèse *de novo* par l'AT pourrait être une conséquence de la formation de ROS.

Parmi la multitude de protéines dont l'expression semble augmenter en présence d'AT chez le neutrophile, une protéine a été choisie, étant donné sa modulation évidente (expression 5x fois supérieure en présence d'AT par rapport au témoin selon les résultats de densitométrie). Les résultats de spectrométrie de masse ont révélé qu'il s'agissait en fait d'annexine-1. Très peu d'expériences convaincantes ont démontré la synthèse *de novo* de l'annexine-1 chez le neutrophile. D'autre part, il s'agit du premier cas connu de synthèse d'annexine-1 à l'intérieur du processus d'apoptose. La synthèse *de novo* de l'annexine-1 chez le neutrophile a été déduite à la suite d'une hybridation *in situ* et non par marquage métabolique tel qu'utilisé dans cette expérience. Ainsi, il a été observé qu'une fois que le neutrophile a traversé la barrière endothéliale, soit après son extravasation, celui-ci synthétise de l'annexine-1. Le contact avec la matrice extracellulaire serait l'évènement responsable de cette synthèse protéique (Oliani *et al*, 2001 : 603). Le rôle exact de cette synthèse est inconnu. Néanmoins, l'annexine-1 est connue pour son action anti-inflammatoire, notamment à l'intérieur du mode d'action des glucocorticoïdes (Solito, 1991 : 238). L'ajout de cette protéine peut aussi entraîner le détachement des

leucocytes de l'endothélium dans un contexte inflammatoire (Lim *et al*, 1998 : 14535). Ainsi, cette protéine pourrait agir à l'intérieur d'un mécanisme de rétro-inhibition agissant sur la diapédèse du neutrophile et empêchant l'exacerbation de l'inflammation causée par un recrutement excessif de neutrophile au site inflammatoire. Cette hypothèse est corroborée par l'observation, chez les souris *Anx^{-/-}*, d'une augmentation notable de la migration des leucocytes lors d'une inflammation stimulée par le zymosan (Roviezzo *et al*, 2002 : 541). Ensuite, il est important de mentionner qu'une augmentation de l'induction du gène de l'annexine-1 a été notée chez des cellules A549 et HeLa exposées à divers stress cellulaires. Par exemple, la production d'ARNm pour l'annexine-1 serait favorisée suite à un traitement à la chaleur (*heat shock*), avec de l'H₂O₂ ou en présence d'arsenite de sodium. Ainsi, il a été proposé que l'annexine-1 pourrait avoir une fonction de protéine de stress au même titre que les HSPs. Cette hypothèse est confirmée par la présence d'éléments de choc thermique (HSE) consistant en quatre répétitions inversées d'éléments à cinq paires de bases, nGAAn, dans le promoteur du gène d'annexine-1 (Rhee *et al*, 2000 : 3220). Dans ce cas-ci, il serait donc possible que le neutrophile produise de l'annexine-1 à titre de protéine chaperone (de protection) en réaction à un stress, en l'occurrence, l'AT.

La synthèse *de novo* de l'annexine-1 en présence d'AT chez le neutrophile a été confirmée par immunoprécipitation de protéines marquées au ³⁵S. Cette expérience a également permis de constater que cette protéine pouvait être produite en présence d'agents anti-apoptotiques comme la dexaméthasone ou le GM-CSF. La synthèse *de novo* de l'annexine-1 en présence de dexaméthasone est connue, notamment chez les A549 (Solito *et al*, 1998 : 514). Ainsi, la synthèse d'annexine-1 observée en présence de dexaméthasone et de GM-CSF démontre que l'annexine-1 synthétisée *de novo* intracellulaire ne serait pas liée directement à l'induction d'apoptose du neutrophile. Toutefois, l'immunoprécipitation de l'annexine-1 intracellulaire montre qu'il existe plusieurs fragments de cette protéine à l'intérieur de la cellule. Il a été démontré que l'annexine-1 pouvait être clivée par plusieurs types d'enzymes comme la calpaïne (Liu, Fisher et Zimmerman, 1995 : 373), la cathepsine G (Ando *et al*, 1989 : 6948) ou une métalloprotéase membranaire (Movitz, Sjölin et Dahlgren, 1999 : 101). Ce clivage

pourrait former une protéine au bout N-terminal tronqué dont l'affinité envers le Ca^{2+} et la capacité de liaison aux membranes phospholipidiques seraient modifiées. De plus, il a été constaté que des fragments générés suite à une digestion *in vitro* avec l'élastase pouvaient conserver leur activité biologique, soit leur action inhibitrice envers la PLA₂ cytosolique (Huang *et al*, 1987 : 7639). À la lumière de ces faits, il est possible de croire que les fragments observés suite à l'immunoprécipitation de l'annexine-1 marquée au ³⁵S puissent être actifs dans le processus d'apoptose, étant donné leur modulation différente en présence d'AT (en particulier le fragment d). Également, des fragments différents pourraient être générés, de façon indirecte, dû à l'activation de caspases au cours de l'apoptose. En effet, les travaux de Debret *et al* ont démontré qu'une forme tronquée d'annexine-1 augmente en fonction du taux apoptotique. Cette forme tronquée serait absente dès qu'un inhibiteur des caspases, le z-VAD-fmk est ajouté au milieu de culture (Debret *et al*, 2003 : 195). Le clivage de l'annexine-1 ne pourrait être le produit de l'action directe d'une caspase, étant donné l'absence de site de reconnaissance de cette enzyme dans la séquence peptidique de l'annexine-1 (Wallner *et al*, 1986 : 77), mais plutôt le fruit d'une action indirecte (sur les calpaïnes par exemple).

