

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**EFFET DU TRIOXYDE D'ARSENIC SUR LES NEUTROPHILES
HUMAINS : VOIES CELLULAIRES IMPLIQUÉES**

Par
François Binet

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

M. Michel Charbonneau, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

M. Sylvain Bourgoin, Ph.D.
Université Laval

Examineur externe

M. Marc Pouliot, Ph.D.
Université Laval

Directeur de recherche

M. Denis Girard, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Remerciements

Avant de débiter cet ouvrage, je désire remercier sincèrement plusieurs personnes qui ont facilité le difficile parcours qu'est le doctorat.

D'abord, je désire remercier mon directeur de recherche, M. Denis Girard. Après six années de recherches, je n'aurais pu difficilement trouver meilleur partenaire pour accomplir ma formation graduée. Denis fut non seulement mon directeur de recherche mais aussi un mentor qui s'est aussi assuré de ma bonne stabilité émotionnelle. Merci beaucoup, Denis, pour six belles années de travaux et d'échanges scientifiques fructueux.

Également, je désire remercier mes partenaires de laboratoire, d'abord Sonia, Éliane, Claude, Valérie et Martin qui m'ont beaucoup appris lors de mes débuts au labo ainsi que mes plus récents collègues, Jamila, Francis, Jean-Christophe et David. J'ai réalisé grâce à eux qu'il y a toujours quelque chose de nouveau à apprendre même avec des techniques qu'on croit déjà acquises. Je tiens aussi à vous remercier pour la belle dynamique qui s'est développée dans le «vieux» et le «nouveau» labo DG. Je tiens aussi à témoigner ma reconnaissance envers le personnel de soutien de l'INRS. Plus précisément, je désire remercier Josée, Francine, Jocelyne, Jacques, Daniel et Louis pour leur efficacité et leur bonne humeur qui ont certes contribuées à faire de ce doctorat une expérience des plus agréable. De plus, je voudrais aussi remercier tous les collègues des autres laboratoires qui m'ont aidé grâce à leur soutien technique et que j'ai eu aussi beaucoup de plaisir à côtoyer, je pense entre autres à Guylaine, Geneviève, Kathy, Anik, Madeleine, Sihem, Thérésa, Michele et Julie.

Ensuite, je tiens finalement à remercier ma copine depuis huit ans, Ophélie, qui a partagé tant de mes angoisses que mes questionnements durant ce doctorat. Sans son soutien vital, je n'aurais certes pu achever mes études graduées. Merci milles fois pour la patience et la compréhension que tu as su conserver pendant toutes ces années. Également, je désire remercier mes parents, Réjean et Louise, ma sœur Anne-Renée, ainsi que toute ma famille et mes amis pour leur écoute et leur soutien.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	VII
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	X
SOMMAIRE	XI
INTRODUCTION	XIII
SECTION I : SYNTHÈSE.....	1
CHAPITRE 1 : LE RÔLE DU NEUTROPHILE DANS LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE	2
1.1 L'INFLAMMATION.....	2
1.1.1 <i>L'inflammation aiguë</i>	2
1.1.2 <i>L'inflammation chronique</i>	3
1.2 LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE DU NEUTROPHILE	4
1.2.1 <i>La différenciation du neutrophile</i>	4
1.2.2 <i>La mobilisation à partir de la moelle osseuse</i>	5
1.2.3 <i>L'adhésion sur l'endothélium vasculaire</i>	6
1.2.4 <i>La diapédèse et la migration interstitielle</i>	8
1.2.5 <i>Le chimiotactisme</i>	10
1.2.6 <i>La phagocytose et la dégranulation</i>	11
1.2.7 <i>Les NETs (neutrophil extracellular traps)</i>	14
1.2.8 <i>La génération de médiateurs inflammatoires par le neutrophile</i>	15
1.2.9 <i>La résolution de l'inflammation</i>	16
1.3 MALADIES INFLAMMATOIRES IMPLIQUANT LES NEUTROPHILES	17
1.3.1 <i>L'arthrite rhumatoïde</i>	18
1.3.2 <i>Les vasculites associées aux ANCA</i>	19
1.3.3 <i>La fibrose kystique</i>	20
CHAPITRE 2 : L'APOPTOSE	22
2.1 LES RÉCEPTEURS DE MORT : LA VOIE EXTRINSÈQUE	22

2.2 LA VOIE MITOCHONDRIALE.....	25
2.3 LA VOIE DU STRESS AU RE	28
2.3.1 <i>La voie de PERK</i>	29
2.3.2 <i>La voie de IRE1</i>	31
2.3.3 <i>La voie de ATF6</i>	32
2.3.4 <i>L'activation de l'apoptose par les voies de l'UPR et le stress au RE.....</i>	33
2.4 LES PARTICULARITÉS DE L'APOPTOSE DU NEUTROPHILE	36
CHAPITRE 3 : LE TRIOXYDE D'ARSENIC	39
3.1 L'UTILISATION CLINIQUE DU TRIOXYDE D'ARSENIC	39
3.2 LE MODE D'ACTION DU TRIOXYDE D'ARSENIC	41
3.2.1 <i>Induction de la différenciation des cellules APL</i>	41
3.2.2 <i>Mécanismes pro-apoptotiques du trioxyde d'arsenic</i>	43
3.2.3 <i>Impact sur les voies de signalisation : MAPK et NF-κB.....</i>	46
3.3 EFFETS DU TRIOXYDE D'ARSENIC SUR LES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	48
CHAPITRE 4 : OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE	50
4.1 OBJECTIF 1 : IDENTIFIER ET COMPRENDRE LE RÔLE DES PROTÉINES DONT LA SYNTHÈSE DE NOVO EST MODULÉE PAR LE TRIOXYDE D'ARSENIC	50
4.2 OBJECTIF 2 : DÉTERMINER SI LE TRIOXYDE D'ARSENIC PEUT AFFECTER LES FONCTIONS DU NEUTROPHILE ET IDENTIFIER LES VOIES SIGNALÉTIQUES IMPLIQUÉES.....	50
4.3 OBJECTIF 3 : ÉLUCIDER LE MÉCANISME PRO-APOPTOTIQUE DU TRIOXYDE D'ARSENIC SUR LE NEUTROPHILE	51
SECTION 2 : ARTICLES	52
ARTICLE 1.....	53
<i>Résumé en français de l'article.....</i>	54
<i>Texte original de l'article.....</i>	55
ARTICLE 2.....	65
<i>Résumé en français de l'article.....</i>	66
<i>Texte original de l'article.....</i>	67
ARTICLE 3.....	77
<i>Résumé en français de l'article.....</i>	78
<i>Texte tel que soumis</i>	79
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS	113

5.1 L'ANNEXINE-I N'EST PAS IMPLIQUÉE DANS LE PROCESSUS APOPTOTIQUE SELON NOTRE ÉTUDE.....	113
5.2 L'ANNEXINE-I POSSÈDE ÉGALEMENT UNE CAPACITÉ ANTI-ADHÉSIVE CHEZ LES NEUTROPHILES	116
5.3 L'ANNEXINE-I EST UNE PROTÉINE DE STRESS INDUITE PAR LE TRIOXYDE D'ARSENIC	117
5.4 LES MAPK SONT ACTIVÉES PAR LE TRIOXYDE D'ARSENIC ET JOUENT UN RÔLE IMPORTANT DANS L'AUGMENTATION DES FONCTIONS DU NEUTROPHILE PAR CET AGENT	118
5.5 LE FLUX CALCIQUE EST PERTURBÉ, À LONG TERME, EN PRÉSENCE DE TRIOXYDE D'ARSENIC	120
5.6 LE STRESS OXYDATIF EST UNE PARTIE INTÉGRANTE DE L'EFFET PRO-APOPTOTIQUE DU TRIOXYDE D'ARSENIC	122
5.7 LA CASPASE-4 N'EST PAS ESSENTIELLE À L'INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR L'UPR CHEZ LES NEUTROPHILES	123
5.8 LE RÔLE DE LA CASPASE-4 N'EST PAS RELIÉ À LA MATURATION DES CYTOKINES CHEZ LES NEUTROPHILES	124
5.9 LA CASPASE-4 EST IMPLIQUÉE DANS LE CLIVAGE DE LA VIMENTINE	124
5.10 LE TRIOXYDE D'ARSENIC INDUIT UN CHANGEMENT MORPHOLOGIQUE DU RE ACCOMPAGNÉ DE L'ACTIVATION DES VOIES DE L'UPR.....	125
5.11 IMPLICATIONS ET NOUVELLES VOIES DE RECHERCHES.....	126
ANNEXE A	128
RÉFÉRENCES	130

Liste des abbréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ALXR	récepteur à la lipoxine A ₄
ANCA	«antineutrophil cytoplasmic antibodies»
APL	«acute promyelocytic leukemia»
AQP-9	aquaglycéroporine-9
ARNm	acide ribonucléique messenger
As ₂ O ₃	trioxyde d'arsenic
ATF-6	«activating transcription factor-6»
ATP	adénosine triphosphate
ATRA	«all-trans retinoic acid»
Bcl-2	« B-cell lymphoma 2»
BPI	«bacterial permeability increasing protein »
CARD	«caspase activating recruitment domain»
CD(...)	«cluster of differentiation»
c-FLIP	«cellular-FLICE inhibitory protein»
CGD	«chronic granulomatosis disease»
DISC	«death inducing signaling complex»
DR	«death receptor»
eIF2	«eukaryotic initiation factor»
ERO1	« endoplasmic reticulum oxidoreductase»
Erk	«extracellular signal regulated kinase»
FADD	«Fas associated death domain»
FasL	Fas ligand
Fc	«fragment crystallizable»
fMLP	n-formyl-met-leu-phe
GADD(...)	«growth arrest and DNA damage inducible gene»
GRP78	«glucose regulated 78kDa protein»
GSH	gluthation
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène

HSP	protéine de choc thermique
IAP	«inhibitor of apoptosis»
ICAM	«intercellular adhesion molecule»
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IRE-1	«inositol-requiring protein-1»
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	lipopolysaccharides
MAPK	«mitogen activating protein kinase»
Mcl-1	« myeloid cell leukemia sequence 1 »
MPO	myéloperoxydase
NADPH	«nicotinamide adenine dinucleotide phosphate»
NET	«neutrophil extracellular traps»
NF- κ B	nuclear factor kappa B
PAF	«platelet-activating factor»
PDI	« protein disulfide isomerase»
PECAM	«platelet-endothelial cell adhesion molecule»
PERK	«protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase»
PI3K	phosphoinositide-3 kinase
PML-RAR α	«promyelocytic leukemia retinoic acid receptor alpha»
PR3	protéinase-3
RAR α	récepteur à l'acide rétinoïque alpha
RE	réticulum endoplasmique
ROS	réactifs oxygénés
RT-PCR	«reverse transcriptase polymerase chain reaction»
siRNA	«silencing ribonucleic acid»
TNF- α	«tumor necrosis factor- α »
TRADD	«TNF receptor associated death domain»
TRAF(...)	«TNF receptor associated factor»
TRAIL	«tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand»
UPR	«unfolded protein response»

XBP-1

«X-box binding protein 1»

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : La réponse inflammatoire	6
Figure 2 : La formation de l'apoptosome	27
Figure 3 : Les trois voies de l'UPR	29
Figure 4 : Le repliement des protéines	35
Figure 5 : La protéine de fusion aberrante PML-RAR α	42
Figure 6 : Mécanismes impliqués dans l'induction d'apoptose par le trioxyde d'arsenic	44
Tableau 1 : Récepteurs de mort	23

Sommaire

Le trioxyde d'arsenic est un agent très efficace pour traiter la leucémie promyélocytique aiguë. Ce traitement peut engendrer l'apparition de neutropénies. Nous avons donc postulé que cet agent pourrait induire l'apoptose des neutrophiles. Ainsi, les travaux préliminaires à cette thèse ont confirmé cette hypothèse et montré que le trioxyde d'arsenic induit la synthèse de plusieurs protéines. Suite à des analyses par spectrométrie de masse, nous avons découvert que la synthèse d'annexine-I est augmentée en présence de trioxyde d'arsenic. En employant des souris déficientes en annexine-I, nous avons déterminé que la présence de cette protéine n'est pas essentielle à l'induction d'apoptose mais plutôt au développement d'un stress semblable au choc thermique. Puis, afin de déterminer si le stress engendré par le trioxyde d'arsenic peut altérer les fonctions générales du neutrophile, nous avons observé que les MAPK (mitogen activated protein kinase) p38 et JNK (c-jun N-terminal kinase) sont sélectivement phosphorylées par cet agent. Cette phosphorylation ne serait pas dépendante d'une flambée calcique ou de la présence de H₂O₂. Puis, nous avons déterminé que la phosphorylation de p38 et JNK est associée à l'augmentation de l'adhésion, du chimiotactisme, de la dégranulation et de la phagocytose du neutrophile mais pas à l'apoptose

Afin de déterminer plus précisément les voies cellulaires activées lors de l'apoptose induite par le trioxyde d'arsenic, nous avons constaté que la voie du stress au RE (réticulum endoplasmique) est active chez le neutrophile. L'altération de la morphologie du RE, la libération graduelle de calcium dans le cytosol et l'activation des trois voies de l'UPR (unfolded protein response) suggèrent qu'il y a présence d'un stress au RE. Nous avons par contre noté que la caspase-4 traditionnellement associée à cette voie apoptotique pourrait assumer un rôle différent chez le neutrophile, soit le clivage et la présentation de fragments de la vimentine à la surface externe de ce leukocyte. Ces travaux démontrent pour la première fois que le trioxyde d'arsenic possède des capacités agonistiques sur le neutrophile humain. En plus, nous avons révélé l'existence d'une nouvelle voie possiblement impliquée dans l'apoptose constitutive et induite par le

trioxyde d'arsenic. Dans l'ensemble, ces résultats ouvrent la porte au développement de nouveaux agents modulant l'apoptose du neutrophile et par le fait-même au contrôle de l'inflammation.

François Binet, M.Sc.
Étudiant

Denis Girard, Ph.D.
Directeur de recherche

Introduction

Le trioxyde d'arsenic est un médicament employé avec succès pour traiter la leucémie promyélocytaire aiguë (APL). En effet, cette substance induit la rémission moléculaire chez plus de 75% des patients nouvellement diagnostiqués ou en rechute d'APL. L'utilisation clinique de cet agent est de plus en plus répandue. En effet, plusieurs études ont montré l'efficacité du trioxyde d'arsenic sur les cellules non-APL telles que les cellules provenant de myélomes multiples ou de tumeurs solides ovariennes ou prostatiques. L'efficacité de cet agent tient du fait qu'il agit de deux manières distinctes, soit qu'il peut induire la différenciation des cellules cancéreuses à faibles doses tout en provoquant l'apoptose à plus fortes concentrations.

Quelques études cliniques ont démontré qu'une bonne proportion des patients traités avec le trioxyde d'arsenic peuvent développer une neutropénie, soit une baisse du compte sanguin en neutrophiles. Ainsi, nous nous sommes intéressés à savoir si cet agent peut induire l'apoptose du neutrophile. Les résultats préliminaires à cet ouvrage ont démontré que le trioxyde d'arsenic peut effectivement accélérer l'apoptose du neutrophile et ce, de façon concentration-dépendante. De plus, nous avons observé que le trioxyde d'arsenic augmente la synthèse *de novo* de plusieurs protéines. Ceci est étonnant considérant que la majorité des agents qui induisent l'apoptose du neutrophile ont plutôt tendance à inhiber ou à ne pas affecter la synthèse protéique *de novo*.

Le neutrophile est un leukocyte grandement impliqué dans presque tous les désordres inflammatoires. Son abondance, sa capacité à libérer des cytokines qui coordonnent la réponse inflammatoire et son immense arsenal granulaire cytotoxique sont cruciaux pour l'élimination des infections bactériennes et fongiques, mais peuvent aussi être responsables de maladies telles que les vasculites associées aux ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibodies) ou la fibrose kystique. Ainsi, la persistance de cette cellule associée à une baisse du taux apoptotique et un défaut dans l'élimination de celle-ci par des phagocytes professionnels peuvent aussi être responsable de ces pathologies. À cet effet, il est intéressant de noter que le trioxyde d'arsenic a longtemps été utilisé, dans la

médecine traditionnelle chinoise et dans la médecine occidentale du 19^{ème} siècle, dans le traitement de maux à caractère inflammatoire tels que l'arthrite. Il devient donc intéressant de déterminer si cette propriété anti-inflammatoire est reliée à la modulation des capacités du neutrophile.

Ainsi, le but de cette étude est d'abord de comprendre comment le trioxyde d'arsenic induit l'apoptose des neutrophiles. Ensuite, cette recherche désire analyser l'impact de cette substance sur l'inflammation, plus particulièrement sur la réponse inflammatoire du neutrophile. L'approche utilisée est d'abord d'identifier plusieurs protéines dont la synthèse *de novo* est augmentée par le trioxyde d'arsenic. Ainsi, les résultats de spectrométrie de masse nous ont permis d'identifier la protéine annexine-I. Puis, le rôle de cette protéine a été élucidé en observant la dynamique intracellulaire et extracellulaire de celle-ci. En utilisant des neutrophiles provenant de souris déficientes en annexine-I, nous avons également déterminé si cette protéine est essentielle à l'induction de l'apoptose du neutrophile. Ensuite, nous avons aussi regardé la modulation du potentiel inflammatoire du neutrophile par le trioxyde d'arsenic en s'attardant aux principales fonctions du neutrophile, soit le chimiotactisme, la phagocytose ou la dégranulation. Le mécanisme régissant ces fonctions a aussi été investigué, notamment en déterminant le type de MAPK activé et la dépendance à une flambée calcique. Enfin, nous nous sommes intéressés à savoir si la voie du stress au RE pouvait être impliquée dans l'induction d'apoptose par le trioxyde d'arsenic.

Le présent ouvrage démontre en de plus amples détails comment le trioxyde d'arsenic induit l'apoptose du neutrophile. De plus, celui-ci constitue la première évidence que le trioxyde d'arsenic est un agoniste pour le neutrophile, soit en modulant ses principales fonctions. De plus, il s'agit du premier exemple démontrant que la voie apoptotique émanant d'un stress au RE est activée non seulement dans l'apoptose constitutive du neutrophile mais aussi dans l'apoptose induite par le trioxyde d'arsenic.

Ce document présente tout d'abord une revue de littérature divisée en trois chapitres. En premier lieu, le rôle du neutrophile dans la réponse inflammatoire est décrit. Puis, les trois

principales voies apoptotiques sont détaillées. Ensuite, un résumé des principales connaissances concernant le mode d'action du trioxyde d'arsenic est exposé avec une attention particulière aux cellules du système immunitaire. Cette section est suivie de trois articles renfermant la majorité des résultats essentiels à cette thèse. Ces articles ont été publiés ou soumis dans un journal scientifique. Finalement, une discussion des résultats ainsi que des suggestions de futures voies de recherche constituent la dernière section de cet ouvrage.

SECTION I : SYNTHÈSE

Chapitre 1 : Le rôle du neutrophile dans la réponse inflammatoire

1.1 L'inflammation

L'inflammation est une réponse de protection enclenchée par l'organisme lors d'une infection par un agent microbien, viral ou une toxine. Également, l'inflammation peut être activée lors d'un dommage physique aux tissus, par exemple lors d'une brûlure. Ainsi, non seulement ce processus est important dans l'élimination des agents infectieux mais aussi est-il directement relié à la réparation tissulaire et au retour à l'homéostasie. Il existe deux types d'inflammation, soit l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. Celles-ci se distinguent par la durée de la réponse inflammatoire ainsi que par les types cellulaires impliqués.

1.1.1 L'inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réponse immédiate et rapide suite à une infection. Cinq types de signes cliniques peuvent caractériser l'inflammation aiguë, soit la chaleur (*calor*), la rougeur (*rubor*), l'enflure (*tumor*), la douleur (*dolor*) et la perte de fonction (*functio laesa*). Ces phénomènes sont imputables à l'effet des cytokines et autres médiateurs inflammatoires sur les vaisseaux sanguins environnants. D'abord, le flux sanguin est altéré par la dilatation des vaisseaux au site d'inflammation, ce qui contribue à la chaleur et à la rougeur observées. Puis, on observe une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Plusieurs mécanismes sont responsables de cette altération de la perméabilité vasculaire. On note, entre autres, la contraction des cellules endothéliales, par exemple suite à une exposition à l'histamine ou à la bradykinine. Également, un dommage direct suite à une infection bactérienne lytique ou un dommage indirect causé par la libération de réactifs oxygénés ou d'enzymes protéolytiques par les leukocytes adhérents peuvent aussi altérer la perméabilité vasculaire. Ainsi, un mouvement net du plasma riche en protéines vers les tissus entraîne l'accumulation de fluides plasmatiques dans l'espace interstitiel tissulaire. Ce phénomène est associé à

l'enflure. Celui-ci est important dans l'arrivée des leukocytes au site inflammatoire. La migration des cellules vers les tissus et leurs actions locales sont responsables de la douleur observable lors de l'inflammation. La réponse inflammatoire aiguë est caractérisée par l'arrivée massive de neutrophiles suivie par l'arrivée de monocytes qui se différencient rapidement en macrophages. Ces mêmes neutrophiles sécrètent plusieurs types de chimiokines tels que l'IL-8 (interleukine-8) qui attirent davantage de neutrophiles au site inflammatoire. Par la suite, la réponse immunitaire innée est suivie de la réponse immunitaire adaptative. En effet, les lymphocytes activés par les antigènes ayant été drainés par le système lymphatique sont recrutés au site inflammatoire (Kumar, Cotran et Robbins, 1992 ; Janeway *et al*, 2001).

1.1.2 L'inflammation chronique

En situation idéale, l'inflammation aiguë devrait se résorber une fois l'infection contrôlée. Ainsi, la résolution implique un retour à une perméabilité vasculaire normale, un drainage lymphatique des fluides et des protéines plasmatiques ainsi qu'une phagocytose des neutrophiles apoptotiques et des débris nécrotiques par les macrophages. Dans certains cas, il se peut que l'inflammation aiguë ne soit pas résolue et que celle-ci progresse en inflammation chronique. Par exemple, une exposition à des matières inertes comme des particules de silice peut entraîner une inflammation de type chronique. C'est aussi le cas de plusieurs maladies impliquant une réaction contre des autoantigènes telles que l'arthrite rhumatoïde. Contrairement à la réponse inflammatoire aiguë, la réponse chronique implique un recrutement initial de cellules mononucléées telles que les macrophages, lymphocytes et plasmocytes. Cette réponse est également caractérisée par la destruction et la fibrose tissulaire. Celle-ci est causée par la libération d'enzymes protéolytiques telles que l'élastase ou la collagénase, de cytokines comme l'IL-1 ou le TNF (tumor necrosis factor) et de médiateurs lipidiques comme le PAF (platelet activating factor) par les macrophages activés. La réponse des macrophages peut être amplifiée par la présence de lymphocytes activés au site inflammatoire suite à une libération d'interféron- γ (IFN- γ). De la même manière, les plasmocytes peuvent également sécréter des anticorps contre un antigène persistant et activer les macrophages

ou les neutrophiles. Dans le cas d'une sécrétion d'IgE (immunoglobuline E), les éosinophiles peuvent aussi exacerber la réponse inflammatoire chronique suite à la libération de leur contenu granulaire, notamment de la MBP (major basic protein) (Kumar, Cotran et Robbins, 1992 ; Janeway *et al*, 2001 ; Serhan et Ward, 1999).

1.2 La réponse inflammatoire du neutrophile

Le neutrophile ou leukocyte polymorphonucléaire est une cellule très importante dans la résolution d'infections bactériennes et fongiques. Il est le premier type cellulaire à atteindre le site d'infection lors d'une inflammation aiguë. De la moelle osseuse jusqu'au site inflammatoire, le recrutement du neutrophile est finement régulé à plusieurs étapes. Plus précisément, le neutrophile est produit par un processus de différenciation à partir de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Puis, celui-ci doit quitter vers la circulation sanguine, rouler sur l'endothélium et traverser celui-ci, atteindre sa cible terminale par chimiotactisme et détruire l'élément pathogène par phagocytose et dégranulation.

1.2.1 La différenciation du neutrophile

La majeure partie de l'activité de la moelle osseuse est dédiée à la production de neutrophiles. En effet, 60% des cellules retrouvées dans ce compartiment sont de lignée neutrophilique (Edwards, 1994). La différenciation du neutrophile passe par différents stades soit le myéloblaste, le promyélocyte, le myélocyte, le métamyélocyte, band cell et finalement, le neutrophile mature segmenté. À mesure que la différenciation est avancée, les cellules perdent progressivement leur capacité de se diviser. Ce phénomène peut s'expliquer par la baisse d'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire tels que les CDK2, 4 et 6 (cyclin dependent kinase). Aussi, le neutrophile acquiert plusieurs types de granules lors de sa différenciation. D'abord, les granules azurophiliques apparaissent au stade promyélocytaire. Puis, les granules spécifiques et gélatinasiques sont formées au stade myélocytaire. Enfin, le neutrophile mature acquiert aussi des vésicules sécrétoires. La composition de ces granules et vésicules ainsi que leurs rôles chez le neutrophile constituent le sujet de la section 1.2.6. Ainsi, la différenciation du neutrophile entraîne

l'expression de nouvelles enzymes lytiques comme la BPI (bacterial permeability increasing protein) ou de nouveaux récepteurs tels que le CD18 (cluster of differentiation-18) impliqué dans l'adhésion. Ce processus est orchestré par l'expression séquentielle de plusieurs facteurs de transcription tels que C/EBP α (CCAAT-enhancer-binding protein- α), C/EBP ϵ , PU.1 ou GATA. En d'autres mots, la combinaison de l'un ou l'autre de ces facteurs entraîne l'expression de nouvelles protéines. Ces dernières permettent aux neutrophiles d'accomplir des fonctions très spécialisées essentielles à la réponse immunitaire. De plus, l'activation de ces facteurs de transcription serait gouvernée par la présence de facteurs de croissance tels que GM-CSF (granulocyte colony stimulating factor) ou de G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) dans la moelle osseuse (Theilgaard-Monch et al., 2005; Borregaard et Cowland, 1997).

1.2.2 La mobilisation à partir de la moelle osseuse

Il existe une grande réserve de neutrophiles matures dans la moelle osseuse. À titre indicatif, la réserve de neutrophiles contenus dans la moelle osseuse d'une souris est estimée à 120 millions de cellules, alors que la quantité de neutrophiles matures dans la circulation s'élève à moins de 2,5 millions. Il est à noter que la proportion de neutrophiles circulants par rapport aux leukocytes totaux chez la souris est de seulement ~20% alors qu'elle s'élève à plus de 60% chez les humains. Ainsi, il n'est donc pas étonnant de voir le nombre de neutrophiles circulant multiplié par 10 lors d'une infection. De ce fait, la mobilisation à partir de la moelle osseuse constitue une étape cruciale lors d'une infection. Pour atteindre la circulation sanguine, le neutrophile doit traverser l'endothélium sinusoidal de la moelle osseuse. Ce processus est effectué par un phénomène de migration transcellulaire plutôt que par passage intercellulaire. En effet, les jonctions serrées des cellules endothéliales de la moelle osseuse ne sont pas perturbées par le mouvement des neutrophiles vers la circulation sanguine. Le principal facteur de rétention des neutrophiles dans la moelle osseuse est la chimiokine SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1). Celle-ci est exprimée en grande quantité et de façon constitutive par les cellules stromales de la moelle osseuse. Les neutrophiles matures possèdent le récepteur au SDF-1 α , le CXCR4 (chemokine {CXC motif} receptor 4). Ainsi, il a été démontré que le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), un facteur de croissance, peut diminuer

l'expression de CXCR4 sur les neutrophiles, ce qui expliquerait sa capacité à stimuler la libération des neutrophiles de la moelle osseuse. Il est à noter que d'autres facteurs chimiotactiques tels que la leukotriène B₄ (LTB₄), le C5a, et l'IL-8 peuvent aussi induire une libération de neutrophiles matures vers la circulation sanguine (Furze et Rankin, 2008).

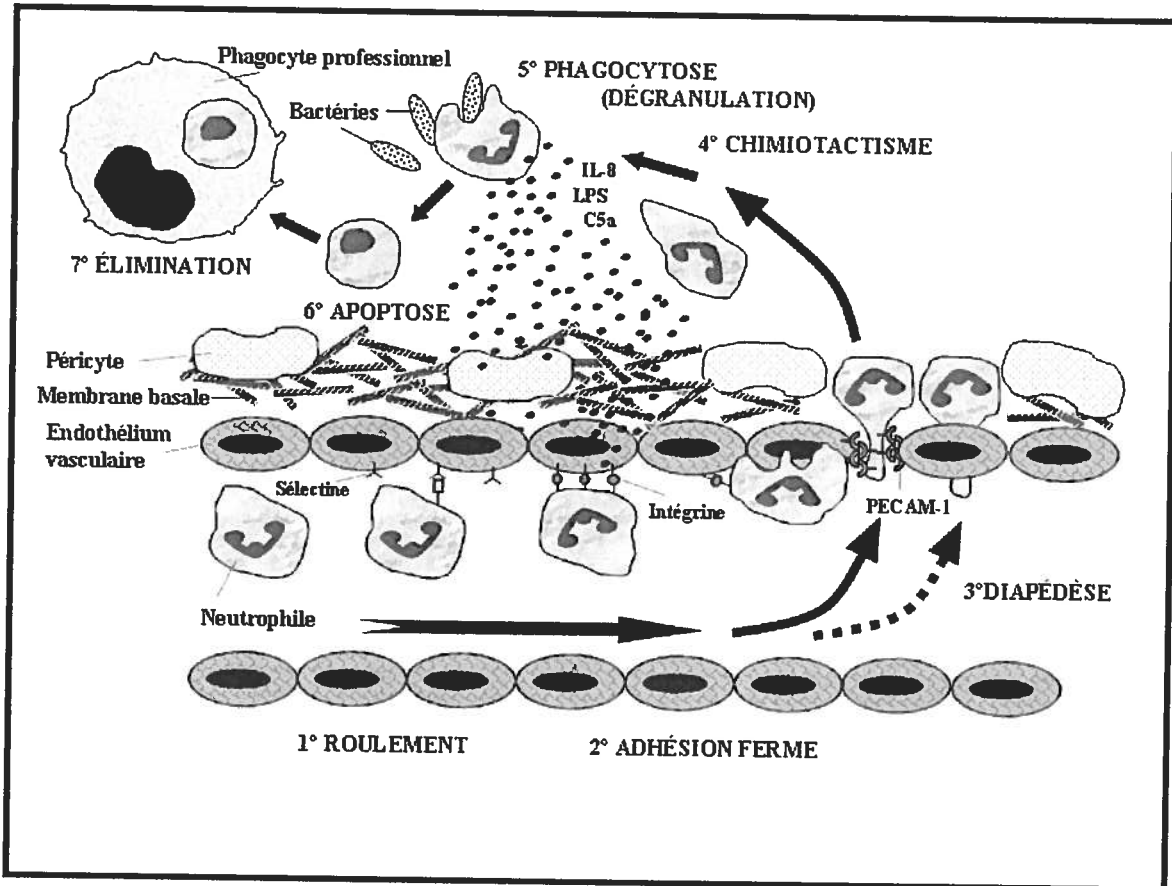


Figure 1 : La réponse inflammatoire. La réponse inflammatoire est guidée à plusieurs étapes, soit au niveau de l'adhésion à l'endothélium, de la diapédèse, du chimiotactisme, de la phagocytose, de l'apoptose et de l'élimination du neutrophile. (Inspiré de Edwards, 1994)

1.2.3 L'adhésion sur l'endothélium vasculaire

L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire est classiquement séparée en trois étapes, soit le roulement, l'activation et l'adhésion ferme. Depuis quelques années, plusieurs autres concepts tels que la capture, le roulement lent et la reptation intra-vasculaire se sont ajoutés afin de mieux définir ce phénomène (voir figure 1). Néanmoins,

par souci de clarté et de concision, seules les grandes étapes seront abordées dans ce chapitre.

D'abord, le roulement des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire permet le ralentissement de ces cellules et l'adhésion ferme. Les protéines responsables du roulement sont les sélectines, des glycoprotéines membranaires. Celles-ci interagissent avec la P-sélectine glycoprotéine ligand-1 (PSGL1) ainsi que d'autres ligands glycosylés. Les E- et P-sélectines sont exprimées sur l'endothélium activé tandis que la L-sélectine est présente sur la plupart des leukocytes. La PSGL1 présente sur les neutrophiles peut aussi agir avec la L-sélectine aussi exprimée sur ce leukocyte dans un processus appelé attachement secondaire. Ce processus permettrait le roulement des neutrophiles sur les cellules déjà adhérentes à l'endothélium. Les sélectines sont particulièrement adaptées à la capture des neutrophiles en mouvement puisque la liaison à ce type de protéine dépend d'une force vive. De la même manière, un ralentissement des cellules entraîne un détachement des sélectines.

La liaison aux sélectines induit un signal intracellulaire à la fois dans le neutrophile et dans la cellule endothéliale. Ce signal entraîne notamment l'activation des intégrines. Les cellules endothéliales activées par la thrombine ou l'histamine peuvent également produire une panoplie de molécules chimiotactiques telles que la PAF, le LTB₄ ou l'IL-8. Ces chimioattractants sont présentés à la surface des cellules endothéliales et activent des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G sur les neutrophiles. Cette liaison permet aussi l'activation des intégrines. Les intégrines sont des protéines transmembranaires impliquées dans la prochaine phase de la cascade adhésive, soit l'arrêt des neutrophiles. La sous-famille des β_2 -intégrines est tout particulièrement importante pour l'adhésion ferme du neutrophile. Cette sous-famille est composée d'hétérodimères de sous-unités α variables (CD11a, CD11b, CD11c) et une sous-unité β (CD18). Les β_2 -intégrines interagissent avec ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) sur les cellules endothéliales. Plusieurs agents chimiotactiques tels que l'IL-8, le C5a, le TNF- α ou le LPS (lipopolysaccharide) peuvent moduler l'adhésion par les intégrines. En effet, ces agents ont pour rôle à la fois d'augmenter la quantité de ces récepteurs à la

surface mais aussi de favoriser la mobilité de ces hétérodimères à la membrane plasmique. L'activation des intégrines implique également un changement de conformation du récepteur qui augmente l'affinité pour ICAM-1. Il est à noter que les β_2 -intégrines interagissent avec plusieurs protéines intracellulaires, notamment des protéines du cytosquelette et des récepteurs Fc (fragment cristallisable). Ainsi, les β_2 -intégrines sont aussi impliquées dans la phagocytose, la dégranulation, la flambée oxydative et l'apoptose (Ley et al., 2007; Cowburn et al., 2008; Burg et Pillinger, 2001; Witko-Sarsat et al., 2000).

1.2.4 La diapédèse et la migration interstitielle

Afin d'atteindre le site inflammatoire, le neutrophile doit traverser la membrane endothéliale. Ce processus est guidé par un phénomène appelé diapédèse. Lors de la diapédèse, le neutrophile emprunte généralement le chemin où il existe le moins de résistance. Il existe deux types de migration transendothéliale, soit la migration paracellulaire et la migration transcellulaire. Le type de migration emprunté dépend largement de la nature de la barrière vasculaire à franchir.

La migration paracellulaire est associée à une perturbation des liens entre les cellules endothéliales. Il existe deux types de protéines aux jonctions endothéliales impliquées dans la migration du neutrophile, soit les protéines des jonctions adhérentes et les protéines des jonctions serrées telles que les occludines et les claudines. Les neutrophiles peuvent détruire ces jonctions en exprimant à leur surface de l'élastase et ce, par un processus indépendant de la dégranulation. De cette façon, la désorganisation des protéines des jonctions serait très localisée au point de contact. Il semble aussi que l'interaction du neutrophile adhérent avec l'endothélium peut induire la formation d'espaces interendothéliaux. En effet, les neutrophiles adhérents induisent une augmentation de concentration en Ca^{2+} intracellulaire et une activation de la MLCK (myosin light chain kinase), ce qui active une contraction des cellules endothéliales. La présence d'interactions homophiliques entre protéines PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1), CD99 et protéines de la famille JAM (junctional adhesion

molécule) est aussi cruciale pour la transmigration endothéliale du neutrophile. Le type de protéines des jonctions impliqué dans cette migration dépend du stimulus inflammatoire. Par exemple, la migration en réponse à l'IL-1 β est guidée par les protéines PECAM-1, ICAM-2 et JAM-A, ce qui n'est pas le cas pour le TNF.

La présence d'une barrière endothéliale plus mince permet un deuxième type de migration, il s'agit de la diapédèse transcellulaire. Dans ce phénomène, des extensions membranaires s'étendent vers l'intérieur des cellules endothéliales. De plus, les cellules traversent le cytoplasme des cellules endothéliales grâce à des canaux membranaires continus nommés organelles vésiculo-vacuolaires. Ces structures de 50 à 100 nm de diamètre sont composées de cavéoles. Celles-ci sont stabilisées par une interaction avec des protéines du cytosquelette, plus précisément avec l'actine et la vimentine. La migration transcellulaire est un processus rapide (<1 min). D'après les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*, les migrations paracellulaire et transcellulaire sont toutes deux impliquées dans la migration à travers la barrière endothéliale. Il faut cependant noter que la diapédèse transcellulaire reste un modèle encore controversé, étant davantage associé à un phénomène observé *in vitro*.

Une fois la membrane endothéliale traversée, les neutrophiles doivent migrer à travers les tissus interstitiels afin d'atteindre le site d'infection. Cette migration est facilitée par la présence de régions en faible densité de protéines de la membrane basale. Ces régions sont situées entre les péricytes, des cellules de 150-200 μ m de largeur formant un réseau discontinu entourant les veinules post-capillaires. Ainsi, la locomotion du neutrophile est assurée par les β_1 , β_2 et β_3 -intégrines. Plus précisément, les récepteurs $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ interagissent avec la laminine, la fibronectine et la vitronectine respectivement. Ces récepteurs sont activés suite à la liaison de PECAM-1 à la surface du neutrophile assurant une coordination dans la séquence locomotrice. De plus, la présence de ces récepteurs à la surface du neutrophile est imputable à une dégranulation provoquée par différents agents chimiotactiques. En effet, le transit des neutrophiles dans l'espace interstitiel est guidé par un gradient chimiotactique de produits provenant de bactéries, de cellules mortes, de cellules stromales et épithéliales (Kvietys et Sandig, 2001; Ley et al., 2007).

1.2.5 Le chimiotactisme

Le mouvement polarisé des cellules à travers un gradient croissant d'un produit chimique est appelé chimiotactisme. Cette fonction est utilisée par le neutrophile pour atteindre, entre autres, les bactéries à éliminer. En général, le chimiotactisme est caractérisé par la formation de pseudopodes et la formation de nouvelles adhésions au substratum. La direction de migration est déterminée par la densité d'occupation des récepteurs aux agents chimiotactiques à un certain point à la surface de la cellule. La liaison des agents chimiotactiques tels que des peptides formylés bactériens à des récepteurs à sept passages transmembranaires, couplés aux protéines G, active la formation de messagers intracellulaires. De cette façon, le gradient extracellulaire est converti en gradient intracellulaire. Le principal messager intracellulaire qui s'accumule aux pseudopodes est le phosphatidylinositol(3,4,5)P₃. Celui-ci provient de l'activité de la PI3K (phosphoinositide-3 kinase). Ainsi, l'inhibition de la PI3K peut réduire le chimiotactisme du neutrophile. Cependant, l'utilisation de souris déficientes en PI3K γ ^{-/-} conjuguée à des inhibiteurs pour les PI3K β et PI3K δ a montré que cette kinase n'est pas essentielle pour le chimiotactisme. En effet, d'autres voies signalétiques pourraient compléter la voie de la PI3K dans ce phénomène, notamment la TORC2 et la PLA₂.

De façon plus macroscopique, le chimiotactisme serait guidé par deux phénomènes, soit l'apparition d'extensions dendritiques par la polymérisation de F-actine et la pression hydrostatique. La polymérisation de F-actine aux pseudopodes est suivie de la dépolymérisation aux extrémités antérieures de la cellule. Ce cycle permet à la cellule de recycler les monomères d'actine vers le front de la cellule pour former des élongations dendritiques. La formation de pseudopodes pourrait aussi être expliquée par un mécanisme mettant en jeu la pression hydrostatique. En effet, l'extension des pseudopodes peut aussi être observée en absence de polymérisation d'actine. Dans certains cas, la formation de bourgeonnement cellulaire est observable au point où l'actine se détache de la membrane plasmique. Ainsi, l'influx rapide de cytosol permet l'expansion de ce bourgeonnement. Ce processus serait dépendant de la myosine II. Pour

l'instant, on connaît très peu les éléments régulant la formation de bourgeonnement cellulaire par une force hydrostatique (Kay et al., 2008; Stephens et al., 2008).

1.2.6 La phagocytose et la dégranulation

Le but final au recrutement du neutrophile est l'élimination des bactéries ou champignons au site d'infection. Ce rôle est accompli par les fonctions de phagocytose et de dégranulation. Le neutrophile possède deux types de récepteurs phagocytiques. Il y a d'abord les récepteurs Fc γ , soit le Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32) ou le Fc γ RIIIB (CD16) qui permettent l'ingestion de cibles opsonisées par des anticorps IgG. D'autre part, il existe aussi les récepteurs CR1 (complement receptor) et CR3 qui sont responsables de la phagocytose des éléments recouverts de facteurs du complément. L'aggrégation des récepteurs Fc à la surface du neutrophile entraîne la phosphorylation des domaines cytoplasmiques ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) via l'activation de Src kinases. Ensuite, cette phosphorylation permet l'arrimage de la tyrosine kinase Syk (spleen tyrosine kinase). Ainsi, Syk peut activer plusieurs voies signalétiques. Par exemple, l'activation de Rho permet la formation d'une coupe phagocytique entourant la cible opsonisée. Plus précisément, RhoA (Ras homolog gene family, member A) est impliqué dans le recrutement de F-actine dans la coupe phagocytique. De plus, d'autres éléments tels que cdc42 (cell division cycle 42) et Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) sont aussi importants dans ce processus permettant l'extension de la membrane et la fermeture du phagosome respectivement. La phagocytose par les récepteurs du complément n'entraîne pas le même type de réponse que celle engendrée par les récepteurs Fc γ . En outre, l'ingestion de particules opsonisées par C3bi ne provoque pas de flambée oxydative ni de production de métabolites de l'acide arachidonique.

La dégradation des bactéries retrouvées dans le phagosome s'effectue par production de réactifs oxygénés (ROS) via l'activation de la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase et par dégranulation des protéines microbicides du neutrophile. La NADPH oxydase est un complexe multimérique composé de sous-unités distribuées dans différents compartiments chez le neutrophile quiescent. Il y a d'abord le

flavocytochrome b_{558} qui réside dans la membrane des granules spécifiques (85%), le reste se retrouvant dans la membrane des vésicules sécrétoires ou dans la membrane plasmique. Le flavocytochrome b_{558} est un hétérodimère composé de la sous-unité $gp91^{phox}$ et $p22^{phox}$ ($phox$ étant phagocyte oxidase). Ensuite, il existe les sous-unités cytosoliques $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $rac2$, en plus d'autres protéines régulatrices telles que la $p40^{phox}$ et la MRP8/14 (myeloid related protein 8/14). Lorsque le neutrophile est stimulé, la sous-unité $p47^{phox}$ est phosphorylée sur ses résidus sérine. Cette phosphorylation entraîne la translocation de la $p47^{phox}$ de même que les sous-unités $p40^{phox}$, $p67^{phox}$ et de $rac2$ vers la membrane. Une fois assemblé, le complexe de la NADPH oxydase permet le transfert d'un électron du NADPH cytosolique vers la membrane grâce au groupement hème présent sur la $gp91^{phox}$. Cet électron est transféré à l'oxygène moléculaire (O_2) pour générer un anion superoxyde (O_2^-) à l'intérieur du phagosome. Par la suite, plusieurs enzymes permettent la génération d'intermédiaires réactifs. Ainsi, l'anion superoxyde est dismuté en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'action de la superoxyde dismutase. Il est à noter que l'anion superoxyde peut aussi se dismuter de façon spontanée. Puis, le peroxyde d'hydrogène peut être converti en espèce encore plus microbicide, soit en HOCl par la myéloperoxydase présente dans les granules azurophiliques. Aussi, la réaction de l'anion superoxyde avec le peroxyde d'hydrogène peut générer, par la réaction de Haber-Weiss, le radical hydroxyl (OH^\cdot), un espèce hautement réactif. Ces différents intermédiaires dérivés de l'oxygène possèdent chacun leur spécificité ainsi que leur durée de vie. Par exemple, le HOCl peut générer des chloramines en réagissant avec des acides aminés, ce qui génère des espèces oxydantes à longue durée de vie.

La génération de réactifs oxygénés est très importante pour la destruction de bactéries et champignons par le neutrophile. En effet, la présence de mutation aux différentes constituantes de la NADPH oxydase entraîne des infections récurrentes. Ainsi, la maladie de granulomatose chronique X-CGD, affectant seulement les individus mâles, est causée par une mutation de la sous-unité $gp91^{phox}$. Il existe aussi d'autres formes de CGD affectant les sous-unités $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p22^{phox}$. Les patients atteints de CGD peuvent néanmoins éliminer la plupart des micro-organismes envahissants. Ceci démontre que la

capacité microbicide implique plusieurs autres mécanismes tels que l'activité des protéines granulaires.

La fusion des granules au phagosome entraîne non seulement l'assemblage de la NADPH oxydase mais aussi la libération de protéines microbicidales granulaires. Cette fusion intraphagosomale prévient la libération extracellulaire du contenu potentiellement toxique des granules. Il existe trois types de granules chez le neutrophile, soit les granules azurophiliques (primaires), spécifiques (secondaires) et gélatinasiques (tertiaires). En plus des granules riches en enzymes protéolytiques, le neutrophile contient des vésicules sécrétoires qui permettent de renflouer la membrane plasmique en protéines telles que les molécules d'adhésion. Ces vésicules pourraient être d'origine endocytaire puisqu'elles contiennent des protéines plasmatiques telles que l'albumine. Les granules sont formés à différents stades de la maturation du neutrophile. Ainsi, les granules azurophiliques sont les premiers à être formés au stade promyélocytaire suivies des granules spécifiques et gélatinasiques au stade myélocytaire, puis viennent les vésicules sécrétoires au stade du neutrophile mature.

Les granules sont composés d'une panoplie d'enzymes impliquées dans l'élimination des microorganismes. Par exemple, les granules azurophiliques contiennent la MPO (myéloperoxydase) ainsi que trois protéases neutres, la cathepsine G, l'élastase et la PR-3. On considère généralement les granules azurophiliques comme étant la principale source d'enzymes microbicidales. Par exemple, ceux-ci contiennent la BPI qui élimine *E. coli* en s'attachant au LPS et en perméabilisant la membrane de cette bactérie. Les granules spécifiques, pour leur part, contiennent des protéines comme la lactoférine qui séquestre le fer et le cuivre. Puis, les granules gélatinasiques renferment de la gélatinase comme les granules spécifiques, mais ne contiennent pas de lactoférine. En plus des granules, le neutrophile contient aussi des lysosomes qui renferment des hydrolases acides. Bien que les lysosomes se retrouvent dans la même fraction que les granules azurophiliques, ceux-ci doivent être considérés comme des entités distinctes. En effet, les lysosomes sont libérés beaucoup plus tardivement dans le phagosome que les granules azurophiliques. Il est également important de comprendre que le contenu des granules se chevauche. En

effet, certaines enzymes peuvent se retrouver chez deux types de granules différents. C'est le cas par exemple de la gélatinase, se retrouvant à la fois dans les granules spécifiques et gélatinasiques.

L'activation de la NADPH oxydase et l'activité des protéines granulaires peuvent aussi être classifiées comme étant respectivement des processus oxygène-dépendant et oxygène-indépendant. Néanmoins, plusieurs résultats démontrent que ces deux phénomènes sont interdépendants. Par exemple, l'activation de la NADPH oxydase et l'influx concomitant d'ions K^+ dans le phagosome entraînent une augmentation du pH et l'activation des protéases azurophiliques. En effet, la hausse du pH et du contenu en ions K^+ permet le détachement des enzymes cationiques attachées à la matrice de protéoglycans chargés négativement. Ainsi, on observe une altération des vacuoles phagocytiques chez les patients atteints de CGD. Alors que les vacuoles de cellules normales démontrent un patron plus diffus, celles de patients souffrant de CGD démontrent un aspect plus aggrégé. Ceci démontre qu'il existe un réel synergisme entre les mécanismes oxygène-dépendant et ceux oxygènes-indépendants dans la destruction de microorganismes par les neutrophiles (Segal, 2005; Nauseef, 2007).