Par la suite, le rôle extracellulaire de l'annexine-1 a été investigué. En effet, il a été observé qu'une application d'annexine-1 au milieu de culture de neutrophiles pouvait induire leur apoptose et ce, de façon dose-dépendante (Solito *et al*, 2003 : 1544). Ainsi, la libération d'annexine-1 dans le surnageant de neutrophiles incubés avec, entre autres, de l'AT a été explorée. Les résultats obtenus démontrent qu'il y aurait une forte augmentation de la libération d'annexine-1 en présence d'AT. De plus, l'addition de cycloheximide ne renverserait pas cette libération, ce qui démontre que l'annexine-1 libérée fait partie du lot de protéines pré-existantes. Cette annexine-1 extracellulaire pourrait agir de deux façons. Premièrement, elle pourrait ralentir la migration du neutrophile vers le site inflammatoire, tel que relevé par la baisse de L-sélectine suite à l'administration de dexaméthasone, un agent qui induit la synthèse d'annexine-1 (Strausbaugh et Rosen, 2001 : 6294). Aussi, celle-ci pourrait accélérer l'apoptose des neutrophiles au site inflammatoire. Certaines expériences ont démontré que l'annexine-1 serait un composant majeur permettant la reconnaissance des cellules apoptotiques

(Madera *et al*, 2005 : 3727). Ainsi, il est tout à fait logique que le neutrophile puisse sécréter de l'annexine-1 en présence d'AT. Il semblerait toutefois que l'annexine-1 synthétisée *de novo* n'aurait rien à voir avec le processus d'apoptose. Du coup, l'annexine-1 intracellulaire et extracellulaire pourraient avoir deux rôles bien différents, l'un intracellulaire et synthétisé *de novo*, étant majoritairement impliqué dans l'inhibition de PLA₂ cytosolique, et l'autre extracellulaire, préformée, ayant un rôle pro-apoptotique. Enfin, la présence d'annexine-1 dans le surnageant de neutrophiles pourrait être néfaste dans certaines situations. En effet, celle-ci peut constituer une source d'autoantigènes chez certains types de cancers du poumon (Brichory *et al*, 2001 : 9824) ainsi que dans certaines maladies autoimmunitaires comme le lupus érythémateux ou l'arthrite rhumatoïde (Goulding *et al*, 1989 : 843).

La relocalisation de l'annexine-1 vers le milieu extracellulaire a été confirmée par zymographie sur gélatine (voir figure 8 en annexe). Les résultats obtenus montrent qu'il y a présence d'une bande à 92 kDa, correspondant à la pro-MMP9. Celle-ci serait augmentée en présence d'AT. Il est connu que l'annexine-1 colocalise de façon intracellulaire et se retrouve à l'intérieur des granules de gélatinase chez les neutrophiles (Perretti *et al*, 2000 : 163). Puisque cette protéine ne possède pas de séquence signal, celle-ci doit emprunter une voie alternative pour être sécrétée. Cette voie serait, à la lumière des résultats obtenus à la figure 8 et des observations notées dans la littérature, via la dégranulation. Ainsi, la libération d'annexine-1 suite à une exposition à l'AT pourrait impliquer une augmentation de l'activité protéolytique dans le milieu extracellulaire des neutrophiles. Les conséquences de cette activité protéolytique pourraient être néfastes sur les tissus environnants dans le cas d'une administration *in vivo* d'AT aux patients atteints de myélomes multiples par exemple. Afin d'évaluer l'implication de l'annexine-1 extracellulaire dans l'induction d'apoptose des neutrophiles, l'activité pro-apoptotique du surnageant de neutrophiles incubés avec de l'AT a été analysée. Les résultats sont présentés à la figure 9 en annexe. Il est possible de constater que même à une concentration de 100% de surnageants (et donc contenant une quantité maximale d'annexine-1), il ne semble pas y avoir d'augmentation d'apoptose. Ceci va à l'encontre des résultats obtenus par Solito *et al* démontrant qu'une application exogène

d'annexine-1 pouvait induire l'apoptose des neutrophiles (Solito *et al*, 2003 : 1544). Bien que le neutrophile possède des récepteurs à l'annexine-1 (FPR et FPRL1) (Perretti, 2003 : 574), la cascade intracellulaire activée par la liaison à ces récepteurs est inconnue pour l'instant. Il est possible, dans ce cas-ci, que l'annexine-1 n'ait pas de rôle pro-apoptotique sur le neutrophile, mais ces résultats n'écartent pas la possibilité que celle-ci puisse agir comme une molécule de reconnaissance de cellules en apoptose. En effet, des études ont démontré que l'annexine-1 pouvait être importante dans l'élimination de cellules apoptotiques par des macrophages (Fan *et al*, 2004 : 2863; Arur *et al*, 2003 : 587).

Enfin, les éosinophiles sont des granulocytes qui possèdent, tout comme les neutrophiles, une très courte durée de vie dans le sang imputable à leur capacité de se diriger spontanément en apoptose. Par contre, la régulation de leur apoptose serait différente de celle des neutrophiles. Par exemple, il semblerait que les caspases 3 et 8 pourraient avoir un rôle mineur chez ce type de granulocyte (Simon, 2001 : 156). De plus, les éosinophiles montrent un patron électrophorétique de synthèse *de novo* très différent des neutrophiles comme en fait foi les gels 2D présentés à la figure 10 (annexe). Ces variations pourraient être à l'origine des effets divergents des glucocorticoïdes sur ces deux types de granulocytes. Ainsi, il serait très intéressant de comparer la synthèse protéique dans l'apoptose de l'éosinophile et du neutrophile notamment en présence d'AT. Cette expérience pourrait nous permettre de mieux comprendre l'implication de certaines voies apoptotiques dans le mode d'action de cet agent. En somme, l'effet pro-apoptotique de l'AT sur les neutrophiles humains pourrait expliquer l'apparition de neutropénies chez des patients atteints de myélomes multiples et traités à l'AT. Aussi, l'administration d'AT pourrait activer une boucle anti-inflammatoire via une synthèse *de novo* d'annexine-1 laquelle est reconnue pour sa capacité à inhiber la PLA₂ cytosolique.

Liste des références

Livres

EDWARDS, S.W. 1994. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. Cambridge : University Press, 319p.

JANEWAY, C.A., P.Travers, M. Walport et J.D. Capra. 1999. Immunobiology : the Immune System in Health and Disease, Fifth Edition. New York : Garland Publishing, 635p.

ROITT, I.M. : éditeur. 1992. Encyclopedia of Immunology. New York : Academic Press.

Articles

AL-GHAMDI, S. S., P. K. Chatterjee, M. J. Raftery, C. Thiemermann et M. M. Yaqoob. 2004. "Role of cytochrome P4502E1 activation in proximal tubular cell injury induced by hydrogen peroxide". Renal Failure, vol. 26, p. 103-10.

AL-SHAMI, A., W. Mahanna et P. H. Naccache. 1998. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 1058-63.