1.2.7 Les NETs (neutrophil extracellular traps)

Récemment, un nouveau type d'action microbicide a été mis à jour pour le neutrophile. Il s'agit des NETs. Ces structures sont composées de filaments de chromatine d'un diamètre de 15 nm auxquelles sont rattachées des protéines granulaires. La chromatine constitue le squelette des NETs. En effet, l'ajout de DNase (et non de protéases) peut dégrader ces structures. La formation de NETs est induite par des produits tels que l'IL-8, le LPS, les bactéries, les champignons ou les plaquettes activées. En effet, il semble que l'activation simultanée de plusieurs types de récepteurs TLR (Toll-like receptor), de récepteurs aux cytokines ou de récepteurs Fc peut engendrer la formation de ces NETs. De plus, les ROS sont très importants dans ce processus puisque l'addition de diphénylène iodonium (DPI), un inhibiteur de la NADPH oxydase, ou l'ajout de catalase, qui dégrade le peroxyde d'hydrogène, peut renverser la formation de NETs. La formation de ces structures est très rapide, variant de 10 à 240 min selon les conditions expérimentales. Ainsi, l'apparition

des NETs s'effectue selon une séquence précise. Il y a dans un premier temps la formation de ROS suite à l'activation de récepteurs de surface. Puis, la membrane nucléaire se désintègre et forme une chaîne de vésicules. L'intégrité des membranes granulaires est aussi perturbée à ce stade. Ensuite, le contenu des granules se mélange à celui du noyau. À ce moment, le contenu nucléaire remplit la majorité de l'espace intracellulaire. Enfin, la cellule devient ronde, se contracte et libère les NETs.

Il est important de noter que l'apparition des NETs n'est pas associée à l'apoptose ni à la nécrose puisqu'il n'y a pas d'activation de caspases ou de dommage non-spécifique à la membrane cellulaire. L'action microbicide des NETs a été démontrée pour les bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*) et Gram-négatives (*Shigella flexneri* et *Salmonella typhimurium*) de même que pour les champignons (*Candida albicans*) et les protozoaires (*Leishmania amazonensis*). Celle-ci dépend de la présence d'ADN (acide désoxyribonucléique), plus précisément des histones. En somme, l'activité des NETs pourrait être complémentaire à la phagocytose et constituerait un deuxième mécanisme d'élimination des bactéries (Brinkmann et Zychlinsky, 2007; Guimaraes-Costa et al., 2009).

1.2.8 La génération de médiateurs inflammatoires par le neutrophile

Le neutrophile a longtemps été considéré comme une cellule au stade terminal de sa différenciation incapable de synthèse protéique. Il est maintenant bien connu que le neutrophile peut synthétiser une large gamme de cytokines, chimiokines et eicosanoïdes en réponse à différents stimuli. La réponse du neutrophile a un impact important sur le cours de la réponse inflammatoire, celui-ci étant le premier appelé au site inflammatoire et présent en grand nombre. Ainsi, il a été démontré que le neutrophile peut produire une importante quantité d'IL-8, ce qui a pour effet de recruter davantage de neutrophiles au site d'infection et amplifier la réponse immunitaire (Gainet et al., 1998). Aussi, les chimiokines sécrétées par ce leukocyte peuvent attirer d'autres types de cellules immunitaires. Par exemple, la sécrétion de défensines a pour effet de recruter des lymphocytes T ou des cellules dendritiques immatures (Chertov et al., 1996; Yang et al.,

2000) tandis que la libération de CCL3 ou CCL4 entraîne l'arrivée de monocytes (Kasama et al., 1993). Aussi, le type de chimiokines libérées par le neutrophile peut favoriser un état pro- ou anti-inflammatoire chez les macrophages. Il est donc de plus en plus reconnu que le neutrophile agit tel un chef d'orchestre en dirigeant le type de cellules recrutées au site inflammatoire. La sécrétion de chimiokines par le neutrophile peut être influencée par des cytokines de type Th1 ou Th2. Par exemple, l'IFN- γ (Th1) exerce un effet stimulateur sur la libération de cytokines, tandis que l'IL-10 (Th2) inhibe la sécrétion de TNF- α ou d'IL-8 (Cassatella et al., 1993). De plus, certaines cytokines telle que l'IL-15 peuvent retarder l'apoptose du neutrophile (Pelletier et al., 2002).

La production de prostaglandines et leucotriènes par le neutrophile a été identifiée il y a plusieurs années déjà (Goldstein et al., 1977; Orange et al., 1967). Depuis, il a été démontré que le neutrophile peut libérer de façon très rapide des prostaglandines, notamment en présence de cristaux de monosodium urate (Gilbert et al., 2003). Ces médiateurs peuvent inhiber plusieurs fonctions du neutrophile telles que le chimiotactisme (Rivkin et al., 1975) ou la productions d'anions superoxydes (Lehmeyer et Johnston, 1978). Également, le neutrophile est connu pour synthétiser en grandes quantités la leucotriène B₄ (LTB₄) à partir de l'activité de la 5-lipoxygénase. Le LTB₄, un puissant facteur de chimiotactisme, contribue à l'amplification de la réponse inflammatoire en favorisant le recrutement de neutrophiles supplémentaires. Enfin, la synthèse de médiateurs lipidiques par le neutrophile est régulée de façon temporelle, passant d'une synthèse de médiateurs pro-inflammatoires, tels que les leucotriènes à une libération de médiateurs favorisant la résolution de l'inflammation, soit les lipoxines (Levy et al., 2001), tel que décrit dans la prochaine section.

1.2.9 La résolution de l'inflammation

Lorsque le neutrophile a accompli sa tâche de phagocyte, celui-ci entre spontanément en apoptose. Le neutrophile apoptotique est ensuite éliminé de façon sécuritaire par les phagocytes professionnels environnants. Ainsi, le macrophage est en quelque sorte «reprogrammé» pour sécréter des facteurs anti-inflammatoires qui permettront la

résolution de l'inflammation. Par exemple, le macrophage peut libérer des cytokines proapoptotiques telles que FasL (Fas ligand) qui induiront l'apoptose des neutrophiles environnants (Brown et Savill, 1999). De plus, le macrophage ayant ingéré un neutrophile apoptotique libère la cytokine anti-inflammatoire TGF- β (transforming growth factor- β_1), ce qui peut inhiber la signalisation par les récepteurs TLR (Toll-like receptors) (Lucas et al., 2003). Ensuite, la résolution de l'inflammation implique aussi un changement du type de médiateurs sécrétés au site d'infection. Ainsi, une hausse d'adénosine au site inflammatoire représente probablement le signal le plus important pour débiter le phénomène de résolution. Le changement de médiateurs survient avant que le neutrophile entre en apoptose. C'est notamment le cas pour les médiateurs dérivés de l'acide arachidonique. Par exemple, la synthèse de leucotriène B₄, un médiateur pro-inflammatoire qui active le recrutement de neutrophiles, est graduellement diminuée pour être remplacé par la lipoxine A₄ qui joue le rôle contraire en retardant l'entrée des neutrophiles au site inflammatoire. La lipoxine A₄ est produite par un processus de synthèse transcellulaire impliquant une interaction des neutrophiles avec les plaquettes (Papayianni et al., 1995). Il est intéressant de noter que l'annexine-1, une protéine proapoptotique pour le neutrophile, peut aussi agir par le même récepteur que la lipoxine A₄ (Solito et al., 2003). Enfin, il existe d'autres médiateurs produits par les macrophages ayant ingérés des neutrophiles apoptotiques qui sont importants pour la résolution du phénomène inflammatoire. Parmi ceux-ci, on retrouve les résolvines et les protectines (Serhan et Savill, 2005; Nathan, 2002).

1.3 Maladies inflammatoires impliquant les neutrophiles

Tel que démontré dans la dernière section, le neutrophile est une cellule centrale dans l'inflammation. Celle-ci est recrutée en grande quantité en réponse à des molécules chimiotactiques telles que l'IL-8. De plus, le neutrophile possède un arsenal cytotoxique important. Bien que cette capacité destructrice soit bénéfique pour l'élimination d'infections bactériennes ou fongiques, celle-ci peut aussi s'avérer dommageable lorsqu'elle affecte les tissus environnants. Ainsi, il existe plusieurs maladies, dont plusieurs exemples seront présentés dans la section suivante, où le neutrophile joue un rôle clé dans la destruction tissulaire. Néanmoins, il faut noter que le neutrophile n'est pas

nécessairement à l'origine de ces maladies, comme c'est le cas lors de neutropénies congénitales, mais plutôt impliqué dans l'aggravation des symptômes observés.

1.3.1 L'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est l'une des maladies autoimmunitaires les plus communes. Celle-ci est caractérisée de façon macroscopique par un épaissement de la membrane synoviale, une destruction du cartilage et des lésions osseuses. De façon microscopique, l'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire impliquant les cellules B, T, les macrophages et les neutrophiles. Plus particulièrement, cette maladie est associée, à l'origine, à l'activation de cellules T CD4⁺ autoréactives. L'antigène responsable de l'activation de ces cellules n'est pas connu. Il pourrait être relié à l'exposition à certaines infections bactériennes (*Mycobacterium*) ou à certains virus (cytomegalovirus et virus d'Epstein-Barr). Toutefois, le développement de l'arthrite est aussi associé à certains facteurs génétiques tels que les locus DRB1 sur le gène HLA (human leukocyte antigen). Ainsi, les individus ayant les allotypes DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*0404 et DRB1*0405 ont quatre fois plus de chances de développer l'arthrite rhumatoïde. Cette maladie est aussi caractérisée par l'accumulation de complexes immuns. Ces complexes sont constitués d'anticorps IgG autoréactifs et du facteur rhumatoïde, un anticorps IgM qui réagit contre la portion Fc des IgG. Ainsi, l'accumulation de ces complexes immuns provoque l'activation des macrophages et la génération de fragments de facteurs du complément. La présence de cytokines comme l'IL-1 ou l'IL-8 sécrétées par les macrophages en plus des facteurs tels que le C5a a pour effet d'activer le neutrophile. Donc, les neutrophiles activés peuvent ensuite réagir contre les complexes immuns. Cette réaction implique la libération d'enzymes granulaires et la formation de ROS par le neutrophile. Ainsi, les neutrophiles sont responsables, en grande partie, de la destruction tissulaire observée dans l'arthrite rhumatoïde (Serhan et Ward, 1999 ; Edwards, 1994 ; Weissmann, 2004) .

1.3.2 Les vasculites associées aux ANCA

Il existe plusieurs maladies ou syndromes associés à la présence d'autoanticorps dirigés contre des protéines granulaires du neutrophile. Ces autoanticorps appelés ANCA sont classés en deux groupes, soit les P-ANCA et les C-ANCA. Ainsi, les P-ANCA démontrent une réactivité contre des antigènes périnucléaires et les C-ANCA, pour des antigènes cytoplasmiques. Plus précisément, il appert que la majorité des C-ANCA réagissent contre la PR3 (protéinase 3) et dans certains cas contre la BPI, l'élastase ou la cathepsin G, tandis que la cible principale des P-ANCA serait la MPO tel que basé sur des patrons obtenus par immunofluorescence. La présence de ces autoanticorps active une flambée oxydative et une dégranulation chez les neutrophiles via une interaction des fragments F(ab')₂ avec les protéines PR3 et MPO exprimées à la surface du neutrophile. Également, la portion Fc des autoanticorps ANCA peut aussi activer les neutrophiles par une interaction avec les récepteurs Fc, plus particulièrement les récepteurs FcγRIIa. Ce processus est dépendant d'une pré-activation suite à la présence de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 ou le TNF-α (tumor necrosis factor-α). Il a été démontré que la présence d'ANCA dans la circulation et l'activation subséquente des neutrophiles sont à l'origine de plusieurs types de syndromes tels que la granulomatose de Wegener, la polyangite microscopique (MPA) et le syndrome Churg-Strauss. L'origine de ces autoanticorps reste pour l'instant nébuleux. Il existe tout de même plusieurs hypothèses expliquant l'apparition des ANCA. D'abord, des facteurs génétiques comme la présence de certains allèles de HLA de classe II (DQw7, DR4) ainsi que le polymorphisme de l'alpha-1 antitrypsine pourrait mener à l'apparition de ces ANCA. De plus, ce processus pourrait aussi être provoqué par l'exposition à certains facteurs environnementaux tels que la silice (Hogan et al., 2001) ou certaines composés tels que l'hydralazine ou le propylthiouracil (Heeringa et Tervaert, 2004). Aussi, il a été remarqué qu'une grande proportion des patients atteints de vasculites associées aux ANCA sont porteurs de la bactérie *S. aureus*. Cette bactérie pourrait activer des cellules T autoréactives par la production de superantigènes. Enfin, d'autres mécanismes comme le mimétisme moléculaire ainsi qu'un défaut dans la reconnaissance des cellules apoptotiques et le relargage subséquent de nouveaux épitopes peuvent aussi expliquer la présence des ANCA (Kallenberg et al., 2002; Witko-Sarsat et al., 2000).

1.3.3 La fibrose kystique

La fibrose kystique est un désordre héréditaire provenant d'une mutation dans le gène codant pour la protéine CFTR (régulateur transmembranaire de la fibrose kystique) impliquée dans le transport des ions chlorures. Les patients atteints de fibrose kystique ont un mucus pulmonaire plus épais, ce qui les prédispose aux infections respiratoires notamment lors d'une exposition à *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, l'obstruction pulmonaire peut favoriser l'inflammation. De plus, cette inflammation, caractérisée par l'influx de neutrophiles peut induire un épaissement du mucus dans les poumons suite à la dégranulation d'enzymes protéolytiques, à la libération d'ADN de cellules en nécrose ou la sécrétion d'IL-8. On peut donc parler d'un cercle vicieux où les neutrophiles jouent un rôle majeur. Plusieurs étapes de la réponse inflammatoire sont perturbées chez ces patients. D'abord, il semble que le clivage de la L-sélectine soit perturbé chez ceux-ci, ce qui augmente le temps de contact avec l'endothélium. De plus, le niveau sérique de ICAM-1, le ligand endothélial des β_2 -intégrines sur les neutrophiles, est augmenté chez les patients souffrant de fibrose kystique, ce qui démontre la présence d'une inflammation chronique. Ensuite, les neutrophiles observés dans ce type de maladie sont plus facilement activables en présence de cytokines pro-inflammatoires. En effet, ceux-ci dégranuleront une plus grande quantité d'élastase suite à une incubation avec du TNF- α ou de l'IL-8 comparativement à des neutrophiles isolés d'individus sains. De plus, les neutrophiles de patients atteints de fibrose kystique sont beaucoup moins sensibles à l'effet de cytokines anti-inflammatoires, par exemple, à l'IL-10. Il a été démontré que les patients souffrant de fibrose kystique sont particulièrement susceptibles à l'infection par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Cette sensibilité s'explique par une diminution de la capacité phagocytaire du neutrophile, notamment par une baisse de la chlorination de protéines bactériennes. Paradoxalement, les différents produits bactéricides du neutrophile sont aussi responsables des dommages observés aux parois alvéolaires chez les patients atteints de cette maladie. Par exemple, il a été observé que les neutrophiles de malades souffrant de fibrose kystique libèrent une plus grande quantité de MMP-9 (métalloprotéase-9), une métalloprotéase impliquée dans la destruction tissulaire (Downey et al., 2009).

Enfin, il a aussi été observé que les neutrophiles de patients possédant la mutation $\Delta F508$ CFTR démontrent un retard important de leur apoptose constitutive (McKeon et al., 2008). Ainsi, ce retard permettrait la persistance des neutrophiles au site inflammatoire et pourrait expliquer la réponse exagérée de ces cellules lors de fibrose kystique. Ces résultats démontrent l'importance de l'apoptose des neutrophiles dans la résolution de l'inflammation. Ainsi, les mécanismes des voies apoptotiques constituent le sujet du deuxième chapitre de cette synthèse.

Chapitre 2 : L'apoptose

L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée, est un processus essentiel à l'entretien des tissus et au développement normal de l'embryon. Ce phénomène est aussi très important dans l'élimination des cellules infectées et des cellules porteuses de mutations. De plus, l'apoptose permet d'équilibrer la prolifération cellulaire en maintenant un nombre constant de cellules destinées au renouvellement des tissus. Par exemple, le nombre important de neutrophiles produit par la moelle osseuse est équilibré par l'apoptose constitutive de ces cellules. Contrairement à la nécrose qui provoque une destruction cellulaire non-spécifique et passive, l'apoptose est un processus actif qui dépend de l'activité enzymatique de protéases incluant les caspases. Le nom caspase provient du fait que leur activité catalytique dépend d'une chaîne cystéine et que le site de clivage se situe précisément après des résidus aspartates. L'apoptose se caractérise également par le maintien de la perméabilité membranaire, le clivage de l'ADN en fragments de 180 pb et l'apparition de marqueurs à la surface externe tels que les phosphatidylsérines qui activent la phagocytose par les macrophages. Il existe deux voies classiques d'induction de l'apoptose, soit la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Depuis quelques années, d'autres voies apoptotiques, comme celle de la voie du RE, ont aussi été identifiées. Ainsi, dans ce chapitre, les différentes voies apoptotiques seront d'abord expliquées en détails. Puis, les particularités des voies apoptotiques du neutrophile seront mises à jour.

2.1 Les récepteurs de mort : la voie extrinsèque

La voie apoptotique extrinsèque implique la liaison de récepteurs membranaires dénommés «récepteurs de mort» par leurs ligands respectifs. Il existe six types de récepteurs de mort connus à ce jour. Les récepteurs ainsi que leurs ligands respectifs sont présentés au tableau I. Ces récepteurs de mort font partie de la superfamille du récepteur au TNF (tumor necrosis factor). Ainsi, ceux-ci se caractérisent par un bout N-terminal extracellulaire de 2 à 4 répétitions riche en cystéine responsable de la liaison aux ligands

Récepteurs	Ligands	Adaptateurs
TNFR1	TNF, LT α	TRADD
CD95 (Fas)	CD95L (FasL)	FADD
DR3	TL1A	TRADD
DR4 (TRAIL R1)	Apo2L/TRAIL	FADD
DR5 (TRAIL R2)	Apo2L/TRAIL	FADD
DR6	?	TRADD ?

Tableau 1 : Les classes de récepteurs de mort. Il existe plusieurs combinaisons de récepteurs et de ligands de mort permettant le recrutement de molécules adaptatrices et l'activation des caspases-8 et -10 (Selon Medema, 2007).

de mort. Également, ceux-ci possèdent une portion intracellulaire composée d'un domaine de mort d'une longueur de 60 à 80 acides aminés. La liaison du ligand à son récepteur entraîne la trimérisation des récepteurs de mort et le recrutement d'une protéine adaptatrice. Cette interaction s'effectue grâce à la portion C-terminale sur la protéine adaptatrice qui possède le même domaine de mort que le récepteur. Ainsi, il existe deux protéines adaptatrices connues à ce jour, soit la FADD (Fas associated death domain) et la TRADD (TNF receptor associated death domain). Les récepteurs CD95 (Fas), DR4 (death receptor-4) et DR5 permettent le recrutement de FADD tandis que les récepteurs TNFR1 et DR3 attirent TRADD. Le récepteur DR6, quant à lui, pourrait recruter TRADD lorsque surexprimé. Sa réelle protéine adaptatrice reste toutefois à déterminer. Ces protéines adaptatrices ne possèdent pas d'activité enzymatique. Par contre, celles-ci peuvent recruter la procaspase-8 ou 10 par une interaction avec les domaines effecteurs de mort présents à la fois chez les deux types de protéines. Le complexe protéique ainsi formé est appelé DISC (death inducing signaling complex) (Medema et al., 1997). À mesure que les procaspases-8 ou 10 sont recrutées au DISC, un processus de transcatalyse permet l'autoclivage de ces procaspases en caspases actives. On considère la caspase-8 comme une caspase initiatrice, c'est-à-dire qu'elle est la première à être activée. Chez les cellules de type I, la caspase-8 est fortement activée et peut directement cliver les

caspases exécutrices 3, 6 ou 7. Par contre, chez les cellules de type II, la caspase-8 doit d'abord cliver des facteurs mitochondriaux comme Bid pour activer les caspases exécutrices. Ainsi, l'apoptose peut être renversée en surexprimant Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ou Bcl-X_L chez les cellules de type II contrairement aux cellules de type I (Barnhart et al., 2003). L'activation des caspases exécutrices entraîne le clivage de plusieurs types de substrats tels que des protéines du cytosquelette (vimentine, lamine), des protéines de signalisation (MAPK) et des protéines nucléaires (PARP = poly {ADP-ribose} polymerase) (Papenfuss et al., 2008 ; MacFarlane, 2003).

Il existe plusieurs facteurs régulant l'activation des récepteurs de mort. D'abord, la protéine c-FLIP (cellular-FLICE inhibitory protein) possède deux domaines effecteurs de mort qui permettent sa liaison à la protéine FADD. De plus, la portion C-terminale de c-FLIP, bien que semblable à la caspase-8, ne possède pas de séquence catalytique. Ainsi, lorsque présente en grande quantité, la protéine c-FLIP peut inhiber le recrutement de la caspase-8 au DISC. C'est plus précisément le cas pour la forme longue de c-FLIP identifiée c-FLIP_L. Ainsi, certaines cellules cancéreuses démontrent une résistance au ligand de mort TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) car elles possèdent un ratio c-FLIP vs caspase-8 très élevé. Ensuite, les protéines de la famille des IAP (inhibitors of apoptosis) telles que XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 sont également des régulateurs négatifs des voies de récepteurs de mort. En effet, les protéines IAP inhibent directement les caspases initiatrices et effectrices. Un troisième niveau de régulation négative de la voie des récepteurs de mort implique l'activation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor- κ B). Plus précisément, le recrutement de TRADD aux récepteurs de mort TNFR1 ou DR3 entraîne la formation d'un complexe impliquant les protéines RIP1 (receptor-interacting protein-1), TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) et cIAP-1 et -2. Ce complexe a la capacité d'activer les MAPK (JNK et p38) et NF- κ B, ce qui active la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire tels que les cIAP-1 et -2. Il faut cependant noter que la protéine adaptatrice TRADD ne possède pas un rôle exclusivement anti-apoptotique. En effet, lorsque TNFR1 est lié, son internalisation permet le détachement de RIP1 et TRAF2, ce qui permet à FADD de s'attacher au récepteur et entraîne le recrutement et l'activation de la caspase-8. Il est

aussi intéressant de noter que l'activation des voies MAPK lors de la liaison aux récepteurs de mort peut aussi provoquer la production de cytokines et de chimiokines comme l'IL-8 ou MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1). Ces facteurs attireront des monocytes qui faciliteront l'élimination des cellules apoptotiques (Ashkenazi et Dixit, 1998).

2.2 La voie mitochondriale

La mitochondrie est le site où a lieu le cycle du citrate et la phosphorylation oxydative. Ainsi, le transfert d'électrons à plusieurs sous-unités protéiques de la membrane interne mitochondriale, dont le cytochrome c, permet la formation d'ATP (adénosine triphosphate). En plus de son implication dans la production d'énergie, la mitochondrie possède également un rôle dans l'apoptose. En effet, le signal à l'origine de la voie intrinsèque apoptotique est la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial. Cette libération est provoquée par une perturbation de la perméabilité membranaire mitochondriale. Il est à noter que d'autres protéines peuvent aussi être libérées de l'espace intermembranaire mitochondrial. C'est le cas, par exemple, de Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) et HtrA2/Omi qui inhibe les IAPs. Il existe un canal localisé dans la membrane externe de la mitochondrie appelé VDAC (voltage dependent anion channel) qui permet le passage du cytochrome c. La conformation de ce canal est régulée par certaines protéines de la famille Bcl-2, plus précisément les protéines Bax et Bak (Shimizu et al., 1999). Également, les facteurs Bax et Bak peuvent aussi former des oligomères et créer des pores dans la membrane mitochondriale. Ainsi, les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'activation de la voie intrinsèque apoptotique.

Il y a deux types de protéines dans la famille Bcl-2 : les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques. Parmi les protéines anti-apoptotiques, on retrouve les protéines Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) et A1. Ces dernières possèdent des similitudes au niveau de certaines séquences nommées BH (Bcl-2 homology). Les

protéines anti-apoptotiques peuvent avoir jusqu'à quatre domaines BH en commun. De leur côté, les protéines pro-apoptotiques se divisent en deux catégories. D'abord, il y a celles possédant des homologies aux domaines BH1-BH3 telles que Bax, Bak, Bok, Bcl-rambo et celles qui n'ont que le domaine BH3 de commun telles que les protéines Bik, Bad, Bid, Bim, Hrk, Noxa et Puma (Tsujimoto, 2003). Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être activées suite à plusieurs types de stimuli nocifs tels qu'un dommage à l'ADN ou une absence de facteurs de croissance. Cette activation peut mener à une augmentation de la synthèse, à un changement de la localisation cellulaire ou à une modification post-traductionnelle de ces facteurs. Par exemple, un dommage à l'ADN provoque l'activation de p53. Cette protéine peut ensuite activer la synthèse de Puma et Noxa, deux protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Nakano et Vousden, 2001; Oda et al., 2000). L'activation de facteur pro-apoptotique peut aussi impliquer une déphosphorylation (Bad) ou un clivage (Bid). Enfin, la protéine Bim est libérée des microtubules suite à une irradiation gamma provoquant l'apoptose (Puthalakath et al., 1999). La balance des facteurs pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 contrôle la libération du cytochrome c. Ainsi, des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-x_L se lient aux facteurs pro-apoptotiques tels que Bax ou Bak (Cheng et al., 2001), ce qui empêche la formation de pores dans la membrane mitochondriale. Aussi, certaines protéines pro-apoptotiques ne participent pas directement à l'élaboration de pores. En effet, celles-ci peuvent agir à titre de facteurs sensibilisants en empêchant l'effet de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. C'est le cas pour la protéine Bim (Terradillos et al., 2002).

De la même manière que le complexe DISC constitue une plate-forme pour l'activation de la caspase-8 ou -10, l'apoptosome permet le recrutement et l'activation de la caspase-9. Ce complexe est formé de sept molécules de Apaf-1 liées en présence de dATP et de cytochrome c (voir figure 2). Plus précisément, Apaf-1 est formée de trois domaines, soit la portion CARD (caspase-recruitment domain) et NOD (nucleotide-binding and oligomerization domain) ainsi que plusieurs motifs WD40 (Riedl et Salvesen, 2007). La région CARD est responsable de la liaison et du recrutement de la caspase-9. Pour sa part, la portion centrale NOD possède une région AAA+ ATPase qui permet l'oligomérisation

de l'apoptosome tandis que les motifs WD40 se lient au cytochrome c. Ainsi, la formation de l'apoptosome est d'abord régulée par la liaison du cytochrome c à la portion WD40. Ceci a pour effet de dégager Apaf-1 en un état semi-verouillé. Dans cette position, Apaf-1 est toujours incapable de s'oligomériser (Yu et al., 2005). En effet, un deuxième signal est requis pour induire la formation de l'apoptosome. Il s'agit de la présence de (d)ATP. La balance (d)ADP-(d)ATP agirait donc comme un second mécanisme contrôlant l'activation de l'apoptosome. En présence de (d)ATP, les domaines CARD de sept molécules d'Apaf-1 peuvent s'oligomériser et former un arrangement circulaire qui permet le recrutement et l'activation de la caspase-9 (Hu et al., 1999).

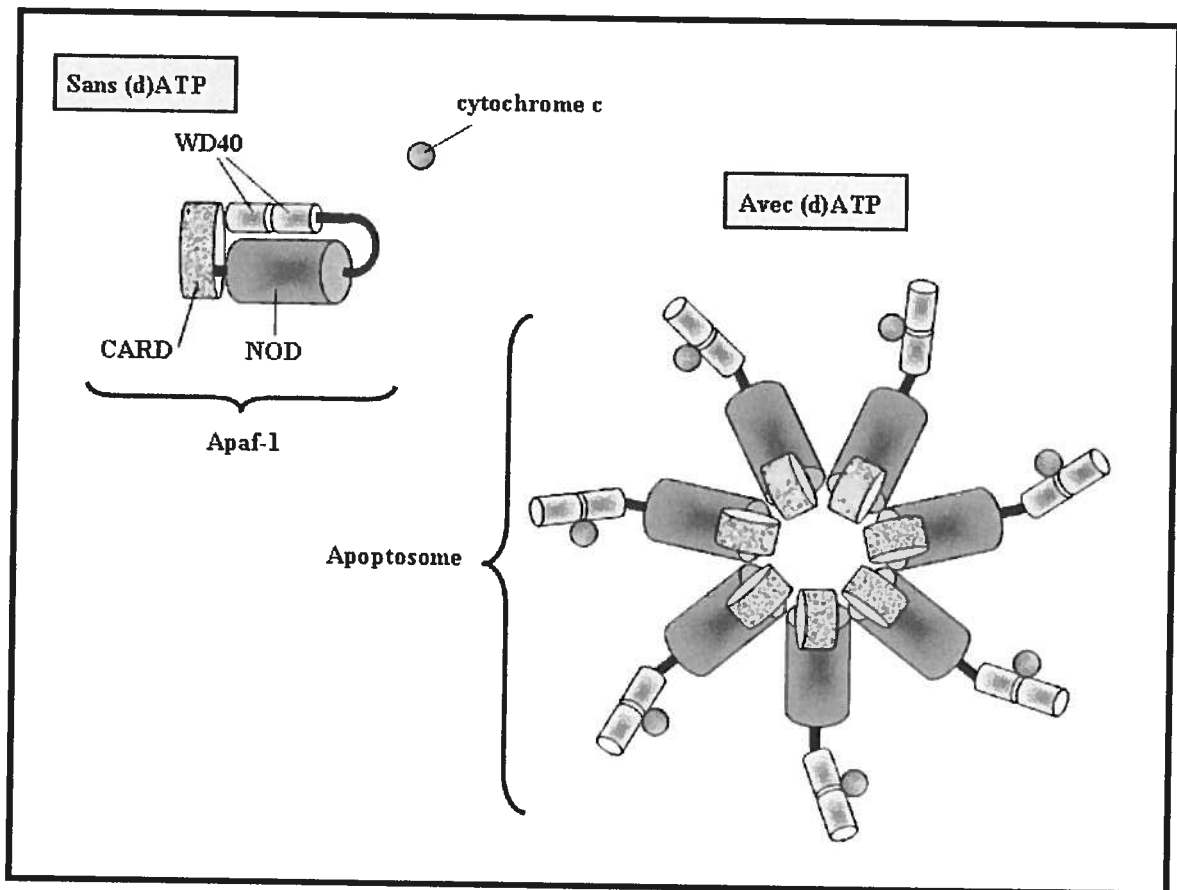


Figure 2 : La formation de l'apoptosome. La présence de (d)ATP et de cytochrome c permet l'oligomérisation des domaines CARD et l'assemblage de l'apoptosome. (Inspirée de Riedl et Salvesen, 2007)

Les voies apoptotiques se caractérisent par deux niveaux d'activation. D'abord, il y a une phase initiatrice caractérisée par la formation de récepteurs de mort et l'activation des caspases 8 ou 10 pour la voie extrinsèque ou la génération de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9 dans le cas de la voie intrinsèque. Puis, il y a une phase exécutive qui implique l'activation de caspases telles que la caspase-3, -6 ou -7 qui clivent directement des substrats cellulaires comme des protéines du cytosquelette ou des protéines de signalisation. L'activation des caspases initiatrices ou exécutive s'opère par deux mécanismes distincts. Dans le cas des caspases exécutive, deux clivages sont nécessaires pour cette opération. Ce processus permet la libération de la portion N-terminale et la formation d'une petite et large sous-unité (Riedl et Shi, 2004). Dans le cas des caspases initiatrices, il semble que celles-ci puissent aussi être clivées. Par contre, leur activité serait davantage stimulée suite à une dimérisation plutôt qu'à un clivage. De cette façon, la dimérisation permettrait la formation d'un site actif (Renatus et al., 2001). Ainsi, dans le cas de la voie intrinsèque, l'assemblage de l'apoptosome génère une plate-forme qui permet la dimérisation et l'activation de la caspase-9. Ce recrutement est essentiellement dû à la présence et à l'exposition des domaines CARD sur Apaf-1.

2.3 La voie du stress au RE

La principale fonction du RE est de permettre le repliement des protéines transmembranaires ou sécrétées. L'entrée des protéines dans la lumière du RE est un processus finement régulé. En effet, l'influx des polypeptides nascent vers l'intérieur du RE doit être équilibré avec la quantité de chaperones nécessaire au bon repliement des protéines. Le maintien de cet équilibre est vital pour la cellule. Ainsi, on observe qu'une accumulation de protéines mal repliées peut ultimement mener à une troisième voie alternative d'apoptose, soit la voie du stress au RE. Il existe trois types de senseurs détectant la présence de protéines mal repliées à l'intérieur du RE, soit les protéines PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), IRE1 (inositol-requiring protein-1) et ATF6 (activating transcription factor-6). Ces trois senseurs sont des protéines transmembranaires dont la partie luminaire interagit avec les protéines mal repliées et dont le domaine cytosolique transmet le signal de stress vers le noyau (voir

figure 3). Ces voies font partie de la réponse aux protéines mal repliées (aussi connues sous le nom de *unfolded protein response* ou *UPR*) (Ron et Walter, 2007).

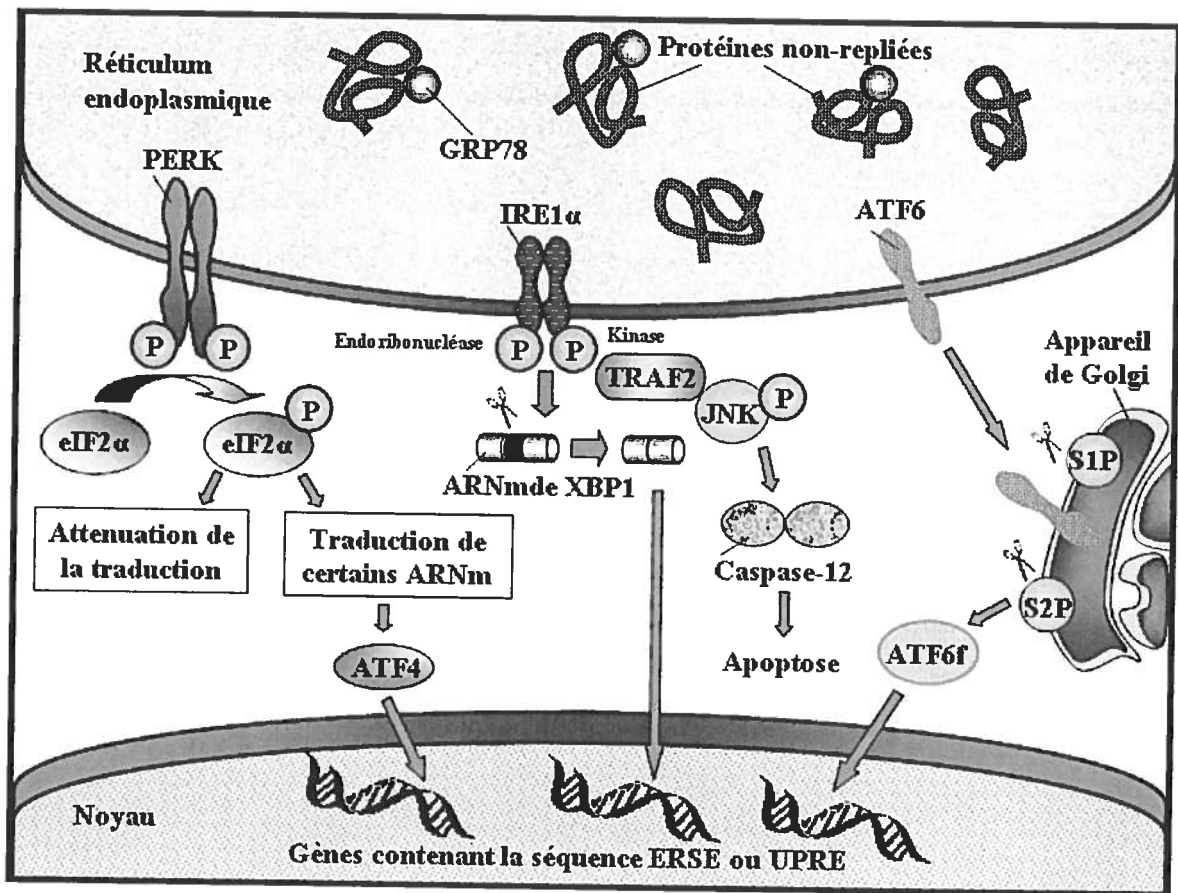


Figure 3 : Les trois voies de l'UPR. L'accumulation de protéines mal repliées dans le RE peut induire les trois voies de l'UPR, soit les voies de PERK, IRE1α et d'ATF6. (Inspirée de Ron et Walter, 2007)

2.3.1 La voie de PERK

Une accumulation de protéines mal repliées provoque d'abord un arrêt de la synthèse protéique. Cet arrêt permet à la cellule de terminer le repliement des protéines déjà présentes dans le RE. La protéine PERK est responsable de cet arrêt. En effet, PERK est une kinase qui phosphoryle la sous-unité α de eIF2 (eukaryotic initiation factor 2) sur le résidu sérine 51. Cette phosphorylation empêche le recyclage de eIF2 en forme GTP liée. Ainsi, la formation d'un complexe tertiaire composé de eIF2 et de méthionyl-ARNt chargé est compromise, ce qui empêche l'initiation de la traduction au codon AUG et

l'assemblage du ribosome 80S (Harding et al., 1999). L'activation de PERK, mais aussi des deux autres voies de l'UPR, requièrent un détachement de Grp78 (glucose regulated 78kDa protein). En conditions normales, Grp78, une protéine chaperone, est associée aux trois senseurs de l'UPR. Par contre, lorsqu'il y a amoncellement de protéines mal repliées, Grp78 se détache des protéines PERK, IRE1 α et ATF6 pour s'attacher à ces polypeptides nascents à l'intérieur du RE (Bertolotti et al., 2000). Ainsi, en absence de Grp78, PERK peut s'homodimériser et se *trans*-phosphoryler, ce qui génère une kinase capable de phosphoryler eIF2 α (Harding et al., 2000). Il est aussi important de comprendre que la phosphorylation de eIF2 α peut également induire la traduction de certains types d'ARNm (acide ribonucléique messenger) contenant des séquences régulatrices particulières. C'est le cas pour la protéine ATF4 qui contient une séquence de lecture courte (short open reading frame) dans sa partie 5' non-traduite (Lu et al., 2004). ATF4 est un facteur de transcription qui induit l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport d'acides aminés, la réponse au stress oxydatif et l'apoptose induite suite à un stress au RE (Harding et al., 2003; Lewerenz et Maher, 2009).

En plus de PERK, il existe trois autres kinases pouvant phosphoryler eIF2 α et provoquer l'arrêt de la synthèse protéique chez les vertébrés. On retrouve GCN2 (general control non-derepressible-2) qui est activée lors d'un manque en acides aminés, HRI (haem-regulated inhibitor) lors d'un déséquilibre dans la synthèse de hème et de globine chez les cellules de lignées érythrocytaires et PKR (phosphorylated double-stranded RNA-dependent protein kinase) lors d'une infection virale. Par contre, seul PERK peut vraiment être reliée au stress du RE découlant d'un amoncellement de protéines non repliées ou mal repliées (Ron et Harding, 2007). L'arrêt de la synthèse protéique dirigé par l'activation de PERK est un phénomène transitoire et réversible. En effet, il existe deux complexes pouvant déphosphoryler eIF2 α . D'abord, on retrouve un complexe présent de façon constitutive formé d'une sous-unité régulatrice eIF2 α spécifique (CReP) et une sous-unité catalytique protéine phosphatase I (PP1c) (Jousse et al., 2003). Puis, chez les cellules soumises à un stress, la phosphorylation de eIF2 α induit l'expression d'une seconde sous-unité régulatrice, la GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible gene-34) qui interagit avec PP1c et augmente grandement la déphosphorylation

de eIF2 α (Novoa et al., 2001). Ce mécanisme de régulation négative permet le rétablissement de la synthèse protéique et un retour à la normale durant la phase tardive d'un stress au RE. Il est à noter qu'une phosphorylation soutenue de eIF2 α peut entraîner l'activation de NF- κ B. En effet, la demi-vie de I κ B étant plus courte que celle de NF- κ B, un arrêt de la traduction induit une augmentation du ratio NF κ B / I κ B (Deng et al., 2004). Conséquemment, NF κ B peut transloquer vers le noyau et activer la transcription de gènes pro-inflammatoires.

2.3.2 La voie de IRE1

Des trois voies de l'UPR, celle impliquant IRE1 est la plus conservée au niveau évolutif. IRE1 est une protéine transmembranaire de ~110 kDa qui existe sous deux isoformes, soit une isoforme IRE1 α exprimée de façon ubiquitaire et une isoforme IRE1 β retrouvée exclusivement chez les cellules épithéliales gastriques (Bertolotti et al., 2001). Le domaine cytoplasmique de IRE1 possède une activité sérine/thréonine kinase ainsi qu'une activité endoribonucléase C-terminale (Shamu et Walter, 1996; Papa et al., 2003). Ainsi, tel que décrit auparavant pour la kinase PERK, la dissociation de la protéine Grp78 permet l'oligomérisation et la *trans*-phosphorylation de la protéine IRE1. Il est à noter que la présence de protéines mal repliées peut directement activer l'oligomérisation de IRE1 (Credle et al., 2005). Ainsi, l'activation de la capacité endoribonucléasique de IRE1 permet l'excision d'une séquence nucléotidique de 26 paires de bases dans l'ARNm de XBP-1 (X-box binding protein 1). Cet ARNm est le seul substrat connu pour l'activité endoribonucléasique de IRE1. L'excision dans l'ARNm de XBP-1 entraîne un décalage dans la séquence de lecture (shift of reading frame) et permet la formation d'un facteur de transcription actif (Yoshida et al., 2001; Calton et al., 2002). D'autre part, le facteur de transcription XBP-1 non-excisé possède la même séquence de localisation nucléaire ainsi que le domaine bZIP (basic leucine zipper) d'attachement à l'ADN et de dimérisation que XBP-1 excisé. Par contre, la forme non-excisée de XBP-1 ne dispose pas du domaine transactivateur qui promeut la transcription génique. Ainsi, XBP-1 non-excisé peut agir comme un régulateur négatif et empêcher l'action de XBP-1 excisé (Yoshida et al., 2006).

Une fois transloqué au noyau, XBP-1 s'attache à des éléments UPR (UPRE) sur l'ADN. Parmi les gènes possédant ces éléments, on retrouve des gènes codant pour des protéines impliquées dans la dégradation des protéines telles que EDEM (endoplasmic reticulum degradation enhancing alpha-mannosidase-like protein), des protéines de types chaperones telles que ERdj4 et des protéines impliquées dans la formation de ponts disulfures telles que PDI-P5 (protein disulfide isomerase) (Lee et al., 2003). Ainsi, l'action principale de XBP-1 est d'augmenter la capacité de repliement des protéines dans le RE ou de favoriser la dégradation des protéines mal repliées. Tel que décrit précédemment, IRE1 α possède également une activité kinase. Lorsqu'il y a oligomérisation et autophosphorylation de IRE1 α , TRAF2, une protéine adaptatrice, se lie au complexe. Cette dernière permet le recrutement et l'activation de JNK (Urano et al., 2000). La kinase JNK est connue pour induire l'expression de gènes inflammatoires en phosphorylant le facteur de transcription AP-1. De plus, JNK peut également stimuler l'apoptose lors d'un stress important au RE en activant la caspase-12 (voir la section 2.3.4).

2.3.3 La voie de ATF6

Il existe deux protéines ATF6 chez les mammifères, ATF6 α et ATF6 β . La protéine ATF6 α est une protéine transmembranaire contenant un domaine cytosolique bZIP et un domaine intraRE de localisation dans l'appareil de Golgi (Haze et al., 1999). Ainsi, lorsque Grp78 se dissocie de ATF6 α , la séquence de localisation est démasquée. Ceci permet la translocation de ATF6 α dans l'appareil de Golgi. Puis, les protéases S1P (site-1 protéase) et S2P (site-2 protéase) présentes dans l'appareil de Golgi peuvent cliver ATF6 α et générer un fragment ATF6f qui se déplace au noyau (Ye et al., 2000). ATF6f est responsable de l'induction de gènes contenant des séquences de réponse au stress au RE (ERSE). Parmi ces gènes, on retrouve Grp78 et XBP-1 (Yoshida et al., 1998). Ainsi, la voie de l'ATF6 peut amplifier la réponse guidée par XBP-1. De même, celle-ci peut permettre le rétablissement de l'homéostasie dans le RE en augmentant l'expression de Grp78. Il existe aussi d'autres facteurs transmembranaires du RE pouvant subir la même translocation et le même clivage que ATF6. C'est le cas de CREBH (cyclic AMP-

responsive element binding protein in hepatocyte). Ainsi, un stress au RE peut également induire le clivage et l'activation de CREBH, ce qui induit la formation de protéines de réponse de phase aiguë (acute phase proteins) (Zhang et al., 2006). De la même manière que l'axe IRE1 α -TRAF2-JNK, ceci démontre qu'un stress au RE peut induire une réponse pro-inflammatoire.

2.3.4 L'activation de l'apoptose par les voies de l'UPR et le stress au RE

Plusieurs agents sont connus pour induire l'apoptose en infligeant un stress au RE. Par exemple, la tunicamycine inhibe la N-glycosylation des protéines, la brefeldine A bloque le transport de l'appareil de Golgi vers le RE tandis que le thapsigargin inhibe les pompes calciques du réticulum endoplasmique/sarcoplasmique (SERCA). Le lien entre l'induction de l'apoptose et le stress au RE a été élucidé en partie suite à la découverte de la caspase-12. Cette caspase est exprimée de façon ubiquitaire et formée d'une sous-unité régulatrice et de deux sous-unités catalytiques p20 et p10 (Van de Craen et al., 1997). Sa particularité tient du fait qu'elle est spécifiquement clivée lors d'un stress au RE. De plus, celle-ci se retrouverait attachée à la face cytosolique du RE. Ainsi, la caspase-12 pourrait agir à titre de caspase initiateur dans cette voie apoptotique (Nakagawa et al., 2000). Tel que décrit précédemment, la caspase-12 pourrait être activée suite à une interaction avec TRAF2 (Yoneda et al., 2001). Il est à noter également que la caspase-12 peut cliver la caspase-9 *in vitro*, ce qui active la voie intrinsèque apoptotique (Morishima et al., 2002). Néanmoins, il a été démontré que le gène codant pour la caspase-12 a acquis certaines mutations délétères menant à une protéine non fonctionnelle chez l'humain (Fischer et al., 2002). Ainsi, la caspase-4 a été proposée comme étant l'orthologue humain de la caspase-12. Tout comme cette dernière, la caspase-4 est présente au RE et est activée spécifiquement suite à un stress au RE (Hitomi et al., 2004). Enfin, la caspase-2 est aussi impliquée dans l'activation de cette voie apoptotique. En effet, celle-ci est présente au RE (Cheung et al., 2006) et permet le clivage et l'activation de la protéine pro-apoptotique Bid. Ainsi, la caspase-2 agit comme une caspase initiateur en amont de la mitochondrie lors d'un stress au RE (Upton et al., 2008).

Les voies de l'UPR sont, à la base, cytoprotectrices ayant pour but de rétablir l'homéostasie du repliement des protéines dans le RE. Par contre, lorsque la quantité des protéines mal repliées excède un certain niveau, les voies de l'UPR peuvent aussi induire l'apoptose. Le principal facteur pro-apoptotique issu des voies de l'UPR identifié à ce jour est la protéine GADD153 aussi appelée CHOP (C/EBP homologous protein). Le facteur de transcription GADD153 est induit par la voie PERK-eIF2 α -ATF4 et la voie ATF6 (Harding et al., 2000). Parmi les gènes ciblés par ce facteur de transcription pro-apoptotique, on retrouve les gènes codant pour DR5, TRB3 et BIM (Ohoka et al., 2005; Yamaguchi et Wang, 2004; Puthalakath et al., 2007). De plus, GADD153 est connue pour induire une baisse d'expression de Bcl-2, une déplétion du niveau de GSH (gluthation) et une production exagérée de ROS (McCullough et al., 2001).

Une autre fonction bien connue du RE est le stockage du calcium intracellulaire. Il existe deux types de canaux calciques dans le RE soit les récepteurs inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃R) et les récepteurs ryanodines (RyR) (Pozzan et al., 1994). Il a été démontré qu'une accumulation de protéines mal repliées peut causer une libération de calcium du RE vers le cytosol (Deniaud et al., 2008). Conséquemment, cet influx de calcium peut affecter la perméabilité de la membrane mitochondriale et activer la voie intrinsèque apoptotique. Le calcium peut également activer les calpaïnes, des protéases en amont des caspases dans la cascade apoptotique (Wang, 2000). De plus, certains agents comme le thapsigargin induisent une libération de calcium du RE, ce qui provoque la déphosphorylation et l'activation de Bad, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (Wang et al., 1999). Par ailleurs, plusieurs protéines de la famille Bcl-2 se retrouvent non seulement dans la mitochondrie mais aussi dans les membranes du RE, notamment Bax et Bak. Ces deux protéines peuvent induire la libération de calcium du RE indépendamment de l'activité des caspases (Nutt et al., 2002).

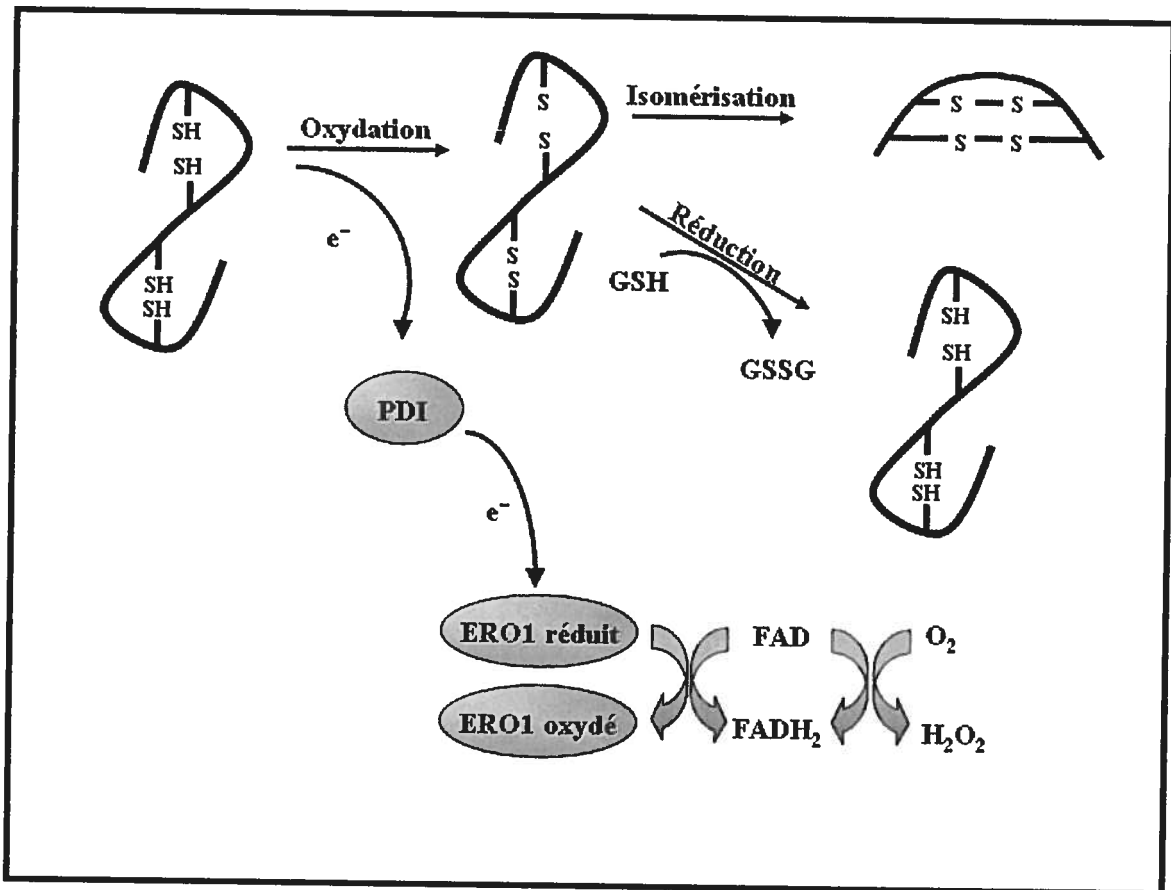


Figure 4 : Le repliement des protéines. Le sous-produit de la formation de liens disulfures dans le RE est le H_2O_2 . (Tel que décrit dans Appenzeller-Herzog et al., 2008)

Ensuite, la formation de liens disulfures dans le RE nécessite l'activité de deux enzymes, la PDI et la ERO1 (endoplasmic reticulum oxidoreductase). La PDI accepte un électron des polypeptides entrant dans le RE (voir figure 4). L'enzyme PDI oxyde ces substrats tandis que ERO1 transfère l'électron de PDI vers l'oxygène moléculaire, générant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un ROS. De plus, le GSH, un tripeptide, peut également être oxydé par la PDI, celui-ci entrant en compétition avec les protéines en repliement. Ainsi, l'accumulation de protéines mal repliées peut générer des réactifs oxygénés en plus de diminuer la quantité de GSH réduit, ce qui par conséquent peut entraîner l'apoptose (Appenzeller-Herzog et al., 2008). Certains agents connus pour induire un stress au RE tels que la tunicamycine peuvent augmenter la formation de ROS par ERO1. Néanmoins, cette accumulation est contrebalancée par l'induction de la voie PERK et le facteur de

transcription ATF4. En effet, ATF4 maintient le niveau de glutathion intra-cellulaire (Harding et al., 2003; Cullinan et Diehl, 2004).

2.4 Les particularités de l'apoptose du neutrophile

La moelle osseuse libère jusqu'à 1×10^9 neutrophiles/kg de poids par jour chez un adulte en bonne santé (von Vietinghoff et Ley, 2008). De plus, considérant son énorme potentiel destructeur, tel que décrit au chapitre 1, il devient primordial que le neutrophile soit éliminé de façon sécuritaire par l'organisme afin d'éviter des dommages aux tissus environnants. Ainsi, le neutrophile est connu pour entrer spontanément en apoptose après 24-36 heures dans la circulation sanguine en absence de facteurs de croissance ou de cytokines (von Vietinghoff et Ley, 2008). Il s'agit d'un mécanisme homéostatique qui assure une balance entre la quantité de cellules formées par la moelle osseuse et la quantité de cellules éliminées. Le maintien de cet équilibre est vital puisqu'une apoptose accélérée des neutrophiles peut accroître les risques d'infections (Andres et Maloisel, 2008) tandis qu'une inhibition de l'apoptose chez ce leukocyte est associée au développement de maladies inflammatoires (Ottonello et al., 2002). De cette façon, l'apoptose du neutrophile est caractérisée par une inhibition des capacités fonctionnelles de cette cellule. En effet, une baisse de la capacité de chimiotactisme, de dégranulation, d'adhésion, de phagocytose et de flambée oxydative a été notée chez des neutrophiles en apoptose (Whyte et al., 1993). De plus, une réduction des récepteurs de surface impliqués dans l'adhésion est aussi observée (Dransfield et al., 1995). Ensuite, l'apoptose de ce leukocyte se caractérise également par la contraction des lobes nucléaires, le noyau passant d'une forme multilobée à une forme ronde. Bien qu'il y ait apparition de fragmentation de l'ADN chez le neutrophile apoptotique, celui-ci ne forme pas de corps apoptotiques. Néanmoins, ce type cellulaire peut présenter la majorité des caractéristiques associées à ce phénomène telles que l'externalisation des phosphatidylsérines ou la dépolarisation de la mitochondrie (Akgul et al., 2001).

Au niveau moléculaire, il est bien connu que les deux voies apoptotiques principales, soit la voie extrinsèque et intrinsèque, sont actives chez le neutrophile. Ce type cellulaire

présente plusieurs récepteurs de mort à sa surface. Ainsi, le neutrophile exprime en grande quantité Fas et FasL. Par contre, certaines études ont démontrés que l'apoptose constitutive du neutrophile n'est pas perturbée par l'ajout d'antagoniste au récepteur Fas (Brown et Savill, 1999), de même que les neutrophiles de souris déficientes en Fas montrent le même taux d'apoptose (Fecho et Cohen, 1998), ce qui réfute la théorie d'une interaction autocrine ou paracrine. Aussi, ce leucocyte peut exprimer TRAIL-R1, -R3 et -R4 mais pas TRAIL-R2. Par contre, la stimulation avec le ligand TRAIL n'induit pas l'apoptose du neutrophile (Daigle et Simon, 2001). Pour ce qui est de la liaison de TNF- α avec son récepteur, les résultats sont variables. En effet, cette cytokine pourrait induire l'apoptose des neutrophiles lorsque utilisée à plus fortes doses (>10 ng/mL) et retarder l'apoptose à plus faibles doses (van den Berg et al., 2001). L'induction de la voie extrinsèque apoptotique et l'activation de la caspase-8, l'enzyme apicale dans cette voie, est importante dans l'apoptose spontanée du neutrophile. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur IETD-CHO, spécifique à la caspase-8, peut diminuer l'apoptose spontanée. L'activation de la caspase-8 pourrait impliquer une déphosphorylation progressive au site Tyr-397 et Tyr-465 (Jia et al., 2008).

Bien que la caspase-8 puisse directement activer la caspase-3, il semble que, chez les neutrophiles, l'activation de cette dernière dépende aussi d'une amplification par le clivage de Bid et l'implication de la voie intrinsèque (Maiani et al., 2004). Ainsi, cette voie serait importante dans l'apoptose spontanée chez ce type cellulaire. Le neutrophile possède relativement peu de mitochondries. En effet, celui-ci tire la majeure partie de son énergie métabolique (ATP) de la glycolyse (Borregaard et Herlin, 1982), lui permettant d'opérer dans un environnement hypoxique tel que retrouvé au site inflammatoire. De plus, le neutrophile possède peu de cytochrome c. Malgré tout, l'activation de la caspase-9 reste très active durant l'apoptose spontanée (Maiani et al., 2004). D'ailleurs, plusieurs facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été découverts chez les neutrophiles. Par exemple, les facteurs Bax et Bak sont facilement détectables chez ce type de cellules (Song et al., 2000). De plus, la phosphorylation sur les résidus Ser136 de Bad a été décrite comme étant le mécanisme à l'origine du retard d'apoptose par le GM-CSF (granulocyte colony stimulating factor) (Klein et al., 2000). Pour ce qui est des

facteurs anti-apoptotiques, le neutrophile exprime Mcl-1, A1 et Bcl-x_L, mais ne possède pas de Bcl-2. Ainsi, il a été démontré que l'activité anti-apoptotique de certaines cytokines telles que l'IL-15 est dépendante de la synthèse de Mcl-1 (Bouchard et al., 2004). La demi-vie de ces facteurs anti-apoptotiques est toutefois très courte. Par exemple, Mcl-1 possède plusieurs séquences PEST responsables de sa rapide dégradation (Kozopas et al., 1993). Ainsi, la faible expression et l'instabilité des facteurs anti-apoptotiques pourraient expliquer l'apoptose constitutive du neutrophile.

Les ROS sont non seulement importants dans la dégradation des pathogènes phagocytés par le neutrophile mais peuvent également dicter l'apoptose de ce leukocyte. En effet, plusieurs agents anti-oxydants tels que le GSH ou la catalase peuvent retarder l'apoptose du neutrophile (Yamamoto et al., 2002; Kasahara et al., 1997). De plus, les neutrophiles de patients atteints de CGD, une maladie affectant la flambée oxydative opérée par la NADPH oxydase, démontrent un retard d'apoptose (Kasahara et al., 1997). Les ROS pourraient constituer le signal initiateur dans la cascade apoptotique chez le neutrophile. Ceux-ci seraient en amont de la génération de céramide et de l'activation de la caspase-8 (Scheel-Toellner et al., 2004).

Enfin, il a été démontré que l'expression de certaines caspases, plus précisément la caspase-1 et -9, est augmentée lors de la différenciation des cellules promyélocytiques en neutrophiles. Paradoxalement, la caspase-2 n'est pas exprimée chez les neutrophiles matures (Santos-Beneit et Mollinedo, 2000). Plusieurs substrats classiques des caspases sont également absents chez le neutrophile. C'est le cas de PARP (poly ADP-ribose polymerase), de NuMa (nuclear mitotic apparatus protein) ou de DNA-PK (DNA-activated protein kinase) (Sanghavi et al., 1998).

Chapitre 3 : Le trioxyde d'arsenic

L'utilisation thérapeutique de l'arsenic date de plus de 2 400 ans. Plus récemment, le trioxyde d'arsenic entre dans la composition de différentes mixtures médicinales dont la solution de Fowler. Cette dernière fut employée aux 18^{ième}, 19^{ième} et 20^{ième} siècles pour traiter divers types de maux tels que l'asthme, le psoriasis, l'eczéma, l'épilepsie, les ulcères ou le cancer (Miller et al., 2002). Ainsi, dans les années 30, la solution de Fowler était le traitement le plus efficace pour soigner la leucémie myéloïde chronique (CML). De plus, le fondateur de la chimiothérapie moderne, Paul Ehrlich, utilisait un dérivé organique d'arsenic, le salvarsan, pour traiter les cas de syphilis et la trypanosomie. Le trioxyde d'arsenic a graduellement été remplacé par d'autres agents chimiothérapeutiques moins toxiques au cours du 20^{ième} siècle. Ce n'est qu'au cours des années 90 que l'emploi de cet agent est revenu à la mode. Le tout débuta en mars 1971, lorsqu'une équipe de l'université médicale de Harbin en Chine commença à s'intéresser à l'effet d'une mixture issue de la médecine traditionnelle chinoise, l'Ailing-1, sur divers types de cancers. Ce mélange, composé de 1% de trioxyde d'arsenic, fut caractérisé comme étant particulièrement efficace pour soigner la leucémie promyélocytaire aiguë (APL) (Antman, 2001).

3.1 L'utilisation clinique du trioxyde d'arsenic

Depuis l'étude de l'équipe de l'université Harbin dans les années 70, plusieurs autres études cliniques sont venues confirmer l'effet marqué du trioxyde d'arsenic sur le cancer APL. Ainsi, la majorité des études ont démontré que cette substance induit un taux de rémission complète de 75% ou plus des patients (Shen et al., 1997; Chen et al., 1998). Ces études ont montré que l'effet est observable autant chez les patients nouvellement diagnostiqués avec l'APL que les patients en rechute. L'effet de ce médicament peut être observable par la disparition de l'ARNm de la protéine de fusion aberrante PML-RAR α (promyelocytic leukemia protein-retinoic acid receptor α) par RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Également, l'administration de trioxyde

d'arsenic entraîne relativement peu d'effets secondaires. Les deux effets les plus importants étant le retard de la repolarisation cardiaque menant à une prolongation de l'intervalle QT et un syndrome de différenciation APL qui peut entraîner une infiltration pulmonaire et une détresse respiratoire (Douer et Tallman, 2005). De plus, quelques études ont noté l'apparition d'une neutropénie, soit une baisse du compte sanguin en neutrophiles (Munshi et al., 2002; Hussein et al., 2004). En bref, l'effet anticancéreux est imputable à la stimulation de la différenciation à faibles doses et à l'induction de l'apoptose à fortes doses des cellules cancéreuses. À ce sujet, il est à noter que la différenciation des cellules promyélocytiques APL génère des neutrophiles tel que décrit à la section 1.2.1.

La dégradation de la protéine de fusion aberrante PML-RAR α est l'effet le plus reconnu du trioxyde d'arsenic. Néanmoins, cet agent peut aussi induire la destruction d'autres types de protéines oncogéniques. Par exemple, la protéine Tax exprimée suite à l'infection au HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus type 1) est sélectivement dégradée en présence de trioxyde d'arsenic. Ce phénomène serait indépendant de l'action des caspases et spécifique pour cette protéine virale, les protéines de structure du HTLV-1 étant non affectées. De plus, cette substance pourrait aussi affecter le niveau d'expression de la protéine de fusion aberrante Bcr-Abl impliquée dans 95% des cas de CML (chronic myelogenous leukemia) et 20% des cas de ALL (acute lymphoblastic leukemia). Le mécanisme d'action impliquerait la baisse d'activité de S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) et PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1), deux enzymes impliquées dans le contrôle de l'initiation de la traduction de certains types d'ARNm, par le trioxyde d'arsenic (Nimmanapalli et al., 2003).

Ensuite, d'autres types de cancer tels que les myélomes multiples et les syndromes myélodysplastiques sont aussi traités avec cet agent. Le taux d'efficacité varie de 30 à 40% et de 23 à 25% respectivement pour les myélomes multiples et les syndromes myélodysplastiques. Il est à noter que chez ces types de cancer, la dose de trioxyde d'arsenic employée est beaucoup plus importante (0,25 mg/kg/jour) que chez les cancers APL (0,15 mg/kg/jour). Ceci démontre que la protéine PML-RAR α est tout

particulièrement sensible à l'effet de ce médicament. Aussi, plusieurs études ont démontré l'efficacité du trioxyde d'arsenic dans le traitement des tumeurs solides. Par exemple, des lignées de cellules cancéreuses prostatiques et ovariennes sont sensibles à l'effet de cet agent (Uslu et al., 2000). Également, des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires humains, soit la lignée Calu-6 (Han et al., 2008) ou des cellules gastriques MGC803 sont aussi susceptibles à l'effet anti-cancéreux du trioxyde d'arsenic (Li et al., 2009). Chez ces dernières, on observe à la fois une induction d'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M.

3.2 Le mode d'action du trioxyde d'arsenic

Les multiples études cliniques des années 90 démontrant l'efficacité du trioxyde d'arsenic ont incité la recherche du mode d'action de cette molécule. Les recherches ont démontré deux effets distincts selon la dose de trioxyde d'arsenic employée, soit la stimulation de la différenciation des cellules APL et l'induction d'apoptose.

3.2.1 Induction de la différenciation des cellules APL

La leucémie promyélocytaire aiguë est le sous-type M3 de leucémies myéloïdes aiguës. Elle se caractérise, dans la majorité des cas, par une translocation du gène codant pour le récepteur à l'acide rétinoïque ($RAR\alpha$) présent sur le chromosome 17 et le gène codant pour la protéine de leucémie promyélocytaire (PML) présent sur le chromosome 15 (voir la figure 5). Il existe d'autres types de translocation menant à l'APL tels que la fusion des gènes $RAR\alpha$ avec le gène codant pour la protéine PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), NPM (nucleophosmin), NuMA (nuclear mitotic apparatus) ou STAT5b (signal transducer and activator of transcription 5b), mais ces événements sont plus rares (5% des cas d'APL). Cette translocation génère une protéine de fusion aberrante PML- $RAR\alpha$ qui peut agir autant sur la voie de signalisation impliquant $RAR\alpha$ que celle impliquant PML (Piazza et al., 2001). Il en résulte un blocage de la différenciation des promyélocytes en granulocytes. Du coup, la caractéristique morphologique de cette interaction est la

destruction des corps nucléaires. Ces structures nucléaires sont responsables de l'induction de gènes impliqués dans l'apoptose mais aussi dans la réponse au stress, notamment en présence d'une infection virale (Bernardi et Pandolfi, 2007). Ainsi, il a été découvert que le trioxyde d'arsenic, à faibles doses (0,1-0,5 μM), peut induire la différenciation des cellules APL. Ceci se manifeste par la disparition de marqueurs associés aux cellules myéloïdes tels que le CD33 et l'apparition de récepteurs associés aux cellules différenciées, soit par exemple, le CD11b. Au niveau moléculaire, l'effet de différenciation du trioxyde d'arsenic est imputable à la restauration des corps nucléaires, lesquels sont perturbés chez les cellules APL. Plus précisément, la protéine PML est phosphorylée sur les résidus Ser et Tyr par des kinases telles que Erk en présence de

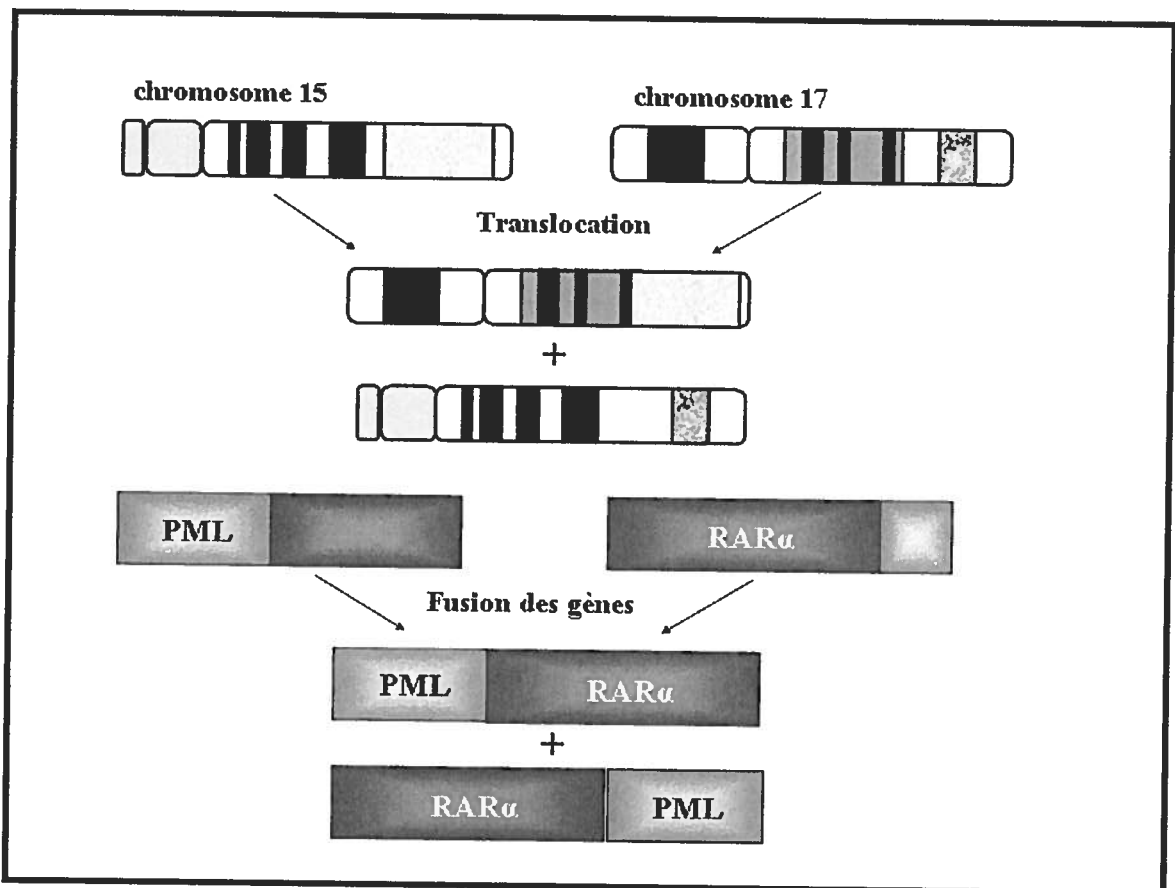


Figure 5 : La protéine de fusion aberrante PML-RAR α . Des événements de recombinaison entre les chromosomes 15 et 17 peuvent mener à la formation d'une protéine de fusion aberrante à l'origine de l'APL

trioxyde d'arsenic. Cette phosphorylation permet la sumoylation de PML, une modification post-traductionnelle. De plus, la sumoylation est essentielle à la formation de ces corps nucléaires. Il est à noter que, lorsque sumoylée, la protéine PML peut interagir avec d'autres partenaires telle que la protéine DAXX qui est impliquée dans l'arrêt de la transcription et pourrait aussi être pro-apoptotique dans certains types cellulaires (Bernardi et Pandolfi, 2007).

Habituellement, le traitement des patients atteints d'APL est effectué en utilisant une combinaison du trioxyde d'arsenic avec l'ATRA (all-trans retinoic acid) afin d'en augmenter l'efficacité et d'éviter une résistance à long terme. L'ATRA induit la différenciation des promyélocytes grâce à plusieurs mécanismes. D'abord, une concentration physiologique d'ATRA (10^{-7} à 10^{-6} M) provoque un changement conformationnel de la protéine aberrante PML-RAR α . Ceci permet le détachement de complexes répresseurs CoR et l'attachement d'acétylases d'histone (HAT), ce qui entraîne l'ouverture de la chromatine et l'activation de la transcription. Ainsi, l'expression de gènes possédant la séquence RARE (retinoic acid response elements) est augmentée, ce qui permet la différenciation vers le stade granulocytique. De plus, le mode d'action de l'ATRA implique aussi une dégradation de la protéine PML-RAR α par le système ubiquitine-protéasome (Wang et Chen, 2008). Également, la synergie du trioxyde d'arsenic et l'ATRA peut s'expliquer par la capacité de ce dernier à favoriser l'expression de AQP9 (aquaglycéporine 9). L'AQP9 est une protéine transmembranaire impliquée dans l'entrée d'arsenic dans la cellule. Ainsi, l'augmentation d'expression d'AQP9 par l'ATRA permet l'entrée massive d'arsenic dans les cellules leucémiques (Hu et al., 2009).

3.2.2 Mécanismes pro-apoptotiques du trioxyde d'arsenic

À plus fortes concentrations ($> 0,5 \mu\text{M}$), le trioxyde d'arsenic peut induire l'apoptose chez divers types de lignées cancéreuses. Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose sont très variés (voir figure 6). D'abord, le trioxyde d'arsenic est connu pour interagir avec des protéines à haut contenu en cystéine, donc comportant plusieurs

groupements thiols (-SH). C'est le cas, entre autres, pour les protéines formant le complexe PTPC (permeability transition pore complex) responsable de la perméabilité mitochondriale et impliqué dans la libération du cytochrome c. Ainsi, le trioxyde d'arsenic pourrait agir directement sur le complexe PTPC pour permettre la libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome (Larochette et al., 1999). Plusieurs facteurs de la famille Bcl-2 contrôlent la perméabilité mitochondriale. Le trioxyde d'arsenic peut augmenter l'expression de plusieurs membres pro-apoptotiques (Noxa, Bmf, and Puma)

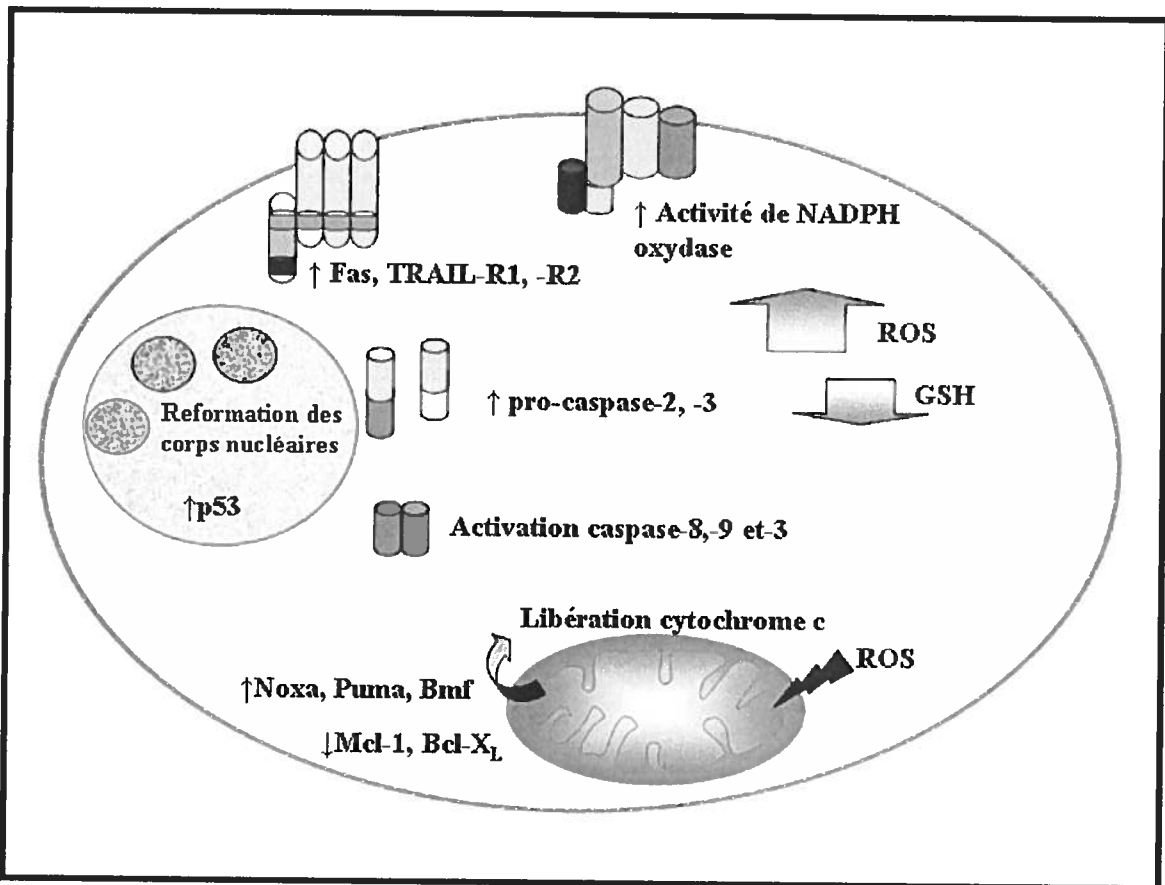


Figure 6 : Mécanismes impliqués dans l'induction d'apoptose par le trioxyde d'arsenic. Plusieurs voies apoptotiques sont activées en réponse au trioxyde d'arsenic dont les voies extrinsèques et intrinsèques. (Miller et al., 2002).

de la famille Bcl-2 tout en diminuant l'expression de membres anti-apoptotiques de celle-ci (Mcl-1 et Bcl-x_L) (Morales et al., 2008). De plus, l'arsenic induit la translocation de Bax vers les corps nucléaires et l'induction d'une apoptose indépendante de l'activation

des caspases (Quignon et al., 1998). Sa capacité d'interagir avec les groupements sulfhydryls sur les résidus cystéines affecte également la polymérisation de la tubuline. Plus précisément, l'arsenic empêche la liaison du GTP en se liant aux résidus Cys-12 et Cys-213 de la tubuline. Cette liaison a pour effet de stabiliser le réseau de microtubule en monomères ou polymères et entraîne un arrêt du cycle cellulaire, ce qui peut éventuellement mener à l'apoptose (Li et Broome, 1999). En plus d'activer la voie intrinsèque, le trioxyde d'arsenic peut aussi stimuler la voie extrinsèque apoptotique. En effet, l'expression des récepteurs de mort Fas (Woo et al., 2004) et TRAIL-R1 et -R2 (Liu et al., 2003) est augmentée, ce qui, par le fait-même, entraîne une activation de la caspase-8 initiatrice. De plus, l'expression de régulateurs négatifs de cette cascade incluant FLIP, peut aussi être diminuée en présence de cet agent (Kerbaux et al., 2005). Non seulement y a-t-il augmentation de l'activité des caspases, mais l'expression des pro-caspases-2 et -3 en présence de trioxyde d'arsenic est aussi stimulée (Soignet et al., 1998).

Ensuite, plusieurs études ont démontré l'importance de la production de ROS dans le mode d'action du trioxyde d'arsenic. En effet, l'utilisation d'antioxydants tels que le N-acétyl-cystéine (NAC), un précurseur de GSH, ou la catalase, une enzyme capable de convertir le H_2O_2 en O_2 et en H_2O , peuvent diminuer l'effet pro-apoptotique de cette molécule (Chen et al., 1998; Theilgaard-Monch et al., 2005). De la même façon, deux agents qui augmentent la quantité de ROS dans la cellule en diminuant la quantité de GSH, soit le buthionine sulfoximine ou l'acide ascorbique, peuvent augmenter l'effet pro-apoptotique du trioxyde d'arsenic (Zhu et al., 1999; Grad et al., 2001). Ainsi, certaines lignées cellulaires sont plus réfractaires à l'effet de ce médicament dû à leur contenu élevé en GSH. C'est le cas par exemple de la lignée promyélocytaire HL-60 qui possède trois fois plus de GSH que la lignée NB4 provenant du cancer APL. Cette dernière est beaucoup plus sensible à l'effet du trioxyde d'arsenic (Dai et al., 1999). L'effet anti-apoptotique du GSH est imputable à sa capacité de former un complexe $As(GS)_3$ directement avec le trioxyde d'arsenic ou à diminuer la quantité de ROS produite en réponse à cet agent. La source de ces ROS pourrait être la NADPH oxydase, un complexe capable de produire l'anion superoxyde (O_2^-) qui est converti en H_2O_2 par la SOD

(superoxyde dismutase). De cette façon, l'utilisation d'un inhibiteur de ce complexe, le diphénylène iodonium renverse l'apoptose induite par le trioxyde d'arsenic (Chen et al., 1998). Les ROS peuvent affecter la perméabilité membranaire mitochondriale et mener à la libération du cytochrome c. De plus, la mitochondrie peut constituer une autre source de ROS via la chaîne de transport des électrons (Kroemer et de The, 1999). Un dommage à la mitochondrie mène également à la libération d'AIF (apoptosis-inducing factor) et sa translocation vers le noyau. Ce mécanisme a été associé à une forme de mort caspase-indépendante chez les cellules HeLa exposées au trioxyde d'arsenic (Kang et al., 2004). Il est à noter qu'une autre source potentielle de ROS est l'interaction des formes méthylées d'arsenic avec la ferritine. La libération de fer qui s'ensuit génère des ROS par la réaction de Fenton (Ahmad et al., 2000).

D'autres mécanismes peuvent expliquer l'éradication des cellules cancéreuses par le trioxyde d'arsenic. Notamment, cet agent peut stimuler l'expression de p53 (Yedjou et Tchounwou, 2009). Cette protéine est connue pour activer la translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie, ce qui entraîne la libération du cytochrome c et l'activation de la voie intrinsèque apoptotique (Schuler et Green, 2001). Il a également été suggéré qu'un mécanisme immunologique pourrait expliquer l'élimination des cellules cancéreuses par le trioxyde d'arsenic. Plus précisément, l'activité lytique des cellules LAK (lymphokine activated killer) est augmentée en présence de cet agent. En effet, l'expression de certaines molécules d'adhésion telles que le CD54 et le CD38 sur les cellules de myélome ou CD54 et CD11a sur les LAK est augmentée avec le trioxyde d'arsenic, ce qui permet une meilleure reconnaissance et destruction des cellules cancéreuses (Deaglio et al., 2001).

3.2.3 Impact sur les voies de signalisation : MAPK et NF- κ B

Les MAPK sont des enzymes sérine-thréonine kinases responsables de la transduction du signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Celles-ci sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération ou l'apoptose. Il existe trois principaux types de MAPK, soit Erk (extracellular signal-regulated kinases), JNK et p38.

Erk est davantage associée à la différenciation, à la prolifération et à la transformation en présence de facteurs de croissance. Les kinases p38 et JNK sont, pour leur part, plutôt reliées à l'arrêt de la prolifération, à l'apoptose et à la réponse à différents stress cellulaires. Plusieurs études ont démontré que l'arsenic peut activer les trois classes de MAPK dépendamment du type cellulaire, de la dose employée, du temps observé et du niveau d'oxydation de l'arsenic (+3 ou +5). Ainsi, une large gamme de travaux de recherche ont montré que l'induction de l'apoptose par le trioxyde d'arsenic dépend de la phosphorylation de p38 ou de JNK (Kang et Lee, 2008; Chen et al., 2006). La phosphorylation de Erk1/2 (extracellular signal regulated kinase) a davantage été associée à un mécanisme anti-apoptotique de résistance au trioxyde d'arsenic (Ramos et al., 2006). Souvent, la phosphorylation de ces MAPK est reliée à la production de ROS en présence de trioxyde d'arsenic (Kang et Lee, 2008). Dans certains cas, l'inhibition de ces MAPK peut accroître l'effet pro-apoptotique de cette substance (Wen et al., 2008; Ramos et al., 2006). Ainsi, les MAPK peuvent agir dans des voies pro- ou anti-apoptotiques dépendamment du type cellulaire étudié. De plus, la phosphorylation de ces MAPK dépend de l'action en amont de plusieurs types de MEKK (MAPK kinase kinase). Cette activation varie selon le niveau d'oxydation de l'arsenic. Par exemple, la phosphorylation de JNK en présence d'arseniate(+5) est reliée à l'activité de MEKK3 et 4 tandis qu'avec l'arsenite(3+), MEKK2, 3 et 4 sont phosphorylées. Il est à noter que la phosphorylation de JNK par l'arsenite a aussi été imputée à l'inhibition d'une phosphatase (Cavigelli et al., 1996).

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans le développement de plusieurs types de cancers. Par exemple, la production d'IL-6, un facteur de croissance impliqué dans la prolifération de cellules cancéreuses de myélomes multiples, est régulée par NF- κ B. Le trioxyde d'arsenic peut inhiber IKK (I κ B kinase), l'enzyme responsable de la phosphorylation et de la dégradation subséquente de I κ B, l'inhibiteur de NF- κ B. En effet, cet agent se lie au résidu Cys-179 sur IKK, ce qui inactive son site catalytique (Kapahi et al., 2000).

3.3 Effets du trioxyde d'arsenic sur les cellules du système immunitaire

La majorité des études sur le mode d'action du trioxyde d'arsenic ont utilisé des lignées de cellules cancéreuses, principalement les cellules NB4 provenant du cancer APL. Il existe peu de recherches concernant l'effet de cette molécule sur des cellules non cancéreuses. En outre, seulement quelques études se sont penchées sur l'impact de ce médicament sur les cellules du système immunitaire, pourtant directement exposées lors d'une administration intraveineuse de trioxyde d'arsenic.

En premier lieu seulement quelques études ont exploré l'effet de cette substance sur les monocytes ou les macrophages. D'abord, il a été déterminé que l'exposition au trioxyde d'arsenic peut empêcher la différenciation des monocytes en macrophages. Cet effet serait imputable à la baisse d'activité de NF- κ B en présence de cet agent. Également, l'expression de régulateurs négatifs apoptotiques, plus précisément X-IAP et c-FLIP, est diminuée tandis que les caspases 8 et 3 sont activées menant à l'induction d'apoptose chez les monocytes (Lemarie et al., 2006b). Pour ce qui est des macrophages, l'exposition au trioxyde d'arsenic peut entraîner une «dé-différenciation» en monocytes. En effet, l'expression du marqueur CD14 est augmentée tandis que l'expression de CD71 est diminuée, ce qui démontre que le macrophage acquiert un phénotype monocytique. Ce changement de surface s'accompagne par une perte d'adhésion et une réorganisation du cytosquelette menant à une morphologie plus ronde chez le macrophage exposé au trioxyde d'arsenic. Ces changements ne seraient pas reliés à l'induction d'apoptose (Lemarie et al., 2006a). Aussi, certaines fonctions du macrophage comme l'endocytose, la phagocytose et le chimiotactisme, sont diminuées en présence de cet agent, ce qui pourrait expliquer la persistance de l'infection au *Staphylococcus aureus* chez des souris exposées au trioxyde d'arsenic (Bishayi et Sengupta, 2003). De plus, à la même concentration (1 μ M) et au même temps (72 heures), cet agent peut aussi stimuler l'activité de la NADPH oxydase chez les macrophages et augmenter la sécrétion d'IL-8 et de TNF- α en réponse au LPS (Lemarie et al., 2008).

L'effet du trioxyde d'arsenic a aussi été brièvement étudié chez les lymphocytes B et T. Il est intéressant de noter que le trioxyde d'arsenic peut aussi perturber la différenciation des cellules B. En effet, une baisse de la quantité de plasmocytes et une réduction de la quantité d'IgM sécrétée est observable chez des cellules mononuclées différenciées par un mitogène, le PWM (pokeweed mitogen), en présence de ce médicament (Rousselot et al., 1999). Il est bien entendu que l'effet du trioxyde d'arsenic varie grandement selon la dose employée. C'est le cas pour la prolifération des lymphocytes T qui, à faibles doses (nM), est augmentée par le trioxyde d'arsenic, tandis qu'à fortes doses (μM), celle-ci est inhibée. Cette inhibition s'explique par une baisse de la sécrétion d'IL-2 (Galicia et al., 2003). Également, il appert qu'autant les cellules CD4^+ que les CD8^+ sont sensibles à l'effet de cette substance. En effet, le trioxyde d'arsenic peut induire l'apoptose en activant les marqueurs classiques apoptotiques, soit la perturbation de la perméabilité membranaire mitochondriale, l'activation des caspases et la fragmentation de l'ADN chez les lymphocytes T. De plus, comme dans le cas des macrophages, il y a une augmentation du stress oxydatif et une baisse de la capacité anti-oxydante mesurée par le niveau de GSH intracellulaire en présence de cet agent (Gupta et al., 2003).

Enfin, les résultats préliminaires à cette thèse ont démontré que l'apoptose du neutrophile est induite en présence de trioxyde d'arsenic. Ceci s'accompagne par un clivage des trois types de filaments du cytosquelette, soit les filaments intermédiaires, les microfilaments et les microtubules. Aussi, contrairement aux macrophages, l'exposition au trioxyde d'arsenic n'entraîne pas l'activation de la NADPH oxydase chez les neutrophiles. Par contre, l'utilisation de la catalase, une enzyme qui convertit le H_2O_2 en oxygène et en eau peut renverser l'apoptose. Ainsi, l'induction d'apoptose est dépendante de la production de ROS, mais aussi de l'activité des caspases et de la synthèse *de novo* des protéines (Binet et al., 2006).

Chapitre 4 : Objectifs et hypothèses du projet de recherche

4.1 Objectif 1 : Identifier et comprendre le rôle des protéines dont la synthèse de novo est modulée par le trioxyde d'arsenic

Les résultats préliminaires à cette thèse ont démontré que le trioxyde d'arsenic pouvait induire l'apoptose chez les neutrophiles humains. De plus, cet agent peut induire la synthèse *de novo* de plusieurs protéines. Cette observation est étonnante. En effet, il est bien connu que les agonistes qui induisent l'apoptose du neutrophile ont plutôt tendance à inhiber la synthèse protéique ou à n'avoir aucun effet sur celle-ci. Ainsi, le premier objectif de cette thèse est d'identifier des protéines dont la synthèse *de novo* est modulée par le trioxyde d'arsenic et d'en comprendre leur rôle dans l'apoptose. La stratégie employée est de séparer les protéines de neutrophiles incubés avec une solution de marquage métabolique par gels 2D-SDS-PAGE. Les protéines d'intérêt sont ensuite excisées du gel pour être identifiées par spectrométrie de masse. La contribution de ces protéines dans l'apoptose est ensuite analysée, entre autre, en utilisant un modèle de souris déficientes en la protéine d'intérêt. Notre hypothèse est que certaines de ces protéines sont importantes dans l'induction de l'apoptose par le trioxyde d'arsenic.

4.2 Objectif 2 : Déterminer si le trioxyde d'arsenic peut affecter les fonctions du neutrophile et identifier les voies signalétiques impliquées

Le deuxième objectif de cette thèse est de déterminer si le trioxyde d'arsenic peut influencer d'autres fonctions que l'apoptose du neutrophile telles que l'adhésion, le chimiotactisme, la dégranulation et la phagocytose. Pour ce faire, des méthodes telles que la chambre de Boyden, la mesure de l'adhésion sur les cellules A549, la zymographie sur gélatine et la phagocytose de globules rouges de mouton opsonisés ont été employé pour répondre à cet objectif. Aussi, le but de cette section est de connaître le rôle des MAPK chez les neutrophiles traités avec du trioxyde d'arsenic. Ainsi, la phosphorylation des trois MAPK a été investiguée. En effet, plusieurs études ont démontré l'impact majeur de

ces kinases dans l'effet pro-apoptotique ou dans la résistance à l'effet du trioxyde d'arsenic (Kang et Lee, 2008; Giafis et al., 2006; Ramos et al., 2006). De plus, il a aussi été démontré que les MAPK peuvent affecter les fonctions du neutrophile (Fernandez et al., 2005; Lundqvist-Gustafsson et al., 2001). Notre hypothèse est que le trioxyde d'arsenic active la phosphorylation de p38 et JNK, deux kinases couramment associées à la réponse au stress. Cette phosphorylation pourrait moduler l'apoptose ainsi que les différentes fonctions du neutrophile.

4.3 Objectif 3 : Élucider le mécanisme pro-apoptotique du trioxyde d'arsenic sur le neutrophile

Dans le but d'obtenir une meilleure idée du mode d'action du trioxyde d'arsenic sur les neutrophiles, nous avons investigué les voies impliquées dans l'induction d'apoptose par cet agent. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à la voie du RE. En effet, certaines études ont démontré que cette voie pourrait être impliquée dans l'effet pro-apoptotique du trioxyde d'arsenic sur des cellules cancéreuses (Du et al., 2006; Zhang et al., 2007). De plus, il est connu que cet agent peut se lier aux protéines contenant des liens disulfures telles que les microtubules (Li et Broome, 1999). Cette association pourrait perturber le repliement des protéines dans le RE. Également, les résultats obtenus précédemment ont démontré que le trioxyde d'arsenic peut induire l'accumulation de H_2O_2 . De plus, l'ajout de catalase peut renverser l'apoptose du trioxyde d'arsenic. Par ailleurs, il a été démontré que le stress oxydatif peut entraîner l'activation de la voie apoptotique du RE (Xue et al., 2005). Ainsi, notre hypothèse est que le trioxyde d'arsenic active la voie apoptotique du RE chez le neutrophile. Cette voie pourrait être activée suite à l'accumulation de H_2O_2 chez ce leukocyte. Toutefois, aucune étude n'a rapporté l'activation de cette voie chez les neutrophiles.

Section 2 : Articles

Article 1

Titre

Arsenic trioxide induces *de novo* protein synthesis of annexin-1 in neutrophils: association with a heat shock-like response and not apoptosis

Auteurs

François Binet, Sonia Chiasson et Denis Girard

Publié dans la revue

British Journal of Haematology. 2008 Feb;140(4):454-63. Epub 2007 Dec 13.

Contribution personnelle

Cet article contient les résultats concernant le premier objectif de recherche. Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai effectué toutes les expériences à l'exception du génotypage des souris (figure 4C). Également, j'ai participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats, à la rédaction et aux corrections du manuscrit.

Contribution des coauteurs

Sonia Chiasson a effectué la gestion de la colonie de souris déficientes en annexine-I de même que le génotypage des souris (figure 4C). Elle a également apporté une aide technique dans les expériences de poche d'air murine sur les souris déficientes en annexine-I. Denis Girard a participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction et la correction du manuscrit.

Résumé en français de l'article

Nous avons démontré récemment que le trioxyde d'arsenic (TA) induit l'apoptose des neutrophiles humains en plus d'augmenter la synthèse *de novo* des protéines. Dans cet ouvrage, nous avons identifié l'une de ces protéines comme étant l'annexine-I. Il a été découvert récemment que cette protéine serait pro-apoptotique pour les neutrophiles lorsque ajoutée de façon exogène. La présence d'annexine-I a été notée à la membrane cellulaire et dans le surnageant des neutrophiles. L'utilisation de souris déficientes en annexine-I nous a permis de découvrir que l'effet pro-apoptotique du TA est identique peu importe la présence de cette protéine. Nous avons identifié une deuxième protéine de choc thermique nommée (Hsp) 89alpha. Puis, nous avons analysé l'expression des ARNm de différentes Hsp chez les neutrophiles, sachant que le TA peut induire une réponse de type choc thermique sur divers types cellulaires. Ainsi, nous avons constaté que l'expression de HSPA1 et HSPB1 est augmentée en présence de TA dans ces cellules. Nous concluons que l'effet pro-apoptotique du TA sur les neutrophiles est indépendant de l'expression d'annexine-I. Il s'agit du premier ouvrage démontrant que le TA peut induire un effet s'apparentant au choc thermique sur les neutrophiles humains. Aussi, nous démontrons que la synthèse *de novo* de l'annexine-I est reliée à cet effet plutôt qu'à l'induction d'apoptose par le TA.

Arsenic trioxide induces *de novo* protein synthesis of annexin-1 in neutrophils: association with a heat shock-like response and not apoptosis

François Binet, Sonia Chiasson and Denis Girard

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

Received 2 August 2007, accepted for publication 28 September 2007

Correspondence: Dr D. Girard, INRS-Institut Armand-Frappier, 215 boul. Hymus, Pointe-Claire, PQ, Canada, H9R 1G6.
E-mail: denis.girard@iaf.inrs.ca

Summary

We recently demonstrated that arsenic trioxide (ATO) induced apoptosis in human neutrophils and increased *de novo* protein synthesis. Here, we identified one of these newly synthesized proteins as annexin-I (AnxA1), a protein recently found to be proapoptotic in neutrophils when added exogenously. AnxA1 was detected at the cell membrane of ATO-induced neutrophils as well as in the supernatants. Using neutrophils harvested from AnxA1 knockout mice, we found that the proapoptotic activity of ATO was similar in neutrophils, regardless of AnxA1 levels. A second protein was identified as heat shock protein (Hsp) 89 α . Because ATO is known to induce a HS-like response in a variety of cells, we investigated its ability to induce gene expression of Hsp in neutrophils and found that ATO increases *HSP90AA1*, *HSPA1* and *HSPB1* mRNA in these cells. We conclude that ATO-induced neutrophil apoptosis by an AnxA1-independent mechanism. Our data provide the first evidence that ATO induces a stress response in human neutrophils and that *de novo* synthesis of AnxA1 is related to this event rather than to the proapoptotic activity of ATO.

Keywords: neutrophils, apoptosis, drug, immunology.

Arsenic trioxide (As₂O₃ or ATO) is effective in the treatment of various cancers, especially acute promyelocytic leukaemia (APL) (Davison *et al*, 2002; Miller *et al*, 2002; Wang *et al*, 2003). Several reports have indicated that ATO acts principally by inducing cell apoptosis not only in APL, but in a variety of cells including non-APL acute myeloid leukaemia cells, myeloma cells, chronic myeloid leukaemia cells, various solid tumour cells, human myeloid cell lines, such as NB4, HL-60, PLB 985 and U937, and in B and T lymphocytes (Rousselot *et al*, 1999; Rojewski *et al*, 2002; Gupta *et al*, 2003; Surlan *et al*, 2003; Fernandez *et al*, 2004; Korper *et al*, 2004; Zuo *et al*, 2004). It is well established that treatment of APL patients with ATO is associated with the disappearance of the *PML-RAR α* fusion transcript, the characteristic APL gene product of the chromosomal translocation t(15;17) (Chen *et al*, 1996; Shao *et al*, 1998; Soignet *et al*, 1998; Miller, 2002). However, the clinical efficacy of ATO is still not fully understood. In general, ATO induces APL differentiation when used at low concentrations (≤ 5 μ mol/l) while it induces cell apoptosis at higher concentrations (5–20 μ mol/l), a phenomenon which has also

been observed in a variety of cell lines (Li & Broome, 1999; Carre *et al*, 2002; Rojewski *et al*, 2002; Shen *et al*, 2003; Wang *et al*, 2003; Zuo *et al*, 2004).