ALTZNAUER, F., S. Conus, A. Cavalli, G. Folkers et H. U. Simon. 2004. "Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 5947-57.

ALTZNAUER, F., S. Martinelli, S. Yousefi, C. Thurig, I. Schmid, E. M. Conway, M. H. Schoni, P. Vogt, C. Mueller, M. F. Fey, U. Zangemeister-Wittke et H. U. Simon. 2004. "Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils". Journal of Experimental Medicine, vol. 199, p. 1343-54.

ANDO, Y., S. Imamura, Y. M. Hong, M. K. Owada, T. Kakunaga et R. Kannagi. 1989. "Enhancement of calcium sensitivity of lipocortin I in phospholipid binding induced by limited proteolysis and phosphorylation at the amino terminus as analyzed by phospholipid affinity column chromatography". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 6948-55.

ARNHOLD, J. 2004. "Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase". Biochemistry, vol. 69, p. 4-9.

- ARUR, S., U. E. Uche, K. Rezaul, M. Fong, V. Scranton, A. E. Cowan, W. Mohler et D. K. Han. 2003. "Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment". Dev Cell, vol. 4, p. 587-98.
- BEAULIEU, A. D., F. Lang, M. Belles-Isles et P. Poubelle. 1987. "Protein biosynthetic activity of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory arthropathies. Increased synthesis and release of fibronectin". Journal of Rheumatology, vol. 14, p. 656-61.
- BEYERSMANN, D. 2002. "Effects of carcinogenic metals on gene expression". Toxicology Letters, vol. 127, p. 63-8.
- BLAYLOCK, M. G., B. H. Cuthbertson, H. F. Galley, N. R. Ferguson et N. R. Webster. 1998. "The effect of nitric oxide and peroxynitrite on apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes". Free Radical Biology and Medicine, vol. 25, p. 748-52.
- BORREGAARD, N. et J. B. Cowland. 1997. "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte". Blood, vol. 89, p. 3503-21.
- BOUCHARD, A., C. Ratthe et D. Girard. 2004. "Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8". Journal of Leukocyte Biology, vol. 75, p. 893-900.
- 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. 2920-4.
- BRICHORY, F. M., D. E. Misek, A. M. Yim, M. C. Krause, T. J. Giordano, D. G. Beer et S. M. Hanash. 2001. "An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, p. 9824-9.
- BROWN, S. B. et J. Savill. 1999. "Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes". Journal of Immunology, vol. 162, p. 480-5.
- BURNICHON, V., S. Jean, L. Bellon, M. Maraninchi, C. Bideau, T. Orsiere, A. Margotat, V. Gerolami, A. Botta et J. L. Berge-Lefranc. 2003. "Patterns of gene expressions induced by arsenic trioxide in cultured human fibroblasts". Toxicology Letters, vol. 143, p. 155-62.
- CHEN, Y. C., S. Y. Lin-Shiau et J. K. Lin. 1998. "Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis". Journal of Cellular Physiology, vol. 177, p. 324-33.

- CLINE, M. J. 1966. "Ribonucleic acid biosynthesis in human leukocytes. Effects of phagocytosis on RNA metabolism". Blood, vol. 28, p. 188-200.
- COESHOTT, C., C. Ohnemus, A. Pilyavskaya, S. Ross, M. Wiczorek, H. Kroona, A. H. Leimer et J. Cheronis. 1999. "Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 6261-6.
- 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. 2012-20.
- COX, G. 1995. "Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes". Journal of Immunology, vol. 154, p. 4719-25.
- COX, G. et R. C. Austin. 1997. "Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 224-30.
- CREAGH, E. M., H. Conroy et S. J. Martin. 2003. "Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity". Immunological Reviews, vol. 193, p. 10-21.
- DAIGLE, I. et H. U. Simon. 2001. "Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis". International Archives of Allergy and Immunology, vol. 126, p. 147-56.
- DAVISON, K., S. Cote, S. Mader et W. H. Miller. 2003. "Glutathione depletion overcomes resistance to arsenic trioxide in arsenic-resistant cell lines". Leukemia, vol. 17, p. 931-40.
- DE COUPADE, C., E. Solito et J. D. Levine. 2003. "Dexamethasone enhances interaction of endogenous annexin 1 with L-selectin and triggers shedding of L-selectin in the monocytic cell line U-937". British Journal of Pharmacology, vol. 140, p. 133-45.
- DEBRET, R., H. El Btaouri, L. Duca, I. Rahman, S. Radke, B. Haye, J. M. Sallenave et F. Antonicelli. 2003. "Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells". FEBS Letters, vol. 546, p. 195-202.
- DEL MASCHIO, A., A. Zanetti, M. Corada, Y. Rival, L. Ruco, M. G. Lampugnani et E. Dejana. 1996. "Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions". Journal of Cell Biology, vol. 135, p. 497-510.
- DELEO, F. R. 2004. "Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens". Apoptosis, vol. 9, p. 399-413.

- DEVERAUX, Q. L. et J. C. Reed. 1999. "IAP family proteins--suppressors of apoptosis". Genes and Development, vol. 13, p. 239-52.
- EDWARDS, S. W., M. Derouet, M. Howse et R. J. Moots. 2004. "Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1". Biochemical Society Transactions, vol. 32, p. 489-92.
- ELSBACH, P. 1998. "The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense". Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, p. 14-8.
- FAN, X., S. Krahling, D. Smith, P. Williamson et R. A. Schlegel. 2004. "Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes". Molecular Biology of the Cell, vol. 15, p. 2863-72.
- FAURSCHOU, M. et N. Borregaard. 2003. "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation". Microbes Infect, vol. 5, p. 1317-27.
- FECHO, K. et P. L. Cohen. 1998. "Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, p. 373-83.
- FERLAZZO, V., P. D'Agostino, S. Milano, R. Caruso, S. Feo, E. Cillari et L. Parente. 2003. "Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis". Int Immunopharmacol, vol. 3, p. 1363-9.
- FLOWER, R. J. 1988. "Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids". British Journal of Pharmacology, vol. 94, p. 987-1015.
- FOSSATI, G., D. A. Moulding, D. G. Spiller, R. J. Moots, M. R. White et S. W. Edwards. 2003. "The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis". Journal of Immunology, vol. 170, p. 1964-72.
- FOXMAN, E. F., E. J. Kunkel et E. C. Butcher. 1999. "Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation". Journal of Cell Biology, vol. 147, p. 577-88.
- GERKE, V., C. E. Creutz et S. E. Moss. 2005. "Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics". Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 6, p. 449-61.
- 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. 3176-84.