Recently, we identified 5 or 20 μ mol/l of ATO as a novel inducer of apoptosis in mature human neutrophils (Binet *et al*, 2006). This ability of ATO could partially explain the occurrence of neutropenia reported in patients after ATO treatment (Munshi *et al*, 2002; Hussein *et al*, 2004). ATO was found to act via caspase activation, as its proapoptotic effects were reversed by addition of the pan-caspase z-VAD-fmk inhibitor. More specifically, we identified that ATO activates caspase-3 and caspase-8 (Binet *et al*, 2006). Interestingly, although ATO is known to target microtubules (Li & Broome, 1999), we demonstrated that other cytoskeletal structures, including both microfilaments and intermediate filaments, are also targets of ATO treatment in neutrophils, by induction of cleavage of gelsolin and lamin B₁. Curiously, although ATO exhibits certain properties similar to other neutrophil proapoptotic molecules, it also possesses a unique feature: induction of *de novo* protein synthesis. This event is exclusive to

anti-apoptotic agents, including the cytokines interleukin (IL)-4, IL-15, granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and other agents, such as sodium butyrate and dexamethasone (Dex) (Girard *et al.*, 1996, 1997; Stringer *et al.*, 1996; Cox & Austin, 1997; Sakamoto *et al.*, 2003). Of interest, Dex normally induces apoptosis in a variety of cells, but delays apoptosis in neutrophils (Cox & Austin, 1997). Because of the above observations, and given the fact that addition of the protein synthesis inhibitor cycloheximide reversed the ability of ATO to induce neutrophil apoptosis (Binet *et al.*, 2006), we conducted the present study to identify which proteins are newly synthesized in response to ATO, suspecting that they are implicated in the proapoptotic activity of ATO in these cells. ATO was found to induce *de novo* protein synthesis of the potent anti-inflammatory molecule annexin-1 (AnxA1), recently identified as a neutrophil proapoptotic molecule (Solito *et al.*, 2003; Perretti & Solito, 2004), and provide the first evidence that ATO induction of *de novo* AnxA1 synthesis is related to its ability to induce a heat shock (HS)-like response in human neutrophils.

Materials and methods

Neutrophils isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers as previously described (Girard *et al.*, 1996; Binet *et al.*, 2006). 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.

Metabolic labelling and *de novo* protein synthesis assay

Cells (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% autologous serum) were metabolically labelled with 4.625 MBq of the Redivue Pro-Mix L- ^{35}S *in vitro* cell labelling mix (GE Healthcare, Baie d'uré, QC, Canada) in the presence or absence of 5 $\mu\text{mol/l}$ of ATO, or other agonists indicated in figures 1, 5 and 6, for 22 h as previously described (Girard *et al.*, 1997; Binet *et al.*, 2006).

Two dimensional gel electrophoresis

Metabolic labelling was performed as described above and cell lysates were then prepared in lysis buffer [Chaps 4%, Tris 40 mmol/l, urea 8 mol/l, aprotinin 20 $\mu\text{g/ml}$, pepstatin 20 $\mu\text{g/ml}$, leupeptin 20 $\mu\text{g/ml}$, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 mmol/l, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) 1 mmol/l, dithiothreitol 1%]. Isoelectrofocusing was performed (linear strip pH 3–10, IPGphor; GE Healthcare) followed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (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 1–3 d.

Protein identification

To evaluate the nature of selected proteins observed after two-dimensional (2D)-SDS-PAGE [or one-dimensional (1D)-SDS-PAGE], spots were identified by NanoLC-MS/MS using the Q-ToF Ultima (Waters, Milford, MA, USA) mass spectrometer at the National Research Council of Canada (NRC). Database searching was carried out in batch mode using Mascot DaemonTM (Matrix Science, Boston, MA, USA) and against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein database.

Immunoprecipitation of radiolabelled AnxA1

Metabolically labelled 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 μl of non-denaturing lysis buffer (1 mmol/l of EDTA, 20 mmol/l of Tris-HCl, pH 7.4, 10% glycerol, 1% nonidet P-40 (NP-40), 0.01 mg trypsin, 1 $\mu\text{mol/l}$ of orthovanadate/2.5 $\mu\text{mol/l}$ of *p*-nitrophenylphosphate (*o*-vanpNPP), 0.01 mg pepstatin A, 0.01 mg leupeptin, 0.01 mg aprotinin and 1 mmol/l of PMSF for 30 min on ice. The lysates and supernatants were precleared using 20 μl of protein G-Sepharose (GE Healthcare). After 1 h, samples were briefly centrifuged to remove the Sepharose beads, and incubated with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of the murine IgG1 anti-human AnxA1 monoclonal antibody (mAb) (clone 29, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) with gentle agitation overnight. Protein G-Sepharose (20 μl) was then added for an additional 2–3 h incubation. The solid matrix was collected and washed three times with PBS before suspending it in 30 μl of sample buffer and heating to 100°C for 5 min. Labelled proteins were resolved by 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 (Cedex, France) film at -80°C for 1–3 d.

Immunofluorescence microscopy

Cells were incubated with the respective treatments and for the indicated times in the corresponding figure. After a brief centrifugation, cells were suspended in PBS-20% autologous serum and left for 30 min on ice to prevent non-specific binding of the antibodies. Next, centrifugation for 2 min at 300 g on prewashed microscope slides was followed by a 5-min incubation at 37°C with a solution of 2% paraformaldehyde 0.005% digitonin for fixation and permeabilization of the cells. These cells were washed with PBS-1.25% bovine serum albumin and incubated with a 1:20 dilution of the murine IgG1 anti-human AnxA1 antibody mAb (clone 29, BD Biosciences) or the respective isotopic control, for 30 min at

37°C. After several washes, slides were incubated with a 1:50 dilution of a goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibody for 30 min at 37°C. Slides were visualized at 400× with a Leica microscope (Leica Microsystems, Richmond Hill, Canada) equipped with a fluorescent lamp.

Detection of human AnxA1 by immunoblotting

Neutrophils (200 µl of a 10×10^6 cells/ml) were incubated in RPMI 1640-HEPES-penicillin/streptomycin supplemented with 10% autologous serum for 24 h at 37°C with the specified agonists. Supernatants were harvested, centrifuged and cellular debris were discarded. An equivalent volume of 2× Laemmli sample buffer was added to the supernatant. An equivalent of 15 µl of the supernatant was loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). Non-specific sites were blocked with 1% skim milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween (25 mmol/l of Tris-HCl, pH 7.8, 190 mmol/l of NaCl, 0.15% Tween 20) overnight at 4°C. The murine IgG1 anti-human AnxA1 antibody mAb (clone 29, BD Biosciences) was added (1:10 000) for 1 h at room temperature followed by washes with TBS-Tween. The membrane was then incubated with a horseradish peroxidase-labelled goat anti-mouse secondary antibody at 1:50 000 dilution in TBS-Tween + 1% non-fat dry milk for 1 h at room temperature followed by washes. The AnxA1 protein was revealed as above and quantified using a Fluor-S Multimager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the Multi-Analyst version 1.1 program (Bio-Rad).

Mice

AnxA1-null mice (denoted here as AnxA1^{-/-}) were a generous gift of Dr Roderick J. Flower (William Harvey Research Institute, London, UK) (Hannon *et al*, 2003). Genotyping was performed by extracting DNA from the tails of mice and the presence of targeted alleles was monitored by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers (Hannon *et al*, 2003): primer 1 (5'-GCCTTGACAAAGCTATCATGG-3'); primer 2 (5'-GCATTGGTCCTCTTGGTAAGAATG-3') located in the exon 3 and 4 of the AnxA1 gene (ANXA1); primer 3 (5'-TACTGTCTCGT-CCCCTCAAATG-3') and primer 4 (5'-GTTGCACCACAGATGAAACGC-3') located in the lacZ coding sequence. PCR amplification was performed using *Taq* platinum polymerase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) under conditions recommended by the supplier on a T personal model PCR machine (Montreal Biotech Inc, Kirkland, QC, Canada) using 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s and extension at 72°C for 45 s. The 1–2 primer pair allows amplification of a 700 bp fragment when the wild-type allele is present and the 3–4 primer pair allows amplification of a 220 bp fragment when the disrupted allele is present, as previously described (Hannon

et al, 2003). Lack of AnxA1 was confirmed at the protein level by immunoblotting using the polyclonal rabbit anti-mouse AnxA1 antibody (Zymed Laboratories/Invitrogen, South San Francisco, CA, USA).

Murine air pouch experiments

CD-1, AnxA1^{-/-} or Balb/c mice (6–8 weeks old, male and female) were anaesthetized with isollurane. Sterilized air (3 ml filtered through a 0.2-µm millipore filter) was injected subcutaneously in the back using a 26-gauge needle to make an air pouch on day 0 and day 3. On day 6, 1 ml of lipopolysaccharide (LPS) (positive control for neutrophil attraction) (Pelletier *et al*, 2004) was injected into the air pouches of mice 6 h before the mice were killed by CO₂ asphyxiation. The air pouches were washed once with 1 ml and then twice with 2 ml of Hanks balanced salt solution containing 10 mmol/l of EDTA, and the exudates were centrifuged at 100 g for 10 min at room temperature.

Assessment of neutrophil apoptosis

Murine neutrophils (with or without AnxA1) were collected as above, and apoptosis was assessed by flow cytometry following staining with FITC-annexin-V or propidium iodide as previously described (Pelletier *et al*, 2004). For human neutrophils, apoptosis was assessed by flow cytometry after staining with CD16 as previously documented (Pelletier *et al*, 2004).

Semi-quantitative reverse transcription PCR

Isolation of RNA was carried out using a commercially available kit (GenElute, Sigma). Next, 500 ng of RNA were reverse transcribed to DNA with Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV). The sequences of primers used for PCR amplification are as follows: upstream: 5'-CCTCACAGCTATCGTGAAGTGC-3', downstream: 5'-TAGGGTTTTATGGTTTGGGGAAAAC-3' for ANXA1; upstream: 5'-CACG-AGGAGCGGCAGGACGAG-3', downstream: 5'-CAGTGGCGGCAGCAGGGGTGG-3' for HSPB1; upstream: 5'-GACCTGAACAAGAGCATCAA-3', downstream: 5'-TGGTGATGGT-GATCTTGTG-3' for HSPA1; upstream: 5'-CCGGTATGAAAGCTTGACAG-3', downstream: 5'-GCCTCATCATCGCTTACTTC-3' for HSP90AA1; upstream: 5'-CAGGGCATTGCTATTT-ATTCC-3'; downstream: 5'-GACTTCTGTGTCTCCCTCATGC-3' for HSP90AA2 and upstream: 5'-TCGGATAACGAACGAGACTC-3', downstream 5'-CAGGGACTTAATCAACGCAA-3' for 18S. PCR was performed first with a denaturation step of 5 min at 95°C followed by 18 cycles (18S), 29 cycles (HSPA1), 32 cycles (HSP90AA1), 35 cycles (HSPB1) or 37 cycles (ANXA1) of: 94°C for 30 s, 56°C (18S), 58°C (HSPB1 and HSPA4), 60°C (HSP90AA1) or 64°C (ANXA1) for 30 s 72°C for 45 s and completed with a final step of 72°C for 7 min. The PCR products were separated

using an ethidium bromide agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light.

Heat shock

Heat shock was performed by incubating freshly isolated human neutrophils for 30 min at 42°C. Cells were then incubated at 37°C for the indicated period.

Statistical analysis

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

Results

ATO induces *de novo* protein synthesis of AnxA1 in human neutrophils

Based on our results from 2D-SDS-PAGE we selected one spot tentatively identified as actin according to its isoelectric point ($pI = 5.4$) and molecular mass ($m_w = 43\ 000$) for an internal control and another (unknown) spot. The peptide sequences of the first spot were: -AVFPSIVGR; -GYSFTTAAER and -SYELPDGQVITIGNER (with a Mascot score of 93), revealing that this protein is effectively actin (3907622-NCBI) (arrow in Fig 1A). The other spot (circle) was randomly selected, but was chosen because its synthesis was increased reproducibly ($n = 4$) in response to ATO treatment. This spot was identified as AnxA1 (442631-NCBI) and the peptide sequences were: -

ALYEAGER; -TPAQFDAELR and -SEDFGVNEDLADSDAR (Mascot score of 177). The molecular mass of the spot was ~ 28 kDa instead of ~ 38 kDa, or the ~ 32 – 34 kDa cleaved form reported previously in the literature (Solito *et al*, 2003; Perretti & Solito, 2004), with an isoelectric point of ~ 5 . As illustrated in the inset (Fig 1A), the densitometric analysis revealed that ATO significantly increased *de novo* protein of AnxA1 by a factor of 4.7 ± 0.8 (mean \pm SEM, $n = 4$), whereas the synthesis of actin was slightly decreased when compared with control cells undergoing spontaneous apoptosis (0.8 ± 0.04). Because the *de novo* protein synthesis of AnxA1 has never been reported in metabolically labelled neutrophils, we next confirmed this observation by immunoprecipitation. As illustrated in Fig 1B, ATO effectively increased the synthesis of AnxA1. Of note, a basal level of AnxA1 synthesis in the cytosol of cells undergoing spontaneous apoptosis (or 22 h-aged cells) is also observed, while, as expected, no signal was detected in fresh cells. Interestingly, several bands of molecular masses ranging from ~ 28 – 38 kDa were detected, suggesting that proteolysis had occurred.

ATO induces the release of AnxA1 into the external milieu

Annexin-1 is known to be re-localized from the cytosol to the cell membrane and/or released into the external milieu (Solito *et al*, 2003; Perretti & Flower, 2004; Perretti & Solito, 2004). Thus, we investigated the intracellular localization of AnxA1 by immunofluorescence in ATO-activated neutrophils. As illustrated in Fig 2A, neutrophils treated with ATO expressed AnxA1 on their cell membrane (right panel) whereas no such expression (or very little) was observed in control cells (middle

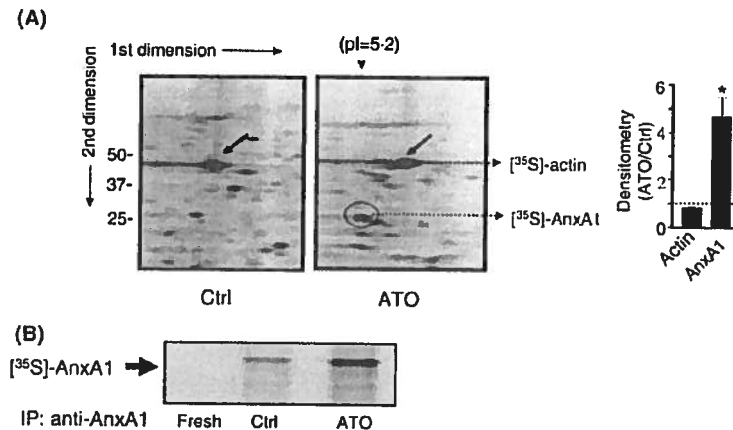


Fig 1. Arsenic trioxide induces *de novo* protein synthesis of annexin-1 in human neutrophils. (A) Freshly isolated human neutrophils were incubated for 22 h with buffer (Ctrl or spontaneous apoptosis) or with 5 $\mu\text{mol/l}$ of the proapoptotic drug arsenic trioxide (ATO) in the presence of 4.625 MBq of the Redivue Pro-Mix L- [³⁵S] *in vitro* cell labelling mix, and 2D-SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) and identification of annexin-1 (arrow) was performed as detailed in *Materials and methods*. *, actin; circle, AnxA1. The densitometric analysis (right panel) was performed as described in *Materials and methods*. (B) Immunoprecipitation was performed with the anti-AnxA1 antibody using freshly isolated cells (fresh) or metabolically-labelled cell lysates to monitor *de novo* synthesis of AnxA1 in response to buffer (Ctrl) or ATO. Results are from one representative experiment out of four.

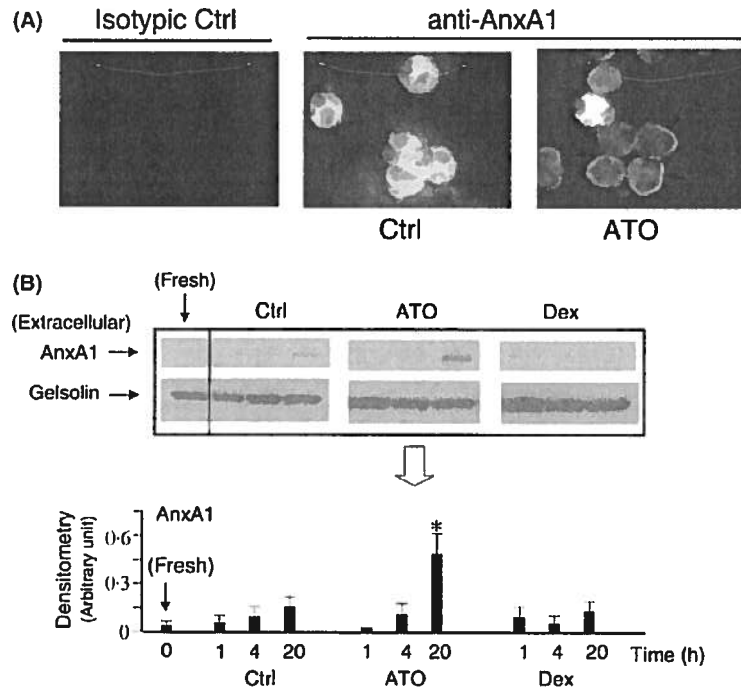


Fig 2. Arsenic trioxide (ATO) induces the release of pre-existing AnxA1 in human neutrophils. (A) Freshly isolated neutrophils were incubated for 3 h with buffer (Ctrl) or 5 $\mu\text{mol/l}$ of ATO and localization of AnxA1 was monitored by immunofluorescence as described in *Materials and methods*. Arrows indicated the presence of AnxA1 at the cell membrane. (B) Neutrophils were incubated for the indicated periods of time with buffer, ATO or dexamethasone (Dex) and the presence of AnxA1 released in the external milieu was assessed by immunoblotting. Densitometric analysis was performed using a Fluor-S multi-imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the Multi-Analyst version 1.1 program (Bio-Rad). Gelsolin expression was monitored to verify equivalent loading. Results are means \pm SEM ($n = 4$). * $P < 0.05$ versus control (Ctrl) by ANOVA. Fresh, freshly isolated cells.

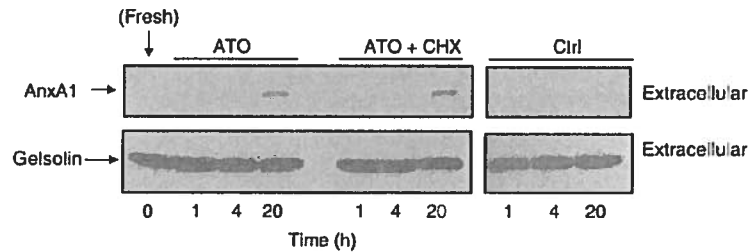


Fig 3. Cycloheximide does not inhibit the release of AnxA1 in arsenic trioxide-activated human neutrophils. Freshly isolated neutrophils were incubated for the indicated period of times with buffer (Ctrl), arsenic trioxide (ATO) alone or in presence of cycloheximide (ATO + CHX). The release of AnxA1 in the external milieu was assessed by immunoblotting as described in Fig. 2. In parallel, the plasma gelsolin was monitored to verify protein loading. Note that treatment with CHX did not alter AnxA1 release. Results are from one representative experiment out of four.

panel), suggesting that AnxA1 could be released from the cytosol to the external milieu. AnxA1 expression was monitored in the external milieu from non-metabolically-labelled ATO-induced cells by Western blot, as addition of recombinant human AnxA1 in cultures was previously found to induce neutrophil apoptosis (Solito *et al.*, 2003). As illustrated in Fig 2B, AnxA1 was barely detected in the external milieu from cells undergoing spontaneous apoptosis (20 h-aged), whereas

its expression was significantly increased after 20 h following induction of apoptosis by ATO. Of note, we failed to detect metabolically-labelled (radioactive) AnxA1 by immunoprecipitation from the extracellular milieu when neutrophils were treated with ATO ($n = 4$, data not shown), suggesting that newly synthesized AnxA1 remains inside the cells. As illustrated in Fig 3, the levels of expression of extracellular AnxA1 remained similar whether or not cells were incubated with

ATO alone for 1, 4 or 20 h in the presence of the protein inhibitor CHX, demonstrating that this release originates from the pre-existing pool of AnxA1 and not the newly synthesized pool.

ATO induces neutrophil apoptosis by an AnxA1-independent mechanism

Because of the above results, and given the fact that exogenously added ANXA-1 was recently found to induce neutrophil apoptosis (Solito *et al.*, 2003), we next investigated whether or not AnxA1 is somewhat involved in the ability of ATO to induce neutrophil apoptosis. However, prior to these experiments, we first verified whether or not ATO could induce apoptosis in murine neutrophils, to eliminate possible species specificity. We used the LPS-induced murine air pouch model to obtain a population of enriched neutrophils ($\geq 85\%$)

(Pelletier *et al.*, 2004). As illustrated in Fig 4A, ATO can induce apoptosis in murine neutrophils. In these experiments, the plant lectin *Viscum album* Agglutinin-1 (VAA-1), known as a potent neutrophil proapoptotic molecule (Savoie *et al.*, 2000; Lavastre *et al.*, 2002), was used as a positive control. It is important to mention that the potency of ATO in murine neutrophils (more than 85% apoptosis) was similar to that observed in human neutrophils (Binet *et al.*, 2006). Thus, knowing that ATO acts similarly in murine neutrophils, we next isolated neutrophils as above but from AnxA1 knockout (KO) mice and their littermate controls, and incubated them with ATO. Curiously, ATO was found to induce apoptosis at the same rate and with the same potency in AnxA1-deficient neutrophils as compared with AnxA1-positive cells (Fig 4B). Results are from three separate experiments in which cells were pooled from 10 different animals for each condition. As no sexual dimorphism was noted in prior experiments, both sexes

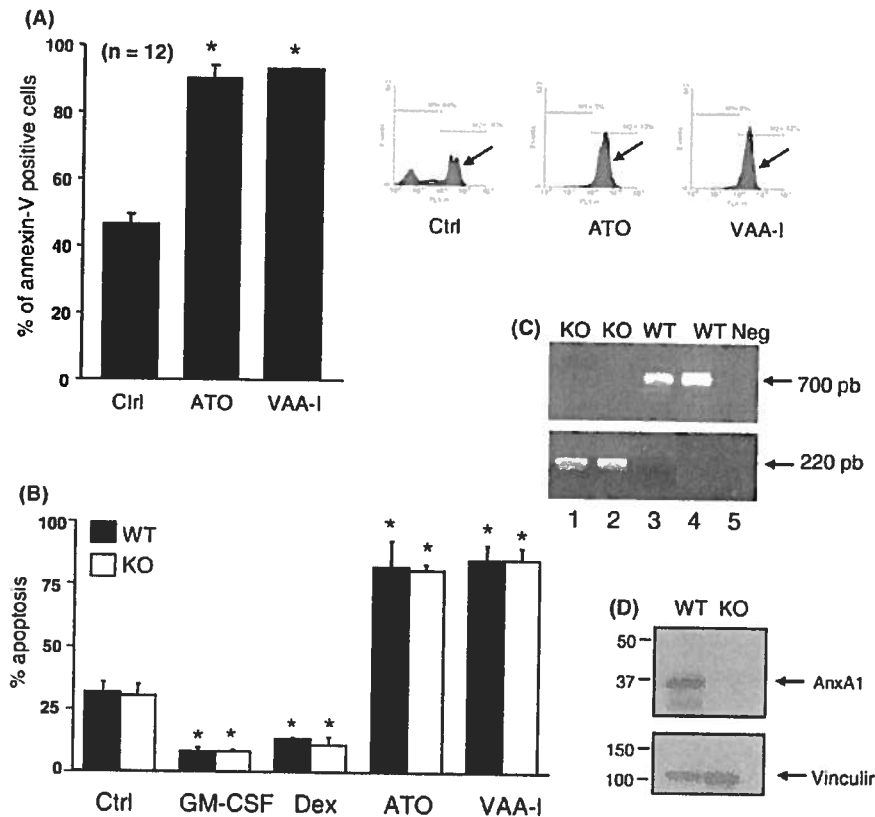


Fig 4. AnxA1 is not required for the proapoptotic property of arsenic trioxide. (A) Neutrophils were harvested from lipopolysaccharide-induced air pouches in CD-1 mice as described in *Materials and methods* and then incubated for 22 h with the indicated agonists. Apoptosis was assessed by flow cytometry using FITC annexin-V. Results are means \pm SEM ($n = 12$) and are expressed as % of annexin-V positive cells. * $P < 0.05$ versus Ctrl by ANOVA. Inset, typical data plotted in the bar graph. (B) Murine neutrophils were harvested as in A, but using mice deficient in AnxA1 (knockout) or in wildtype animals (WT) and incubated for 22 h with the indicated agonists. Apoptosis was assessed by flow cytometry using propidium iodide to measure subdiploid (sub-G₂/G₁) cells from a cell cycle profile. * $P < 0.05$ versus Ctrl by ANOVA. Absence of AnxA1 was confirmed at both the gene and protein levels [panel C and D respectively]. Ctrl, control; ATO, arsenic trioxide; VAA-1, *Viscum album* agglutinin-1; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; Dex, dexamethasone.

were mixed for subsequent experiments. To elucidate whether or not the apoptotic machinery was altered in these neutrophils, we tested, in parallel, the ability of other agents to modulate neutrophil apoptosis. Interestingly, the two anti-apoptotic agents, the cytokine GM-CSF and the glucocorticoid drug Dex delayed neutrophil apoptosis similarly in *AnxA1*^{-/-} and wildtype animals. In addition, treatment with the proapoptotic VAA-1 molecule induced apoptosis to a similar degree in both conditions. Together, these above results suggest that the apoptotic machinery is not altered in *AnxA1*-deficient neutrophils. Absence of *AnxA1* was confirmed at both the gene (Fig 4C) and protein (Fig 4D) levels.

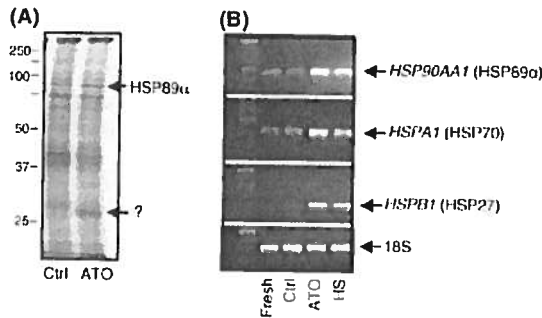


Fig 5. Arsenic trioxide induces a heat shock (HS)-like response in human neutrophils. (A) Metabolically-labelled neutrophils were treated with buffer (Ctrl) or arsenic trioxide (ATO) for 22 h and cell lysates were prepared and run on 1D-SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis). The selected band was identified by mass spectrometry as Hsp89 α . Results are from one representative experiment out of three. (B) HS was induced by incubating neutrophils for 30 min at 42°C and then reduced to 37°C for the rest of the incubation period. For the other conditions, cells were incubated in parallel for 30 min in buffer. Gene expression of the indicated Hsp protein (Hsp) was assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Results are from one representative experiment of at least three.

ATO induces de novo protein synthesis of Hsp proteins in human neutrophils

Because we found that the expression of other spots was increased by ATO in neutrophils, as evidenced by 2D-SDS-PAGE, we decided to perform 1D-SDS-PAGE to identify the few prominent polypeptides newly synthesized in response to ATO. As illustrated in Fig 5A, two major bands (molecular mass of ~90 and ~28 kDa, see arrows) were reproducibly detected by such an approach. One band (~90 kDa) with the sequence -GVVDESDLPLNISR- was clearly identified by mass spectrometry as the Hsp protein (Hsp) 89 α (Hsp89 α) (3287489-NCBI), the sole protein detected in the sample. In contrast, identification of the other band has not yet been determined, as several different polypeptides were present in this sample, rendering it impossible to clearly identify which polypeptide was newly synthesized. Interestingly, the cellular response of arsenic shares many features common to the Hsp responses (Miller *et al*, 2002). As little evidence exists in the literature suggesting that *AnxA1* is a stress protein induced by heat (Kim *et al*, 1997; Rhee *et al*, 2000), we next investigated the ability of ATO to induce Hsp in neutrophils. Freshly isolated neutrophils were treated with ATO (5 μ mol/l) for 3 h and, in parallel, a HS was induced by treating cells at 42°C for 30 min and re-incubating them at 37°C for 2.5 h (total of 3 h, like ATO) to compare both conditions. As illustrated in Fig 5B, RT-PCR reveals that both ATO and HS treatment induced mRNA expression for *HSP90AA1*, *HSPA1* and *HSPB1*. Of note, although Hsp89 α and Hsp70 were constitutively expressed in freshly isolated cells, the expression of Hsp27 varied from not detectable to barely detectable. We next decided to study, in parallel, the profile of proteins newly synthesized in response to ATO and HS after running 2D-SDS-PAGE. Interestingly, although the profiles presented some differences (Fig 6), both ATO and HS induced *de novo* protein synthesis of *AnxA1* (arrow) according to the molecular mass of 28 kDa and a pI of 5.2 previously determined.

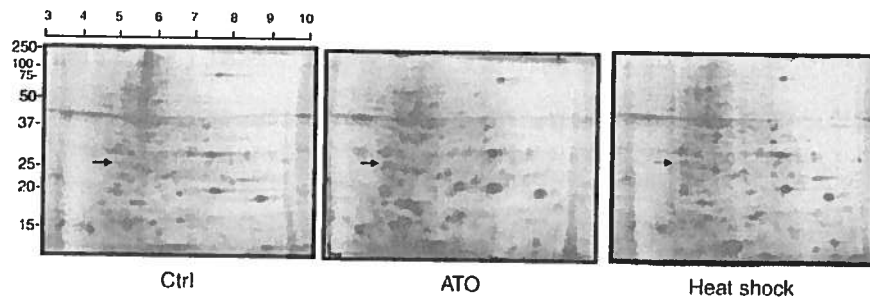


Fig 6. Arsenic trioxide and heat shock (HS) induce *de novo* protein synthesis of *AnxA1* in human neutrophils. HS was performed as described in *Materials and methods*. Where HS was not performed, cells were treated with buffer (Ctrl) or 5 μ mol/l of arsenic trioxide (ATO). Cells were metabolically labelled for 22 h and 2D-SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) was assessed as described in *Materials and methods*. Results are representative of three independent experiments. The spot at 28 kDa, with an apparent pI of 5.2, corresponding to *AnxA1* is indicated by a white arrow. Of note, ATO is more potent in inducing *de novo* protein synthesis than the mild 30 min HS; however, it is clear that *AnxA1* is increased by HS.

Discussion

The present study determined that ATO induces *de novo* protein synthesis of AnxA1 in human neutrophils. Although a few studies have suggested *de novo* synthesis of AnxA1 under different experimental conditions, there was no previous evidence until now to support its *de novo* synthesis at the polypeptide level in human neutrophils. AnxA1 is known to possess powerful anti-inflammatory activities that are due largely to its ability to inhibit cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂), which plays a key role in the production of the potent inflammatory mediator prostaglandins and leucotrienes (Perretti & Solito, 2004). AnxA1 is expressed in large amounts in the cytosol of human neutrophils, where a large proportion is localized in the cytoplasmic (gelatinase) granules (Perretti *et al.*, 2000). AnxA1 does not possess a signal peptide and is, therefore, not exported via the classical secretory pathway, but rather is externalized from the cells to the cell surface via exocytosis (Perretti *et al.*, 2000; Perretti & Flower, 2004). Our immunofluorescence data, combined with Western blot experiments, confirmed that ATO induced the translocation of AnxA1 from the cytosol to the membrane and then released it into the external milieu. This is in agreement with a previous study reporting that AnxA1 was released into the extracellular milieu of activated neutrophils (Perretti *et al.*, 1996). The present study demonstrated that ATO increased *de novo* synthesis of AnxA1 in the cytosol, and that different polypeptides were detected by immunoprecipitation, suggesting that newly synthesized AnxA1 is cleaved over time. Interestingly, in a recent study, AnxA1 was found to be released in the external milieu of tumour necrosis factor- α -induced neutrophils into a clipped form of 33 kDa (Vong *et al.*, 2007). 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 performed in neutrophils, have reported different AnxA1 polypeptides of 31, 33, 36, 37 and 38 kDa and also a form of ~50 kDa. Moreover, different spots of AnxA1 have been observed by 2D-SDS-PAGE in fragile X syndrome with pIs in the range of 5–7 (Sun *et al.*, 2001). The spot identified in this study had a Mr of ~28 kDa with an unconventional pI of ~5.2. We suggest that this represents a fragment of native newly synthesized AnxA1. It is important to note that our experiments were performed following several hours of culture. The more conventional 38 kDa polypeptide was also detected by immunoblotting, and several fragments were detected by immunoprecipitation. Furthermore, the lysis buffers used in 2D-SDS-PAGE *versus* 1D-SDS-PAGE differed, which possibly contributed to differences in the observed molecular masses as an earlier study reported proteolysis of lipocortin-I (ancient terminology of AnxA1) with elastase, generating more than 10 fragments ranging from 8–38 kDa (Huang *et al.*, 1987). More recently, AnxA1 was identified as a substrate for human leucocyte elastase (Rescher *et al.*, 2006). Nevertheless, the significant point is that the newly synthesized pool of AnxA1 reported

here is not released (or only very weakly) into the external milieu. To support this, immunoprecipitation did not detect any newly synthesized AnxA1 (or radioactive AnxA1) in the external milieu. Furthermore, expression of AnxA1 in the external milieu did not vary, whether or not neutrophils underwent spontaneous apoptosis or if this process was delayed by Dex. In addition to the fact that necrotic cells were not observed (based on trypan blue exclusion assay) under any conditions, inhibiting cell death with Dex further supports the notion that AnxA1 release was not because of cell necrosis. One would expect decreased AnxA1 expression in response to anti-apoptotic agents, but this was not observed. Knowing that exogenous addition of recombinant human AnxA1 to human neutrophils induced apoptosis after 6 h (Solito *et al.*, 2003), it is tempting to speculate that ATO-induced neutrophil apoptosis via the release of AnxA1. However, this has never been reported in previous studies. Our results obtained with the AnxA1^{-/-} mice clearly demonstrate that ATO can induce neutrophil apoptosis by an AnxA1-independent mechanism.

Interestingly, the cellular response of arsenic is known to share features with the HS response (Kim *et al.*, 1997; Beere, 2005). Thus, identification of Hsp89 α as another protein newly synthesized in response to ATO suggests that ATO induces a HS-like response in neutrophils. We have demonstrated that HS by itself induces *de novo* protein synthesis in human neutrophils. Eid *et al.* (1987) first reported that human neutrophils were able to synthesize proteins *de novo*; the identified proteins were Hsp70 and Hsp85. Our current results support the notion that *de novo* synthesis of Hsp may play important roles in the general biology of neutrophils that need to be further investigated.

AnxA1 has been reported to have a chaperone-like function (Kim *et al.*, 1997). Stoichiometric amounts of AnxA1 were found to suppress thermally induced inactivation and aggregation of citrate synthase and glutamate dehydrogenase. In addition, according to circular dichroism spectroscopy, AnxA1 was effective in refolding guanine hydrochloride-denatured glutamate dehydrogenase. More recently, AnxA1 was identified as a stress protein induced by heat (Rhee *et al.*, 2000). Analysis of the promoter region of human AnxA1 revealed the presence of a putative HS element that might be responsible for increasing transcription by heat stress, oxidative stress and arsenite. Thus, we propose that *de novo* synthesis of AnxA1 induced by ATO is related to its ability to induce a stress response rather than apoptosis. The fact that other polypeptides are newly synthesized in response to ATO, suggests a complex mechanism of action. Nevertheless, ATO induces neutrophils apoptosis by a protein synthesis-dependent mechanism, as the addition of cycloheximide prevents, at least partially, its proapoptotic activity (Binet *et al.*, 2006).

Our data provide the first evidence that ATO can induce a stress response in human neutrophils. We propose that AnxA1 is one of the stress-induced proteins, such as Hsp27, Hsp70 and Hsp89 α . The fact that HS, like ATO, induced *de novo* protein synthesis, including AnxA1, in neutrophils,

provides further support. Identification of these proteins will shed light on the mode of action of ATO. Although *de novo* synthesis of AnxA1 induced by ATO is not involved in apoptosis, the observation that ATO-induced neutrophil apoptosis suggests that this drug possesses anti-inflammatory properties. In addition, it is highly plausible that AnxA1 production is involved in other anti-inflammatory parameters not yet investigated. The role of AnxA1 in inflammation has been clearly established recently using AnxA1 KO mice; these mice exhibit an exaggerated response to pro-inflammatory stimuli and a partial or complete resistance to the anti-inflammatory effects of glucocorticoids (Rovietto *et al*, 2002; Hannon *et al*, 2003).

Acknowledgements

This study was partly supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-89534) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). FB holds a PhD FRSQ award, and DG is a Scholar from FRSC. We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

References

- Beere, H.M. (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 2633–2639.
- Binet, F., Cavalli, H., Moisan, E. & Girard, D. (2006) Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and *de novo* protein synthesis. *British Journal Haematology*, **132**, 349–358.
- Carre, M., Carles, G., Andre, N., Douillard, S., Ciccolini, J., Briand, C. & Braguer, D. (2002) Involvement of microtubules and mitochondria in the antagonism of arsenic trioxide on paclitaxel-induced apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, **63**, 1831–1842.
- Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Ni, J.H., Zhong, H.L., Si, G.Y., Jin, X.L., Tang, W., Li, X.S., Xong, S.M., Shen, Z.X., Sun, G.L., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Gazin, C., Naoe, T., Chen, S.J., Wang, Z.Y. & Chen, Z. (1996) *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB1 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood*, **88**, 1052–1061.
- Cox, G. & Austin, R.C. (1997) Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *Journal of Leukocyte Biology*, **61**, 224–230.
- Davison, K., Mann, K.K. & Miller, Jr, W.H. (2002) Arsenic trioxide: mechanisms of action. *Seminars in Hematology*, **39**(2 Suppl. 1), 3–7.
- Eid, N.S., Kravath, R.E. & Lanks, K.W. (1987) Heat-shock protein synthesis by human polymorphonuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*, **165**, 1448–1452.
- Fernandez, C., Ramos, A.M., Sancho, P., Amran, D., de Blas, E. & Aller, P. (2004) 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. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 3877–3884.
- Girard, D., Paquet, M.F., Paquin, R. & Beaulieu, A.D. (1996) Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood*, **88**, 3176–3184.
- Girard, D., Paquin, R. & Beaulieu, A.D. (1997) Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, *de novo* protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochemical Journal*, **325**(pt 1), 147–153.
- Gupta, S., Yel, L., Kim, D., Kim, C., Chiplunkar, S. & Gollapudi, S. (2003) Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. *Molecular Cancer Therapeutics*, **2**, 711–719.
- Hannon, R., Croxtall, J.D., Getting, S.J., Rovietto, F., Yona, S., Paul-Clark, M.J., Gavins, F.N., Perretti, M., Morris, I.F., Buckingham, J.C. & Flower, R.J. (2003) Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin I-/- mouse. *FASEB Journal*, **17**, 253–255.
- Huang, K.S., McGray, P., Mattaliano, R.J., Burne, C., Chow, F.P., Sinclair, L.K. & Pepinsky, R.B. (1987) Purification and characterization of proteolytic fragments of lipocortin I that inhibit phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 7639–7645.
- Hussein, M.A., Saleh, M., Ravandi, F., Mason, J., Rifkin, R.M. & Ellison, R. (2004) Phase 2 study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *British Journal Haematology*, **125**, 470–476.
- Kim, G.Y., Lee, H.B., Lee, S.O., Rhee, H.J. & Na, D.S. (1997) Chaperone like function of lipocortin I. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **43**, 521–528.
- Korper, S., Nolte, F., Thiel, E., Schrezenmeier, H. & Rojewski, M.T. (2004) The role of mitochondrial targeting in arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloid cell lines. *British Journal Haematology*, **124**, 186–189.
- Lavastre, V., Pelletier, M., Saller, R., Hostanska, K. & Girard, D. (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*, **168**, 1419–1427.
- Li, Y.M. & Broome, J.D. (1999) Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Research*, **59**, 776–780.
- Miller, Jr, W.H. (2002) Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells. *Oncologist*, **7**(Suppl. 1), 14–19.
- Miller, Jr, W.H., Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, I. & Waxman, S. (2002) Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research*, **62**, 3893–3903.
- Munshi, N.C., Tricot, G., Desikan, R., Badros, A., Zangari, M., Toor, A., Morris, C., Anaissie, E. & Barlogie, B. (2002) Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*, **16**, 1835–1837.
- Pelletier, M., Bouchard, A. & Girard, D. (2004) *In vivo* and *in vitro* roles of IL-21 in inflammation. *Journal of Immunology*, **173**, 7521–7530.
- Perretti, M. & Flower, R.J. (2004) Annexin I and the biology of the neutrophil. *Journal of Leukocyte Biology*, **76**, 25–29.
- Perretti, M. & Solito, E. (2004) Annexin I and neutrophil apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, **32**, 507–510.
- Perretti, M., Croxtall, J.D., Wheller, S.K., Goulding, N.J., Hannon, R. & Flower, R.J. (1996) Mobilizing lipocortin I in adherent human

- leukocytes downregulates their transmigration. *Nature Medicine*, **2**, 1259–1262.
- Perretti, M., Christian, H., Wheller, S.K., Aiello, I., Mugridge, K.G., Morris, J.F., Flower, R.J. & Goulding, N.I. (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*, **24**, 163–174.
- Rescher, U., Goebeler, V., Wilbers, A. & Gerke, V. (2006) Proteolytic cleavage of annexin I by human leukocyte elastase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1763**, 1320–1324.
- Rhee, H.J., Kim, G.Y., Huh, J.W., Kim, S.W. & Na, D.S. (2000) Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 3220–3225.
- Rojewski, M.T., Balus, C., Knauf, W., Thiel, E. & Schrezenmeier, H. (2002) Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *British Journal Haematology*, **116**, 555–563.
- Rousselot, P., Labaume, S., Marolleau, J.P., Larghero, J., Noguera, M.H., Brouet, J.C. & Femand, J.P. (1999) Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Research*, **59**, 1041–1048.
- Roviezzo, F., Getting, S.J., Paul-Clark, M.J., Yona, S., Gavins, E.N., Perretti, M., Hannon, R., Croxtall, I.D., Buckingham, J.C. & Flower, R.J. (2002) The annexin-I knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **53**, 541–553.
- Sakamoto, C., Suzuki, K., Hato, F., Akahori, M., Hasegawa, T., Hino, M. & Kitagawa, S. (2003) Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway. *International Journal of Hematology*, **77**, 60–70.
- Savoie, A., Lavastre, V., Pelletier, M., Hajto, T., Hostanska, K. & Girard, D. (2000) Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **68**, 845–853.
- Shao, W., Ianelli, M., Ferrara, F.I., Riccioni, R., Rosenauer, A., Davison, K., Lamph, W.W., Waxman, S., Pelicci, P.G., Lo Coco, F., Avvisati, G., Testa, U., Peschle, C., Gambacorti-Passerini, C., Nervi, C. & Miller, Jr. W.H. (1998) Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR alpha protein in acute promyelocytic leukemia cells. *Journal of the National Cancer Institute*, **90**, 124–133.
- Shen, Z.Y., Shen, W.Y., Chen, M.H., Shen, J. & Zeng, Y. (2003) Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As₂O₃. *International Journal of Molecular Medicine*, **11**, 479–484.
- Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., Ihanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L.J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabrilove, I., Scheinberg, D.A., Pandolfi, P.P. & Warrell, Jr, R.P. (1998) Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *New England Journal of Medicine*, **339**, 1311–1318.
- Solito, E., Kamal, A., Russo-Marie, F., Buckingham, J.C., Marullo, S. & Perretti, M. (2003) A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin I on human neutrophils. *FASEB Journal*, **17**, 1544–1546.
- Stringer, R.E., Hart, C.A. & Edwards, S.W. (1996) Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *British Journal Haematology*, **92**, 169–175.
- Sturlan, S., Baumgartner, M., Roth, E. & Bachleitner-Hofmann, T. (2003) Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells. *Blood*, **101**, 4990–4997.
- Sun, H.T., Cohen, S. & Kaufmann, W.E. (2001) Annexin-I is abnormally expressed in fragile X syndrome: two-dimensional electrophoresis study in lymphocytes. *American Journal of Medical Genetics*, **103**, 81–90.
- Vong, L., D'Acquisto, F., Pederzoli-Ribeil, M., Lavagno, L., Flower, R.J., Witko-Sarsat, V. & Perretti, M. (2007) Annexin I cleavage in activated neutrophils: a pivotal role for proteinase 3. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 29998–30004.
- Wang, H.Y., Liu, S.X. & Zhang, M. (2003) Gene expression profile changes in NB4 cells induced by arsenic trioxide. *Acta Pharmacologica Sinica*, **24**, 646–650.
- Zuo, L., Li, J., Yang, Y., Wang, X., Shen, T., Xu, C.M. & Zhang, Z.N. (2001) 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. *Annals of Hematology*, **83**, 751–758.

Article 2

Titre

Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2.

Auteurs

François Binet et Denis Girard

Publié dans la revue

Journal of Leukocyte Biology. 2008 Dec; 84(6):1613-22. Epub 2008 Aug 26.

Contribution personnelle

Cet article contient les résultats concernant le deuxième objectif de recherche. Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai effectué toutes les expériences dans cet article. Également, j'ai participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats, à la rédaction et aux corrections du manuscrit.

Contribution des coauteurs

Denis Girard a participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction et la correction du manuscrit.

Résumé en français de l'article

Le trioxyde d'arsenic (TA) est un agent connu pour traiter la leucémie promyélocytaire. De plus, il peut induire l'apoptose et l'activation des MAPK chez les promyélocytes et les cellules cancéreuses. Nous avons récemment découvert que le TA induit l'apoptose des neutrophiles. L'objectif de cette recherche était d'abord de déterminer si les MAPK sont activées par le TA puis de savoir si cet agent peut avoir des effets d'agoniste sur le neutrophile. Nous avons remarqué que le TA active la phosphorylation de p38 qui, contrairement à l'effet du H₂O₂, n'est pas réversible par l'ajout exogène de catalase. Également, cette activation est observable avant la production de H₂O₂ et ne requiert pas d'activation d'une flambée calcique. Puis, nous avons observé que le TA induit la phosphorylation de JNK mais non de Erk1/2. En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de ces kinases, nous avons déterminé que l'effet pro-apoptotique du TA est indépendant de l'activation de ces MAPK. Par contre, la stimulation des capacités d'adhésion, de migration, de phagocytose, de libération des granules gélatinasiques et spécifiques, mais non des granules azurophiliques, ainsi que la libération des vésicules sécrétoires et l'augmentation de l'activité gélatinasique en présence de TA sont dépendantes de l'activité de p38 et/ou JNK. Il s'agit de la première étude qui associe d'importantes propriétés d'agoniste du TA sur le neutrophile. En considérant le rôle prépondérant du neutrophile dans une variété de désordres inflammatoires, nous croyons que le TA pourrait être utilisé de façon plus répandue en clinique, notamment dans le contrôle de l'inflammation.

Texte original de l'article

Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or *c-jun* NH₂-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2

François Binet and Denis Girard¹

Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada

Abstract: Arsenic trioxide (ATO) is known for treating acute promyelocytic leukemia and for inducing apoptosis and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in promyelocytes and cancer cells. We recently reported that ATO induces neutrophil apoptosis. The aim of this study was to establish whether or not ATO recruits MAPKs in neutrophils, as well as to further investigate its agonistic properties. We found that ATO activates p38 and that, unlike H₂O₂, this response was not inhibited by exogenous catalase. Also, we demonstrated that ATO-induced p38 activation occurs before H₂O₂ generation and without a calcium burst. We next established that ATO recruits *c-jun* NH₂-terminal (JNK) but not extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (Erk-1/2). Using pharmacological inhibitors, we found that the proapoptotic activity of ATO occurs by a MAPK-independent mechanism. In contrast, the ability of ATO to enhance adhesion, migration, phagocytosis, release, and activity of gelatinase and degranulation of secretory, specific, and gelatinase, but not azurophilic granules, is dependent upon activation of p38 and/or JNK. This is the first study establishing that ATO possesses important agonistic properties in human neutrophils. Given the central role of neutrophils in various inflammatory disorders, we propose that ATO might have broader therapeutic implications in clinics, especially for regulating inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 84: 1613–1622; 2008.

Key Words: drug · inflammation · signalization

INTRODUCTION

Arsenic trioxide (As₂O₃ or ATO) is currently used as a cure against acute promyelocytic leukemia [1–3]. Its great efficiency in inducing cell differentiation or apoptosis in many cancerous cells has prompted clinicians to expand its use to other types of cancers such as multiple myeloma [2]. The mode of action of ATO is complex, probably largely cell specific, and is not fully understood. However, it is clear that this drug affects both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis, leading ulti-

mately to caspase activation and disruption of cell machinery and cytoskeleton [3].

The vast majority of studies aimed at elucidating the mode of action of ATO have been performed in immature cancer cells. Only a few studies have examined the effect of this drug on primary mature cells of the immune system. Arsenic has been shown to alter the differentiation of monocytes to macrophages [4] and B cells to plasma cells [5]. In addition, ATO was found to alter human macrophage functions *in vitro* [6]. Also, induction of CD4 and CD8 T-cell apoptosis has been observed in response to ATO [7]. Recently, we found that ATO, at clinically achievable concentrations, induces neutrophil apoptosis by a H₂O₂- and de novo protein synthesis-dependent mechanism, leading to caspase activation [8]. Also, we found that ATO triggers de novo synthesis of many polypeptides in neutrophils, including annexin-I [1]. This protein was originally classified as anti-inflammatory due to its ability to inhibit cellular phospholipase A₂ (cPLA₂) and was recently identified as a chaperone-like protein. Unfortunately, we were not able to confirm a direct involvement of this protein in the proapoptotic activity of ATO, since the potency for inducing neutrophil apoptosis was not altered using cells isolated from annexin-I KO mice [1]. However, we demonstrated that ATO induced gene and protein expression of some heat shock proteins.

The three major mitogen-activated protein (MAP) kinases have been identified in neutrophils: the extracellular signal-regulated kinase (Erk) 1 and 2, the p38 kinase and the *c-Jun* amino-terminal kinase (JNK, also referred as a stress-activated kinase or SAPK). The Erk-1/2 MAPK is involved in growth and differentiation, p38 and JNK MAPKs are typically associated with apoptosis and cell stress responses [9]. These kinases are part of signaling pathways regulating activation of neutrophils by classical neutrophil agonists, including fMLP, tumor necrosis factor- α (TNF- α), or platelet-activating factor (PAF) [10, 11]. In addition, p38 and JNK have been linked with many facets involved in the inflammatory response, including cell adhesion, degranulation, chemotaxis and release of cytokines [12, 13].

¹ Correspondence: INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada. E-mail: denis.girard@ia.inrs.ca
Received July 16, 2008; revised July 30, 2008; accepted August 5, 2008.
doi: 10.1189/jlb.03081421

ATO has been shown to activate all three MAPKs in a variety of cancer cells. Trivalent arsenic species inhibit dephosphorylation of JNK in HeLa cells [14]. In addition, ATO induced sustained phosphorylation of JNK in multiple myeloma cells such as ILKM-3 and U266, and this activation was correlated with apoptosis induction [15]. Phosphorylation of p38 has also been demonstrated in a variety of cancer cells, including K562, LNKAP, and MCF-7. In these cells, the addition of ascorbic acid potentiates the response of ATO by increasing the GTP-bound form of Rac1, a downstream effector of p38 [16]. This indicates that reactive oxygen species, especially H_2O_2 , could be implicated in the ATO-induced phosphorylation of p38. ATO-induced Erk-1/2 phosphorylation has been reported in BEAS bronchial epithelial cells [17], but not in K562 cells [18], demonstrating that the effect of ATO on the MAPKs can vary in different cells. Indeed, the pattern of MAPK phosphorylation induced by ATO was reported to vary according to cell types, doses, and the cellular environment.

In the present study, we were interested in establishing the involvement of the MAPKs in ATO-treated human neutrophils. We postulated that H_2O_2 could trigger the phosphorylation of the stress kinase p38, as this relationship has been established in other systems [19]. This phosphorylation could, in turn, control many of the neutrophil functions. Surprisingly, our results demonstrated that ATO activated p38 in an H_2O_2 -independent fashion. Also, JNK, but not Erk-1/2, was activated by ATO, and MAPKs are not involved in ATO-induced neutrophil apoptosis. However, we show here that ATO possesses neutrophil agonistic properties never before reported, including adhesion, migration, phagocytosis, release, and activity of gelatinase and degranulation of secretory, specific, and gelatinase, but not azurophilic granules, and that all of these functions are dependent upon activation of p38 and/or JNK. ATO should now be considered as a potent activator of the neutrophil functions. A model of activation is presented.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, agonists, and Abs

Arsenic trioxide (As_2O_3), catalase, EGTA, LPS, PDB059, SB203580, A23187, and TNF- α were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and technical bovine xanthine was from Ultra Scientific (North Kingstown, RI, USA). IL-3 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and GM-CSF was obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ). Anti-phospho-specific p38 (pTyr^{129/132}), Erk-1/2 (pTyr^{182/187}), and JNK1-2/SAPK (pTyr^{183/185}) were from BioSource (Camarillo, CA, USA). Antibodies against the nonphosphorylated form of p38 (sc-535) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), polyclonal Erk-1/2 was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), and polyclonal SAPK/JNK was obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). FITC-CD11b conjugated antibody, monoclonal CD35 (clone E11), and CD63 (clone H5C6) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). The anti-CD66b antibody (clone 3013) was from AbD Serotec (Raleigh, NC, USA). Fluor-3-AM was acquired from Molecular Probes (Eugene, OH, USA), and the JNK inhibitor II was purchased from Calbiochem (Madison, WI, USA).

Neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Inc., Quebec, Canada), as described previously [20]. 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 Diff-Quick staining (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Cell viability was systematically evaluated before and after each treatment.

Production of reactive oxygen species

Cells were washed once and resuspended in HBSS-0.1% BSA, containing 5 μ M of CM-H₂DCl₂ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), at a cell density of 1×10^6 cells/ml for 15 min at 37°C. Cells were then incubated in the presence or absence of ATO from 5 to 180 min. The shift of fluorescence in FL1 was recorded using a FACScan.

Cell culture

The human lung epithelial A549 cell line was purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cells were grown in RPMI-1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FCS and antibiotics. Cell viability was systematically evaluated by trypan blue exclusion assay before and after each treatment, and mortality never exceeded 5%.

Migration assay

In vitro migration was performed in a 48-well microchemotaxis chamber (Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA) using a 3- μ m polycarbonate membrane filter as previously published [21]. The bottom wells were loaded with buffer or agonists (final volume of 25 μ l), the membrane was placed over the wells, and the top layer of the chamber was added over the membrane. Cells [50 μ l from a suspension of 1×10^6 cells/ml in RPMI-1640] were then added to the top chamber wells. The chamber was incubated at 37°C for 60 min in a humidified incubator in the presence of 5% CO_2 . After incubation, the top of the chamber was removed, and the upper side of the membrane was carefully wiped with a rubber scraper. The membrane was then fixed in methanol, colored with Diff-Quick staining kit, mounted on a glass slide, and examined under oil immersion at $\times 400$. The number of cells in five representative fields was counted, and the results were expressed as indices (number of cells from tested group/number of cells from the corresponding control). IL-3 was used as a positive control [22].

Gelatin zymography

Neutrophils were incubated from 0 to 60 min under various conditions. Cells were then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, and pellets were discarded. The supernatants (10 μ l corresponding to 0.1×10^6 cells) were mixed with a non-reducing buffer (10% glycerol, Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 1%), and run on 10% acrylamide gels containing 0.2% gelatin. Gels were washed for 30 min twice with 2.5% Triton X-100 and incubated overnight in digestion buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM). Gels were stained with Coomassie blue 0.1% and destained. Densitometric analysis was performed with a Fluor S Multimager, Multi Analyst ver. 1.1 program (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Adhesion of neutrophils

Neutrophils (treated or not with ATO 5 μ M for 2 h, previously found to be optimal) were labeled for 30 min with 5- μ M calcein-AM (Molecular Probes), and adhesion onto A549 cells was measured essentially as we have previously published [23]. The number of adherent neutrophils was calculated by counting the number of fluorescent cells from five randomly selected high-power fields ($\times 400$) observed with a photomicroscope Leica DMRL equipped with an epi-100 de-epifluorescent condenser. Images were taken with a Cooke Sensicam high-performance camera coupled to the Image Pro-plus (ver. 1.0) program.

Phosphorylation events

Neutrophils (10×10^6 cells/ml RPMI-1640) were stimulated from 15 s to 30 min with the indicated agonists. In some experiments, cells were preincubated for 30 min with inhibitors for p38 (SB203580, at 10 μ M), Erk-1/2 (PDB059, at 10 μ M) or JNK (JNKi, at 5 μ M). Cells were lysed in 2 \times Laemmli's sample buffer, and aliquots corresponding to 1×10^6 cells were

loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (p38) or polyvinylidene difluoride membranes (Erk-1/2 and JNK). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS)-Tween containing 5% nonfat dry milk (Carnation, Don Mills, Ontario, Canada). After washing, the antiphospho-specific p38, Erk-1/2, or JNK antibody, or the antibody directed against the corresponding unphosphorylated form were added at a final dilution of (1:1000) for phospho-specific antibody or 1:100 for the unphosphorylated form, respectively, in TBS-Tween. The membranes were kept overnight at 4°C and were then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) at 1:20,000 in TBS-Tween +5% BSA or a goat anti-mouse HRP secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk followed by several washes. Protein expression was revealed using an enhanced chemiluminescence Western blot analysis detection system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Assessment of neutrophil apoptosis

Apoptosis was evaluated by monitoring CD16 shedding. Briefly, cells were incubated on ice for 30 min with PBS + 20% autologous serum to prevent nonspecific binding via Fc receptors. Cells were washed and 2 µl FITC-CD16 antibody was added to 1×10^6 cells for 30 min on ice (light protected). Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and apoptotic neutrophils were evaluated by measuring the number of CD16-negative cells.

Phagocytosis of sheep erythrocytes

Sheep red blood cells (SRBCs) (QueLab, Montreal, Quebec, Canada) were opsonized with a 1:200 dilution of a rabbit IgG anti-SRBC antibody (Sigma) for 45 min at 37°C. Neutrophils (2×10^6 cells in RPMI-1640) pretreated 15 min with the indicated agonists were incubated with 50×10^6 opsonized SRBCs for 30 min. The samples were centrifuged at 200g for 10 min at 4°C. Supernatants were discarded, and an osmotic shock was performed on the pellets by treating them with 300 µl H₂O for 20 s, followed by the addition of 4.5 ml of PBS. The samples were washed, and the final pellets were suspended in 200 µl of PBS. Phagocytosis was measured and expressed as the percentage of neutrophils ingesting at least one opsonized SRBC. Toxaphene was used herein as a positive control for evaluating chemical-induced phagocytosis as previously reported [24].

Cell surface expression of CD35, CD63, and CD66b

Cell surface expression of CD35, CD63, and CD66b was monitored for assessing degranulation of secretory, specific, and gelatinase or azurophilic granules,

respectively, by flow cytometry essentially as previously published [25]. Non-specific binding of the antibodies was prevented by incubating the cells with PBS+20% autologous serum for 30 min on ice. Then, after several washes, primary antibodies or an IgG₁ isotypic control antibody were added at a concentration of 0.5 µg/ml for 30 min on ice. Cells were washed twice and incubated with 10 µg/ml of a FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibody for 30 min at 4°C. Analysis was performed with a FACScan (BD Biosciences).

Calcium mobilization

Calcium mobilization was assessed using the fluorescent probe Fluo-3 AM (Molecular Probes) as described previously [26]. Neutrophils (5×10^6 cells/ml) were incubated for 30 min at 37°C with 3 µM Fluo-3-AM in PBS-1% BSA. Cells were washed three times and resuspended at 5×10^6 cells/ml in PBS-1% BSA. An aliquot of 50 µl was transferred to a FACS tube containing 430 µl of PBS-1% BSA + 1 mM CaCl₂. Samples were loaded onto a FACScan flow cytometer, and fluorescence in FL1 was recorded for a period of ~20 s. Then, 5 µl of 100× agonist was added to the tube and fluorescence was recorded during an additional 3 min. The calcium ionophore A23187 was used at a final concentration of 10 µM. HBSS was used as negative control. A gate based on forward- and side-scatter was used to exclude debris.

Statistics

Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows ver. 3.0 using Student's *t* test. Statistical significance was established at *P* < 0.05.

RESULTS

ATO induces p38 phosphorylation in an H₂O₂- and calcium-independent manner

We have previously found that induction of apoptosis by ATO occurs by a H₂O₂-dependent mechanism and that this drug could also induce a heat shock-like response in human neutrophils [1, 8]. ROS, especially H₂O₂, have been found to be involved in signal transduction [27] and could trigger the phosphorylation of different MAPK, including p38, which is involved in stress response. Therefore, we investigate whether or not ATO will activate p38. As illustrated in Fig. 1A, ATO can strongly induce p38 phosphorylation. In these experiments, the stress-induced H₂O₂ molecule was used as a posi-

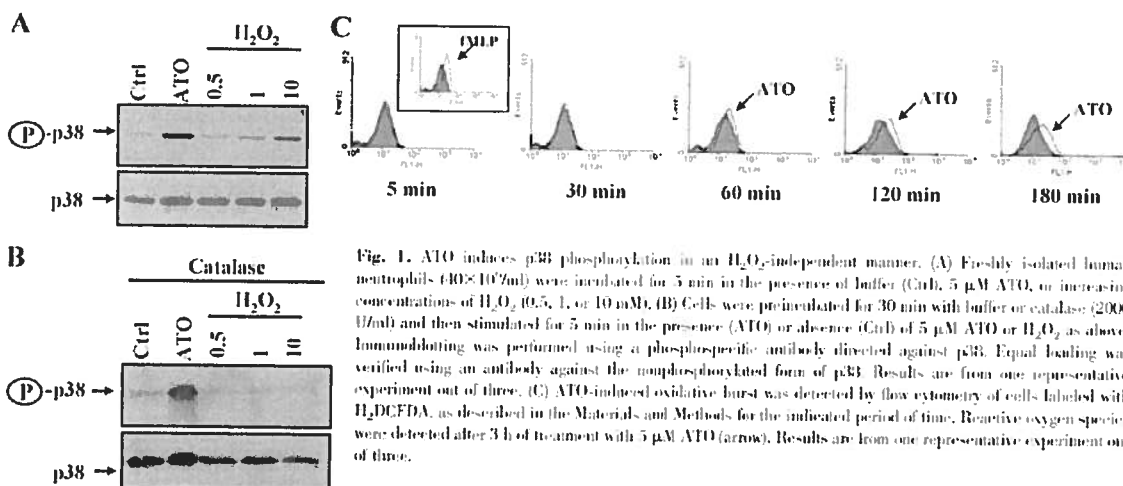


Fig. 1. ATO induces p38 phosphorylation in an H₂O₂-independent manner. (A) Freshly isolated human neutrophils (40×10^6 /ml) were incubated for 5 min in the presence of buffer (Ctrl), 5 µM ATO, or increasing concentrations of H₂O₂ (0.5, 1, or 10 mM). (B) Cells were preincubated for 30 min with buffer or catalase (2000 U/ml) and then stimulated for 5 min in the presence (ATO) or absence (Ctrl) of 5 µM ATO or H₂O₂ as above. Immunoblotting was performed using a phospho-specific antibody directed against p38. Equal loading was verified using an antibody against the unphosphorylated form of p38. Results are from one representative experiment out of three. (C) ATO-induced oxidative burst was detected by flow cytometry of cells labeled with H₂DCFDA, as described in the Materials and Methods for the indicated period of time. Reactive oxygen species were detected after 3 h of treatment with 5 µM ATO (arrow). Results are from one representative experiment out of three.

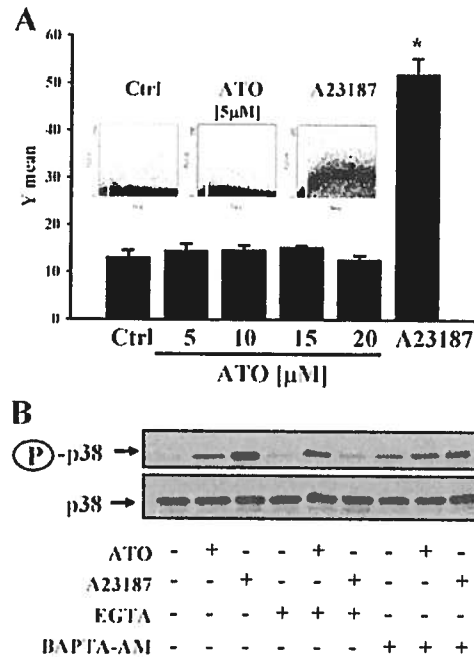


Fig. 2. ATO induces p38 phosphorylation in a calcium-independent manner. (A) Intracellular calcium mobilization was assessed by flow cytometry using the Fluo-3-AM probe, as described in Materials and Methods. Cells were treated with buffer (Ctrl), ATO, or the calcium ionophore A23187 (10 μ M). The Y mean amplitudes were plotted ($n = 3$). (Inset) Representative data are plotted in the bar graph. (B) Neutrophils were pretreated for 30 min with the extracellular Ca^{2+} chelator EGTA (0.5 mM), intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA-AM (50 μ M), or buffer, and then treated for 5 min with buffer (Ctrl) or ATO (5 μ M). p38 activation was investigated by immunoblotting. Results are from one representative experiment out of three. *, $P \leq 0.05$ vs. Ctrl.

active control. In contrast to H_2O_2 , addition of catalase, an inhibitor of H_2O_2 , did not reverse ATO-induced p38 phosphorylation (Fig. 1B). Using a flow cytometry approach, we found that ROS generation in ATO-induced neutrophils was detected only after at least 1 h of treatment and not after 5 or 30 min (Fig. 1C). This indicates that activation of p38 MAPK by ATO occurs before any ROS detection, including H_2O_2 .

Because of the importance of calcium for neutrophil activation, we decided to investigate the effect of ATO on calcium mobilization. As illustrated in Fig. 2A, increasing concentrations of ATO (0–20 μ M) did not result in any burst of calcium in neutrophils, as opposed to the ionophore A23187, which was used as a positive control. Moreover, pretreatment of neutrophils with the extracellular calcium chelator EGTA or the intracellular calcium chelator BAPTA-AM did not reverse the ability of ATO to induce p38 phosphorylation (Fig. 2B). As expected, pretreatment of cells with EGTA or BAPTA-AM causes an inhibition of p38 activation in response to A23187. Taken together, these results indicate that activation of p38 by ATO occurs by a H_2O_2 -independent mechanism and that a burst of calcium is not necessary for such activation.

Activation of p38 and JNK is not associated with the ability of ATO to induce human neutrophil apoptosis

Because we found that ATO activates p38 in neutrophils, we decided to investigate whether or not it could activate the two other major MAPKs, Erk-1/2 and JNK. As illustrated in Fig. 3A, kinetic experiments (0.25–30 min) reveal that, in addition to p38 (bottom panel), ATO also recruits JNK but not Erk-1/2, despite the fact that cells were responsive to Erk-1/2 activation, as judged by phosphorylation of this MAPK by the cytokine GM-CSF (upper panel). As expected, the Erk-1/2 inhibitor PD98059 was found to reverse the effect of GM-CSF. The ATO-induced JNK activation was rapid, since the maximum of phosphorylation was observed after 0.25–0.5 min (middle panel). The JNK inhibitor (JNKi) was found to markedly attenuate the ability of ATO to induce JNK phosphorylation. The ability of ATO to activate p38 was attenuated by the p38 inhibitor SB203580 (lower panel), and ATO also activated p38 less rapidly than JNK, since the maximum of phosphorylation was observed after 5 min instead of 0.5 min.

Many reports have described proapoptotic roles for p38 and JNK in the presence of ATO [18, 28]. Because we originally demonstrated that ATO induced apoptosis in neutrophils by a mechanism that is not fully understood [8], and since we found here that ATO activates two MAPKs (p38 and JNK), we further investigated the potential role of MAPKs in the proapoptotic activity of ATO. As illustrated in Fig. 3B, the proapoptotic activity of ATO was not affected by treatments with specific inhibitors of the three major MAPKs. The antiapoptotic activity of GM-CSF was significantly decreased by treatment with the PD98059, which is known to reverse Erk-1/2 activity. This latter result correlates with the ability of GM-CSF to activate Erk-1/2 (Fig. 3A, upper panel) [29]. Of note, all inhibitors were each used at a concentration known to be effective in activated neutrophils [30] and did not show any significant effect on the basal apoptotic rate of these cells. As expected, IL-1 activated JNK phosphorylation in human neutrophils, as we have previously reported [30]. Apoptosis was also confirmed by cytology (data not shown). Taken together, these results clearly demonstrate that the proapoptotic activity of ATO is not linked to activation of MAPKs.

Effects of ATO on neutrophil functions other than apoptosis: role of MAPKs in adhesion, migration, and phagocytosis

MAPKs have also been demonstrated to play key roles in the control of inflammation. For example, in a pulmonary inflammation model, p38 has been identified as the main kinase responsible for LPS-triggered neutrophil accumulation [31]. Consequently, we hypothesized that the phosphorylation of MAPKs was implicated in an activation response. Adhesion of neutrophils to epithelial or endothelial cells is a major step in the recruitment of neutrophils to inflammatory sites. Therefore, we evaluated the ability of ATO-treated neutrophils to adhere to a confluent layer of human epithelial A549 cells *in vitro* in the presence or absence of MAPK inhibitors. Neutrophils treated with ATO showed an increase in adhesion to A549 cells as observed in Fig. 4A. Of note, adhesion was significantly

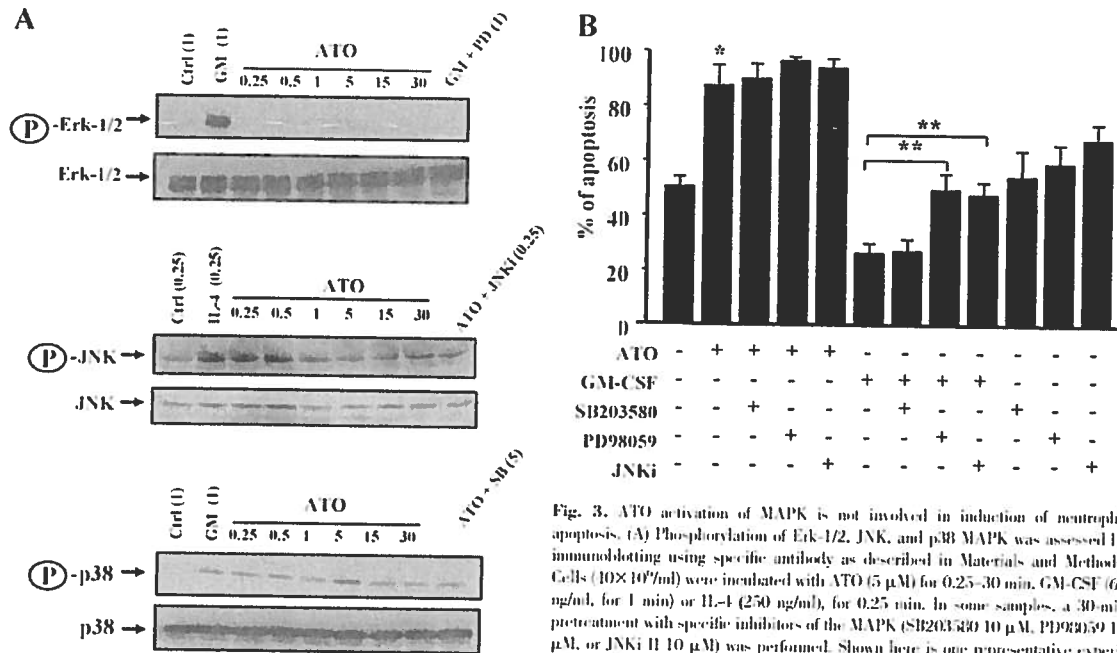


Fig. 3. ATO activation of MAPK is not involved in induction of neutrophil apoptosis. (A) Phosphorylation of Erk-1/2, JNK, and p38 MAPK was assessed by immunoblotting using specific antibody as described in Materials and Methods. Cells ($10 \times 10^6/ml$) were incubated with ATO (5 μM) for 0.25–30 min, GM-CSF (65 ng/ml, for 1 min) or IL-4 (250 ng/ml), for 0.25 min. In some samples, a 30-min pretreatment with specific inhibitors of the MAPK (SB203580 10 μM , PD98059 10 μM , or JNKi II 10 μM) was performed. Shown here is one representative experiment of at least three separate experiments. (B) Neutrophils were pretreated with pharmacological-specific inhibitors as above and then buffer, ATO (5 μM) or GM-CSF (65 ng/ml) was added and cells were further incubated for a period of 20 h. Apoptosis was evaluated by flow cytometry following CD16 staining by calculating the number of CD16 negative cells. *, $P \leq 0.05$ vs. Ctrl. **, $P \leq 0.05$.

decreased with the use of p38 and JNK inhibitors, showing that both signaling pathways are involved in this biological process. Interestingly, the proadhesive effect of ATO was comparable to that of LPS, a potent neutrophil agonist.

Several classic neutrophil activators, such as fMLP, known to activate adhesion, have also been shown to stimulate neutrophil migration [32]. Therefore, we decided to verify whether or not this was the case for ATO. Using a modified Boyden chamber assay, we found that ATO increased significantly neutrophil migration by a factor of 1.9 ± 0.5 . This was significantly reversed by SB203580 and JNKi inhibitors, but not, as expected, by PD98059 (Fig. 4B), indicating that both p38 and JNK pathways are involved. The effect of ATO was less important than the potent chemotactic factor IL-8.

Phagocytosis is a crucial biological process in innate immunity, and impairment of phagocytosis leads to recurrent infections. Consequently, we next looked at the effect of ATO on neutrophil phagocytosis. As illustrated in Fig. 1C, ATO can enhance the ability of neutrophils to ingest opsonized sheep red blood cells. The percentage of phagocytosis increases from 38.8 ± 1.6 to 73 ± 5.2 (mean \pm SE, $n=3$). Using pharmacological inhibitors, we found that the effect of ATO was significantly reduced only when cells were pretreated with SB203580, indicating that p38 plays a major role. Although we noted a slight decrease with JNKi, this was not statistically significant. The ability of ATO to induce phagocytosis was at potency similar to that of the environmental pollutant toxaphene, used routinely as a positive control when investigating chemical-induced phagocytosis [24]. These results suggest that

ATO stimulates neutrophil phagocytosis via a p38-dependent pathway.

ATO induces degranulation of gelatinase, specific, and secretory but not azurophilic granules in neutrophils

We have recently demonstrated that ATO induced the release of annexin-1, a protein that colocalizes with gelatinase within the specific and gelatinase granules. Therefore, we hypothesized that ATO could induce degranulation and the release of gelatinase. To verify this, we evaluated gelatinase (or MMP-9) release using a gelatin zymography assay, since this protease is found in the specific or gelatinase granules. As illustrated in Fig. 5, A and B, ATO induces the release of gelatinase into the external milieu, peaking after 30 min of treatment. Since only the use of the p38 pharmacological inhibitor was suitable for investigating the role of MAPK in this assay (the other inhibitors were found to alter the basal level by themselves), we can only conclude that at least p38 is involved. In parallel, we systematically verified, by trypan blue exclusion assay, that no cell necrosis occurred during the ATO treatments (data not shown).

To further support ATO induction of gelatinase degranulation, we next monitored, by flow cytometry, the cell surface expression of CD66b, a marker of specific and gelatinase granules [25]. As illustrated in Fig. 6A (upper panel), ATO increased cell surface expression of CD66b in neutrophils. This concurs with the results obtained with the zymography, which indicated the presence of gelatinase b in the external

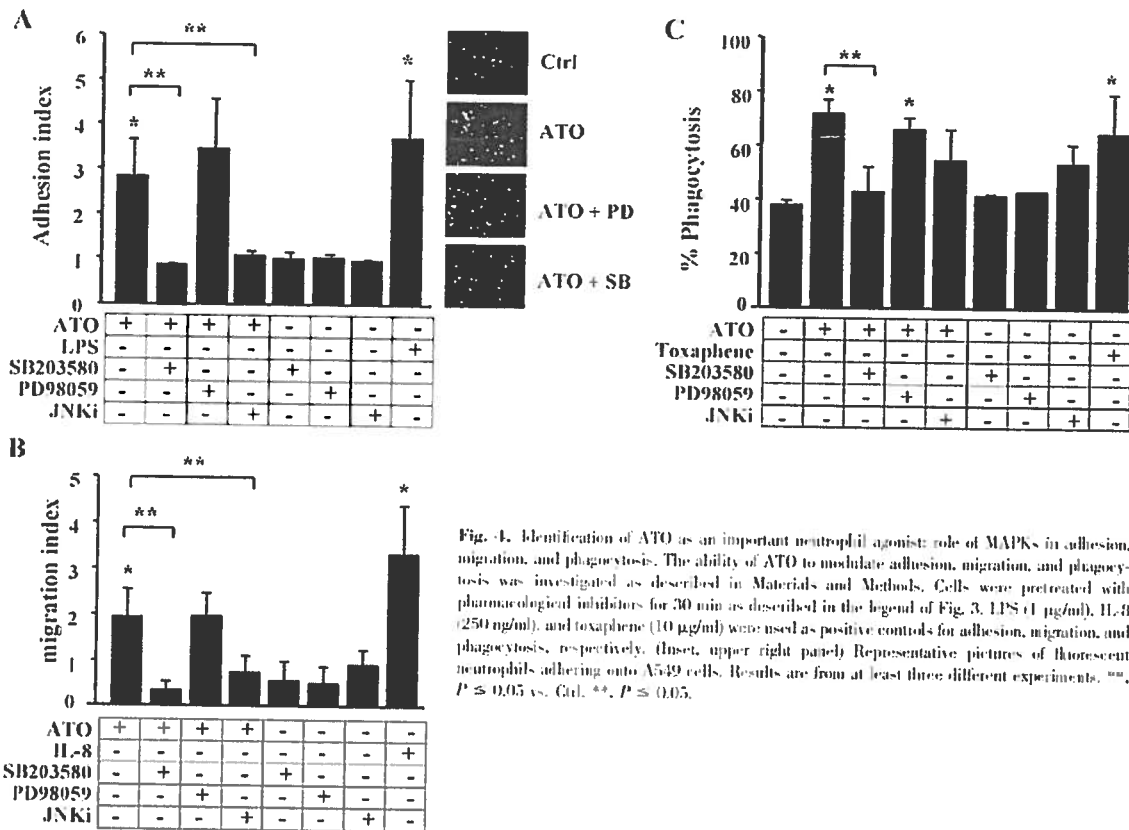


Fig. 4. Identification of ATO as an important neutrophil agonist: role of MAPKs in adhesion, migration, and phagocytosis. The ability of ATO to modulate adhesion, migration, and phagocytosis was investigated as described in Materials and Methods. Cells were pretreated with pharmacological inhibitors for 30 min as described in the legend of Fig. 3. LPS (1 μ g/ml), IL-8 (250 ng/ml), and toxaphene (10 μ g/ml) were used as positive controls for adhesion, migration, and phagocytosis, respectively. (inset, upper right panel) Representative pictures of fluorescent neutrophils adhering onto A549 cells. Results are from at least three different experiments. **, $P \leq 0.05$ vs. Ctrl. ***, $P \leq 0.05$.

milien. In these experiments, fMLP was used as a positive control of neutrophil degranulation. In parallel, we investigated whether or not ATO could also induce degranulation of both secretory and azurophilic granules using CD35 and CD63 markers, respectively [25]. As shown in Fig. 6A (middle panel), ATO increased cell surface expression of CD35 as strongly as fMLP, as judged by the shift of fluorescence, which overlapped for both agonists. In contrast to CD66b and CD35, ATO did not modulate the expression of CD63 in neutrophils. Pretreatments with the p38 MAPK inhibitor (SB203580) demonstrated that the degranulation event was p38 dependent (Fig. 6B). Taken together, these results demonstrate that ATO acts on specific subsets of granules, in contrast to fMLP, which stimulates the release of all types of granules investigated. However, the ability of fMLP to induce degranulation of azurophilic granules was not significantly increased. We conclude that phosphorylation of p38 by ATO stimulates exocytosis of secretory, specific, and gelatinase, but not azurophilic granules.

DISCUSSION

ATO induction of MAPK signaling in APL and non-APL cancer cell lines has been well characterized. However, little is known regarding the effect of ATO on signaling in cells of the

immune system, especially in neutrophils. We have recently demonstrated that ATO induces human neutrophil apoptosis by a mechanism that is dependent upon de novo protein synthesis and H_2O_2 production [1, 8]. Considering that H_2O_2 could activate cell stress in neutrophils, we hypothesized that ATO might activate members of the MAPKs and that this could be related to its proapoptotic activity. However, the results obtained in this study reveal that the general picture of neutrophil activation by ATO is not that simplistic. We provide the first evidence that ATO effectively activates p38 in human neutrophils. We demonstrated that ATO-induced p38 phosphorylation occurs by a H_2O_2 -independent mechanism, based on the fact that 1) activation of p38 by ATO, in contrast with H_2O_2 itself, is not reversed by catalase treatment; and 2) ATO activates p38 far before an increase of ROS (including H_2O_2) production can be observed. In addition to p38, we are the first to demonstrate that ATO recruits JNK, but not Erk-1/2 in human neutrophils. ATO has been found to be a proapoptotic agent in many cancer cell lines. The implication of activation of MAPK in the apoptosis effect has been shown to be dependent on cell type. For example, in human myelomonocytic leukemia U937 cells, the activation of p38 was shown to be essential for ATO proapoptotic effect, as well as for production of ROS and calcium burst [33]. This is in sharp contrast to our results, which show that the proapoptotic activity of ATO is not

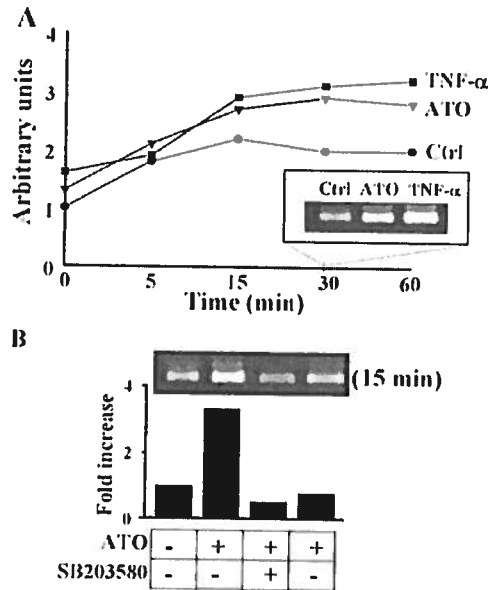


Fig. 5. ATO induces the release and activity of gelatinase by a p38 MAPK-dependent mechanism. (A) Extracellular release of gelatinase (or MMP-9) was evaluated using gelatin zymography, as described in Materials and Methods after the indicated period of time following the treatment with agonists. (Inset) Representative data obtained after 30 min of treatment with buffer (Ctrl), 5 μ M ATO or 100 ng/ml tumor necrosis factor- α (TNF- α). Gelatinase activity was measured in arbitrary units by quantitative analysis of negatively stained bands through computerized image analysis (FluorS-Multimager, Multi Analyst ver. 1.1 program (Bio-Rad)). (B) Neutrophils were pretreated with the SB203580 p38-specific inhibitor and incubated for 15 min with buffer, ATO, or TNF- α . Supernatants were then separated as described in Materials and Methods. Results are from one representative experiment out of four. Densitometric analysis was performed, and results are expressed as fold increase vs. Ctrl.

linked to MAPK activation. Moreover, we did not observe any calcium burst in response to ATO. However, there is a discrepancy regarding the precise role of the p38 stress kinase for ATO effects. The addition of various p38 inhibitors, including SB203580, sp-202, and SC10-169 or siRNA against p38, strongly enhanced the induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia KT-1 cells [31]. In this case, JNK activation was found to be the kinase responsible for the transduction of proapoptotic signals inside the cells as has been reported in other studies [28].

In addition to the new observation that ATO activates p38 and JNK MAPKs in neutrophils, we provide the first evidence that ATO is a neutrophil agonist with a larger spectrum of activity than previously reported, since it modulates several important neutrophil functions other than apoptosis, including adhesion, migration, phagocytosis, and degranulation, in which p38 and/or JNK are involved.

Accumulation of ROS is also a common feature observed in response to ATO cell activation. Indeed, many genes associated with the NADPH oxidase subunits, such as p67^{phox}, gp91^{phox} or rac-2 are up-regulated upon ATO treatment in NB4 cells, and this could lead to production of ROS and cell death

[35]. Although we demonstrated that the addition of catalase, which converts H₂O₂ to water and oxygen, could reverse the proapoptotic effect of ATO in neutrophils [8], one can imagine that at least two separate phenomena occur in ATO-induced neutrophils. First, ATO could trigger p38 phosphorylation without need for calcium burst or ROS production (particularly H₂O₂). Second, this drug could simultaneously lead to increased accumulation and release of H₂O₂, which could trigger apoptosis. Therefore, activation of the p38 and JNK kinases would be a fast response, and this would occur before any apparent signs of apoptosis. Indeed, ATO-induced phosphorylation of p38 and JNK was found to be maximal at 5 min and 15 s, respectively (Fig. 3A). Interestingly, the modes of entry of ATO in a cell, as well as the release of H₂O₂, appear to involve the aquaglyceroprotein 9 (AQP9) that was found to be expressed in human neutrophils [36]. Moreover, a clear correlation between the expression of AQP9 with arsenite uptake and sensitivity in leukemia cells has been recently reported [37].

One feature of classic activators of neutrophils, such as fMLP or platelet-activating factor (PAF) is the stimulation of calcium release. Curiously, we did not observe any calcium burst with ATO treatment in neutrophils, even at concentrations up to 20 μ M, which is four times the concentration needed to induce apoptosis in neutrophils. This is in contrast with other reports that have demonstrated a transient increase of calcium in various models with the use of ATO [33]. However, neutrophils are nondividing primary cells and do not respond in the same way as cancer cells in the presence of ATO. In fact, no production of ROS from the NADPH oxidase or mitochondria has been detected with ATO in human neutrophils [8] in contrast with APL cells, for example [39]. It is notable that arsenite has also been shown to alter calcium homeostasis in certain models. Perturbation of calcium signaling could be the result of initiation of an endoplasmic reticulum (ER) stress response [40]. Interestingly, ATO was reported to up-regulate genes encoding proteins of the metallothionein family or protein-folding and chaperone proteins [40], which are indicative of an ER stress response. We have recently demonstrated that in addition to annexin-1, ATO increases de novo protein synthesis of heat shock protein B9 α (Hsp49 α), as well as gene expression of Hsp27 and Hsp70 in human neutrophils [1], supporting the notion that ATO is implicated in an ER stress response in these cells. This remains to be investigated further.

Many neutrophil agonists such as fMLP, TNF- α , or LPS are known to activate MAPKs in neutrophils, especially p38 and JNK, which elicit functional responses, including degranulation, adherence, chemotaxis, or superoxide production [41–43]. As previously mentioned, activation of these functions by ATO is under the control of two kinases, namely p38 and JNK. Other upstream kinases, including MKK1, have been associated with activation of p38 or JNK [14]. Interestingly, *Mkk1*^{-/-} cells were largely resistant to arsenite toxicity, and phosphorylation of JNK in the presence of arsenite was abrogated in these cells [15]. Other kinases upstream of p38 or JNK that are phosphorylated with ATO include MKK3, MKK6, and MKK7 [31, 46]. Further studies in this area of research will elucidate the precise upstream target of ATO responsible for the initiation of cell signaling in neutrophils.

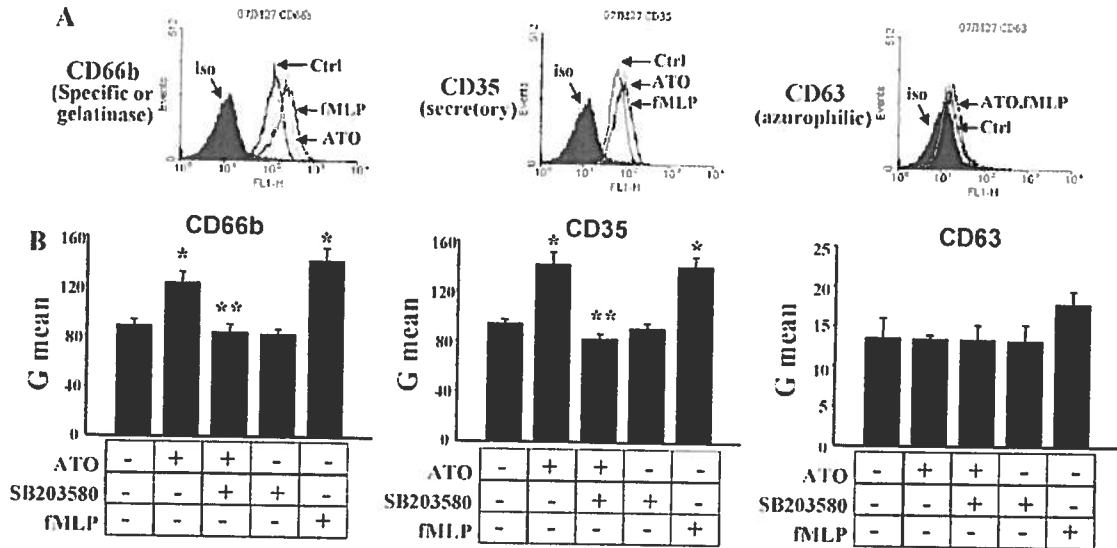
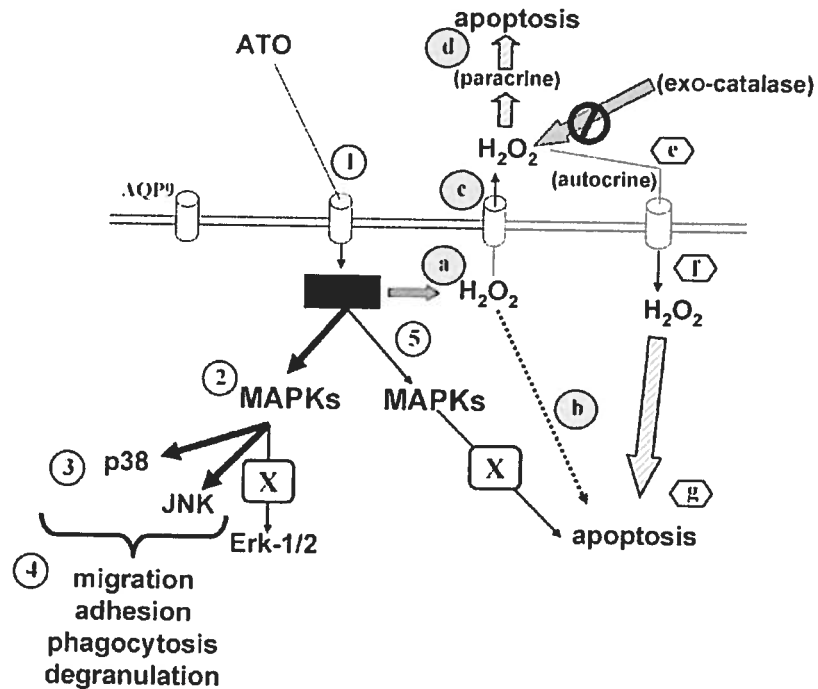


Fig. 6. ATO induces degranulation of gelatinase, specific and secretory, but not azurophilic granules in neutrophils by a p38-dependent mechanism. (A) Release of subset types of granules was evaluated by flow cytometry by monitoring cell surface expression of CD66b, CD63, or CD66b, as described in Materials and Methods. Cells were incubated in presence of buffer (Ctrl), ATO (5 μ M) for 30 min or fMLP (0.1 μ M) for 5 min. Legend is as follows: isotypic antibody (filled), Ctrl (black), ATO (light gray), and fMLP (dotted). Results are from one representative experiment out of at least three. (B) Cells were preincubated with SB203580 and then for 30 min with ATO or fMLP (as above). *, $P \leq 0.05$ vs. Ctrl. **, $P \leq 0.05$ vs. ATO.

Our results clearly show that ATO, a chemotherapeutic drug, can stimulate many events implicated in the inflammatory cascade. In fact, adhesion of neutrophils to epithelial or endothelial cells and disruption of the subendothelial extracellular

matrix (ECM) by metalloprotease are important steps leading to migration of neutrophils to inflammatory sites [47]. Release of MMP-9 is also implicated in a proangiogenic response [48], which could be detrimental to cancer patients. However, ATO

Fig. 7. The last proposed model of ATO activation in human neutrophils. ATO enters the cells via aquaglyceroporphin (AQP9) expressed in neutrophils (1) and then activates MAPKs (2), p38 and JNK, but not Erk-1/2. MAPKs are activated by ATO. For short to moderate periods of time after activation (3), ATO enhances neutrophil migration, adhesion phagocytosis, and degranulation (all granules but azurophilic) (4). For a long period of activation (5), ATO induces apoptosis by a MAPK-independent mechanism. In parallel, by an unknown mechanism (black box), ATO increases intracellular H_2O_2 content (a) that can lead directly to apoptosis (b, dotted line). H_2O_2 may be released into the external milieu via AQP9 (H_2O_2 is known to pass through such channels) (c) and can induce in a paracrine and/or autocrine fashion (d-e-g). This is supported by the fact that the addition of exogenous catalase (to which the cell is not permeable) is known to totally inhibit ATO-induced apoptosis.



also enhances the ability of neutrophils to exert phagocytosis. This is interesting from a clinical point of view, if we consider that patients with APL often suffer from neutropenia [19]. Indeed, APL is the result of a block in the differentiation of promyelocytic cells, which are precursors of the neutrophils. Therefore, ATO could stimulate innate immunity in patients receiving ATO treatment, in part, by increasing phagocytosis of neutrophils. Given that cancer patients could suffer from recurrent infections due to the low number of leukocytes, we propose that ATO might confer dual protection, by inducing apoptosis of cancerous promyelocytic cells and also by activating neutrophils, particularly with regards to their ability to exert phagocytosis.