- GOULDING, N. J., M. R. Podgorski, N. D. Hall, R. J. Flower, J. L. Browning, R. B. Pepinsky et P. J. Maddison. 1989. "Autoantibodies to recombinant lipocortin-1 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 48, p. 843-50.
- GRABSTEIN, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh et a. l. et. 1994. "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor". Science, vol. 264, p. 965-8.
- GRIFFIN, J. D., O. Spertini, T. J. Ernst, M. P. Belvin, H. B. Levine, Y. Kanakura et T. F. Tedder. 1990. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors". Journal of Immunology, vol. 145, p. 576-84.
- GUPTA, S., L. Yel, D. Kim, C. Kim, S. Chiplunkar et S. Gollapudi. 2003. "Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2". Mol Cancer Ther, vol. 2, p. 711-9.
- HAMPTON, M. B., A. J. Kettle et C. C. Winterbourn. 1998. "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing". Blood, vol. 92, p. 3007-17.
- HAMPTON, M. B., M. C. Vissers, J. I. Keenan et C. C. Winterbourn. 2002. "Oxidant-mediated phosphatidylserine exposure and macrophage uptake of activated neutrophils: possible impairment in chronic granulomatous disease". Journal of Leukocyte Biology, vol. 71, p. 775-81.
- HANNON, R., J. D. Croxtall, S. J. Getting, F. Roviezzo, S. Yona, M. J. Paul-Clark, F. N. Gavins, M. Perretti, J. F. Morris, J. C. Buckingham et R. J. Flower. 2003. "Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{-/-} mouse". FASEB Journal, vol. 17, p. 253-5.
- 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.
- HAYASHI, T., T. Hideshima, M. Akiyama, P. Richardson, R. L. Schlossman, D. Chauhan, N. C. Munshi, S. Waxman et K. C. Anderson. 2002. "Arsenic trioxide inhibits growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment". Mol Cancer Ther, vol. 1, p. 851-60.
- HUANG, K. S., P. McGray, R. J. Mattaliano, C. Burne, E. P. Chow, L. K. Sinclair et R. B. Pepinsky. 1987. "Purification and characterization of proteolytic fragments of lipocortin I that inhibit phospholipase A2". Journal of Biological Chemistry, vol. 262, p. 7639-45.

- HUSSEIN, M. A., M. Saleh, F. Ravandi, J. Mason, R. M. Rifkin et R. Ellison. 2004. "Phase 2 study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma". British Journal of Haematology, vol. 125, p. 470-6.
- ISHITSUKA, K, R. Ikeda, S. Suzuki, N. Ohno, A. Utsunomiya, K. Uozumi, S. Hanada et T. Arima. 1999. "The inductive pathways of apoptosis and G₁ phase accumulation by arsenic trioxide in an adult T-cell leukemia cell line, MT-1". Blood, vol. 94 (suppl.1), p. 263b.
- IWAI, K., T. Miyawaki, T. Takizawa, A. Konno, K. Ohta, A. Yachie, H. Seki et N. Taniguchi. 1994. "Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils". Blood, vol. 84, p. 1201-8.
- JACK, R. M. et D. T. Fearon. 1988. "Selective synthesis of mRNA and proteins by human peripheral blood neutrophils". Journal of Immunology, vol. 140, p. 4286-93.
- JACQUIER-SARLIN, M. R. et B. S. Polla. 1996. "Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin". Biochemical Journal, vol. 318 (Pt 1), p. 187-93.
- JING, Y., J. Dai, R. M. Chalmers-Redman, W. G. Tatton et S. Waxman. 1999. "Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway". Blood, vol. 94, p. 2102-11.
- KANG, Y. H., M. J. Yi, M. J. Kim, M. T. Park, S. Bae, C. M. Kang, C. K. Cho, I. C. Park, M. J. Park, C. H. Rhee, S. I. Hong, H. Y. Chung, Y. S. Lee et S. J. Lee. 2004. "Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria". Cancer Research, vol. 64, p. 8960-7.
- 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. 1748-53.
- KIM, S. W., H. J. Rhee, J. Ko, Y. J. Kim, H. G. Kim, J. M. Yang, E. C. Choi et D. S. Na. 2001. "Inhibition of cytosolic phospholipase A₂ by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 15712-9.
- KLEBANOFF, S. J., S. Olszowski, W. C. Van Voorhis, J. A. Ledbetter, A. M. Waltersdorff et K. G. Schlechte. 1992. "Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage". Blood, vol. 80, p. 225-34.
- KLEBANOFF, S. J. 2005. "Myeloperoxidase: friend and foe". Journal of Leukocyte Biology, vol.77, p.598-625.

- KLEIN, J. B., M. J. Rane, J. A. Scherzer, P. Y. Coxon, R. Kettritz, J. M. Mathiesen, A. Buridi et K. R. McLeish. 2000. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways". Journal of Immunology, vol. 164, p. 4286-91.
- KNEPPER-NICOLAI, B., J. Savill et S. B. Brown. 1998. "Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 30530-6.
- KOBAYASHI, S., K. Yamashita, T. Takeoka, T. Ohtsuki, Y. Suzuki, R. Takahashi, K. Yamamoto, S. H. Kaufmann, T. Uchiyama, M. Sasada et A. Takahashi. 2002. "Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 33968-77.
- KROEMER, G. et H. de The. 1999. "Arsenic trioxide, a novel mitochondriotoxic anticancer agent?". Journal of the National Cancer Institute, vol. 91, p. 743-5.
- LAVASTRE, V. et D. Girard. 2002. "Tributyltin induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases". J Toxicol Environ Health A, vol. 65, p. 1013-24.
- LAVASTRE, V., M. Pelletier, R. Saller, K. Hostanska et D. Girard. 2002. "Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases". Journal of Immunology, vol. 168, p. 1419-27.
- LAVASTRE, V., C. J. Roberge, M. Pelletier, M. Gauthier et D. Girard. 2002. "Toxaphene, but not beryllium, induces human neutrophil chemotaxis and apoptosis via reactive oxygen species (ROS): involvement of caspases and ROS in the degradation of cytoskeletal proteins". Clinical Immunology, vol. 104, p. 40-8.
- 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. 283-8.
- LEE, E., T. Lindo, N. Jackson, L. Meng-Choong, P. Reynolds, A. Hill, M. Haswell, S. Jackson et S. Kilfeather. 1999. "Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B(4) receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 160, p. 2079-85.
- LI, Y. M. et J. D. Broome. 1999. "Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells". Cancer Research, vol. 59, p. 776-80.

- LILES, W. C. et S. J. Klebanoff. 1995. "Regulation of apoptosis in neutrophils--Fas track to death?". Journal of Immunology, vol. 155, p. 3289-91.
- LIM, L. H., E. Solito, F. Russo-Marie, R. J. Flower et M. Perretti. 1998. "Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 14535-9.
- LINDSTEN, T., A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan, S. J. Korsmeyer, G. R. MacGregor et C. B. Thompson. 2000. "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues". Molecular Cell, vol. 6, p. 1389-99.
- LIU, L., A. B. Fisher et U. J. Zimmerman. 1995. "Regulation of annexin I by proteolysis in rat alveolar epithelial type II cells". Biochemistry and Molecular Biology International, vol. 36, p. 373-81.
- MADERNA, P., S. Yona, M. Perretti et C. Godson. 2005. "Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26)". Journal of Immunology, vol. 174, p. 3727-33.
- MANCUSO, F., R. J. Flower et M. Perretti. 1995. "Leukocyte transmigration, but not rolling or adhesion, is selectively inhibited by dexamethasone in the hamster post-capillary venule. Involvement of endogenous lipocortin 1". Journal of Immunology, vol. 155, p. 377-86.
- MARSDEN, V. S. et A. Strasser. 2003. "Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more". Annual Review of Immunology, vol. 21, p. 71-105.
- MCKANNA, J. A. 1995. "Lipocortin 1 in apoptosis: mammary regression". Anatomical Record, vol. 242, p. 1-10.
- MEAGHER, L. C., J. M. Cousin, J. R. Seckl et C. Haslett. 1996. "Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes". Journal of Immunology, vol. 156, p. 4422-8.
- MIKAMI, M., M. Yamazaki et S. Yui. 1998. "Kinetic analysis of tumor cell death-inducing mechanism by polymorphonuclear leukocyte-derived calprotectin: involvement of protein synthesis and generation of reactive oxygen species in target cells". Microbiology and Immunology, vol. 42, p. 211-21.
- MILLER, W. H. Jr, H. M. Schipper, J. S. Lee, J. Singer et S. Waxman. 2002. "Mechanisms of action of arsenic trioxide". Cancer Research, vol. 62, p. 3893-903.

- 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. 2495-502.
- MOULDING, D. A., C. Akgul, M. Derouet, M. R. White et S. W. Edwards. 2001. "BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 70, p. 783-92.
- MOVITZ, C., C. Sjolín et C. Dahlgren. 1999. "Cleavage of annexin I in human neutrophils is mediated by a membrane-localized metalloprotease". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1416, p. 101-8.
- MULLER, W. A., S. A. Weigl, X. Deng et D. M. Phillips. 1993. "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes". Journal of Experimental Medicine, vol. 178, p. 449-60.
- 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-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro". Blood, vol. 90, p. 2772-83.
- NEWBURGER, P. E., Y. V. Subrahmanyam et S. M. Weissman. 2000. "Global analysis of neutrophil gene expression". Current Opinion in Hematology, vol. 7, p. 16-20.
- O'NEILL, A., M. C. Greenan, B. Doyle, J. M. Fitzpatrick et R. W. Watson. 2004. "Gene profiling of in vitro and in vivo models of delayed neutrophil apoptosis: a common pathway?". Biochemical Society Transactions, vol. 32, p. 470-3.
- OLIANI, S. M., M. J. Paul-Clark, H. C. Christian, R. J. Flower et M. Perretti. 2001. "Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression". American Journal of Pathology, vol. 158, p. 603-15.
- OTTONELLO, L., G. Frumento, N. Arduino, M. Bertolotto, P. Dapino, M. Mancini et F. Dallegri. 2002. "Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3". Journal of Leukocyte Biology, vol. 72, p. 125-32.
- PARENTE, L. et E. Solito. 2004. "Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein". Inflammation Research, vol. 53, p. 125-32.
- PARK, J. W., Y. J. Choi, M. A. Jang, S. H. Baek, J. H. Lim, T. Passaniti et T. K. Kwon. 2001. "Arsenic trioxide induces G2/M growth arrest and apoptosis after caspase-3 activation and bcl-2 phosphorylation in promonocytic U937 cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 286, p. 726-34.

- PELLETIER, M., C. Ratthe et D. Girard. 2002. "Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2". FEBS Letters, vol. 532, p. 164-70.
- PERRETTI, M., J. D. Croxtall, S. K. Wheller, N. J. Goulding, R. Hannon et R. J. Flower. 1996. "Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration". Nature Medicine, vol. 2, p. 1259-62.
- PERRETTI, M., H. Christian, S. K. Wheller, I. Aiello, K. G. Mugridge, J. F. Morris, R. J. Flower et N. J. Goulding. 2000. "Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis". Cell Biology International, vol. 24, p. 163-74.
- PERRETTI, M., N. Chiang, M. La, I. M. Fierro, S. Marullo, S. J. Getting, E. Solito et C. N. Serhan. 2002. "Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor". Nature Medicine, vol. 8, p. 1296-302.
- PERRETTI, M. 2003. "The annexin 1 receptor(s): is the plot unravelling?". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 24, p. 574-9.
- PHILIP, J. G., R. J. Flower et J. C. Buckingham. 1998. "Blockade of the classical pathway of protein secretion does not affect the cellular exportation of lipocortin 1". Regulatory Peptides, vol. 73, p. 133-9.
- POLLA, B. S., M. Bachelet, G. Elia et M. G. Santoro. 1998. "Stress proteins in inflammation". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 851, p. 75-85.
- RESCHER, U. et V. Gerke. 2004. "Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions". Journal of Cell Science, vol. 117, p. 2631-9.
- RHEE, H. J., G. Y. Kim, J. W. Huh, S. W. Kim et D. S. Na. 2000. "Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent". European Journal of Biochemistry, vol. 267, p. 3220-5.
- ROUSSELOT, P., S. Labaume, J. P. Marolleau, J. Larghero, M. H. Noguera, J. C. Brouet et J. P. Fermand. 1999. "Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients". Cancer Research, vol. 59, p. 1041-8.
- ROVIEZZO, F., S. J. Getting, M. J. Paul-Clark, S. Yona, F. N. Gavins, M. Perretti, R. Hannon, J. D. Croxtall, J. C. Buckingham et R. J. Flower. 2002. "The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response". Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 53, p. 541-53.
- RUIZ, L. M., G. Bedoya, J. Salazar, O. Garcia de D et P. J. Patino. 2002. "Dexamethasone inhibits apoptosis of human neutrophils induced by reactive oxygen species". Inflammation, vol. 26, p. 215-22.