Given the central role of neutrophils in various inflammatory disorders and knowing that ATO can regulate several important neutrophil functions, we propose that ATO might have broader clinical implications beyond cancer treatment. On the basis of the results presented in this study, we propose a first model of neutrophil activation in response to ATO, in which MAPKs, including p38 and JNK, but not Erk-1/2, are involved in neutrophil responses. The rapid activation of these MAPKs can regulate neutrophil functions, including migration, adhesion, phagocytosis, and degranulation, after short to moderate time periods of treatment with ATO. In contrast, a longer period of activation with ATO causes the release of accumulated intracellular H_2O_2 which, if released into the external milieu, leads to apoptosis by a MAPK-independent mechanism (Fig. 7).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partly supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-89534) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). F. B. holds a FRSQ Ph.D. award and D. G. is a Scholar from FRSQ. We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

REFERENCES

1. Binet, F., Chiasson, S., Girard, D. (2003) Arsenic trioxide induces de novo protein synthesis of annexin-I in neutrophils: association with a heat shock-like response and not apoptosis. *Br. J. Haematol.* **140**, 454–463.
2. Munshi, N. C., Fricton, G., Desikan, R., Bados, A., Zangari, M., Toor, A., Morris, C., Amisic, E., Barlogie, B. (2002) Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* **16**, 1335–1337.
3. Miller, W. H., Jr., Schipper, H. M., Lee, J. S., Singer, J., Waxman, S. (2002) Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* **62**, 3993–3993.
4. Lemarie, A., Morzadec, C., Merino, D., Micheau, O., Fardel, O., Verhbet, L. (2006) Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophage differentiation through nuclear factor- κ B-related survival pathway down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 304–314.
5. Rousselet, P., Labonne, S., Marolleau, J. P., Langhero, J., Noguera, M. H., Bronet, J. C., Feraud, J. P. (1999) Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Res.* **59**, 1041–1043.
6. Lemarie, A., Bourbonnay, E., Morzadec, C., Fardel, O., Verhbet, L. (2003) Inorganic arsenic activates reduced NADPH oxidase in human primary macrophages through a Rho kinase/p38 kinase pathway. *J. Immunol.* **170**, 6010–6017.
7. Gupta, S., Yel, L., Kim, D., Kim, C., Ghilpinkar, S., Gollapudi, S. (2003) Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 711–719.
8. Binet, F., Cavalli, H., Moisan, E., Girard, D. (2006) Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis. *Br. J. Haematol.* **132**, 349–358.
9. Raman, M., Chen, W., Cobb, M. H. (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100–3112.
10. Niek, J. A., Avdi, N. J., Young, S. K., Knall, C., Gervins, P., Johnson, G. L., Worthen, G. S. (1997) Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J. Clin. Invest.* **99**, 975–986.
11. Rafuse, P., Lee, J. K., Leung, C. C., Raffin, T. A. (1995) TNF- α induces tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in adherent human neutrophils. *J. Immunol.* **154**, 1785–1792.
12. Herlaar, E., Brown, Z. (1999) p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* **5**, 439–447.
13. Kasper, B., Brandt, E., Ernst, M., Petersen, F. (2006) Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases. *Blood* **107**, 1760–1775.
14. Cavigelli, M., Li, W. W., Liu, A., Su, B., Yoshioka, K., Karin, M. (1996) The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.* **15**, 6269–6279.
15. Kajiguchi, T., Yamamoto, K., Iida, S., Ueda, R., Emi, N., Naoe, T. (2006) Sustained activation of c-Jun-N-terminal kinase plays a critical role in arsenic trioxide-induced cell apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Cancer Sci.* **97**, 540–545.
16. Verma, A., Mohindra, M., Deb, D. K., Sossano, A., Kamthampoti, S., Ravandi, F., Minceci, S., Kalkalokam, D. V., Phtanias, I. C. (2002) Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to arsenic trioxide. *J. Biol. Chem.* **277**, 49833–49835.
17. Wu, W., Graves, L. M., Jaspers, I., Deylin, R. B., Reed, W. S., Samet, J. M. (1999) Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals. *Am. J. Physiol. Lung Physiol.* **277**, 1924–1931.
18. Shin, M. J., Kim, H. J., Yang, S. J., Lee, I. S., Choi, H. I., Kim, T. (2002) Arsenic trioxide induces apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells: possible involvement of p38 MAP kinase. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 377–383.
19. Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y., Holbrook, N. J. (1993) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem. J.* **333**, 291–300.
20. Girard, D., Bolani, N., Beaulieu, A. D. (1998) Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15R α) but not the IL-9/13alpha component. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **48**, 232–240.
21. Rathe, C., Pelletier, M., Roberge, C. J., Girard, D. (2002) Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin. Immunol.* **105**, 169–175.
22. Huber, A. R., Kunkel, S. L., Todd, R. F., III, Weiss, S. J. (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* **254**, 99–102.
23. Pelletier, M., Girard, D. (2005) Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* **141**, 315–325.
24. Gauthier, M., Roberge, C. J., Pelletier, M., Tessier, P. A., Girard, D. (2001) Activation of human neutrophils by technical toxaphene. *Clin. Immunol.* **98**, 46–53.
25. Jee, N. R., Bane, M. J., Lominadze, G., Luermann, G. C., Ward, R. A., McLeish, K. R. (2007) The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C1690–C1700.
26. Moisan, E., Chiasson, S., Girard, D. (2007) The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin. *Clin. Exp. Immunol.* **150**, 158–165.
27. Bhat, N. R., Zhang, P. (1999) Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurochem.* **72**, 112–119.
28. Davison, K., Mann, K. K., Waxman, S., Miller, W. H., Jr. (2004) JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **103**, 3196–3202.
29. Klein, J. B., Rane, M. J., Scherzer, J. A., Cowan, P. Y., Ketritz, R., Mathiesen, J. M., Burdick, A., McLeish, K. R. (2000) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Immunol.* **164**, 4236–4291.
30. Rathe, C., Pelletier, M., Chiasson, S., Girard, D. (2007) Molecular mechanisms involved in interleukin-8-induced human neutrophils' expression

- and regulation of suppressor of cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 1287–1296.
31. Kim, H. J., Lee, H. S., Chung, V. H., Kang, J. L. (2006) β 3B Mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF- κ B activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages. *Toxicology* **225**, 36–47.
 32. Hoffstein, S. T., Friedman, R. S., Weissmann, G. (1982) Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils. *J. Cell Biol.* **95**, 231–241.
 33. Iwama, K., Nakajo, S., Anchi, T., Nakaya, K. (2001) Apoptosis induced by arsenic trioxide in leukemia U937 cells is dependent on activation of p38, inactivation of ERK and the Ca^{2+} -dependent production of superoxide. *Int. J. Cancer* **92**, 518–526.
 34. Giatsis, N., Katsoulidis, E., Sassano, A., Tallman, M. S., Higgins, L. S., Nebret, A. R., Davis, R. J., Plataniotis, L. C. (2006) Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of arsenite trioxide-dependent cellular responses. *Cancer Res.* **66**, 6763–6771.
 35. Chou, W. C., Jie, C., Kennedy, A. A., Jones, R. J., Trush, M. A., Dang, C. V. (2001) Role of NADPH oxidase in arsenite-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4573–4583.
 36. Laito, V. M., Forslund, T., Sundqvist, T., Magnusson, K. E., Gustafsson, M. (2002) Neutrophil leukocyte motility requires directed water influx. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 212–222.
 37. Leung, J., Pang, A., Yuen, W. H., Kwong, Y. L., Tse, E. W. (2007) Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenite uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood* **109**, 740–746.
 38. Florea, A. M., Splittstoesser, F., Busselberg, D. (2007) Arsenite trioxide (As₂O₃) induced calcium signals and cytotoxicity in two human cell lines: SY-5Y neuroblastoma and 293 embryonic kidney (HEK). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **220**, 292–301.
 39. Wang, J., Li, L., Gang, H., Shi, G., Yi, J. (2008) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are responsible for the high susceptibility to arsenite cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk. Res.* **32**, 129–146.
 40. Du, Y., Wang, K., Fang, H., Li, J., Xiao, D., Zheng, P., Chen, Y., Fan, H., Pan, X., Zhao, C., et al. (2006) Coordination of intrinsic, extrinsic, and endoplasmic reticulum-mediated apoptosis by inositolb mesylate combined with arsenic trioxide in chronic myeloid leukemia. *Blood* **107**, 1582–1590.
 41. Krump, L., Sanghera, J. S., Pelech, S. L., Furuya, W., Grinstein, S. (1997) Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of β 3B mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **272**, 937–944.
 42. Mocsai, A., Jakus, Z., Vantus, T., Berton, C., Lowell, C. A., Lugli, E. (2000) Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of β 3B mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J. Immunol.* **164**, 4321–4331.
 43. Rame, M. J., Carrithers, S. L., Arthur, J. M., Klein, J. B., McLoish, K. R. (1997) Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J. Immunol.* **159**, 5070–5075.
 44. Ding, C., Davis, R. J., Flavell, R. A. (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 55–72.
 45. Peng, Z., Peng, L., Fan, V., Zandi, E., Shetzer, H. G., Xia, Y. (2007) A critical role for I κ B kinase beta in metalloproteinase-1 expression and protection against arsenite toxicity. *J. Biol. Chem.* **282**, 21487–21496.
 46. Nutharatanapong, N., Chen, K., Sinhasani, P., Keane, J. F., Jr. (2005) EGF receptor-dependent JNK activation is involved in arsenite-induced p21Cip1/Waf1 upregulation and endothelial apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H99–H1107.
 47. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Hallewachs-Mecavelli, J. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* **80**, 617–653.
 48. Aird, V. C., Kupriyanova, E. A., Deryugina, E. I., Quigley, J. P. (2007) Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 20262–20267.
 49. Ghilis, J. (1963) Acute promyelocytic leukemia? *Blood* **21**, 237–240.

Article 3

Titre

New findings in the human neutrophil cell physiology: activation of the endoplasmic reticulum stress-mediated cell pathway of apoptosis.

Auteurs

François Binet, Sonia Chiasson et Denis Girard

Soumis dans la revue

Blood

Contribution personnelle

Cet article contient les résultats concernant le troisième objectif de recherche. Je suis l'auteur principal de cet article. J'ai effectué toutes les expériences sauf quelques expériences de RT-PCR et immunobuvardages de type Western (figures 2B, 3A, B, E et F). Également, j'ai participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article.

Contribution des coauteurs

Sonia Chiasson a effectué des expériences de RT-PCR (figures 2B, 3A, E et F) et une expérience d'immunobuvardage de type Western (figure 3B). Denis Girard a participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction et la correction du manuscrit.

Résumé en français de l'article

Il existe trois voies apoptotiques, soit la voie extrinsèque, la voie intrinsèque et la voie du RE (RE) dont on vient juste de prouver l'existence. Alors que l'activation des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque chez les neutrophiles est bien connue à ce jour, l'implication de la voie du RE, impliquant généralement la caspase-4, reste inconnue chez ces cellules. En utilisant des techniques de microscopie par immunofluorescence et de microscopie électronique, nous avons constaté des perturbations du RE des neutrophiles incubés avec du trioxyde d'arsenic, un agent qui induit un stress au RE. L'expression et l'activation de plusieurs acteurs importants des voies de l'*unfolded protein response*, soit GRP78 (glucose regulated 78kDa protein), GADD153, ATF6, XBP1 et eIF2 α sont augmentées chez des neutrophiles incubés avec le TA ou d'autres agents qui provoquent un stress au RE. Bien que la caspase-4 soit active chez les neutrophiles, son inhibition ne renverse pas l'effet pro-apoptotique du TA et ce, même à une concentration capable de renverser l'activation de la caspase-4. Nous avons également constaté que les cellules THP-1 déficientes en caspase-4 sont aussi sensibles au TA, ce qui démontre que cette caspase n'est pas essentielle à l'effet pro-apoptotique du TA. L'activation de la caspase-4 est associée au clivage et à la présentation à la surface du neutrophile apoptotique de la vimentine. Il s'agit du premier article démontrant que la voie apoptotique du RE est opérationnelle chez les neutrophiles et que celle-ci est indépendante de l'activité de la caspase-4.

Texte tel que soumis

New findings in the human neutrophil cell physiology: activation of the endoplasmic reticulum stress-mediated cell pathway of apoptosis.

François Binet*, Sonia Chiasson*, Denis Girard*¹

**Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Canada*

Running title: Activation of ER stress-mediated pathway in PMNs

Keywords: Neutrophils, apoptosis, caspases, caspase-4, endoplasmic reticulum

Word counts: for text=4994 for abstract=195

¹Corresponding author:

Denis Girard, PhD

Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des neutrophiles

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

denis.girard@iaf.inrs.ca

Phone: (450) 687-5010 (X- 8847) Fax: (450) 686-5309

ABSTRACT

Apoptosis can result from activation of three major pathways: the extrinsic, the intrinsic, and the most recently identified endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated pathway. While the two former pathways are known to be operational in PMNs, the existence of the ER stress-mediated pathway, generally involving caspase-4, has never been reported in these cells. Using immunofluorescence and electron microscopy, we present evidence of ER alterations in PMNs activated by the ER stress inducer arsenic trioxide (ATO). Several key players of the unfolded protein response, including GRP78, GADD153, ATF6, XBP1 and eIF2 α are expressed and activated in PMNs treated with ATO or other ER stress inducers. Although caspase-4 is activated in PMNs, treatment with a caspase-4 inhibitor did not attenuate the proapoptotic effect of ATO at a concentration that reverses caspase-4 activation. The proapoptotic effect of ATO was not reversed in caspase-4 deficient THP1 cells, supporting that caspase-4 is dispensable for ATO-induced apoptosis. We identify that caspase-4 is rather involved in the cleavage and expression of vimentin at the cell surface of apoptotic PMNs. This is the first study establishing that the ER stress-mediated apoptotic pathway operates in human PMNs and that this occurs by a caspase-4-independent mechanism.

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; SA, spontaneous apoptosis, ATO, arsenic trioxide; TM, tunicamycin; TP, thapsigargin; UPR, unfolded protein response; IRE1, inositol-requiring protein-1; ATF6, activating transcription factor-6; PERK, protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase; eIF2 α , eukaryotic initiation factor 2 alpha

INTRODUCTION

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are important cells of the immune system involved in host defence. The production pool (bone marrow release) of PMNs is one of the fastest in the body. It is estimated that more than 10^7 cells/min can be produced in the average adult ¹. Because the level of circulating PMNs remains constant in healthy individuals, an important control mechanism must operate to continuously eliminate cells and maintain a balance of PMNs in blood. Keeping this in mind, human PMNs are known to spontaneously undergo apoptosis. Constitutive or spontaneous apoptosis (SA) of PMNs represents a useful system for studying biochemical consequences of this kind of cell death, since no external stimuli are needed. If the basal apoptotic rate of PMNs is suppressed or delayed by an agent, this may be deleterious for an organism during an inflammatory state, since PMNs will perpetuate tissue damage by releasing their toxic products. Conversely, the concept that resolution of PMN-mediated inflammation can be achieved in part through induction of neutrophil apoptosis could be of benefit for individuals suffering from an inflammatory disorder². Therefore, elimination of apoptotic PMNs during an inflammatory state represents an interesting avenue of research for the development of future potential therapeutic strategies. The study and discovery of molecules that modulate the PMN apoptotic rate, as well as the mechanisms and the diverse pathways involved in apoptosis are of great importance in biology and medicine.

Although there is no doubt that both the extrinsic and intrinsic pathways of cell apoptosis are operational in PMNs, there is no evidence that the recently identified endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated cell apoptotic pathway exists in these cells. Caspase-4, an ER resident caspase known to be implicated in ER stress-induced apoptosis³, has, thus

far, only been studied at the mRNA level in human PMNs; therefore, its protein expression and activity in these cells has never been reported.

The ER is the cytoplasmic compartment responsible for the synthesis, initial post-translational modification, proper folding and maturation of newly synthesized transmembrane and secretory proteins. Because of the existence of high concentrations of proteins, large amount of chaperone molecules are present in the ER in order to maintain proteins in a folding-competent state, and to prevent protein folding intermediates from aggregation. However, a number of cellular stress or cytotoxic conditions, including hypoxia, nutrient deprivation, disturbances of calcium flux, and elevated protein synthesis and secretion lead to accumulation and aggregation of unfolded and/or misfolded proteins in the ER lumen and cause so-called ER stress⁴. ER stress can be viewed as an imbalance between the cellular demand for ER function and its capacity. ER stress has been implicated in diverse diseases, including cancer, diabetes, cerebral ischemia, neurodegenerative and cardiovascular diseases⁵.

ER stress leads cells to initiate self-protective mechanisms via activation of a range of stress-response signalling pathways termed the unfolded protein response (UPR). The UPR emanates from the ER, but may require both the nucleus and the Golgi apparatus for signal transduction⁶. The main goal for initiating UPR is to reduce unfolded protein load in the ER by attenuating translation (to limit further accumulation of misfolded proteins), promoting protein folding, secretion and degradation. In brief, the UPR is fundamentally a cytoprotective response. However, excessive or prolonged UPR (if ER homeostasis cannot be restored) may result in apoptosis via mitochondria-dependent or -independent

mechanisms. Although the ER is now being recognized as an important organelle that can regulate programmed cell death, the signal-transducing events required for connecting ER stress to the apoptotic machinery are still under intensive investigation.

At least three different classes of ER stress transducers have been identified, each defining a distinct arm of the UPR: inositol-requiring protein-1 (IRE1), activating transcription factor-6 (ATF6) and protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK)^{6,7}, which serve as proximal sensors of protein folding status in the ER. PERK, ATF6 and IRE1 transmit this information across the ER membrane to the cytosol. Initially, during ER stress, the PERK pathway is activated, resulting in phosphorylation and inactivation of the translation initiation factor eIF2 α . High levels of eIF2 α phosphorylation result in activation of the nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) by a mechanism that is not fully understood⁷. The cleaved cytoplasmic domain of ATF6 can function alone as a transcription factor for the regulation of genes encoding other transcription factors and molecular chaperones. Finally, activation of IRE1 results in unconventional splicing of mRNA of the transcription factor, XBP1. XBP1 mRNA encodes a potent transcriptional activator (XBP1s), whereas the unspliced XBP1 mRNA encodes XBP1u, an inhibitor of the UPR. Both ATF6 and XBP1 can activate transcription of genes encoding molecular chaperones and proteins involved in ER-associated degradation. IRE1 can also act by an alternative route which, upon phosphorylation, leads to recruitment of TRAF-2 (tumour necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor-2), resulting in activation of c-Jun-NH₂-terminal kinase (JNK)^{6,7}. In absence of ER stress, the UPR is not activated because the three ER luminal stress 'sensors' PERK, ATF6 and IRE1 proteins are sequestered as

inactive complexes with Bip (immunoglobulin-heavy-chain-binding protein), also known as GRP78.

In the present study, we have looked at the activation of the ER stress-mediated cell apoptotic pathway using electronic and fluorescence microscopy. Furthermore, we have studied the expression of the majors players implicated in the UPR at the gene and protein level. Also, we investigated the implication of caspase-4 namely its expression and cleavage and determine if the inhibition of its activity could reverse the apoptosis of the neutrophil.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies. Arsenic trioxide (As_2O_3), tunicamycin (TM), thapsigargin (TP) and RPMI were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri). The antibody against phosphospecific eIF2 α antibody was purchased from Cell Signaling (Denvers, MA), the GRP78, GADD153 and caspase-4 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and the polyclonal Erk1/2 from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Annexin-V and PI were purchased from Biosource (Camarillo, CA). The caspase-4 substrate Ac-LEVD-AFC was purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). The caspase-4 inhibitor z-LEVD-FMK was purchased from BioVision (Mountain View, CA). Fluo-3-AM and ER-tracker were acquired from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Cell culture. Stable caspase-4-deficient (KO) human THP1 monocytic cells and a corresponding clone transfected with a vector containing a scrambled sequence (vector control or VC) were kindly provided by Dr. Alan G. Porter. Briefly, shRNA sequences against caspase-4 were linearized into the pSilencer vector (Ambion) containing the hygromycin selection marker and transfected into THP-1 cells by electroporation. The stably expressing caspase-4 shRNA THP-1 clones were selected using hygromycin. Control cells (VC) were also generated after electroporation of vector containing shRNA with scrambled sequences⁹. Wild-type cells were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. THP-1 KO and VC cells were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 50 μ g hygromycin. Cell viability was systematically evaluated before and after each treatment, and mortality never exceeded 5%.

Neutrophil isolation. Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers as previously described^{10,11}. Blood donations were obtained from consenting individuals according to institutionally approved procedures.

Immunofluorescence detection of ER. Cells were centrifuged for 2 min at 300g on prewashed microscope slides and incubated with 1 μ M of ER-tracker-Red for 30 min at 37°C. After two brief washes, cells were visualized (400 X) with a Leica microscope equipped with a fluorescent lamp.

Electron microscopy. An aliquot of freshly isolated PMNs was reserved, and the rest was used for treatment with ATO or buffer (SA) for 22h. Cells were fixed overnight with 2.5% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). After several washes in PBS with 3% sucrose, cells were fixed with 1.3% OsO₄ for 2h and embedded in Spurr resin. Thin slices were prepared with an ultramicrotome and stained with 5% uranyl acetate and filtered lead citrate. Examinations of ultra thin sections were examined with a Hitachi H-7100 transmission electron microscope.

Calcium accumulation. The intracellular calcium accumulation was observed using Fluo-3-AM dye. Briefly, cells were pre-incubated with 3 μ M of Fluo-3-AM for 30 min at 37°C. Then, the respective agonists were added for 20 h. Cells were washed two times in PBS and analysed in FL1 using a FACScan.

RT-PCR. Isolation of RNA was carried out using a commercially available kit (GenElute, Sigma). Synthesis of cDNA was done using 500 ng of RNA with Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV). For detection of spliced XBP1, the method consisted of a first amplification at 94 °C, 5 min and 2 cycles at 95 °C, 30 sec, 55 °C, 30 sec, 72 °C, 30 sec with the following primers: forward: 5'-CCTTGTAGTTGAGAACCAGG-3'; reverse: 5'-GGGCTT-GGTATATATGTGG-3'. Then, PCR products were digested with 7.5 U of PstI enzyme and the PCR reaction was completed using the same primer for an additional 28 cycles. Amplification of other cDNA was done using a denaturation step of 5 min at 95 °C followed by 18 cycles (18S), 29 cycles (GADD153), 30 cycles (GRP78), 34 cycles (calcineurin) or 36 cycles (ATF6) of 94 °C for 30 s, 56 °C (18S), 67 °C (GADD153), 61 °C (GRP78), 60 °C (calcineurin) or 55 °C (ATF6) for 30 s, 72 °C for 45 s and completed with a final step of 72 °C for 7 min. The following primers were used: 5'-CCGATAACGAACGAGACTC-3' (sense) and 5'-CAGGGACTTAATCAACGCAA-3' (antisense) for 18S; 5'-GAAACGGAAACAGAGTGGTCATTC-CCC-3' (sense) and 5'-GTG-GGATTGAGGGTCACATCATTGGCA-3' (antisense) for GADD153; 5'-GTTTGCTGAGGA-AGACAAAAAGCTC-3' (sense) and 5'-CACTTCCATAGAGTTTGCTGATAATTG-3' (antisense) for GRP78; 5'-CTGACTCCCACAGGGATGTT-3' (sense) and 5'-GTGGTTCTC-AGTGGCATGTG-3' (antisense) for calcineurin; 5'-ATGAAGTTGTGTCAGAGAAC-3' (sense) and 5'-GGGTGCTATTGTAATGACTCA-3' (antisense) for ATF6. The PCR products were separated using an ethidium bromide 2% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light.

Western-blotting. Neutrophils (10×10^6 cells/mL RPMI-Hepes-P/S with 10% autologous serum) were stimulated with the respective agonists and for the indicated times. Cells were lysed in 2X Laemmli's sample buffer and aliquots corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose or polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS)-Tween containing nonfat dry milk (Carnation, Don Mills, Ontario, Canada) or BSA. After washing, the antibody directed against phospho-eIF2 α (1:1000), GADD153 (1:1000), Caspase-4 (1:1000), Erk1/2 (1:1000) or GRP78 (1:400) was added in TBS-Tween. The membranes were kept overnight at 4 °C. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-mouse or goat anti-rabbit horseradish (HRP) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1:20,000 in TBS-Tween +5% nonfat dry milk followed by several washes. Protein expression was revealed using an enhanced chemiluminescence Western blotting detection system. In some experiments, the expression of vimentin and vinculin was monitored using anti-human cytoskeletal antibodies [mouse monoclonal antivimentin (Clone V9, 1:2000) or mouse monoclonal antivinculin (1:150)] as published⁸.

Preparation of nuclear extracts and electromobility shift assay (EMSA). Nuclear extracts were prepared using NucBuster protein extraction kit from Novagen. EMSA reaction was done with Gel Shift Assay System from Promega. Briefly, a volume corresponding to 7 μ g of nuclear proteins was mixed with 1.75 pmol of unlabeled NF- κ B consensus oligonucleotides (Promega #E3292) (competitive) or unlabeled SP1 consensus oligonucleotides (Promega #E3232) (non-competitive) for 15 min at room temperature.

Then, 0.03 pmol of [³²P]-labeled NF-κB consensus oligonucleotide was added to these mixtures, for 30 min at room temperature. Electrophoresis of the DNA-protein complexes was performed using 4% polyacrylamide non-denaturing gels. The gels were exposed at -80°C for 12-24h and the bands were visualized using X-OMAT films.

Caspase-4 activity assay. Neutrophils were stimulated as specified in figure legends. Cells were washed in PBS and disrupted using a lysis buffer (Hepes 25mM pH7,5, EDTA 5 mM, 5 mM MgCl₂, DTT 10 mM, pepstatin 10 µg/mL, leupeptin 10 µg/mL, PMSF 2 mM, Triton X-100 0,5%). Protein concentration was determined using the Bradford assay. An amount of 10µg of proteins was mixed in 200µL of reaction buffer containing Hepes 50mM, sucrose 10%, CHAPS 0,1%, DTT 10mM with 100µM of the caspase-4 substrate Ac-LEVD-AFC for 1 hr at 37°C . Cleavage of the caspase substrate was monitored using a fluorometer at 405 nm (excitation) and 500 nm (emission).

Detection of apoptosis. Apoptosis was evaluated by cytology as previously described¹⁰. For THP-1 cells, apoptosis measurements were done with Annexin-V/PI staining. Cells were washed and incubated for 15min with 2µL of Annexin-V-FITC and 5µL of PI. Annexin-V⁺/PI cells were characterized as apoptotic cells following FACScan analysis.

Cell surface expression of vimentin by flow cytometry. PMNs (10 x 10⁶ cells/mL RPMI-HEPES-P/S) were incubated at 37°C, 5% CO₂, in the presence or absence of ATO for 24 h. Cells were harvested in cold PBS and blocked with PBS containing 20% autologous serum for 30 min on ice. Cells were washed in PBS and incubated with the anti-vimentin or anti-vinculin (negative control) antibodies or with corresponding isotypic

control antibodies prior to incubation with FITC-conjugated antibodies and cell surface expression was analyzed using a FACScan as previously published⁸.

Statistics. Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows version 3.0 using Student's *t*-test. Statistical significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS

We first examined whether or not the ER network is perturbed in apoptotic PMNs, by monitoring the ER by immunofluorescence using an ER-Tracker dye. As illustrated in **Fig. 1A**, only a weak diffuse signal is detected in freshly isolated PMNs (Fresh) but an intense signal is observed after treatment with the ER stress inducers ATO or TM. The signal was reproducibly more intense with ATO than TM probably due to the fact that ATO is a more potent inducer of PMN apoptosis than TM under our experimental conditions (*data not shown*). To further support ER alterations in apoptotic PMNs, we examined cells by electron microscopy in order to confirm the presence of some vacuoles recently reported to correspond to dilatation of the ER¹²⁻¹⁴. As illustrated in **Fig. 1B** such vacuoles were observed in ATO-induced PMNs but not in fresh cells. This was also observed in SA (*data not shown*). Thus, ER alterations can be observed in SA and in ATO-induced PMN apoptosis. The ER fulfills many roles inside the cells, including the storage of calcium. Thus, we investigated the possibility that calcium homeostasis was perturbed during PMN apoptosis.

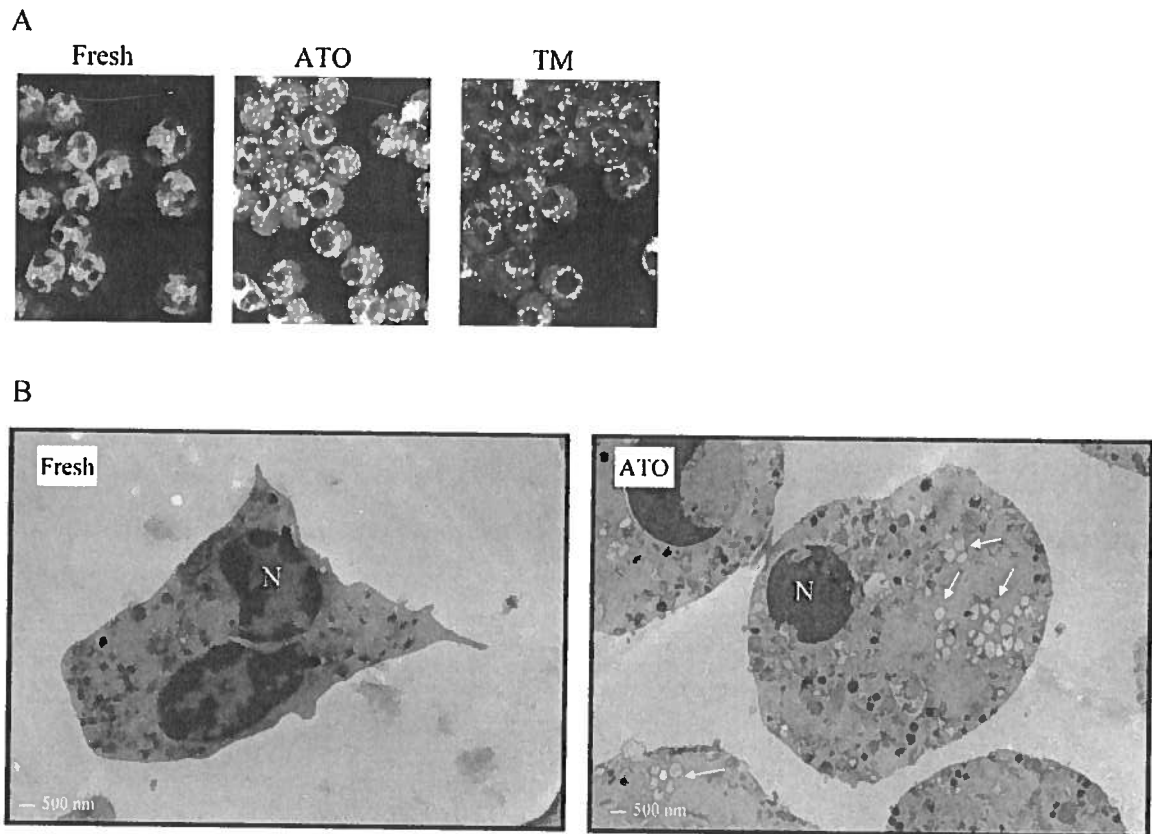


Figure 1. Alteration of the endoplasmic reticulum in apoptotic neutrophils. (A) Freshly isolated cells (Fresh) were incubated the presence of ATO or TM for 20 h and then processed for immunofluorescence (A) or electron microscopy (B) for the observation of morphological changes. (A) The ER was stained with the ER tracker (400X magnification). Results are representative of at least four different experiments. (B) Dilatation of the ER (arrows) is not observed in freshly isolated cells but is a characteristic of apoptotic cells seen during ATO-induced neutrophil apoptosis (5000X).

We next found, using Fluo-3-AM staining and FACS analysis, that an increased cytoplasmic calcium concentrations were observed during SA and in ATO- or TM-induced apoptosis (Ctrl : $1,72 \pm 0,08$; ATO : $2,72 \pm 0,17$; TM : $1,68 \pm 0,02$ as a relative value to freshly isolated cells, $n = 4$, $p < 0,05$ Ctrl vs ATO and Ctrl vs TM). This elevation in calcium levels was observed after 20-24h but not at earlier period of time (0-6h), when cells are not apoptotic (*data not shown*). Addition of EDTA did not reverse this process,

demonstrating that this increase is independent of extracellular calcium uptake (*data not shown*). We also investigated whether or not such intracellular calcium increase could alter gene expression of calcineurin, which is involved in regulation of calcium inside the ER. As illustrated in **Fig. 2**, expression of calcineurin was observed in SA and in response to TP, and was further increased in response to ATO or TM.

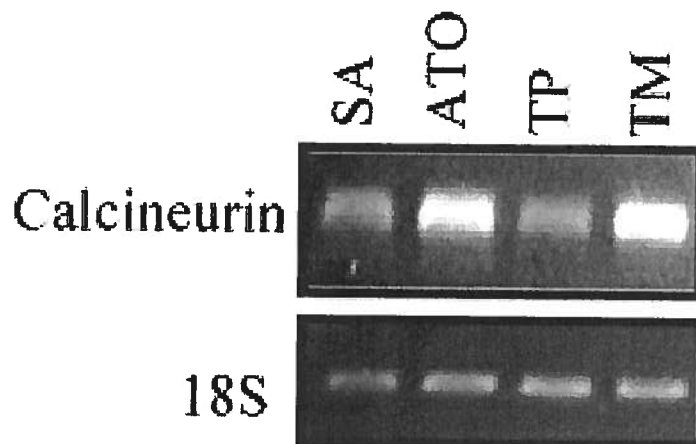


Figure 2. ER stress increases calcineurin gene expression in human PMNs. Calcineurin gene expression was assessed by RT-PCR in PMNs treated for 5 h with diluent (SA), ATO, TM or TP. Results are from one representative experiment out of four.

Expression and regulation of important key players involved during the unfolded protein response (UPR) in human PMNs. The above results indicate that an ER stress occurs during PMN apoptosis, allowing the possibility that an UPR may be induced in these cells. To support this, we investigated the possibility that one or more of the three arms of the UPR, namely PERK, ATF6 and IRE1 is/are activated in PMNs. Because UPR induction is initially characterized by up-regulation of several ER resident chaperones,

including the well-known GRP78/BiP and GADD153, we investigated whether or not these two key players are expressed and modulated in PMNs. As illustrated in **Fig. 3**, both GRP-78 and GADD153 are expressed at mRNA (**Fig. 3A**) and protein (**Fig. 3B**) levels in PMNs. The expression of GRP78 mRNA was increased after 1 h of treatment with ATO and TM, whereas up-regulation of GADD153 mRNA occurred later, after 5 h in response to ATO and TM. We performed kinetic experiments, to determine time points for the detection of significant up-regulation of these two ER chaperones in ATO-induced PMNs (*data not shown*). At the protein level, a marked increased expression of GADD153 and GRP78 was observed after 5 h of treatment with ATO (**Fig. 3B**). TM also induced a significant expression of GADD153 under the same conditions, whereas a more subtle increase in expression of GRP78 was noted in response to this ER stress inducer. Collectively, these results indicated that the modulation of GRP78 and GADD153 can be observed and is variable in PMNs, depending upon which ER stress inducers are tested.

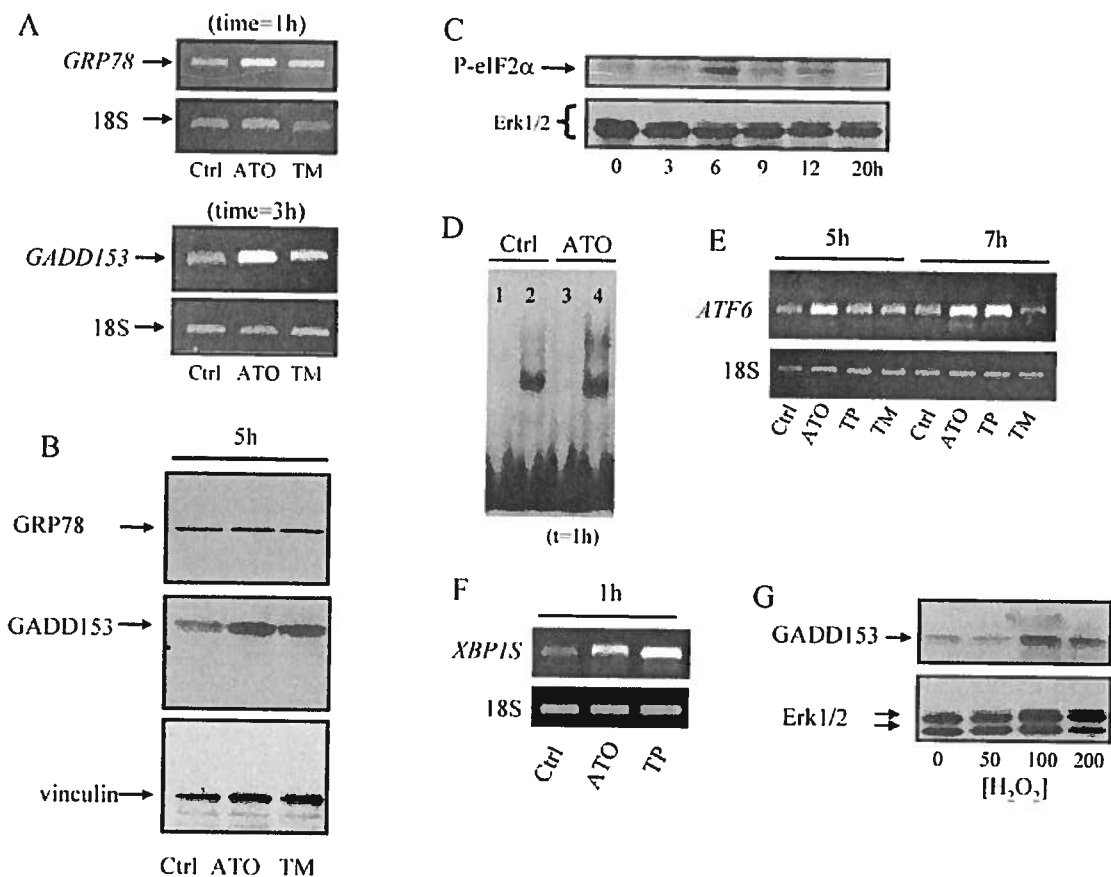


Figure 3. The three signaling pathways of the UPR known to be triggered during ER stress operate in human PMNs. (A) mRNA expression of GRP78 and GADD153 with diluent (ctrl), ATO (5 μ M) and TM (5 μ g/mL). (B) Protein expression of GRP78 and GADD153 was assessed by immunoblotting. 18S and vinculin are presented here as loading controls. (C) Phosphorylation of eIF2 α was monitored by immunoblotting at different time points with ATO (5 μ M) treatment. (D) Activation of NF- κ B was assayed using EMSA. 1 and 3 (competitive assay): nuclear protein extracts were mixed with an excess of non-labeled NF- κ B probe. 2 and 4 (non-competitive assay): nuclear protein extracts were mixed with an excess of non-labeled AP-1 probe. Nuclear proteins were isolated from PMNs treated or not with ATO for 1 hr. (E) ATF6 mRNA expression after 5 h or 7 h was detected by RT-PCR. (F) The splicing of XBP1 mRNA was investigated as described in Material and Methods in PMNs treated with diluent (ctrl), ATO or TP (1 μ M) for 1 hr. (G) GADD153 protein expression with increasing concentrations of H₂O₂. These data are representatives of at least three independent experiments.

Knowing that these two ER chaperones (especially GRP78 known to be associated with the three ER sensors) are expressed and modulated in neutrophils, we then studied the

possibility that the PERK signaling pathway operates in these cells. As illustrated in **Fig. 3C**, eIF2 α , the prototype downstream marker of PERK activation, is phosphorylated during SA and is further activated in response to ATO. Phosphorylation of eIF2 α by PERK has been reported previously to be required for NF- κ B activation in response to ER stress¹⁵. Because of this, and to further support the involvement of the PERK signaling pathway in PMNs, we next determined whether or not ATO could lead to NF- κ B activation. Nuclear extracts were prepared from control or ATO-induced PMNs and EMSA reactions were performed. NF- κ B binding was increased in response to ATO as compared with untreated cells (**Fig. 3D**), indicating that the ER stress inducer ATO activates NF- κ B in PMNs.

In order to determine if the two other cell signaling pathways occurring in response to ER stress are operational in neutrophils, we monitored gene expression of ATF6 and XBP1. As illustrated in **Fig. 3E**, PMNs express ATF6 and its expression was markedly increased by ATO after 5h, a period of time when both TP and TM have a weak effect. After 7h of treatment, the expression of ATF6 was further increased by ATO to a level that was also observed in response to TP but not TM, indicating that ATF6 expression is differentially modulated according to different ER stress inducers. **Fig. 3F** reveals that PMNs also express *XBP1s* (the spliced form) and that its expression increases in response to ATO and TP. Because ROS are known to induce ER stress, and since we recently demonstrated the importance of H₂O₂ in SA and in ATO-induced PMN apoptosis¹⁶, in addition with the fact that TNF- α was previously found to induce UPR in a ROS-dependent mechanism¹³, we next verified the ability of H₂O₂ to induce UPR in PMNs by investigating GADD153

protein expression. As illustrated in **Fig. 3G**, activation of PMNs with H₂O₂ increased GADD153 protein expression. Collectively, the above results indicate that the three signaling pathways of the UPR known to be triggered during ER stress exist and are operational in PMNs.

Expression and activation of caspase-4 in human neutrophils. ATO is known to induce apoptosis in PMNs^{16,17} and to induce ER stress in other cells¹⁸. Because of the importance of caspase-4 during ER stress^{3,7}, we examined whether or not PMNs express this caspase at the protein level and, if so, if it is processed and activated in ATO-induced cells. As illustrated in **Fig. 4A**, PMNs express procaspase-4 and cleavage of this caspase occurs over time, as judged by the appearance of the active form of caspase-4, a cleaved polypeptide of ~29 kDa, as reported in other cells³. Caspase-4 processing requires several hours for detection, peaking between 12-18h. Using the pharmacological inhibitor LEVD-fmk, a caspase-4 inhibitor, we found that the cleavage of caspase-4 during SA and ATO-induced apoptosis was reversible in a concentration-dependent manner (**Fig. 4B**). Since caspase cleavage is not always indicative of caspase activity, we further demonstrated that caspase-4 was effectively activated in PMNs by measuring the release of a fluorophore from a synthetic peptide target sequence. As illustrated in **Fig. 4C**, caspase-4 activity was detected not only in ATO-induced apoptosis, but also during SA, although at lower levels. Pre-treatment with the caspase-4 inhibitor abolishes the caspase-4 activity completely (**Fig. 4D**). These results corroborate the findings obtained by immunoblotting and confirm that caspase-4 is expressed and activated in PMNs.

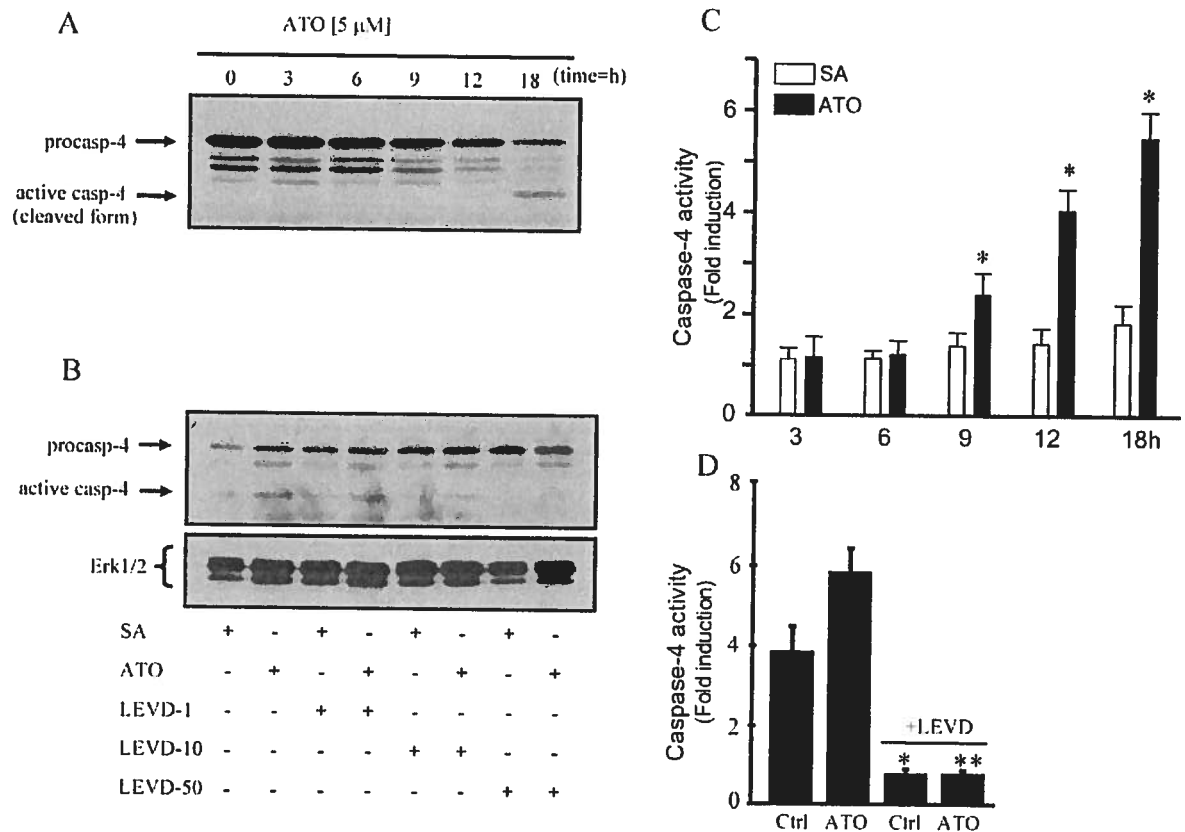


Figure 4. Expression, processing, activity of caspase-4 in human PMNs. (A) Expression and processing (or cleavage) of procaspase-4 was assessed by immunoblotting. Neutrophils were incubated with $5 \mu\text{M}$ of ATO for the indicated periods of time. (B) The specific inhibitor of caspase-4, LEVD-fmk (LEVD), reverses the cleavage of the procaspase-4 after 18 h of treatment with diluent (ctrl) or ATO ($5 \mu\text{M}$). Erk1/2, a MAPK that is not activated by ATO in PMNs #900, was used as a loading control. (C ad D) The caspase-4 activity was determined by measuring the generation of the fluorescent cleavage product from Ac-LEVD-AFC as described in Materials and Methods for the indicated periods of time during SA or in response to ATO (C). Activity is expressed as fold increase over untreated cells (time=0 h). (D) LEVD-fmk ($50 \mu\text{M}$) abolishes caspase-4 activity. Results are means \pm SEM ($n \geq 3$). * $P < 0.05$ vs Ctrl without caspase-4 inhibitor; ** $P < 0.05$ vs ATO without caspase-4 inhibitor.

Role of caspase-4 in spontaneous and ER stress-induced neutrophil apoptosis. Because of the above results, we next investigated the role of caspase-4 during neutrophil apoptosis. Cells were pre-treated with increasing concentrations of the caspase-4 inhibitor and then

incubated in the presence or absence of ATO. As expected, ATO significantly induced PMN apoptosis compared to SA as assessed by cytology (**Fig. 5A**). However, under both conditions, the apoptotic rate was unaffected by the caspase-4 inhibitor treatment, at a concentration known to reverse its processing and activation. These results were confirmed by another method based on CD16 shedding as monitored by flow cytometry (*data not shown*). Next, caspase-4-deficient and wildtype THP1 cells were treated with increasing concentrations of ATO and apoptosis was evaluated in comparison with the classical ER stress inducer TM in order to eliminate any response specific to ATO. Results presented in **Fig. 5B** show that wild type (WT), caspase-4-deficient (KO) or cells transfected with a vector containing a scrambled sequence (vector control or VC)⁹ all exhibit similar rates of apoptosis in response to ATO or TM. Absence of caspase-4 was confirmed by western-blot (inset, **Fig. 5**). Therefore, these data indicate that caspase-4 is not essential for the pro-apoptotic activity of the ER stress inducer ATO and that the inability to inhibit SA and ATO-induced apoptosis by the caspase-4 inhibitor (**Fig. 5A**) is not due to a specific effect of ATO.

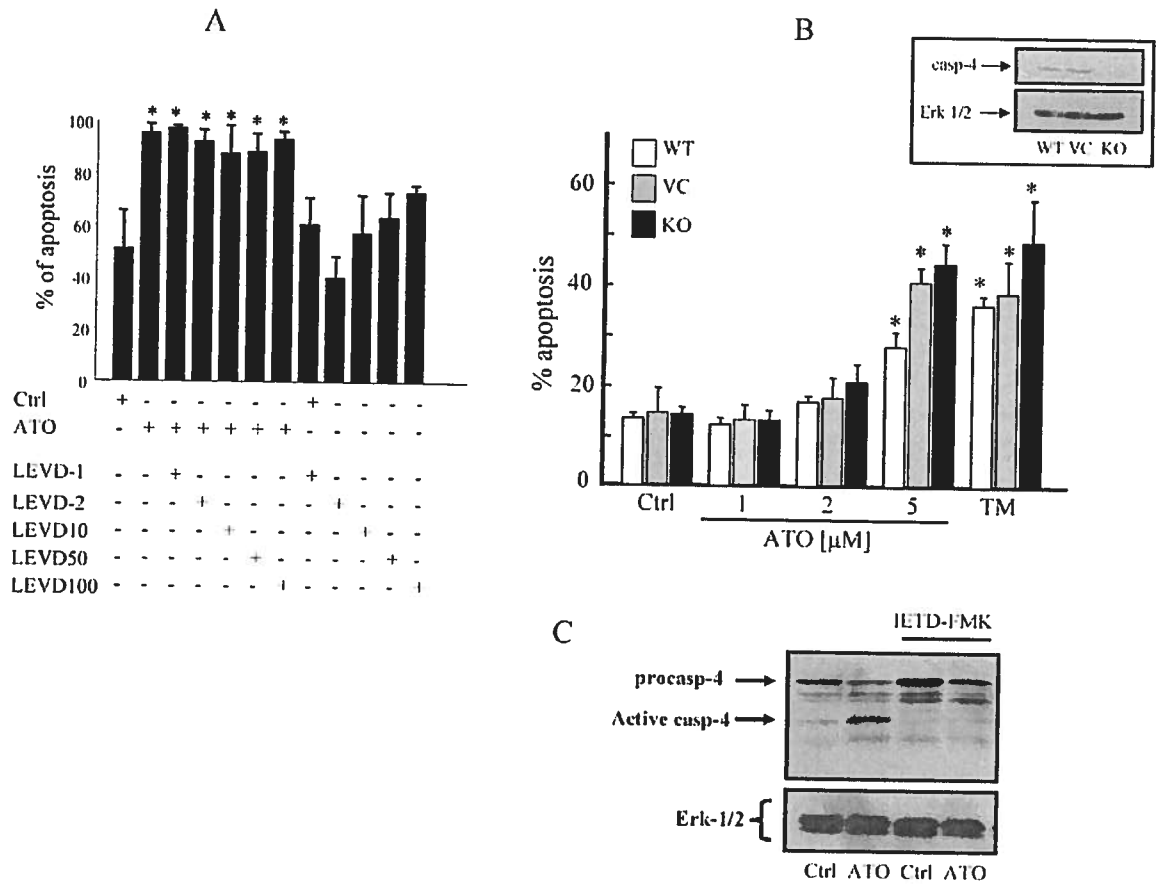


Figure 5. Caspase-4 is dispensable for ATO-induced cell apoptosis. (A) Cells were exposed to diluent (ctrl or SA) or ATO (5 μ M) for 18 h in the presence of increasing concentrations of LEVD-fmk. Apoptosis was assessed by cytology. * $P < 0.05$ Ctrl vs ATO. (B) Wildtype (WT), caspase-4-deficient (KO) or vector control containing a scrambled sequence (VC) human THP-1 cells were incubated for 5 days with the indicated concentrations of ATO (μ M) or 5 μ g/mL TM. Apoptosis was assessed by flow cytometry by counting the number of annexin-V⁺/PI⁺ cells. Caspase-4 protein expression was verified by immunoblotting (inset). (C) The cleavage of caspase-4 was reversed when cells were pre-treated with the caspase-8 inhibitor IETD-fmk (50 μ M) for 1h before treatment with the diluent (Ctrl) or ATO for 20 h as assessed by immunoblotting. * $P < 0.05$ vs corresponding Ctrl. The data are means of at least three independent experiments.

Because of this, and since procaspase-4 appears to require several hours for its processing and activation, we then decided to pre-treat cells with the caspase-8 inhibitor IETD-fmk, prior to monitoring caspase-4 processing. As illustrated in **Fig. 5C**, the cleavage of

caspase-4 was reversed by the caspase-8 inhibitor in ATO-induced PMN apoptosis, as well as during SA, indicating that caspase-4 activation requires the action of upstream initiator components such as caspase-8.

Role of caspase-4 in the cleavage and expression of vimentin at the cell surface of apoptotic PMNs. Because of the above results indicating that caspase-4 is dispensable for induction of apoptosis, and knowing that the role of caspase-4 in ER stress has been recently challenged¹⁹, we next decide to determine a possible role of caspase-4 in PMNs, an area that is completely unknown. In fact, the role of caspase-4 in functions other than ER stress-induced apoptosis has only been recently investigated. Interestingly, vimentin was recently identified as one possible caspase-4 substrate²⁰. Because we recently identify that vimentin is cleaved via caspases during SA and that this protein is expressed at the cell surface of apoptotic PMNs⁸, we hypothesized that caspase-4 could be involved in this process. As expected, vimentin, but not vinculin, was expressed at the cell surface of PMNs during SA (**Fig. 6A** and **Fig. 6B**) and ATO further increased such expression. Treatment with the caspase-4 inhibitor reverses completely vimentin expression. In addition, the caspase-4 inhibitor prevents the cleavage of vimentin in both SA and ATO-induced PMNs (**Fig. 6C**).

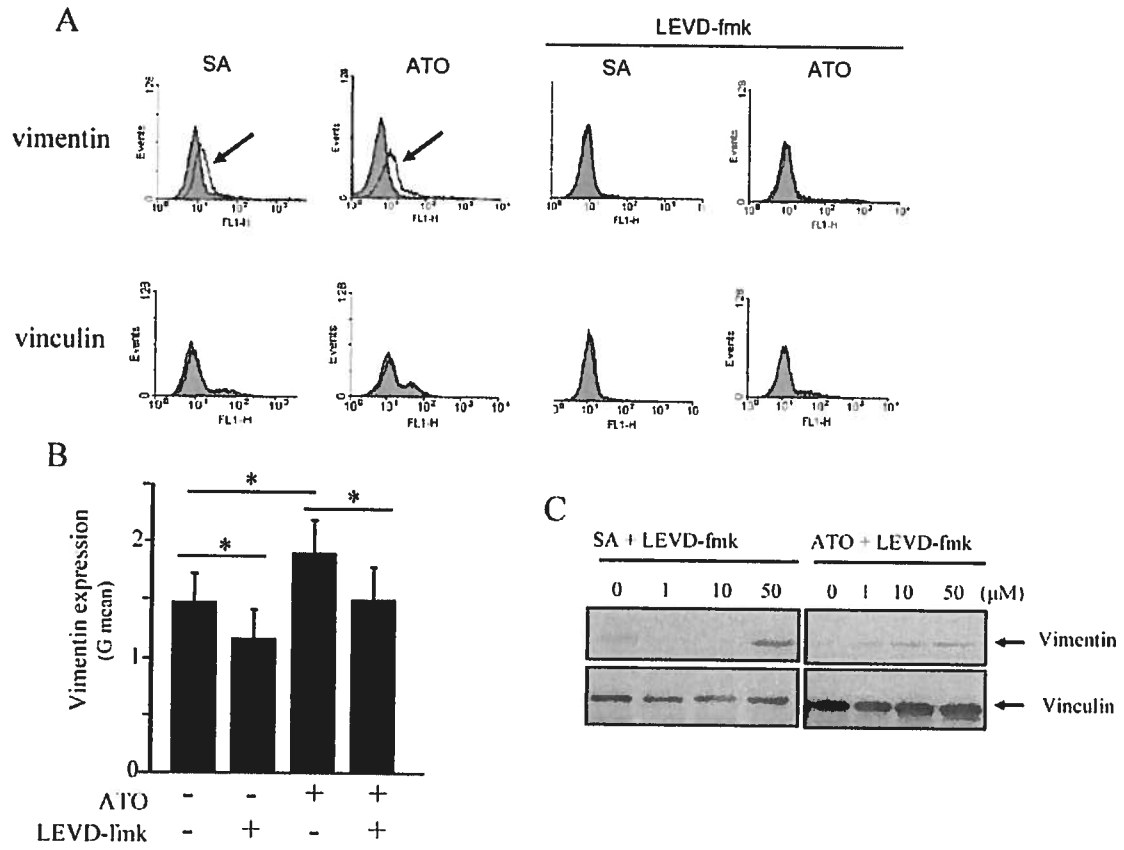


Figure 6. Caspase-4 is involved in the cleavage and expression of vimentin at the cell surface of apoptotic neutrophils. PMNs were isolated, incubated with buffer (SA) or 5 μ M ATO in the presence or absence of a caspase-4 inhibitor (LEVD-fmk) and cell surface expression of vimentin (arrows) or vinculin (negative control) was assessed by flow cytometry as described in Materials and Methods. (A) Typical results obtained with one blood donors. (B) Results obtained from different blood donors were plotted and illustrated as a bar graph (means \pm SEM, n=8). (C) Cleavage of caspase-4 was assessed by immunoblotting. Note that the degradation of vimentin was reversed by LEVD-fmk. Results are from one representative experiment out of four. * P<0.05

DISCUSSION

Several criteria have been used in this study to demonstrate that the recently identified ER stress-mediated pathway of cell apoptosis operates in PMNs. First, we have observed alteration of the ER by immunofluorescence and electron microscopy. Second, we noted an elevation in calcium levels and gene activation of calcineurin known to be involved in regulation of calcium inside the ER. Third, we demonstrated that all three arms of the UPR are activated in apoptotic PMNs. These criteria indicate that the ER stress pathway of apoptosis is operational in these cells. The intracellular signalling pathways in response to the UPR have been relatively well-defined in cells undergoing massive protein secretion, such as plasma B cells or hepatocytes^{21,22}. However, until now, no study has revealed a link between neutrophil apoptosis and the ER stress pathway. Some studies have proposed that this pathway operates in promyelocytes, which are progenitors of neutrophils²³. In addition, the expression of GADD153, which is involved in a pro-apoptotic branch in UPR signalling, has been shown to be upregulated during retinoic acid differentiation of promyelocytic cells²⁴. This suggests that GADD153 may be implicated in activation of PMN apoptosis. Interestingly, we have previously demonstrated that ATO treatment induced intracellular accumulation of ROS in PMNs¹⁶. We also reported that co-incubation of ATO with catalase, which degrades H₂O₂, downregulated not only ATO-induced apoptosis, but also SA. Here, we showed that GADD153 expression is up-regulated by H₂O₂ in PMNs. The above results demonstrate that H₂O₂ may be an upstream component of the PMN apoptotic machinery, acting at least in part via activation of the GADD153 arm of the ER stress pathway. With respect to this, TNF- α was recently found to promote the UPR in a ROS-dependent fashion in L929 cells¹⁴. The fact that addition of catalase in the medium markedly reverses SA

supports the important role of H₂O₂ in inducing an ER stress-like response in PMNs. Moreover, catalase was also found to completely reverse the ability of PMNs to produce de novo protein synthesis during SA and in response to ATO. Such production of new proteins supports an ER stress response, since the UPR is initially engaged to circumvent a cytotoxic signal by activating protein synthesis, particularly those involved in protein folding, including chaperones⁶. This is in agreement with the recent observation that ATO induces de novo protein synthesis of several chaperones¹⁷. However, activation of the UPR in PMNs is probably prolonged, leading to an irreversible cell condition causing death by initiating apoptosis. We propose that this occurs not only in agent-induced apoptosis, but also during SA, where H₂O₂ can accumulate in the medium over time²⁵.

In addition to UPR signalling, ER stress is also known to activate the ER-overload response that triggers activation of the transcription factor NF-κB. Activation of NF-κB may be related to calcium release from the ER and production of ROS²⁶. Therefore, this could explain the activation of NF-κB we reported here, in addition to calcium accumulation and up-regulation of calreticulin gene expression. Phosphorylation of eIF2α could also be a prerequisite for activation of NF-κB. In fact, a decrease of IκB synthesis following eIF2α phosphorylation was reported as the central mechanism activating NF-κB in response to UV-induced cell apoptosis²⁷. NF-κB activation was found to protect cells from ER stress-induced ROS production in mouse embryonic fibroblasts²⁸. Therefore, phosphorylation of eIF2α by ATO could trigger the activation of NF-κB in PMNs. This is in agreement with a previous study reporting that such activation could serve to protect cells from ROS-induced apoptosis¹³.

Several studies have identified caspase-4 as a key player in the ER stress-mediated pathway of apoptosis in humans or caspase-12 in rodents^{3,5-7,29}. Here, we report for the first time the protein expression of caspase-4 as well as its processing and activation during SA and in response to ER stress in PMNs. However, the role of caspase-4 appears to be dispensable in both SA and in ER stress-induced apoptosis. Using the pharmacological caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk, we were able to reverse the caspase-4 processing, showing that caspase-4 may be implicated in an amplification loop rather than being the initiator. This is surprising, considering that caspase-4 has been described as an initiator caspase, based on structural evidence¹⁹. Indeed, activation of caspase-4 was found to occur prior to activation of caspase-3 or -9 in melanoma cells subjected to TM or TP³⁰. On the other hand, caspase-4 was also described as an intermediate activator of Fas-mediated apoptosis, transmitting the death signal from caspase-8 to caspase-3²⁹. In addition, the ER stress inducer edelfosine was found to activate caspase-8 and -3 before the onset of apoptosis. In this case, caspase-4 was suggested to be activated alongside with ASK1/JNK and caspase-8/BAP31 signalling pathways³¹.

One possible explanation for the different role of caspase-4 may be explained by the absence of caspase-2 in PMNs. Caspase-2 was identified as an ER-resident and proximal caspase in brefeldin A- and TM-induced apoptosis³². Therefore, it is plausible that caspase-4 may be confined to other roles in PMNs, such as amplifying mitochondrial or death-receptor associated apoptosis, due to lack of caspase-2 expression. Caspase-4 deficient cell lines were found to be equally sensitive to ER stress inducers TM, TP and brefeldin A⁹. We have confirmed these results using THP-1 deficient cell lines which lack

caspase-4. These cells were equally sensitive not only to TM but also to ATO. This concurs with the fact that the proapoptotic effect of ATO in PMNs occurs via a caspase-4-independent mechanism. To further support this, treatment of PMNs with increasing concentrations of the specific caspase-4 inhibitor LEVD-fmk did not result in inhibition of apoptosis. Caspase-12 was proposed to be part of the proapoptotic pathway of ER stress response involving TRAF2 and JNK³³. Interestingly, we have previously demonstrated that ATO activates JNK in PMNs; however, addition of a JNK inhibitor did not rescue the cells from SA or ATO-induced apoptosis³⁴, suggesting that activation of the TRAF2-JNK pathway is not necessary for neutrophil apoptosis. A non-apoptotic role has been proposed recently for caspase-4⁹. The authors demonstrated that LPS-induced IL-1 β , CCL4 (MIP1 β) and CXCL8 (IL-8) mRNA expression were downregulated in caspase-4 deficient THP-1 cells, and this was explained by the reduced NF- κ B activation in the absence of caspase-4. Thus, it is also possible that caspase-4 is involved in some way in the production of cytokines in PMNs, although this remains to be determined. Recently, vimentin was found to be a caspase-4 substrate²⁰. To date, vimentin is probably the only caspase-4 substrate that has been identified. Despite the fact that caspase-4 is probably not directly involved in PMN apoptosis, we have been able to show, that this caspase is involved in vimentin cleavage and in its expression on cell surface of apoptotic PMNs, since treatment with a caspase-4 inhibitor reverses these events. Collectively, our results are in agreement with others demonstrating that an ER stress mediated pathway of apoptosis can occur by a caspase-4-independent mechanism, as recently reported in other cells¹⁹.

In conclusion, this study provides the first evidence that the ER stress pathway of cell apoptosis is operational in PMNs. Caspase-4 is expressed, processed and activated in these cells, but is involved in other functions than apoptosis such as the cleavage of vimentin and its cell surface expression on apoptotic PMNs. ER stressors, like ATO, should now be considered as potential tools for controlling/down-regulating inflammation by killing PMNs and may therefore be of benefit for the treatment of diseases other than cancers, including inflammatory diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partly supported by the the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-89534) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). DG is a Scholar from FRSQ. We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

AUTHORSHIP

Conception and design: DG and FB. Performed research: FB and SC. Analysis and interpretation of data: DG,FB and SC. DG and FB wrote the paper.

REFERENCES

- 1 Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 1997;61:375-380.
- 2 Whyte MK, Savill J, Meagher LC, Lee A, Haslett C. Coupling of neutrophil apoptosis to recognition by macrophages: coordinated acceleration by protein synthesis inhibitors. *J Leukoc Biol.* 1997;62:195-202.
- 3 Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 2004;165:347-356.
- 4 Chen LH, Jiang CC, Watts R, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of melanoma cells by the ARC protein. *Cancer Res.* 2008;68:834-842.
- 5 Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:444-452.
- 6 Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:519-529.
- 7 Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:663-674.
- 8 Moisan E, Girard D. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol.* 2006;79:489-498.

- 9 Lakshmanan U, Porter AG. Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB-dependent production of IL-8 and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1). J Immunol. 2007;179:8480-8490.
- 10 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.
- 11 Pelletier M, Bouchard A, Girard D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. J Immunol. 2004;173:7521-7530.
- 12 Kadara H, Lacroix L, Lotan D, Lotan R. Induction of endoplasmic reticulum stress by the pro-apoptotic retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human head and neck cancer cells. Cancer Biol Ther. 2007;6:705-711.
- 13 Xue X, Piao JH, Nakajima A, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. J Biol Chem. 2005;280:33917-33925.
- 14 Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. Toxicol Appl Pharmacol. 2009;234:256-265.

- 15 Hung JH, Su IJ, Lei HY, et al. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2004; 279:46384-46392.
- 16 Binet F, Cavalli H, Moisan E, Girard D. Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis. *Br J Haematol.* 2006;132:349-358.
- 17 Binet F, Chiasson S, Girard D. Arsenic trioxide induces de novo protein synthesis of annexin-1 in neutrophils: association with a heat shock-like response and not apoptosis. *Br J Haematol.* 2008;140:454-463.
- 18 Zhang H, Duncan G, Wang L, et al. Arsenic trioxide initiates ER stress responses, perturbs calcium signalling and promotes apoptosis in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2007;85:825-835.
- 19 Obeng EA, Boise LH. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005;280:29578-29587.
- 20 Yang X, Wang J, Liu C, et al. Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Am J Pathol.* 2005;167:705-719.
- 21 Gass JN, Gifford NM, Brewer JW. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem.* 2002;277:49047-

49054.

- 22 Gass JN, Jiang HY, Wek RC, Brewer JW. The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol Immunol.* 2008;45:1035-1043.
- 23 Grenda DS, Murakami M, Ghatak J, et al. Mutations of the ELA2 gene found in patients with severe congenital neutropenia induce the unfolded protein response and cellular apoptosis. *Blood.*2007;110:4179-4187.
- 24 Gery S, Park DJ, Vuong PT, Chih DY, Lemp N, Koeffler HP. Retinoic acid regulates C/EBP homologous protein expression (CHOP), which negatively regulates myeloid target genes. *Blood.* 2004;104:3911-3917.
- 25 Kasahara Y, Iwai K, Yachie A, et al. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood.* 1997;89: 1748-1753.
- 26 Pahl HL, Baeuerle PA. Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett.* 1996;392:129-136.
- 27 Jiang HY, Wek RC. GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem J.* 2005;385:371-380.
- 28 Mauro C, Crescenzi E, De Mattia R, et al. Central role of the scaffold protein tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in regulating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2006;281:2631-2638.

- 29 Kamada S, Washida M, Hasegawa J, Kusano H, Funahashi Y, Tsujimoto Y. Involvement of caspase-4(-like) protease in Fas-mediated apoptotic pathway. *Oncogene*. 1997;15:285-290.
- 30 Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, et al. Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2007;67:9750-9761.
- 31 Nieto-Miguel T, Fonteriz RI, Vay L, Gajate C, Lopez-Hernandez S, Mollinedo F. Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells. *Cancer Res*. 2007;67:10368-10378.
- 32 Cheung HH, Lynn Kelly N, Liston P, Korneluk RG. Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs. *Exp Cell Res*. 2006;312:2347-2357.
- 33 Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*. 2001;276:13935-13940.
- 34 Binet F, Girard D. Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1613-1622.

Chapitre 5 : Discussion et conclusions

Les résultats préliminaires à cette étude ont démontré que le trioxyde d'arsenic peut induire l'apoptose et que celle-ci est, du moins en partie, dépendante de la synthèse protéique *de novo*. Ainsi, notre premier objectif était d'identifier les protéines dont la modulation d'expression en présence de trioxyde d'arsenic est la plus significative, notre but étant d'identifier de nouveaux acteurs dans la cascade menant à l'apoptose du neutrophile. Ainsi, nous avons effectué une analyse par LC-MS/MS sur plusieurs protéines candidates. L'une d'elles s'est révélée être plus particulièrement intéressante. En effet, nous avons identifiée une protéine nommée annexine-I. Puis, nous avons confirmé sa modulation en immunoprécipitant la fraction synthétisée *de novo* en utilisant un anticorps spécifique pour celle-ci. L'élucidation du rôle de la protéine annexine-I dans l'effet du trioxyde d'arsenic était justifiée par le fait qu'une étude publiée quelques mois plus tôt démontrait que celle-ci pouvait induire l'apoptose lorsque ajoutée de façon exogène à des neutrophiles humains (Solito et al., 2003).

5.1 L'annexine-I n'est pas impliquée dans le processus apoptotique selon notre étude

L'annexine-I fut le premier membre de la famille des annexines à être identifié. Celle-ci possède le domaine C-terminal de 4 répétitions de 70 acides aminés responsable de l'interaction calcium dépendante avec les phospholipides membranaires qui est commune à toutes les annexines. La portion N-terminale confère la spécificité fonctionnelle des différentes annexines. Ainsi, un analogue de l'annexine-I, le peptide Ac2-26, a été développé pour étudier le rôle précis de l'annexine-I. Celui-ci comprend les premiers acides aminés du domaine N-terminal de cette protéine. La première fonction de l'annexine-I à être élucidée fut sa capacité à inhiber la phospholipase A₂ cytosolique, une enzyme générant l'acide arachidonique nécessaire à la génération de médiateurs pro-inflammatoires par les cycloxygénases ou lipoxygénases. De plus, il a été découvert que l'expression de cette protéine pouvait être induite par les glucocorticoïdes et expliquer leur capacité anti-inflammatoire. En somme, plusieurs études ont démontré que l'annexine-I est impliquée dans une variété de processus cellulaires qui promeuvent la

résolution de l'inflammation. C'est le cas pour la capacité de l'annexine-I à induire l'apoptose des neutrophiles. En effet, l'étude de Solito et coll. (2001) a démontré que cet effet est observable après six heures d'incubation avec l'annexine-I recombinante et est imputable, entre autres, à la stimulation d'une flambée calcique et à la déphosphorylation de Bad. Également, la transfection d'un plasmide contenant la séquence de l'annexine-I pourrait stimuler autant l'apoptose basale que celle induite par l'incubation avec du TNF- α ou de l'étoposide chez des cellules promonocytaires U937 (Solito et al., 2001; Canaider et al., 2000; Petrella et al., 2005). Ainsi, nos résultats ont démontré que l'annexine-I pouvait être mobilisée à la membrane plasmique à court terme, soit après trois heures d'incubation, et se retrouver dans le milieu extracellulaire après 20 heures d'incubation. Cette libération est fortement stimulée par l'incubation avec le trioxyde d'arsenic. Ainsi, ces observations nous ont permis d'émettre l'hypothèse que l'annexine-I libérée dans le surnageant de neutrophiles pourrait stimuler l'apoptose des cellules environnantes de façon paracrine. Afin de déterminer l'importance de l'annexine-I dans le processus apoptotique nous avons développé une colonie de souris déficientes en annexine-I. Le modèle de la poche d'air murine a ensuite été utilisé afin de récolter une grande quantité de neutrophiles murins pour des expériences *ex vivo*. Ce modèle consiste en deux injections de 3 cc d'air stérile de façon intradermique dans le dos de la souris au jour 0 et 3. Puis au jour 6, nous injectons un produit bactérien, le LPS, qui attire une grande quantité de neutrophiles à l'intérieur de la poche d'air. Nous avons par la suite investigué le taux d'apoptose des neutrophiles murins incubés avec différents agents qui retardent ou induisent ce processus. Ce taux a été comparé chez les cellules normales et déficientes en annexine-I. Les résultats obtenus démontrent que la présence d'annexine-I n'a aucun effet sur le taux apoptotique. Ceci est nettement en contraste avec l'étude de Solito et coll. (2001) citée précédemment. Cependant, certains travaux ont démontré un rôle anti-apoptotique pour cette protéine. Notamment, l'équipe de Wu et coll. a démontré que l'effet anti-apoptotique du dexaméthasone est dépendant de l'induction de l'annexine-I chez les U937 (Wu et al., 2000). De plus, la présence d'annexine-I a été associée à une augmentation de la résistance à certains agents chimiothérapeutiques telles que l'adriamycine, le melphalan ou l'étoposide. Dans la même veine, un traitement avec des

ADNc anti-sens pour l'annexine-I a pour effet d'accroître la sensibilité des cellules cancéreuses MCF-7 à ces trois agents (Wang et al., 2004).

L'absence d'effet significatif de la délétion du gène d'annexine-I sur le taux apoptotique pourrait également être expliquée par un phénomène compensatoire. En effet, il a été établi que les souris déficientes en annexine-I ont une expression plus élevée d'annexine-2, -4, -5 et -6 que les souris normales (Hannon et al., 2003). Ainsi, il est possible que cette augmentation puisse compenser l'absence d'annexine-I, ce qui aurait pour effet de diminuer l'impact sur le taux apoptotique. À cet effet, l'annexine-5 aurait un rôle dans l'induction d'apoptose. Les cellules déficientes en annexine-5 démontrent une baisse de dépolarisation de la mitochondrie et de libération du cytochrome c et sont plus résistantes à l'effet d'agents pro-apoptotiques telles que la staurosporine (Hawkins et al., 2002). De plus, la surexpression de cette protéine augmente l'apoptose des chondrocytes et contribue au développement d'arthropathies (Ea et al., 2008). Il est à noter que l'effet pro-apoptotique de l'annexine-5 n'a aucun rapport avec son utilisation biochimique détectant la présence de phospholipides à la membrane externe durant l'apoptose. En effet, l'annexine-5 est une protéine très majoritairement intracellulaire. Également, l'annexine-4 a aussi été reliée à une baisse de prolifération de cellules cancéreuses, ce qui implique une augmentation de l'apoptose (Grun et al., 2009).

Bien que les résultats présentés dans cette thèse démontrent que l'absence d'annexine-I n'a aucun impact sur le taux d'apoptose des neutrophiles, il reste que cette protéine pourrait tout de même être impliquée dans des phénomènes apparentés. Plus précisément, l'annexine-I pourrait être importante dans la reconnaissance des cellules apoptotiques. Ainsi, la libération d'annexine-I observée en présence de trioxyde d'arsenic permettrait l'élimination des neutrophiles apoptotiques. À cet effet, il a été démontré que la phagocytose de neutrophiles en apoptose par des macrophages est stimulée par l'ajout d'un milieu concentré en annexine-I. De plus, cet effet impliquerait la liaison de l'annexine-I à son récepteur, le récepteur à la lipoxine A₄ (ALXR), puisqu'un antagoniste, le Boc1, peut renverser cette phagocytose (Jitkaew et al., 2009). Aussi, la libération de l'annexine-I a été reliée à l'activation de la cascade apoptotique car celle-ci est réversible

par un inhibiteur pharmacologique aux caspases, le zVAD-FMK (Scannell et al., 2007). Il a aussi été démontré que l'annexine-I se localise dans des régions riches en phosphatidylsérines à la surface des cellules Jurkat apoptotiques. De cette façon, l'annexine-I pourrait agir comme une molécule liant deux phosphatidyl-sérines, ce qui permettrait la liaison de deux membranes, en l'occurrence, la cellule Jurkat apoptotique et le macrophage. Ainsi, cette étude confirme que l'absence d'annexine-I, cette fois par l'ajout de siRNA (silencing ribonucleic acid) perturbe la reconnaissance des cellules apoptotiques. Il est aussi intéressant de noter que l'équipe de Arur et coll. (2003) a aussi montré que l'absence d'annexine-I n'a aucun effet sur le taux apoptotique bien qu'elle puisse avoir un effet sur la phagocytose et l'élimination des cellules Jurkat apoptotiques. Ainsi, il est fort probable que, dans nos conditions, l'annexine-I n'ait pas de rôle majeur dans l'induction d'apoptose par le trioxyde d'arsenic, mais plutôt dans l'élimination des neutrophiles apoptotiques.

5.2 L'annexine-I possède également une capacité anti-adhésive chez les neutrophiles

Plusieurs études ont montré la capacité anti-adhésive de l'annexine-I à l'intérieur de différents modèles *in vitro* et *in vivo*. Cette fonction est aussi dépendante d'une relocalisation à la surface du neutrophile (Perretti et D'Acquisto, 2009). Elle implique une liaison au récepteur ALXR et est liée à la capacité de l'annexine-I d'interagir avec la molécule d'adhésion α_4 -intégrine (Solito et al., 2000) ou d'induire le clivage de la L-sélectine (de Coupade et al., 2003). Ainsi, l'annexine-I a la capacité d'induire le détachement des neutrophiles de l'endothélium vasculaire. Il s'agirait d'un mécanisme anti-inflammatoire permettant la résolution de l'inflammation. De cette façon, il est possible que dans nos conditions, la translocation observée soit imputable à une activation de l'adhésion des neutrophiles par le trioxyde d'arsenic. En effet, dans le deuxième article de cette thèse, il a été démontré que le trioxyde d'arsenic induit une augmentation de l'adhésion des neutrophiles aux cellules épithéliales A549. Cet effet est observable après deux heures d'incubation, tandis que la relocalisation à la membrane plasmique de l'annexine-I notée dans le premier article est perceptible après trois heures de culture. De

plus, il a été montré que l'annexine-I ne possède pas de séquence signal la guidant vers une sécrétion par la voie classique. Celle-ci est classée comme l'interleukine-1, sa sécrétion impliquant une voie alternative. Plus précisément, la libération de cette protéine est un phénomène dépendant de la dégranulation. En effet, il a été démontré que l'annexine-I colocalise avec les granules gélatinasiques à l'intérieur du neutrophile (Perretti et al., 2000). Ainsi, dans le deuxième article, nous avons également observé que le trioxyde d'arsenic peut induire une libération des granules gélatinasiques, ce qui pourrait expliquer la présence d'annexine-I à la surface du neutrophile. En somme, la présence d'annexine-I à la surface agirait comme un mécanisme de rétro-inhibition pour diminuer l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire.

5.3 L'annexine-I est une protéine de stress induite par le trioxyde d'arsenic

L'analyse par LC-MS/MS des protéines dont l'expression est modulée par le trioxyde d'arsenic nous a permis d'identifier une seconde protéine, la Hsp89 α . De plus, l'analyse des transcrits pour les trois classes de Hsp (hsp27, 70 et 90) nous a permis de conclure que le trioxyde d'arsenic induit ces ARNm de la même intensité et selon la même cinétique qu'un choc thermique. De plus, en observant les patrons de synthèse *de novo* des protéines par gels 2D, nous observons la même modulation pour l'expression d'annexine-I en présence de trioxyde d'arsenic et d'un choc thermique. Tous ces indices nous laissent croire que l'annexine-I agirait comme une protéine chaperone dans notre système. Ceci est corroboré par plusieurs résultats dans la littérature. D'abord, il a été démontré que l'annexine-I peut empêcher l'inactivation et l'aggrégation des protéines soumises à un choc thermique tout en permettant le repliement des protéines soumises à un stress chimique, soit la guanidine-HCl. Ces propriétés sont caractéristiques des protéines de choc thermique (Hsp) (Kim et al., 1997). Il a aussi été observé que l'expression de l'annexine-I peut être stimulée par différents stress dont le choc thermique, l'H₂O₂ et l'arsenite. En effet, il existe une séquence HSE (heat shock element) dans le promoteur de l'annexine-I qui serait responsable de la réponse à ces différents stress (Rhee et al., 2000). Dans le même ordre d'idée, il a aussi été démontré que la

présence d'annexine-I pourrait empêcher la nécrose de cellules exposées au H_2O_2 et favoriser l'apoptose (Sakamoto et al., 1996). De plus, il est bien connu que le stress oxydatif active l'expression des chaperones (Kalmar et Greensmith, 2009). À cet effet, tel que décrit dans le deuxième article de cette thèse, nous avons observé une accumulation de H_2O_2 dans les neutrophiles exposés au trioxyde d'arsenic et ce, à partir d'une heure de traitement.

5.4 Les MAPK sont activées par le trioxyde d'arsenic et jouent un rôle important dans l'augmentation des fonctions du neutrophile par cet agent

Les résultats obtenus dans le premier article démontrent que l'arsenic active une réponse de stress qui s'apparente à un choc thermique. Nous proposons que l'annexine-I fasse partie des différentes protéines induites par ce choc au même titre que les Hsp90, 70 et 27. Ainsi, nous avons par la suite tenté de déterminer si ce choc pouvait activer une voie signalétique à l'intérieur des neutrophiles et si celle-ci pourrait être responsable de l'induction d'apoptose. Pour ce faire, nous avons d'abord regardé la phosphorylation des MAPK, puisque celles-ci sont impliquées dans la transduction du signal lors d'une exposition à divers types de stress tels qu'un choc thermique, un stress oxydatif ou un dommage à l'ADN (Raman et al., 2007). Les résultats obtenus montrent que le trioxyde d'arsenic induit la phosphorylation de p38 et JNK mais non de Erk1/2. Ces résultats sont logiques en considérant le rôle classique de Erk1/2 dans la prolifération et la croissance cellulaire (Raman et al., 2007). De plus, plusieurs études ont démontré que p38 et JNK sont phosphorylées en présence de trioxyde d'arsenic. Cette phosphorylation a été reliée à l'induction d'apoptose chez différents types de cellules cancéreuses (Giafis et al., 2006; Wen et al., 2008). Les résultats obtenus dans notre étude démontrent que la phosphorylation de p38 et JNK n'est pas liée à l'induction d'apoptose. Il a également été démontré que la phosphorylation de p38 n'est pas reliée à l'induction d'un stress oxydatif par le trioxyde d'arsenic. Ainsi, d'un point de vue temporel, l'activation de p38 est beaucoup plus rapide que la production de H_2O_2 . De plus, l'ajout de catalase ne renverse pas la phosphorylation de p38 par le trioxyde d'arsenic, alors qu'elle supprime celle induite par le H_2O_2 ajouté de façon exogène. Ainsi, deux voies distinctes sont activées par

le trioxyde d'arsenic, soit une voie rapide qui induit les MAPK indépendamment de la présence de H₂O₂ et une voie plus longue qui implique l'accumulation de ROS, renversée par la catalase, qui induit l'apoptose du neutrophile.

Nous avons ensuite montré que la phosphorylation des p38 et JNK-MAPK est associée à l'augmentation de plusieurs fonctions du neutrophile. L'importance de ces kinases dans le développement d'une réponse inflammatoire est bien connue, comme en fait foi l'utilisation d'inhibiteurs de type imidazole pyridinil spécifiques pour la p38 pour traiter des désordres tels que l'arthrite rhumatoïde (Kumar et al., 2003). La p38 possède plusieurs substrats tels que les kinases MAPAPK (MAPK-activated protein kinase) et MSK1 (mitogen and stress-activated protein kinase 1) ou le facteur de transcription ATF (activating transcription factor-2). Ainsi, l'impact de l'activité de la p38 sur différents évènements de la cascade inflammatoire a été révélé, notamment sur le chimiotactisme ou la flambée oxydative, en réponse au fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) chez le neutrophile (Zu et al., 1998). De plus, les résultats obtenus lors de l'examen des différentes fonctions du neutrophile démontrent que l'effet du trioxyde d'arsenic passe par l'activation de JNK. Cette kinase peut phosphoryler des facteurs de transcription comme c-Jun ou des récepteurs tels que l'IRS-1 (insulin receptor-1). Ainsi, nos résultats démontrent que, dans la majorité des cas, l'inhibition de l'une ou l'autre de ces kinases empêche presque entièrement l'activité fonctionnelle du neutrophile.

Il est possible que des substrats différents soient phosphorylés et activés par la p38 et JNK. Plusieurs substrats de ces kinases pourraient être impliqués dans notre cas. Par exemple, la phosphorylation de p38 peut être impliquée dans l'augmentation d'expression ou l'activation de la β_2 -intégrine (CD11b/CD18) comme c'est le cas en présence de TNF- α (Montecuccio et al., 2008), ce qui pourrait expliquer l'augmentation d'adhésion des neutrophiles en présence de trioxyde d'arsenic. De plus, la MAPKAPK2, un substrat de p38, est capable de phosphoryler plusieurs partenaires de la F-actine, dont Hsp27 et LSP1 (Huang et al., 1997; Stokoe et al., 1992), ce qui pourrait être impliqué dans le chimiotactisme du neutrophile observé en présence de trioxyde d'arsenic. Aussi, la phosphorylation de la paxilline, une protéine adaptatrice présente au niveau des contacts

focaux par JNK, est aussi importante dans la migration cellulaire (Huang et al., 2003). Enfin, il est intéressant de noter que GADD153, un facteur de transcription pro-apoptotique dont l'expression est associée à un stress au RE, est phosphorylé par la p38. Nous avons démontré dans le troisième article que l'expression de GADD153 est augmentée par une exposition au trioxyde d'arsenic chez les neutrophiles. Ainsi, il a été démontré que la phosphorylation de GADD153 sur les résidus sérine 78 et 81 par la p38 peut augmenter l'activité de ce facteur de transcription (Wang et Ron, 1996). Par contre, dans notre cas, il est à noter que l'inhibition de la p38 n'a pas réussi à renverser l'apoptose induite par le trioxyde d'arsenic. Ceci démontre que l'activation de GADD153 par la p38 n'est pas essentielle dans notre modèle.

5.5 Le flux calcique est perturbé, à long terme, en présence de trioxyde d'arsenic

L'analyse de la flambée calcique par l'utilisation de la sonde Fluo-3-AM au FACS (fluorescent activated cell sorter), ainsi que l'emploi de chélateur de calcium intracellulaire (BAPTA-AM) et extracellulaire (EGTA), nous a permis de conclure que l'activation des fonctions du neutrophile par le trioxyde d'arsenic est indépendante d'une hausse de calcium intracellulaire. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le trioxyde d'arsenic n'agit pas via un récepteur. En effet, aucun récepteur pour le trioxyde d'arsenic n'a été découvert à ce jour. Plutôt, des transporteurs de la famille des AQP seraient responsables du transport intracellulaire de cet agent (Liu et al., 2004). Ainsi, des produits tels que le fMLP, le C5a ou PAF ou des chémokines comme l'IL-8 peuvent activer les fonctions du neutrophile en induisant une flambée calcique. En effet, la liaison d'un récepteur couplé aux protéines G, comme c'est le cas pour ces produits, entraîne l'activation de la phospholipase C et l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃).

La liaison de l'IP₃ sur certains types de récepteurs induit la libération de calcium stocké intracellulairement (Tintinger et al., 2005). Nos résultats démontrent que des concentrations de trioxyde d'arsenic allant jusqu'à 20 µM sont incapables d'induire une flambée calcique. Ceci est contradictoire avec les travaux de Florea et coll. 2007 qui ont

démontré que le trioxyde d'arsenic peut induire une hausse rapide du calcium intracellulaire. Par contre, ces résultats ont été obtenus en utilisant des neuroblastomes ou des cellules rénales et des sondes fluorescentes différentes, soit la Fluo-4-AM et rhod-2 (Florea et al., 2007). Nous avons cependant remarqué que le trioxyde d'arsenic peut induire une accumulation graduelle de calcium intracellulaire observable seulement à long terme (20 heures) tel que démontré dans le troisième article. Nous proposons que cette augmentation de calcium intracellulaire puisse participer à l'activation des voies de l'UPR. En effet, un des principaux sites de stockage du calcium intracellulaire est le RE. L'influx de calcium à l'intérieur de cet organite est régi par des pompes de la famille des SERCA (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases) tandis que l'efflux vers le cytoplasme est géré par des canaux à récepteurs IP_3 ainsi que des récepteurs à la ryanodine (RyR). Il existe également plusieurs protéines à l'intérieur du RE qui séquestrent le calcium. Parmi celles-ci, on retrouve la calréticuline. Une déplétion du calcium dans ce compartiment cellulaire empêche le repliement des protéines, interfère avec la rétention de certaines protéines dans la lumière du RE, inhibe le trafic des protéines du RE vers l'appareil de Golgi et perturbe l'activité de certaines chaperones comme la Grp78 ou la calnexine (Schroder, 2008). Ainsi, il a été découvert que certains agents qui perturbent la balance calcique intracellulaire peuvent induire les voies de l'UPR et ultimement l'apoptose, c'est le cas de la thapsigargine qui inhibe les pompes SERCA (Luciani et al., 2009).

D'un autre côté, des agents qui induisent une accumulation de protéines mal repliées tels que la tunicamycine peuvent aussi entraîner une libération de calcium stocké dans le RE. De cette façon, le calcium libéré par le RE induit une dépolarisation de la mitochondrie, suite à l'activation de Bad par exemple. Ainsi, nos résultats démontrent qu'il y a une lente libération de calcium du RE vers le cytoplasme en présence de trioxyde d'arsenic, ce qui pourrait contribuer à induire l'apoptose. Aussi, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'ARNm de la calcineurine, une phosphatase dépendante de la présence de calcium qui contrôle l'influx de calcium par les récepteurs IP_3 (Cameron et al., 1995). Il a été démontré que la calcineurine serait importante dans la survie à un stress au RE (Bonilla et al., 2002). Néanmoins, il semble que l'augmentation d'expression de la

calcineurine ne soit pas suffisante pour inhiber l'effet pro-apoptotique du trioxyde d'arsenic dans les neutrophiles.

5.6 Le stress oxydatif est une partie intégrante de l'effet pro-apoptotique du trioxyde d'arsenic

Également, les résultats préliminaires à cette thèse ont démontré que l'ajout de catalase renverse l'apoptose induite par le trioxyde d'arsenic. Aussi, nous avons remarqué, tel que décrit dans le deuxième article, qu'il y a une accumulation de H_2O_2 à l'intérieur des neutrophiles qu'on observe à partir de 60 min d'incubation avec cette substance. Cette accumulation est donc trop lente pour expliquer la phosphorylation des MAPK et l'activation des différentes fonctions du neutrophile. Par contre, celle-ci pourrait expliquer des phénomènes plus tardifs tels que la libération de calcium, l'activation des voies de l'UPR et l'induction des caspases. Ainsi, il a été établi que l'exposition à un stress oxydatif tel que l' H_2O_2 peut entraîner l'accumulation de protéines mal repliées et l'induction des voies de l'UPR (Xue et al., 2005). L'exposition aux ROS peut entraîner l'oxydation des groupements thiols sur les résidus cystéines des pompes calciques RyR, ce qui provoque une libération graduelle du calcium contenu dans le RE (Hidalgo, 2005). La perte de calcium dans cet organite entraîne un mauvais repliement des protéines. D'un autre point de vue, cet amoncellement de protéines non-fonctionnelles peut même devenir une source de ROS. En effet, il a été démontré que l'enzyme ERO1 α , impliquée dans la formation de liens disulfures, génère de l' H_2O_2 comme sous-produit (Appenzeller-Herzog et al., 2008). Il est possible d'émettre l'hypothèse qu'une partie de l' H_2O_2 produit en réponse à l'exposition au trioxyde d'arsenic puisse provenir de ce système. En effet, nous avons démontré préalablement à cette thèse, que les sources traditionnelles de ROS dans le neutrophile ne sont pas ou peu impliquées dans l'effet du trioxyde d'arsenic. Par exemple, l'activité de la NADPH oxydase n'est pas stimulée chez les neutrophiles et les cellules PLB-985 déficientes en gp91^{phox}, une sous-unité de la NADPH oxydase, sont autant susceptibles à l'effet de ce médicament que leur contrepartie normale. Également, la mitochondrie constituerait une source négligeable de ROS chez les neutrophiles incubés avec du trioxyde d'arsenic (Binet et al., 2006). Il a été suggéré que les ROS constituent un signal en amont de la cascade apoptotique des neutrophiles. Aussi, une baisse de

glutathion pourrait précéder cette accumulation de ROS (Scheel-Toellner et al., 2004). Dans le même ordre d'idée, l'arsenic est connu pour se lier au glutathion lors d'un processus de détoxification, l'As(GS)₃ formé étant exporté à l'extérieur de la cellule par les protéines MRP (multidrug resistance-associated protein) des transporteurs ATPases de la superfamille ABC (Rosen, 2002). D'ailleurs les cellules ayant un faible contenu en glutathion telles que les cellules NB4 du cancer APL sont sensibles à l'effet pro-apoptotique de cette molécule (Dai et al., 1999). En somme, il est possible qu'une combinaison telle qu'une baisse de glutathion et l'augmentation de l'activité de ERO1 α puissent mener à l'augmentation de H₂O₂ à l'intérieur des neutrophiles en présence de trioxyde d'arsenic. Du coup, ce stress oxydatif pourrait activer les voies de l'UPR.

5.7 La caspase-4 n'est pas essentielle à l'induction de l'apoptose par l'UPR chez les neutrophiles

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent pour la première fois l'expression de la caspase-4 au niveau protéique chez le neutrophile. Celle-ci serait, selon plusieurs études, une caspase initiatrice responsable de l'induction de la cascade apoptotique lors d'un stress au RE. Ainsi, nous avons utilisé un inhibiteur de la caspase-4, le LEVD-FMK, pour renverser l'apoptose induite par le trioxyde d'arsenic. Nous n'avons pas été en mesure de réduire l'apoptose induite par cet agent suite à une pré-incubation avec cet inhibiteur et ce, même en utilisant des doses beaucoup plus fortes que celles retrouvées dans la littérature (100 μ M comparativement à 10 μ M) (Oda et al., 2008). Nous avons tout de même été en mesure de renverser l'activité ainsi que le clivage de cette enzyme en utilisant une concentration de 50 μ M d'inhibiteur de caspase-4. Il est important de noter que l'implication de la caspase-4 dans la réponse au stress au RE a été mise en doute chez certains types cellulaires (Obeng et Boise, 2005). De plus, il est possible que la caspase-4 agisse plus en aval dans la cascade apoptotique. Par exemple, celle-ci pourrait être activée par la caspase-8, tel que démontré dans le troisième article. Un tel rôle a déjà été suggéré pour cette caspase. En effet, les travaux de Nieto-Miguel et coll. (2007) montrent que l'activation de la caspase-4 survient après l'induction de l'apoptose et en aval de l'activation de la caspase-8. Ces derniers proposent que la caspase-4 fasse partie d'une boucle amplificatrice (Nieto-Miguel et al., 2007). De la même manière, tel que décrit

dans le troisième article, nos résultats démontrent que l'inhibition de la caspase-8 peut empêcher le clivage de la caspase-4. Il est intéressant de noter que l'activité de la caspase-8 peut générer un fragment p20 à partir d'une protéine du réticulum endoplasmique Bap31. Ce fragment peut transmettre le signal apoptotique en favorisant la libération du calcium du RE vers la mitochondrie. Une hausse de la concentration calcique dans la mitochondrie induit la libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome (Breckenridge et al., 2003). Il serait intéressant d'explorer cette voie chez les neutrophiles traités avec du trioxyde d'arsenic.

5.8 Le rôle de la caspase-4 n'est pas relié à la maturation des cytokines chez les neutrophiles

La caspase-4 fait partie des caspases inflammatoires au même titre que la caspase-1 ou la caspase-5. Ces enzymes sont responsables de la maturation de cytokines telles que la pro-IL-1 β et l'IL-8 (Martinon et Tschopp, 2007). Ainsi, la caspase-4 a été associée à la synthèse de nombreuses cytokines comme l'IL-1 β , IL-6 ou l'IL-8 en réponse au LPS (Lakshmanan et Porter, 2007). Nous avons étudié la sécrétion de la cytokine IL-8 en réponse au trioxyde d'arsenic en prenant soin d'inclure l'inhibiteur LEVD-FMK pour déterminer l'implication de la caspase-4 dans ce processus. Les résultats obtenus présentés à l'annexe A (figure 7 du troisième article non présentée dans la version soumise pour publication) démontrent que le trioxyde d'arsenic et le LPS induisent la libération d'IL-8, mesurée par ELISA chez le neutrophile à 6 heures et 20 heures. Par contre, l'inhibiteur à la caspase-4, le LEVD-FMK, n'a pas renversé cette libération, il a même augmentée celle-ci, ce qui démontre que la caspase-4 n'est pas impliquée dans la maturation des cytokines dans le neutrophile.

5.9 La caspase-4 est impliquée dans le clivage de la vimentine

Notre investigation s'est ensuite tournée vers le clivage de la vimentine par la caspase-4. La vimentine est une protéine du cytosquelette de la famille des filaments intermédiaires. Cette protéine est clivée lors de l'apoptose spontanée des neutrophiles et certains fragments peuvent être présentés à la surface de ces cellules apoptotiques (Moisan et

Girard, 2006). De plus, il a été démontré que la caspase-4 clive la vimentine, ce qui libère p53 et permet sa translocation vers le noyau chez des fibroblastes synoviaux isolés de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Yang et al., 2005). Nos résultats ont permis de constater que la dégradation de la vimentine observée en présence de trioxyde d'arsenic et en condition d'apoptose spontanée est renversée par le LEVD-FMK. Ceci entraîne, par le fait-même, une baisse de la présentation du fragment C-terminal de la vimentine à la surface du neutrophile apoptotique. Ainsi, il est possible que la caspase-4 soit importante dans la présentation à la surface de certains types d'antigènes. Étant donné la présence d'autoanticorps contre la vimentine dans certains désordres inflammatoires tels que l'arthrite rhumatoïde (Tilleman et al., 2008), il devient intéressant d'explorer le rôle de la caspase-4 dans le développement de ces pathologies. Ces résultats sont tout particulièrement pertinents si l'on considère que les neutrophiles sont une source importante d'autoantigènes (Bartunkova et al., 2003). De plus, peu d'études se sont attardées à ce sujet dans la littérature, bien que cette caspase puisse être activée chez des fibroblastes arthritiques stimulés par un agent apoptotique, TRAIL-R2 en combinaison avec la lactacystine (Yang et al., 2005).

5.10 Le trioxyde d'arsenic induit un changement morphologique du RE accompagné de l'activation des voies de l'UPR

En plus d'observer le clivage de la caspase-4, nos travaux ont permis de constater que l'incubation avec le trioxyde d'arsenic entraîne une altération morphologique du RE. La dilatation du RE est un phénomène facilement observable chez les cellules sécrétrices comme les plasmocytes, à l'intérieur des cellules exprimant une protéine dont le repliement est incorrect ou lorsque celles-ci sont exposées à un stress au RE. L'altération morphologique de cet organite est imputable à l'augmentation du contenu en acide phosphatidique. En effet, il a été démontré qu'un stress au RE perturbe l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des phospholipides, soit la phosphocholine cytidylyl-transférase et diacylglycerol cholinephosphotransférase (Schroder, 2008).

Le troisième critère employé pour détecter un stress au RE en présence de trioxyde d'arsenic est l'examen des trois voies de l'UPR. Nos résultats montrent que l'expression

ou l'activation de senseurs provenant des trois voies de l'UPR sont augmentées en présence de trioxyde d'arsenic. Ainsi, nous démontrons pour la première fois que ces voies peuvent être impliquées dans l'apoptose du neutrophile. De plus, il est possible que plusieurs résultats obtenus dans les deux premiers articles de cette thèse soient reliés à l'induction de ces voies. Par exemple, il est connu que l'activation des voies de l'UPR contrebalance l'accumulation de protéines mal repliées par une augmentation de la quantité de chaperones. Il est permis de spéculer que l'augmentation de l'expression des Hsp70, Hsp90 et peut-être même de l'annexine-1, soit reliée à ce phénomène. En perspective, il serait aussi très intéressant de vérifier si l'induction de la protéine GADD153 est responsable de l'induction de l'apoptose par le trioxyde d'arsenic. En effet, il est bien connu que la délétion de cette protéine inhibe l'apoptose induite par un stress au RE (Song et al., 2008).

5.11 Implications et nouvelles voies de recherches

Les travaux présentés dans cette thèse permettent de mieux comprendre l'effet du trioxyde d'arsenic sur les neutrophiles humains et ce, à court et à long termes. Ainsi, il a été démontré que cet agent exhibe un effet plus complexe que prévu, n'étant pas simplement qu'un agoniste pro-apoptotique du neutrophile. En effet, cet agent pourrait activer la plupart des fonctions du neutrophile, incluant la phagocytose. Cette propriété pourrait s'avérer intéressante d'un point de vue clinique en considérant que plusieurs patients traités avec cette substance présentent des neutropénies et une susceptibilité accrue aux infections bactériennes. De plus, nous avons démontré que l'annexine-I est impliquée dans un mécanisme homologue au choc thermique lors d'une exposition au trioxyde d'arsenic. Il reste maintenant à déterminer si, dans notre système, l'annexine-I peut offrir une certaine protection contre le stress oxydatif ou chimique. Par exemple, l'annexine-I pourrait s'attacher à différentes protéines mal repliées lors d'une exposition au trioxyde d'arsenic comme c'est le cas avec les autres types de chaperones. Également, ces résultats montrent que les neutrophiles peuvent activer les voies du stress au RE. Nous suggérons que cette voie pourrait même s'activer à l'intérieur de l'apoptose spontanée. Ainsi, l'utilisation du trioxyde d'arsenic nous a permis de révéler l'existence d'une nouvelle voie apoptotique chez le neutrophile. Il est permis de croire que

L'activation des voies de l'UPR puisse être responsable de certaines pathologies associées aux neutrophiles. D'ailleurs, il existe une relation étroite entre les voies de l'UPR et l'inflammation. Par exemple, plusieurs cytokines inflammatoires telles que le TNF- α sont connues pour être induites par l'UPR (Hu et al., 2006). Ce phénomène pourrait impliquer la voie IRE1 α -JNK et le facteur de transcription AP-1 (Gargalovic et al., 2006). Ainsi, les voies de l'UPR ont été associées à plusieurs maladies inflammatoires telles que l'athérosclérose (Gargalovic et al., 2006) ou le diabète de type II (Ozcan et al., 2004). L'activation des voies de l'UPR chez le neutrophile pourrait entraîner la sécrétion de cytokines qui contribue à la pathologie de certains désordres inflammatoires. Ainsi, un dérèglement des voies de l'UPR serait impliqué dans le développement de l'arthrite rhumatoïde, une maladie qui provoque la suractivation du neutrophile (Gao et al., 2008). En bref, les prochains travaux devront s'attarder à comprendre comment les voies de l'UPR contrôlent l'apoptose du neutrophile et si un dérèglement de ces voies peut expliquer l'établissement de pathologies associées aux neutrophiles.