SAKAMOTO, C., K. Suzuki, F. Hato, M. Akahori, T. Hasegawa, M. Hino et S. Kitagawa. 2003. "Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway". International Journal of Hematology, vol. 77, p. 60-70.

SAKAMOTO, E., F. Hato, T. Kato, C. Sakamoto, M. Akahori, M. Hino et S. Kitagawa. 2005. "Type I and type II interferons delay human neutrophil apoptosis via activation of STAT3 and up-regulation of cellular inhibitor of apoptosis 2". Journal of Leukocyte Biology, vol. 78, p. 301-9.

SALCEDO, R., K. Wasserman et M. Patarroyo. 1997. "Endogenous fibronectin of blood polymorphonuclear leukocytes: stimulus-induced secretion and proteolysis by cell surface-bound elastase". Experimental Cell Research, vol. 233, p. 33-40.

SAVILL, J. et C. Haslett. 1995. "Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation". Seminars in Cell Biology, vol. 6, p. 385-93.

SAVILL, J. 1997. "Apoptosis in resolution of inflammation". Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 375-80.

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. 845-53.

SCAPINI, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni et M. A. Cassatella. 2000. "The neutrophil as a cellular source of chemokines". Immunological Reviews, vol. 177, p. 195-203.

SCHEEL-TOELLNER, D., K. Q. Wang, P. R. Webb, S. H. Wong, R. Craddock, L. K. Assi, M. Salmon et J. M. Lord. 2004. "Early events in spontaneous neutrophil apoptosis". Biochemical Society Transactions, vol. 32, p. 461-4.

SCHOLZ, C., T. Wieder, L. Starck, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, B. Dorken et P. T. Daniel. 2005. "Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway". Oncogene, vol. 24, p. 1904-13.

SEELY, A. J., J. L. Pascual et N. V. Christou. 2003. "Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance". Crit Care, vol. 7, p. 291-307.

SEOL, J. G., W. H. Park, E. S. Kim, C. W. Jung, J. M. Hyun, Y. Y. Lee et B. K. Kim. 2001. "Potential role of caspase-3 and -9 in arsenic trioxide-mediated apoptosis in PCI-1 head and neck cancer cells". International Journal of Oncology, vol. 18, p. 249-55.

- SEVEAU, S., H. Keller, F. R. Maxfield, F. Piller et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. "Neutrophil polarity and locomotion are associated with surface redistribution of leukosialin (CD43), an antiadhesive membrane molecule". Blood, vol. 95, p. 2462-70.
- SHEN, Z. Y., J. Shen, W. J. Cai, C. Hong et M. H. Zheng. 2000. "The alteration of mitochondria is an early event of arsenic trioxide induced apoptosis in esophageal carcinoma cells". International Journal of Molecular Medicine, vol. 5, p. 155-8.
- SIMON, H. U. 2001. "Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences". Immunological Reviews, vol. 179, p. 156-62.
- SIMON, H. U. 2003. "Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation". Immunological Reviews, vol. 193, p. 101-10.
- SOIGNET, S. L., P. Maslak, Z. G. Wang, S. Jhanwar, E. Calleja, L. J. Dardashti, D. Corso, A. DeBlasio, J. Gabilove, D. A. Scheinberg, P. P. Pandolfi et R. P. Warrell Jr. 1998. "Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide". New England Journal of Medicine, vol. 339, p. 1341-8.
- SOLITO, E., G. Raugei, M. Melli et L. Parente. 1991. "Dexamethasone induces the expression of the mRNA of lipocortin 1 and 2 and the release of lipocortin 1 and 5 in differentiated, but not undifferentiated U-937 cells". FEBS Letters, vol. 291, p. 238-44.
- SOLITO, E., C. de Coupade, L. Parente, R. J. Flower et F. Russo-Marie. 1998. "IL-6 stimulates annexin 1 expression and translocation and suggests a new biological role as class II acute phase protein". Cytokine, vol. 10, p. 514-21.
- SOLITO, E., C. Raguene-Nicol, C. de Coupade, A. Bisagni-Faure et F. Russo-Marie. 1998. "U937 cells deprived of endogenous annexin 1 demonstrate an increased PLA2 activity". British Journal of Pharmacology, vol. 124, p. 1675-83.
- SOLITO, E., I. A. Romero, S. Marullo, F. Russo-Marie et B. B. Weksler. 2000. "Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin". Journal of Immunology, vol. 165, p. 1573-81.
- SOLITO, E., C. de Coupade, S. Canaider, N. J. Goulding et M. Perretti. 2001. "Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation". British Journal of Pharmacology, vol. 133, p. 217-28.
- SOLITO, E., A. Kamal, F. Russo-Marie, J. C. Buckingham, S. Marullo et M. Perretti. 2003. "A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils". FASEB Journal, vol. 17, p. 1544-6.