ANNEXE A

Figure 7. *Caspase-4 activity is not required for release of IL-8 in LPS and ATO-treated neutrophils*

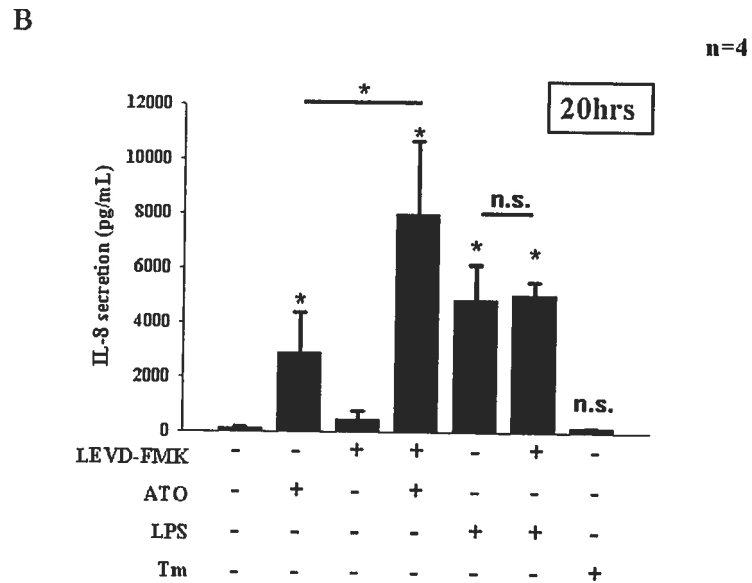
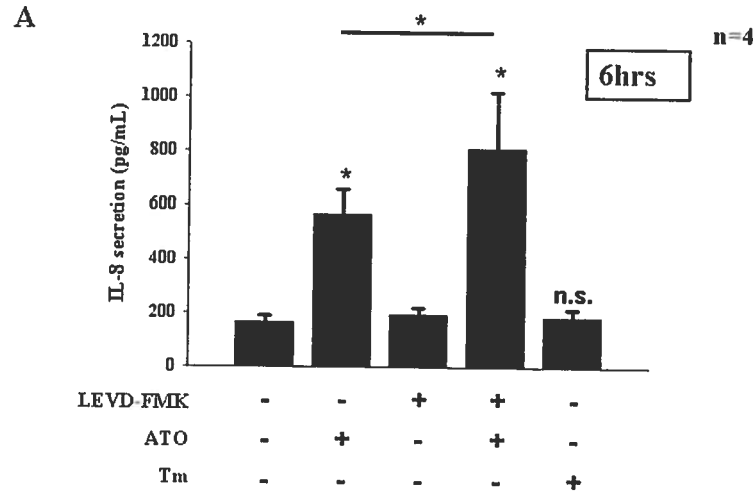


Figure 7. Caspase-4 activity is not required for release of IL-8 in LPS and ATO-treated neutrophils. Release of IL-8 in the supernatant of ATO 5µM, LPS 1µg/mL or tunicamycin 5µg/mL treated neutrophils at 6 hrs (A) or 20 hrs (B) in the presence or absence of LEVD-FMK 50µM was assessed by ELISA. * p<0,05.

Références

- AHMAD, S., K. T. Kitchin et W. R. Cullen. 2000. "Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen" . Arch Biochem Biophys, vol. 382, no. 2, p. 195-202.
- AKGUL, C., D. A. Moulding et S. W. Edwards. 2001. "Molecular control of neutrophil apoptosis" . FEBS Lett, vol. 487, no. 3, p. 318-22.
- ANDRES, E.,F. Maloisel. 2008. "Idiosyncratic drug-induced agranulocytosis or acute neutropenia" . Curr Opin Hematol, vol. 15, no. 1, p. 15-21.
- ANTMAN, K. H. 2001. "Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy" . Oncologist, vol. 6 Suppl 2, no. 1-2.
- APPENZELLER-HERZOG, C., J. Riemer, B. Christensen, E. S. Sorensen et L. Ellgaard. 2008. "A novel disulphide switch mechanism in Ero1alpha balances ER oxidation in human cells" . EMBO J, vol. 27, no. 22, p. 2977-87.
- ASHKENAZI, A.,V. M. Dixit. 1998. "Death receptors: signaling and modulation" . Science, vol. 281, no. 5381, p. 1305-8.
- BARNHART, B. C., E. C. Alappat et M. E. Peter. 2003. "The CD95 type I/type II model" . Semin Immunol, vol. 15, no. 3, p. 185-93.
- BARTUNKOVA, J., V. Tesar et A. Sediva. 2003. "Diagnostic and pathogenetic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies" . Clin Immunol, vol. 106, no. 2, p. 73-82.
- BERNARDI, R.,P. P. Pandolfi. 2007. "Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies" . Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 8, no. 12, p. 1006-16.
- BERTOLOTTI, A., X. Wang, I. Novoa, R. Jungreis, K. Schlessinger, J. H. Cho, A. B. West et D. Ron. 2001. "Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice" . J Clin Invest, vol. 107, no. 5, p. 585-93.
- BERTOLOTTI, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding et D. Ron. 2000. "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response" . Nat Cell Biol, vol. 2, no. 6, p. 326-32.
- BINET, F., H. Cavalli, E. Moisan et D. Girard. 2006. "Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis" . Br J Haematol, vol. 132, no. 3, p. 349-58.

- BISHAYI, B., M. Sengupta. 2003. "Intracellular survival of Staphylococcus aureus due to alteration of cellular activity in arsenic and lead intoxicated mature Swiss albino mice". Toxicology, vol. 184, no. 1, p. 31-9.
- BONILLA, M., K. K. Nastase et K. W. Cunningham. 2002. "Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress". EMBO J, vol. 21, no. 10, p. 2343-53.
- BORREGAARD, N., J. B. Cowland. 1997. "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte". Blood, vol. 89, no. 10, p. 3503-21.
- BORREGAARD, N., T. Herlin. 1982. "Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis". J Clin Invest, vol. 70, no. 3, p. 550-7.
- 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". J Leukoc Biol, vol. 75, no. 5, p. 893-900.
- BRECKENRIDGE, D. G., M. Stojanovic, R. C. Marcellus et G. C. Shore. 2003. "Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol". J Cell Biol, vol. 160, no. 7, p. 1115-27.
- BRINKMANN, V., A. Zychlinsky. 2007. "Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs". Nat Rev Microbiol, vol. 5, no. 8, p. 577-82.
- BROWN, S. B., J. Savill. 1999. "Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes". J Immunol, vol. 162, no. 1, p. 480-5.
- BURG, N. D., M. H. Pillinger. 2001. "The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity". Clin Immunol, vol. 99, no. 1, p. 7-17.
- CALFON, M., H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark et D. Ron. 2002. "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA". Nature, vol. 415, no. 6867, p. 92-6.
- CAMERON, A. M., J. P. Steiner, A. J. Roskams, S. M. Ali, G. V. Ronnett et S. H. Snyder. 1995. "Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux". Cell, vol. 83, no. 3, p. 463-72.
- CANAIDER, S., E. Solito, C. de Coupade, R. J. Flower, F. Russo-Marie, N. J. Goulding et M. Perretti. 2000. "Increased apoptosis in U937 cells over-expressing lipocortin 1 (annexin I)". Life Sci, vol. 66, no. 18, p. PL265-70.
- CASSATELLA, M. A., L. Meda, S. Bonora, M. Ceska et G. Constantin. 1993. "Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide". J

Exp Med, vol. 178, no. 6, p. 2207-11.

CAVIGELLI, M., W. W. Li, A. Lin, B. Su, K. Yoshioka et M. Karin. 1996. "The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase" . EMBO J, vol. 15, no. 22, p. 6269-79.

CHEN, D., R. Chan, S. Waxman et Y. Jing. 2006. "Buthionine sulfoximine enhancement of arsenic trioxide-induced apoptosis in leukemia and lymphoma cells is mediated via activation of c-Jun NH2-terminal kinase and up-regulation of death receptors" . Cancer Res, vol. 66, no. 23, p. 11416-23.

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" . J Cell Physiol, vol. 177, no. 2, p. 324-33.

CHENG, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten et S. J. Korsmeyer. 2001. "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis" . Mol Cell, vol. 8, no. 3, p. 705-11.

CHERTOV, O., D. F. Michiel, L. Xu, J. M. Wang, K. Tani, W. J. Murphy, D. L. Longo, D. D. Taub et J. J. Oppenheim. 1996. "Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils" . J Biol Chem, vol. 271, no. 6, p. 2935-40.

CHEUNG, H. H., N. Lynn Kelly, P. Liston et R. G. Korneluk. 2006. "Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs" . Exp Cell Res, vol. 312, no. 12, p. 2347-57.

COWBURN, A. S., A. M. Condliffe, N. Farahi, C. Summers et E. R. Chilvers. 2008. "Advances in neutrophil biology: clinical implications" . Chest, vol. 134, no. 3, p. 606-12.

CREDLE, J. J., J. S. Finer-Moore, F. R. Papa, R. M. Stroud et P. Walter. 2005. "On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum" . Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 102, no. 52 , p. 18773-84.

CULLINAN, S. B.,J. A. Diehl. 2004. "PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress" . J Biol Chem, vol. 279, no. 19, p. 20108-17.

DAI, J., R. S. Weinberg, S. Waxman et Y. Jing. 1999. "Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system" . Blood, vol. 93, no. 1, p. 268-77.

DAIGLE, I.,H. U. Simon. 2001. "Alternative functions for TRAIL receptors in eosinophils and neutrophils" . Swiss Med Wkly, vol. 131, no. 17-18, p. 231-7.

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” . Br J Pharmacol, vol. 140, no. 1, p. 133-45.
- DEAGLIO, S., D. Canella, G. Baj, A. Arnulfo, S. Waxman et F. Malavasi. 2001. “Evidence of an immunologic mechanism behind the therapeutical effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on myeloma cells” . Leuk Res, vol. 25, no. 3, p. 227-35.
- DENG, J., P. D. Lu, Y. Zhang, D. Scheuner, R. J. Kaufman, N. Sonenberg, H. P. Harding et D. Ron. 2004. “Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2” . Mol Cell Biol, vol. 24, no. 23, p. 10161-8.
- DENIAUD, A., O. Sharaf el dein, E. Maillier, D. Poncet, G. Kroemer, C. Lemaire et C. Brenner. 2008. “Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis” . Oncogene, vol. 27, no. 3, p. 285-99.
- DOUER, D., M. S. Tallman. 2005. “Arsenic trioxide: new clinical experience with an old medication in hematologic malignancies” . J Clin Oncol, vol. 23, no. 10, p. 2396-410.
- DOWNEY, D. G., S. C. Bell et J. S. Elborn. 2009. “Neutrophils in cystic fibrosis” . Thorax, vol. 64, no. 1, p. 81-8.
- DRANSFIELD, I., S. C. Stocks et C. Haslett. 1995. “Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis” . Blood, vol. 85, no. 11, p. 3264-73.
- DU, Y., K. Wang, H. Fang, J. Li, D. Xiao, P. Zheng, Y. Chen, H. Fan, X. Pan, C. Zhao, Q. Zhang, S. Imbeaud, E. Graudens, E. Eveno, C. Auffray, S. Chen, Z. Chen et J. Zhang. 2006. “Coordination of intrinsic, extrinsic, and endoplasmic reticulum-mediated apoptosis by imatinib mesylate combined with arsenic trioxide in chronic myeloid leukemia” . Blood, vol. 107, no. 4, p. 1582-90.
- EA, H. K., V. Monceau, E. Camors, M. Cohen-Solal, D. Charlemagne et F. Liote. 2008. “Annexin 5 overexpression increased articular chondrocyte apoptosis induced by basic calcium phosphate crystals” . Ann Rheum Dis, vol. 67, no. 11, p. 1617-25.
- EDWARDS, S.W. 1994. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. New York : Cambridge University Press, 299p.
- FECHO, K., P. L. Cohen. 1998. “Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils” . J Leukoc Biol, vol. 64, no. 3, p. 373-83.
- FERNANDEZ, G. C., J. M. Ilarregui, C. J. Rubel, M. A. Toscano, S. A. Gomez, M. Beigier Bompadre, M. A. Isturiz, G. A. Rabinovich et M. S. Palermo. 2005. “Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival:

- involvement of alternative MAPK pathways” . Glycobiology, vol. 15, no. 5, p. 519-27.
- FISCHER, H., U. Koenig, L. Eckhart et E. Tschachler. 2002. “Human caspase 12 has acquired deleterious mutations” . Biochem Biophys Res Commun, vol. 293, no. 2, p. 722-6.
- FLOREA, A. M., F. Splettstoesser et D. Busselberg. 2007. “Arsenic trioxide (As₂O₃) induced calcium signals and cytotoxicity in two human cell lines: SY-5Y neuroblastoma and 293 embryonic kidney (HEK)” . Toxicol Appl Pharmacol, vol. 220, no. 3, p. 292-301.
- FURZE, R. C., S. M. Rankin. 2008. “Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow” . Immunology, vol. 125, no. 3, p. 281-8.
- GAINET, J., S. Chollet-Martin, M. Brion, J. Hakim, M. A. Gougerot-Pocidallo et C. Elbim. 1998. “Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation” . Lab Invest, vol. 78, no. 6, p. 755-62.
- GALICIA, G., R. Leyva, E. P. Tenorio, P. Ostrosky-Wegman et R. Saavedra. 2003. “Sodium arsenite retards proliferation of PHA-activated T cells by delaying the production and secretion of IL-2” . Int Immunopharmacol, vol. 3, no. 5, p. 671-82.
- GAO, B., S. M. Lee, A. Chen, J. Zhang, D. D. Zhang, K. Kannan, R. A. Ortmann et D. Fang. 2008. “Synoviolin promotes IRE1 ubiquitination and degradation in synovial fibroblasts from mice with collagen-induced arthritis” . EMBO Rep, vol. 9, no. 5, p. 480-5.
- GARGALOVIC, P. S., N. M. Gharavi, M. J. Clark, J. Pagnon, W. P. Yang, A. He, A. Truong, T. Baruch-Oren, J. A. Berliner, T. G. Kirchgessner et A. J. Lusis. 2006. “The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells” . Arterioscler Thromb Vasc Biol, vol. 26, no. 11, p. 2490-6.
- GIAFIS, N., E. Katsoulidis, A. Sassano, M. S. Tallman, L. S. Higgins, A. R. Nebreda, R. J. Davis et L. C. Plataniotis. 2006. “Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of arsenic trioxide-dependent cellular responses” . Cancer Res, vol. 66, no. 13, p. 6763-71.
- GILBERT, C., P. E. Poubelle, P. Borgeat, M. Pouliot et P. H. Naccache. 2003. “Crystal-induced neutrophil activation: VIII. Immediate production of prostaglandin E₂ mediated by constitutive cyclooxygenase 2 in human neutrophils stimulated by urate crystals” . Arthritis Rheum, vol. 48, no. 4, p. 1137-48.
- GOLDSTEIN, I. M., C. L. Malmsten, B. Samuelsson et G. Weissmann. 1977. “Prostaglandins, thromboxanes, and polymorphonuclear leukocytes: mediation and modulation of inflammation” . Inflammation, vol. 2, no. 4, p. 309-17.
- GRAD, J. M., N. J. Bahlis, I. Reis, M. M. Oshiro, W. S. Dalton et L. H. Boise. 2001.

“Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells” . Blood, vol. 98, no. 3, p. 805-13.

GRUN, B., E. Benjamin, J. Sinclair, J. F. Timms, I. J. Jacobs, S. A. Gayther et D. Dafou. 2009. “Three-dimensional in vitro cell biology models of ovarian and endometrial cancer” . Cell Prolif, vol. 42, no. 2, p. 219-28.

GUIMARAES-COSTA, A. B., M. T. Nascimento, G. S. Froment, R. P. Soares, F. N. Morgado, F. Conceicao-Silva et E. M. Saraiva. 2009. “Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps” . Proc Natl Acad Sci U S A, vol.

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, no. 8, p. 711-9 .

HAN, Y. H., S. Z. Kim, S. H. Kim et W. H. Park. 2008. “Arsenic trioxide inhibits the growth of Calu-6 cells via inducing a G2 arrest of the cell cycle and apoptosis accompanied with the depletion of GSH” . Cancer Lett, vol. 270, no. 1, p. 40-55.

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 J, vol. 17, no. 2, p. 253-5.

HARDING, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira et D. Ron. 2000. “Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells” . Mol Cell, vol. 6, no. 5, p. 1099-108.

HARDING, H. P., Y. Zhang et D. Ron. 1999. “Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase” . Nature, vol. 397, no. 6716, p. 271-4.

HARDING, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden et D. Ron. 2003. “An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress” . Mol Cell, vol. 11, no. 3, p. 619-33.

HAWKINS, T. E., D. Das, B. Young et S. E. Moss. 2002. “DT40 cells lacking the Ca²⁺-binding protein annexin 5 are resistant to Ca²⁺-dependent apoptosis” . Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 99, no. 12, p. 8054-9.

HAZE, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura et K. Mori. 1999. “Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress” . Mol Biol Cell, vol. 10, no. 11, p. 3787-99.

HEERINGA, P., J. W. Tervaert. 2004. “Pathophysiology of ANCA-associated vasculitides: are ANCA really pathogenic?” . Kidney Int, vol. 65, no. 5, p. 1564-7.

- HIDALGO, C. 2005. "Cross talk between Ca²⁺ and redox signalling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/Ca²⁺ release channels" . Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, vol. 360, no. 1464, p. 2237-46.
- HITOMI, J., T. Katayama, Y. Eguchi, T. Kudo, M. Taniguchi, Y. Koyama, T. Manabe, S. Yamagishi, Y. Bando, K. Imaizumi, Y. Tsujimoto et M. Tohyama. 2004. "Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death" . J Cell Biol, vol. 165, no. 3, p. 347-56.
- HOGAN, S. L., K. K. Satterly, M. A. Dooley, P. H. Nachman, J. C. Jennette et R. J. Falk. 2001. "Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis" . J Am Soc Nephrol, vol. 12, no. 1, p. 134-42.
- HU, J., Y. F. Liu, C. F. Wu, F. Xu, Z. X. Shen, Y. M. Zhu, J. M. Li, W. Tang, W. L. Zhao, W. Wu, H. P. Sun, Q. S. Chen, B. Chen, G. B. Zhou, A. Zelent, S. Waxman, Z. Y. Wang, S. J. Chen et Z. Chen. 2009. "Long-term efficacy and safety of all-trans retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia" . Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 106, no. 9, p. 3342-7.
- HU, P., Z. Han, A. D. Couvillon, R. J. Kaufman et J. H. Exton. 2006. "Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression" . Mol Cell Biol, vol. 26, no. 8, p. 3071-84.
- HU, Y., M. A. Benedict, L. Ding et G. Nunez. 1999. "Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis" . EMBO J, vol. 18, no. 13, p. 3586-95.
- HUANG, C., Z. Rajfur, C. Borchers, M. D. Schaller et K. Jacobson. 2003. "JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration" . Nature, vol. 424, no. 6945, p. 219-23.
- HUANG, C. K., L. Zhan, Y. Ai et J. Jongstra. 1997. "LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils" . J Biol Chem, vol. 272, no. 1, p. 17-9.
- 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" . Br J Haematol, vol. 125, no. 4, p. 470-6.
- JANEWAY, C.A., P. Travers, M. Walport et M. Shlomchik. 2001. Immunobiology : The Immune System in Health and Disease. États-Unis : Garland Publishing, 732p.
- JIA, S. H., J. Parodo, A. Kapus, O. D. Rotstein et J. C. Marshall. 2008. "Dynamic regulation of neutrophil survival through tyrosine phosphorylation or dephosphorylation of caspase-8" . J Biol Chem, vol. 283, no. 9, p. 5402-13.

- JITKAEW, S., E. Witasp, S. Zhang, V. E. Kagan et B. Fadeel. 2009. "Induction of caspase- and reactive oxygen species-independent phosphatidylserine externalization in primary human neutrophils: role in macrophage recognition and engulfment" . J Leukoc Biol, vol. 85, no. 3, p. 427-37.
- JOUSSE, C., S. Oyadomari, I. Novoa, P. Lu, Y. Zhang, H. P. Harding et D. Ron. 2003. "Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells" . J Cell Biol, vol. 163, no. 4, p. 767-75.
- KALLENBERG, C. G., A. Rarok, C. A. Stegeman et P. C. Limburg. 2002. "New insights into the pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis" . Autoimmun Rev, vol. 1, no. 1-2, p. 61-6.
- KALMAR, B., L. Greensmith. 2009. "Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress" . Adv Drug Deliv Rev, vol. 61, no. 4, p. 310-8.
- KANG, Y. H., S. J. Lee. 2008. "The role of p38 MAPK and JNK in Arsenic trioxide-induced mitochondrial cell death in human cervical cancer cells" . J Cell Physiol, vol. 217, no. 1, p. 23-33.
- 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 Res, vol. 64, no. 24, p. 8960-7.
- KAPAHI, P., T. Takahashi, G. Natoli, S. R. Adams, Y. Chen, R. Y. Tsien et M. Karin. 2000. "Inhibition of NF-kappa B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of Ikappa B kinase" . J Biol Chem, vol. 275, no. 46, p. 36062-6.
- 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, no. 5, p. 1748-53.
- KASAMA, T., R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick et S. L. Kunkel. 1993. "Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha" . J Exp Med, vol. 178, no. 1, p. 63-72.
- KAY, R. R., P. Langridge, D. Traynor et O. Hoeller. 2008. "Changing directions in the study of chemotaxis" . Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 9, no. 6, p. 455-63.
- KERBAUY, D. M., V. Lesnikov, N. Abbasi, S. Seal, B. Scott et H. J. Deeg. 2005. "NF-kappaB and FLIP in arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in myelodysplastic

- syndromes (MDSs)” . Blood, vol. 106, no. 12, p. 3917-25.
- KIM, G. Y., H. B. Lee, S. O. Lee, H. J. Rhee et D. S. Na. 1997. “Chaperone-like function of lipocortin 1” . Biochem Mol Biol Int, vol. 43, no. 3, p. 521-8.
- 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” . J Immunol, vol. 164, no. 8, p. 4286-91.
- KOZOPAS, K. M., T. Yang, H. L. Buchan, P. Zhou et R. W. Craig. 1993. “MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2” . Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90, no. 8, p. 3516-20.
- KROEMER, G.,H. de The. 1999. “Arsenic trioxide, a novel mitochondriotoxic anticancer agent?” . J Natl Cancer Inst, vol. 91, no. 9, p. 743-5.
- KUMAR, S., J. Boehm et J. C. Lee. 2003. “p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases” . Nat Rev Drug Discov, vol. 2, no. 9, p. 717-26.
- KUMAR, V., R.S. Cotran et S.L. Robbins. 1992. Basic Pathology Fifth Edition. États Unis : W.B. Saunders Company, 772p.
- KVIETYS, P. R.,M. Sandig. 2001. “Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular?” . News Physiol Sci, vol. 16, no. 15-9.
- LAKSHMANAN, U.,A. G. Porter. 2007. “Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB-dependent production of IL-8 and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1)” . J Immunol, vol. 179, no. 12, p. 8480-90.
- LAROCLETTE, N., D. Decaudin, E. Jacotot, C. Brenner, I. Marzo, S. A. Susin, N. Zamzami, Z. Xie, J. Reed et G. Kroemer. 1999. “Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore” . Exp Cell Res, vol. 249, no. 2, p. 413-21.
- LEE, A. H., N. N. Iwakoshi et L. H. Glimcher. 2003. “XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response” . Mol Cell Biol, vol. 23, no. 21, p. 7448-59.
- LEHMEYER, J. E.,R. B. Johnston Jr. 1978. “Effect of anti-inflammatory drugs and agents that elevate intracellular cyclic AMP on the release of toxic oxygen metabolites by phagocytes: studies in a model of tissue-bound IgG” . Clin Immunol Immunopathol, vol. 9, no. 4, p. 482-90.
- LEMARIE, A., E. Bourdonnay, C. Morzadec, O. Fardel et L. Vernhet. 2008. “Inorganic

- arsenic activates reduced NADPH oxidase in human primary macrophages through a Rho kinase/p38 kinase pathway” . J Immunol, vol. 180, no. 9, p. 6010-7.
- LEMARIE, A., C. Morzadec, E. Bourdonnay, O. Fardel et L. Vernhet. 2006a. “Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic” . J Immunol, vol. 177, no. 5, p. 3019-27.
- LEMARIE, A., C. Morzadec, D. Merino, O. Micheau, O. Fardel et L. Vernhet. 2006b. “Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophagic differentiation through nuclear factor-kappaB-related survival pathway down-regulation” . J Pharmacol Exp Ther, vol. 316, no. 1, p. 304-14.
- LEVY, B. D., C. B. Clish, B. Schmidt, K. Gronert et C. N. Serhan. 2001. “Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution” . Nat Immunol, vol. 2, no. 7, p. 612-9.
- LEWERENZ, J.,P. Maher. 2009. “Basal levels of eIF2alpha phosphorylation determine cellular antioxidant status by regulating ATF4 and xCT expression” . J Biol Chem, vol. 284, no. 2, p. 1106-15.
- LEY, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky et S. Nourshargh. 2007. “Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated” . Nat Rev Immunol, vol. 7, no. 9, p. 678-89.
- LI, Y., X. Qu, J. Qu, Y. Zhang, J. Liu, Y. Teng, X. Hu, K. Hou et Y. Liu. 2009. “Arsenic trioxide induces apoptosis and G2/M phase arrest by inducing Cbl to inhibit PI3K/Akt signaling and thereby regulate p53 activation” . Cancer Lett, vol.
- LI, Y. M.,J. D. Broome. 1999. “Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells” . Cancer Res, vol. 59, no. 4, p. 776-80.
- LIU, Q., S. Hilsenbeck et Y. Gazitt. 2003. “Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent G1 or G2/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL” . Blood, vol. 101, no. 10, p. 4078-87.
- LIU, Z., J. M. Carbrey, P. Agre et B. P. Rosen. 2004. “Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins” . Biochem Biophys Res Commun, vol. 316, no. 4, p. 1178-85.
- LU, P. D., H. P. Harding et D. Ron. 2004. “Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response” . J Cell Biol, vol. 167, no. 1, p. 27-33.
- LUCAS, M., L. M. Stuart, J. Savill et A. Lacy-Hulbert. 2003. “Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion” . J Immunol, vol. 171, no. 5, p. 2610-5.
- LUCIANI, D. S., K. S. Gwiazda, T. L. Yang, T. B. Kalynyak, Y. Bychkivska, M. H.

- Frey, K. D. Jeffrey, A. V. Sampaio, T. M. Underhill et J. D. Johnson. 2009. "Roles of IP3R and RyR Ca²⁺ channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death" . Diabetes, vol. 58, no. 2, p. 422-32.
- LUNDQVIST-GUSTAFSSON, H., S. Norrman, J. Nilsson et A. Wilsson. 2001. "Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in Staphylococcus aureus-induced neutrophil apoptosis" . J Leukoc Biol, vol. 70, no. 4, p. 642-8.
- MACFARLANE, M. 2003. "TRAIL-induced signalling and apoptosis" . Toxicol Lett, vol. 139, no. 2-3, p. 89-97.
- MAIANSKI, N. A., J. Geissler, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, D. Roos et T. W. Kuijpers. 2004. "Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis" . Cell Death Differ, vol. 11, no. 2, p. 143-53.
- MARTINON, F., J. Tschopp. 2007. "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation" . Cell Death Differ, vol. 14, no. 1, p. 10-22.
- MCCULLOUGH, K. D., J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw et N. J. Holbrook. 2001. "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state" . Mol Cell Biol, vol. 21, no. 4, p. 1249-59.
- MCKEON, D. J., A. M. Condliffe, A. S. Cowburn, K. C. Cadwallader, N. Farahi, D. Bilton et E. R. Chilvers. 2008. "Prolonged survival of neutrophils from patients with Delta F508 CFTR mutations" . Thorax, vol. 63, no. 7, p. 660-1.
- MEDEMA, J. P., C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer et M. E. Peter. 1997. "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)" . EMBO J, vol. 16, no. 10, p. 2794-804.
- MILLER, W. H. Jr, H. M. Schipper, J. S. Lee, J. Singer et S. Waxman. 2002. "Mechanisms of action of arsenic trioxide" . Cancer Res, vol. 62, no. 14, p. 3893-903.
- MOISAN, E., D. Girard. 2006. "Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis" . J Leukoc Biol, vol. 79, no. 3, p. 489-98.
- MONTECUCCO, F., S. Steffens, F. Burger, A. Da Costa, G. Bianchi, M. Bertolotto, F. Mach, F. Dallegri et L. Ottonello. 2008. "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways" . Cell Signal, vol. 20, no. 3, p. 557-68.
- MORALES, A. A., D. Gutman, K. P. Lee et L. H. Boise. 2008. "BH3-only proteins Noxa, Bmf, and Bim are necessary for arsenic trioxide-induced cell death in myeloma" . Blood, vol. 111, no. 10, p. 5152-62.

- MORISHIMA, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata et Y. Yasuhiko. 2002. "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12" . J Biol Chem, vol. 277, no. 37, p. 34287-94.
- MUNSHI, N. C., G. Tricot, R. Desikan, A. Badros, M. Zangari, A. Toor, C. Morris, E. Anaissie et B. Barlogie. 2002. "Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma" . Leukemia, vol. 16, no. 9, p. 1835-7.
- NAKAGAWA, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner et J. Yuan. 2000. "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta" . Nature, vol. 403, no. 6765, p. 98-103.
- NAKANO, K., K. H. Vousden. 2001. "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53" . Mol Cell, vol. 7, no. 3, p. 683-94.
- NATHAN, C. 2002. "Points of control in inflammation" . Nature, vol. 420, no. 6917, p. 846-52.
- NAUSEEF, W. M. 2007. "How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view" . Immunol Rev, vol. 219, no. 88-102.
- NIETO-MIGUEL, T., R. I. Fonteriz, L. Vay, C. Gajate, S. Lopez-Hernandez et F. Mollinedo. 2007. "Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells" . Cancer Res, vol. 67, no. 21, p. 10368-78.
- NIMMANAPALLI, R., P. Bali, E. O'Bryan, L. Fuino, F. Guo, J. Wu, P. Houghton et K. Bhalla. 2003. "Arsenic trioxide inhibits translation of mRNA of bcr-abl, resulting in attenuation of Bcr-Abl levels and apoptosis of human leukemia cells" . Cancer Res, vol. 63, no. 22, p. 7950-8.
- NOVOA, I., H. Zeng, H. P. Harding et D. Ron. 2001. "Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha" . J Cell Biol, vol. 153, no. 5, p. 1011-22.
- NUTT, L. K., A. Pataer, J. Pahler, B. Fang, J. Roth, D. J. McConkey et S. G. Swisher. 2002. "Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores" . J Biol Chem, vol. 277, no. 11, p. 9219-25.
- OBENG, E. A., L. H. Boise. 2005. "Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis" . J Biol Chem, vol. 280, no. 33, p. 29578-87.
- ODA, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi et N. Tanaka. 2000. "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis" . Science, vol. 288, no. 5468, p. 1053-8.

- ODA, T., Y. Kosuge, M. Arakawa, K. Ishige et Y. Ito. 2008. "Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells" . Neurosci Res, vol. 60, no. 1, p. 29-39.
- OHOKA, N., S. Yoshii, T. Hattori, K. Onozaki et H. Hayashi. 2005. "TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death" . EMBO J, vol. 24, no. 6, p. 1243-55.
- ORANGE, R. P., M. D. Valentine et K. F. Austen. 1967. "Release of slow-reacting substance of anaphylaxis in the rat: polymorphonuclear leukocyte" . Science, vol. 157, no. 786, p. 318-9.
- OTTONELLO, L., G. Frumento, N. Arduino, M. Bertolotto, M. Mancini, E. Sottofattori, F. Dallegri et M. Cutolo. 2002. "Delayed neutrophil apoptosis induced by synovial fluid in rheumatoid arthritis: role of cytokines, estrogens, and adenosine" . Ann N Y Acad Sci, vol. 966, no. 226-31.
- OZCAN, U., Q. Cao, E. Yilmaz, A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L. H. Glimcher et G. S. Hotamisligil. 2004. "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes" . Science, vol. 306, no. 5695, p. 457-61.
- PAPA, F. R., C. Zhang, K. Shokat et P. Walter. 2003. "Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug" . Science, vol. 302, no. 5650, p. 1533-7.
- PAPAYIANNI, A., C. N. Serhan, M. L. Phillips, H. G. Rennke et H. R. Brady. 1995. "Transcellular biosynthesis of lipoxin A4 during adhesion of platelets and neutrophils in experimental immune complex glomerulonephritis" . Kidney Int, vol. 47 , no. 5, p. 1295-302.
- PAPENFUSS, K., S. M. Cordier et H. Walczak. 2008. "Death receptors as targets for anti-cancer therapy" . J Cell Mol Med, vol. 12, no. 6B, p. 2566-85.
- 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 kinase-1/2". FEBS Lett., vol.532., no.1-2, p.164-70.
- 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 Biol Int, vol. 24, no. 3, p. 163-74.
- PERRETTI, M., F. D'Acquisto. 2009. "Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation" . Nat Rev Immunol, vol. 9, no. 1, p. 62-70 .
- PETRELLA, A., M. Festa, S. F. Ercolino, M. Zerilli, G. Stassi, E. Solito et L. Parente.

2005. "Induction of annexin-1 during TRAIL-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells" . Cell Death Differ, vol. 12, no. 10, p. 1358-60.
- PIAZZA, F., C. Gurrieri et P. P. Pandolfi. 2001. "The theory of APL" . Oncogene, vol. 20, no. 49, p. 7216-22.
- POZZAN, T., R. Rizzuto, P. Volpe et J. Meldolesi. 1994. "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores" . Physiol Rev, vol. 74, no. 3, p. 595-636.
- PUTHALAKATH, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King et A. Strasser. 1999. "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex" . Mol Cell, vol. 3, no. 3, p. 287-96.
- PUTHALAKATH, H., L. A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P. N. Kelly, N. D. Huntington, P. D. Hughes, E. M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet et A. Strasser. 2007. "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim" . Cell, vol. 129, no. 7, p. 1337-49.
- QUIGNON, F., F. De Bels, M. Koken, J. Feunteun, J. C. Ameisen et H. de The. 1998. "PML induces a novel caspase-independent death process" . Nat Genet, vol. 20, no. 3, p. 259-65.
- RAMAN, M., W. Chen et M. H. Cobb. 2007. "Differential regulation and properties of MAPKs" . Oncogene, vol. 26, no. 22, p. 3100-12.
- RAMOS, A. M., C. Fernandez, D. Amran, D. Esteban, E. de Blas, M. A. Palacios et P. Aller. 2006. "Pharmacologic inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERKs) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) decrease glutathione content and sensitize human promonocytic leukemia cells to arsenic trioxide-induced apoptosis" . J Cell Physiol, vol. 209, no. 3, p. 1006-15.
- RENATUS, M., H. R. Stennicke, F. L. Scott, R. C. Liddington et G. S. Salvesen. 2001. "Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9" . Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 98, no. 25, p. 14250-5.
- 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" . Eur J Biochem, vol. 267, no. 11, p. 3220-5.
- RIEDL, S. J., G. S. Salvesen. 2007. "The apoptosome: signalling platform of cell death" . Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 8, no. 5, p. 405-13.
- RIEDL, S. J., Y. Shi. 2004. "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis" . Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 5, no. 11, p. 897-907.
- RIVKIN, I., J. Rosenblatt et E. L. Becker. 1975. "The role of cyclic AMP in the chemotactic responsiveness and spontaneous motility of rabbit peritoneal neutrophils. The

- inhibition of neutrophil movement and the elevation of cyclic AMP levels by catecholamines, prostaglandins, theophylline and cholera toxin” . J Immunol, vol. 115, no. 4, p. 1126-34.
- RON, D.,P. Walter. 2007. “Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response” . Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 8, no. 7, p. 519-29.
- RON, D. et HARDING, H.P. 2007 dans : Translational Control in Biology and Medicine. États-Unis : Cold Spring Harbor, 934p.
- ROSEN, B. P. 2002. “Biochemistry of arsenic detoxification” . FEBS Lett, vol. 529 , no. 1, p. 86-92.
- 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 Res, vol. 59, no. 5, p. 1041-8.
- SAKAMOTO, T., W. T. Repasky, K. Uchida, A. Hirata et F. Hirata. 1996. “Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H₂O₂-treated rat thymocytes by lipocortin I” . Biochem Biophys Res Commun, vol. 220, no. 3, p. 643-7.
- SANGHAVI, D. M., M. Thelen, N. A. Thornberry, L. Casciola-Rosen et A. Rosen. 1998. “Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils” . FEBS Lett, vol. 422, no. 2, p. 179-84.
- SANTOS-BENEIT, A. M.,F. Mollinedo. 2000. “Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells” . J Leukoc Biol, vol. 67, no. 5, p. 712-24.
- SCANNELL, M., M. B. Flanagan, A. deStefani, K. J. Wynne, G. Cagney, C. Godson et P. Maderna. 2007. “Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages” . J Immunol, vol. 178, no. 7, p. 4595-605.
- SCHEEL-TOELLNER, D., K. Wang, R. Craddock, P. R. Webb, H. M. McGettrick, L. K. Assi, N. Parkes, L. E. Clough, E. Gulbins, M. Salmon et J. M. Lord. 2004. “Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling ” . Blood, vol. 104, no. 8, p. 2557-64.
- SCHRODER, M. 2008. “Endoplasmic reticulum stress responses” . Cell Mol Life Sci, vol. 65, no. 6, p. 862-94.
- SCHULER, M.,D. R. Green. 2001. “Mechanisms of p53-dependent apoptosis” . Biochem Soc Trans, vol. 29, no. Pt 6, p. 684-8.
- SEGAL, A. W. 2005. “How neutrophils kill microbes” . Annu Rev Immunol, vol. 23, no. 197-223.

SERHAN, C.N. et P.A. Ward : éditeur. 1999. Molecular and Cellular Basis of Inflammation. États-Unis : Humana Press, 338p

SERHAN, C. N., J. Savill. 2005. "Resolution of inflammation: the beginning programs the end" . Nat Immunol, vol. 6, no. 12, p. 1191-7.

SHAMU, C. E., P. Walter. 1996. "Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus" . EMBO J, vol. 15, no. 12, p. 3028-39.

SHEN, Z. X., G. Q. Chen, J. H. Ni, X. S. Li, S. M. Xiong, Q. Y. Qiu, J. Zhu, W. Tang, G. L. Sun, K. Q. Yang, Y. Chen, L. Zhou, Z. W. Fang, Y. T. Wang, J. Ma, P. Zhang, T. D. Zhang, S. J. Chen, Z. Chen et Z. Y. Wang. 1997. "Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients" . Blood, vol. 89, no. 9, p. 3354-60.

SHIMIZU, S., M. Narita et Y. Tsujimoto. 1999 . "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC" . Nature, vol. 399, no. 6735, p. 483-7.

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" . N Engl J Med, vol. 339, no. 19, p. 1341-8.

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" . Br J Pharmacol, vol. 133, no. 2, 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 J, vol. 17, no. 11, p. 1544-6.

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" . J Immunol, vol. 165 , no. 3, p. 1573-81.

SONG, B., D. Scheuner, D. Ron, S. Pennathur et R. J. Kaufman. 2008. "Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes" . J Clin Invest, vol. 118, no. 10, p. 3378-89.

SONG, K., Y. Chen, R. Goke, A. Wilmen, C. Seidel, A. Goke, B. Hilliard et Y. Chen. 2000. "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression" . J Exp Med, vol. 191, no. 7, p.

1095-104.

STEPHENS, L., L. Milne et P. Hawkins. 2008. "Moving towards a better understanding of chemotaxis" . Curr Biol, vol. 18, no. 11, p. R485-94.

STOKOE, D., K. Engel, D. G. Campbell, P. Cohen et M. Gaestel. 1992. "Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins" . FEBS Lett, vol. 313, no. 3, p. 307-13.

TERRADILLOS, O., S. Montessuit, D. C. Huang et J. C. Martinou. 2002. "Direct addition of BimL to mitochondria does not lead to cytochrome c release" . FEBS Lett, vol. 522, no. 1-3, p. 29-34.

THEILGAARD-MONCH, K., L. C. Jacobsen, R. Borup, T. Rasmussen, M. D. Bjerregaard, F. C. Nielsen, J. B. Cowland et N. Borregaard. 2005. "The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation" . Blood, vol. 105, no. 4, p. 1785-96.

TILLEMANN, K., K. Van Steendam, T. Cantaert, F. De Keyser, D. Elewaut et D. Deforce. 2008. "Synovial detection and autoantibody reactivity of processed citrullinated isoforms of vimentin in inflammatory arthritides" . Rheumatology (Oxford), vol. 47, no. 5, p. 597-604.

TINTINGER, G., H. C. Steel et R. Anderson. 2005. "Taming the neutrophil: calcium clearance and influx mechanisms as novel targets for pharmacological control" . Clin Exp Immunol, vol. 141, no. 2, p. 191-200.

TSUJIMOTO, Y. 2003. "Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria" . J Cell Physiol, vol. 195, no. 2, p. 158-67.

UPTON, J. P., K. Austgen, M. Nishino, K. M. Coakley, A. Hagen, D. Han, F. R. Papa et S. A. Oakes. 2008. "Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress" . Mol Cell Biol, vol. 28, no. 12, p. 3943-51.

URANO, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding et D. Ron. 2000. "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1" . Science, vol. 287, no. 5453, p. 664-6.

USLU, R., U. A. Sanli, C. Sezgin, B. Karabulut, E. Terzioglu, S. B. Omay et E. Goker. 2000. "Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines" . Clin Cancer Res, vol. 6, no. 12, p. 4957-64.

VAN DE CRAEN, M., P. Vandenabeele, W. Declercq, I. Van den Brande, G. Van Loo, F. Molemans, P. Schotte, W. Van Crielinge, R. Beyaert et W. Fiers. 1997. "Characterization of seven murine caspase family members" . FEBS Lett, vol. 403, no. 1, p. 61-9.

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” . J Leukoc Biol, vol. 69, no. 3, p. 467-73.
- VON VIETINGHOFF, S.,K. Ley. 2008. “Homeostatic regulation of blood neutrophil counts” . J Immunol, vol. 181, no. 8, p. 5183-8.
- WANG, H. G., N. Pathan, I. M. Ethell, S. Krajewski, Y. Yamaguchi, F. Shibasaki, F. McKeon, T. Bobo, T. F. Franke et J. C. Reed. 1999. “Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD” . Science, vol. 284, no. 5412, p. 339-43.
- WANG, K. K. 2000. “Calpain and caspase: can you tell the difference?” . Trends Neurosci, vol. 23, no. 1, p. 20-6.
- WANG, X. Z.,D. Ron. 1996. “Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase” . Science, vol. 272, no. 5266, p. 1347-9.
- WANG, Y., L. Serfass, M. O. Roy, J. Wong, A. M. Bonneau et E. Georges. 2004. “Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells” . Biochem Biophys Res Commun, vol. 314, no. 2, p. 565-70.
- WANG, Z. Y.,Z. Chen. 2008. “Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable” . Blood, vol. 111, no. 5, p. 2505-15.
- WEISSMANN, G. 2004. “Pathogenesis of rheumatoid arthritis” . J Clin Rheumatol, vol. 10, no. 3 Suppl, p. S26-31.
- WEN, J., H. Y. Cheng, Y. Feng, L. Rice, S. Liu, A. Mo, J. Huang, Y. Zu, D. J. Ballon et C. C. Chang. 2008. “P38 MAPK inhibition enhancing ATO-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells” . Br J Haematol, vol. 140, no. 2, p. 169-80.
- WHYTE, M. K., L. C. Meagher, J. MacDermot et C. Haslett. 1993. “Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis” . J Immunol, vol. 150 , no. 11, p. 5124-34.
- WITKO-SARSAT, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. “Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects” . Lab Invest, vol. 80, no. 5, p. 617-53.
- WOO, S. H., I. C. Park, M. J. Park, S. An, H. C. Lee, H. O. Jin, S. A. Park, H. Cho, S. J. Lee, H. S. Gwak, Y. J. Hong, S. I. Hong et C. H. Rhee. 2004. “Arsenic trioxide sensitizes CD95/Fas-induced apoptosis through ROS-mediated upregulation of CD95/Fas by NF-kappaB activation” . Int J Cancer, vol. 112, no. 4, p. 596-606.
- WU, Y. L., X. R. Jiang, D. M. Lillington, A. C. Newland et S. M. Kelsey. 2000. “Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance” . Br J

Haematol, vol. 111, no. 3, p. 807-16.

XUE, X., J. H. Piao, A. Nakajima, S. Sakon-Komazawa, Y. Kojima, K. Mori, H. Yagita, K. Okumura, H. Harding et H. Nakano. 2005. "Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha" . J Biol Chem, vol. 280, no. 40, p. 33917-25.

YAMAGUCHI, H., H. G. Wang. 2004. "CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells" . J Biol Chem, vol. 279, no. 44, p. 45495-502.

YAMAMOTO, A., S. Taniuchi, S. Tsuji, M. Hasui et Y. Kobayashi. 2002. "Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*" . Clin Exp Immunol, vol. 129, no. 3, p. 479-84.

YANG, D., Q. Chen, O. Chertov et J. J. Oppenheim. 2000. "Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells" . J Leukoc Biol, vol. 68, no. 1, p. 9-14.

YANG, X., J. Wang, C. Liu, W. E. Grizzle, S. Yu, S. Zhang, S. Barnes, W. J. Koopman, J. D. Mountz, R. P. Kimberly et H. G. Zhang. 2005. "Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts" . Am J Pathol, vol. 167, no. 3, p. 705-19.

YE, J., R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Dave, R. Prywes, M. S. Brown et J. L. Goldstein. 2000. "ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs" . Mol Cell, vol. 6, no. 6, p. 1355-64.

YEDJOU, C. G., P. B. Tchounwou. 2009. "Modulation of p53, c-fos, RARE, cyclin A, and cyclin D1 expression in human leukemia (HL-60) cells exposed to arsenic trioxide" . Mol Cell Biochem, vol.

YONEDA, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama et M. Tohyama. 2001. "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress" . J Biol Chem, vol. 276, no. 17, p. 13935-40.

YOSHIDA, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura et K. Mori. 1998. "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors" . J Biol Chem, vol. 273, no. 50, p. 33741-9.

YOSHIDA, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada et K. Mori. 2001. "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor" . Cell, vol. 107, no. 7, p. 881-91.

YOSHIDA, H., M. Oku, M. Suzuki et K. Mori. 2006. "pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response" . J Cell Biol, vol. 172, no. 4, p. 565-75.

YU, X., D. Acehan, J. F. Menetret, C. R. Booth, S. J. Ludtke, S. J. Riedl, Y. Shi, X. Wang et C. W. Akey. 2005. "A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform" . Structure, vol. 13, no. 11, p. 1725-35.

ZHANG, H., G. Duncan, L. Wang, P. Liu, H. Cui, J. R. Reddan, B. F. Yang et I. M. Wormstone. 2007. "Arsenic trioxide initiates ER stress responses, perturbs calcium signalling and promotes apoptosis in human lens epithelial cells" . Exp Eye Res, vol. 85, no. 6, p. 825-35.

ZHANG, K., X. Shen, J. Wu, K. Sakaki, T. Saunders, D. T. Rutkowski, S. H. Back et R. J. Kaufman. 2006. "Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response" . Cell, vol. 124, no. 3, p. 587-99.

ZHU, X. H., Y. L. Shen, Y. K. Jing, X. Cai, P. M. Jia, Y. Huang, W. Tang, G. Y. Shi, Y. P. Sun, J. Dai, Z. Y. Wang, S. J. Chen, T. D. Zhang, S. Waxman, Z. Chen et G. Q. Chen. 1999. "Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations" . J Natl Cancer Inst, vol. 91, no. 9, p. 772-8.

ZU, Y. L., J. Qi, A. Gilchrist, G. A. Fernandez, D. Vazquez-Abad, D. L. Kreutzer, C. K. Huang et R. I. Sha'afi. 1998. "p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation" . J Immunol, vol. 160, no. 4, p. 1982-9.