- SORENSEN, O., K. Amljots, J. B. Cowland, D. F. Bainton et N. Borregaard. 1997. "The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils". Blood, vol. 90, p. 2796-803.
- STANKOVA, J., S. Turcotte, J. Harris et M. Rola-Pleszczynski. 2002. "Modulation of leukotriene B4 receptor-1 expression by dexamethasone: potential mechanism for enhanced neutrophil survival". Journal of Immunology, vol. 168, p. 3570-6.
- STEWART, M. et N. Hogg. 1996. "Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity". Journal of Cellular Biochemistry, vol. 61, p. 554-61.
- STRAUSBAUGH, H. J. et S. D. Rosen. 2001. "A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from myeloid cells". Journal of Immunology, vol. 166, p. 6294-300.
- STRINGER, R. E., C. A. Hart et S. W. Edwards. 1996. "Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival". British Journal of Haematology, vol. 92, p. 169-75.
- TSAO, F. H., K. C. Meyer, X. Chen, N. S. Rosenthal et J. Hu. 1998. "Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 18, p. 120-8.
- 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. 467-73.
- WAGNER, C., M. Pioch, C. Meyer, C. Iking-Konert, K. Andrassy et G. M. Hansch. 2000. "Differentiation of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic infections and chronic inflammatory diseases: evidence of prolonged life span and de novo synthesis of fibronectin". Journal of Molecular Medicine, vol. 78, p. 337-45.
- WALLNER, B. P., R. J. Mattaliano, C. Hession, R. L. Cate, R. Tizard, L. K. Sinclair, C. Foeller, E. P. Chow, J. L. Browing, K. L. Ramachandran et a. l. et. 1986. "Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity". Nature, vol. 320, p. 77-81.
- WALTHER, A., K. Riehemann et V. Gerke. 2000. "A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR". Molecular Cell, vol. 5, p. 831-40.
- WARD, C., E. R. Chilvers, M. F. Lawson, J. G. Pryde, S. Fujihara, S. N. Farrow, C. Haslett et A. G. Rossi. 1999. "NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 4309-18.

- WEI, S., J. H. Liu, P. K. Epling-Burnette, A. M. Gamero, D. Ussery, E. W. Pearson, M. E. Elkabani, J. I. Diaz et J. Y. Djeu. 1996. "Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". Journal of Immunology, vol. 157, p. 5155-62.
- WEINMANN, P., P. Gaetgens et B. Walzog. 1999. "Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3". Blood, vol. 93, p. 3106-15.
- WEISBART, R. H., D. W. Golde et J. C. Gasson. 1986. "Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors". Journal of Immunology, vol. 137, p. 3584-7.
- WEISBART, R. H., L. Kwan, D. W. Golde et J. C. Gasson. 1987. "Human GM-CSF primes neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to the major physiological chemoattractants". Blood, vol. 69, p. 18-21.
- 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.
- WITKO-SARSAT, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects". Laboratory Investigation, vol. 80, p. 617-53.
- WOO, M., R. Hakem, M. S. Soengas, G. S. Duncan, A. Shahinian, D. Kagi, A. Hakem, M. McCurrach, W. Khoo, S. A. Kaufman, G. Senaldi, T. Howard, S. W. Lowe et T. W. Mak. 1998. "Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes". Genes and Development, vol. 12, p. 806-19.
- WOO, S. H., I. C. Park, M. J. Park, H. C. Lee, S. J. Lee, Y. J. Chun, S. H. Lee, S. I. Hong et C. H. Rhee. 2002. "Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells". International Journal of Oncology, vol. 21, p. 57-63.
- WU, C. C., J. D. Croxtall, M. Perretti, C. E. Bryant, C. Thiemermann, R. J. Flower et J. R. Vane. 1995. "Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 3473-7.
- 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. 674-85.
- ZHENG, Y., H. Yamaguchi, C. Tian, M. W. Lee, H. Tang, H. G. Wang et Q. Chen. 2005. "Arsenic trioxide (As(2)O(3)) induces apoptosis through activation of Bax in

hematopoietic cells". Oncogene, vol. 24, p. 3339-47.

ZHOU, L., Y. Jing, M. Styblo, Z. Chen et S. Waxman. 2005. "Glutathione-S-transferase pi inhibits As₂O₃-induced apoptosis in lymphoma cells: involvement of hydrogen peroxide catabolism". Blood, vol. 105, p. 1198-203.

ANNEXES

TRAVAUX COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE

Méthodologie

Des neutrophiles ont été incubés avec du diluant (HBSS) ou de l'AT à 5 μ M ou 20 μ M pour une durée de 20h. Les surnageants ont été récoltés par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Un aliquot de 15 μ L de surnageant a été migré sur un gel SDS-PAGE contenant 0,1% de gélatine. Après 2h30 de migration à 100V constant, le gel a été lavé 2 fois 30 minutes avec une solution de 2,5% Triton X-100 et incubés toute la nuit dans un tampon de digestion (Tris-HCl 50mM pH 7.4, NaCl 150mM, CaCl₂ 5mM). Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie pour 30 minutes et décoloré. La densitométrie a été effectuée grâce au Fluor-S MultiImager (BioRad) et au logiciel Multi-Analyst version 1.1 (BioRad).

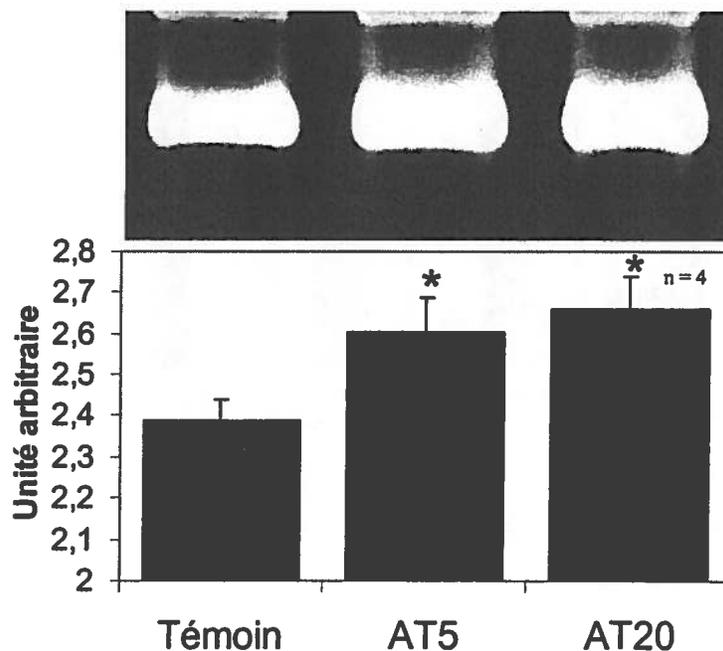


Figure 8 : Zymographie sur gélatine de surnageants de neutrophiles incubés avec le diluant (témoin) ou l'AT à 5 μ M ou 20 μ M.

Méthodologie

Des neutrophiles sont incubés en présence d'AT à 5 μ M ou du diluant (HBSS) pour une période de 20h. Les surnageants de ces neutrophiles sont prélevés suite à une centrifugation à 13 000rpm pour 10 minutes à 4°C. Ces surnageants sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Ensuite, un deuxième lot de neutrophiles est isolé et incubé en présence d'un mélange de RPMI et de 5, 20, 50 ou 100% de surnageants de neutrophiles stimulés à l'AT ou au diluant. Après 20h d'incubation, les cellules sont récoltées, lavées et préincubées pour 30 minutes en présence de 20% de sérum autologue afin de réduire les interactions non-spécifiques avec les récepteurs Fc. Puis, les cellules sont lavées et incubées avec 2 μ L d'anticorps de souris CD16-FITC anti-humain à l'abri de la lumière (PharMingen Canada, Mississauga, ON) pour 30 minutes sur glace. Une analyse par cytométrie en flux a été effectuée (10 000 événements) avec un appareil FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

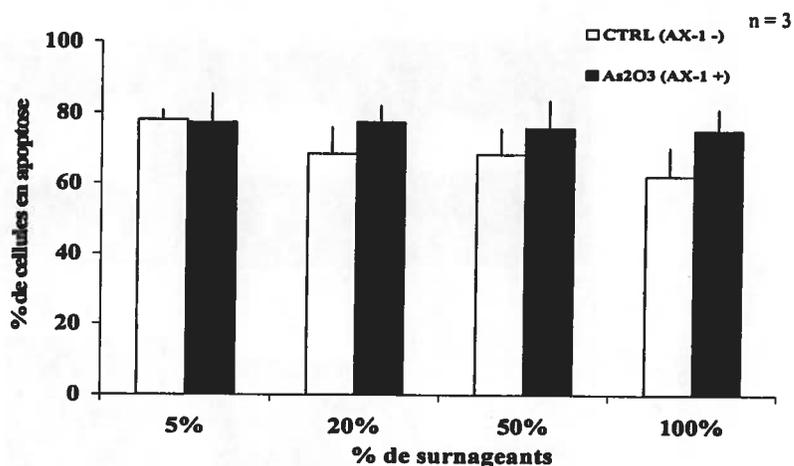


Figure 9 : Effet des surnageants de neutrophiles incubés avec de l'AT (contenant de l'annexine-1) ou avec le diluant (ne contenant pas d'annexine-1) sur l'apoptose des neutrophiles humains.

Méthodologie

Les granulocytes sont isolés selon la méthode Ficoll-Paque habituelle. Puis, les éosinophiles sont isolés grâce à une colonne à sélection négative CD16⁺. Ainsi, les granulocytes isolés sont lavés une fois avec du PBS stérile et incubés en présence de 50 μ L de microbilles anti-CD16 et 50 μ L de tampon de liaison (PBS pH 7,2, EDTA 2mM, BSA 0,5% stérile) pour 30 minutes sur glace. Après un ajout de 900 μ L de tampon de liaison, les échantillons sont placés sur une colonne LS MidiMacs (Miltenyi Biotec, Allemagne) en présence d'un champ magnétique. La pureté de la séparation est ensuite évaluée par cytologie. Les éosinophiles et neutrophiles sont incubés pendant 20hrs avec une solution de marquage métabolique (1 x 10⁶cellules/mL pour les éosinophiles et 10 x 10⁶ cellules/mL pour les neutrophiles avec du RPMI-1640 dépourvue de méthionine et cystéine en présence de 125 μ Ci de Redivue Pro-Mix L-[³⁵S] (Amersham Biosciences, Inc) et 10% de sérum autologue). Les cellules sont récoltées et lavées 2 fois avec du PBS et lysées avec du tampon (Chaps 4%, Tris 40 mM, urée 8M, aprotinine 20 μ g/mL, pepstatine 20 μ g/mL, leupeptine 20 μ g/mL, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 1%). Une première séparation (*isoelectrofocusing*) est effectuée sur des bandes à pH linéaire 3-10 (IPGphor Pharmacia Biotech) avec 2 x 10⁶ cellules. Après une deuxième séparation par SDS-PAGE, le gel est coloré au bleu de Coomassie, séché et exposé en présence d'un film Kodak X OMAT-RA à -80 °C pour 3-5 jours.

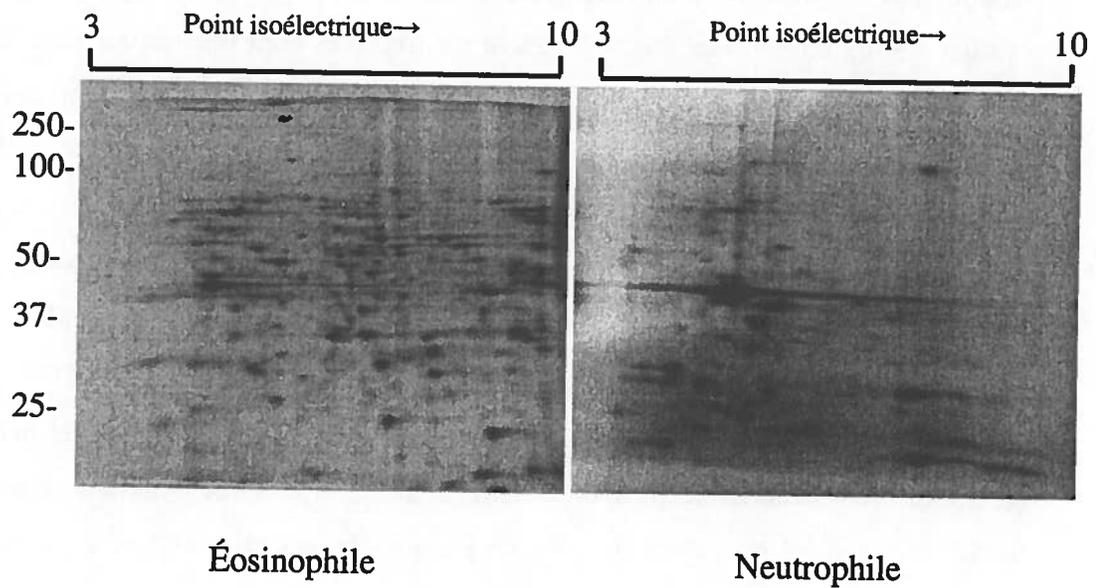


Figure 10 : Synthèse protéique lors de l'apoptose des éosinophiles et neutrophiles (après 20 h d'incubation).

