

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

APOPTOSE DES NEUTROPHILES HUMAINS INDUITE PAR DEUX  
AGENTS ANTI-CANCÉREUX, LE TRIOXYDE D'ARSENIC ET LA  
*VISCUM ALBUM* AGGLUTININE-1

Par  
Hélène Cavalli

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

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

M. Jacques Bernier, PhD  
INRS- Institut Armand-Frappier

Examineur externe

M. Martin Olivier, PhD  
Département de microbiologie et  
Immunologie  
Faculté de médecine  
Université McGill

Directeur de recherche

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



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Denis Girard, mon directeur de recherche qui a vraiment été formidable du début à la fin de mon séjour à l'INRS-IAF, tantôt rassurant et réconfortant lors des moments d'incertitude et de remise en question, souvent taquin ou rieur et toujours généreux de son temps.

Je remercie aussi chaleureusement tous mes collègues de laboratoire, ceux et celles qui, par leur agréable présence, m'ont d'abord convaincue de choisir le labo DG plutôt que d'aller à Québec et qui ont par la suite ensoleillé chacune de mes journées par leurs sourires, leurs confidences et leurs éclats de rires.

J'aimerais également adresser un merci particulier à Valérie Lavastre qui m'a prise sous son aile dès mon arrivée au laboratoire et qui a été une excellente formatrice, admirablement patiente, toujours disponible et extrêmement généreuse.

Je remercie également tous mes autres collègues des laboratoires voisins que je croisais avec plaisir dans les couloirs ou que je venais déranger pendant leur travail.

Finalement, je remercie toute ma famille, mes amis et le vent qui contribuent tous à me rendre heureuse et donc apte au travail.



## TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations .....	vii
Liste des figures et tableaux.....	ix
Sommaire .....	xi
Introduction .....	xiii
<b>SECTION 1 Synthèse.....</b>	<b>1</b>
<b>1. LE NEUTROPHILE : GÉNÉRALITÉS ET APOPTOSE .....</b>	<b>3</b>
1.1 Généralités sur le neutrophile.....	3
1.1.1 Situation au sein du système immunitaire .....	3
1.1.2 Le neutrophile dans l'inflammation.....	4
1.1.3 La phagocytose .....	5
1.2 Le neutrophile en apoptose.....	8
1.2.1 Généralités sur l'apoptose.....	8
1.2.2 Particularités de l'apoptose du neutrophile.....	9
1.2.3 Voies d'induction d'apoptose .....	10
1.2.4 Implication du cytosquelette dans l'apoptose .....	11
<b>2. LES ROS DANS L'APOPTOSE ET LE CANCER .....</b>	<b>14</b>
2.1 Formation de ROS par le métabolisme cellulaire.....	14
2.2 Rôles et dommages causés par les ROS .....	16
2.3 Rôle des ROS dans l'apoptose .....	17
2.4 Rôle des ROS dans le vieillissement .....	19
2.5 Impacts des ROS sur l'apparition et le traitement du cancer.....	20
<b>3. AGENTS ANTI-CANCÉREUX: MODES D'ACTION DE CES INDUCTEURS D'APOPTOSE .....</b>	<b>23</b>
3.1 Généralités.....	23
3.2 Le trioxyde d'arsenic.....	23
3.2.1 Origine et utilisation thérapeutique.....	23
3.2.2 Induction d'apoptose .....	24
3.2.3 Mécanisme d'action impliquant les ROS .....	24
3.2.4 Mécanisme d'action impliquant le cytosquelette.....	25
3.2.5 Autres mécanismes d'action .....	26
3.3 La <i>Viscum album</i> agglutinine-I .....	28
3.3.1 Origine et utilisation thérapeutique.....	28
3.3.2 Structure et mécanisme d'action.....	28
3.3.3 Induction d'apoptose .....	30
<b>SECTION 2 Articles .....</b>	<b>31</b>
<b>1. ARTICLE 1.....</b>	<b>33</b>
1.1 Résumé de l'article 1 en Français.....	35
1.2 Texte original de l'article 1 .....	36
<b>2. ARTICLE 2.....</b>	<b>77</b>
2.2 Résumé de l'article 2 en Français.....	79
2.3 Article 2 tel qu'il sera publié sous peu .....	79
<b>3. ARTICLE 3.....</b>	<b>92</b>
3.1 Résumé de l'article 3 en Français.....	94
3.2 Article 3 tel que publié .....	94

<b>Discussion-Conclusion.....</b>	<b>104</b>
<b>Références .....</b>	<b>111</b>
<b>ANNEXE Résultats non publiés .....</b>	<b>121</b>
Figure 1 .....	122
Figure 2 .....	123
Figure 3A.....	124
Figure 3B .....	124

## Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AIF	facteur induisant l'apoptose ou «apoptosis-inducing factor»
Apaf-1	«apoptotic protease activating factor-1»
APL	«acute promyelocytic leukemia»
ARN	acide ribonucléique
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	trioxyde d'arsenic
As <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	arsenic rouge
As <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	arsenic jaune
AT	«arsenic trioxide»
ATP	adenosine triphosphate
BHA	«butylated hydroxyanisole»
CD	amas de différenciation ou «cluster of differentiation»
CHX	cycloheximide
CuZnSOD	superoxyde dismutase cytosolique couplée au cuivre et au zinc
$\Delta\psi_m$	potentiel de membrane externe mitochondriale
DD	domaine de mort ou «death domain»
FADD	«fas-associating death domain protein»
GDP	guanine diphosphate
GM-CSF	«granulocyte-macrophage colony-stimulating factor»
GPX-1	glutathione peroxidase
GTP	guanine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HOCl	acide hypochloreux
IFN- $\gamma$	Interféron-gamma
IL	interleukine
JNK	«c-Jun N-terminal kinase»
kDa	kilo Dalton
LPS	lipopolysaccharide
MDP	muramyl dipeptide
MFAPs	«microfilaments associated proteins»
MnSOD	superoxyde dismutase intramitochondriale couplée au manganèse
mPTPS	«mitochondrial permeability transition pores»
MTAPs	«microtubules associated proteins»
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase
NF- $\kappa$ B	«nuclear factor kappa-B»
NO	oxyde nitrique
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anion superoxyde
OH <sup>•</sup>	radical hydroxyle
pb	paires de bases
RIP	«ribosome-inactivating protein»
ROS	intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène ou «reactive oxygen species»
SOD-1	superoxyde dismutase cytosolique couplée au cuivre et au zinc
SOD-2	superoxyde dismutase intramitochondriale couplée au manganèse
TNF- $\alpha$	facteur alpha nécrosant des tumeurs ou «tumor necrosis factor alpha»

TNFR      récepteur de facteur nécrosant des tumeurs  
TRADD    «TNFR-associated death domain protein»  
VAA-1    *Viscum album* agglutinine-1



## Liste des figures et tableaux

Figure 1 Leucocytes du système immunitaire .....	4
Figure 2 Exemples d'induction d'apoptose par la voie extrinsèque .....	10
Figure 3 Exemples d'induction d'apoptose par la voie intrinsèque.....	11
Figure 4 Formation de réactifs oxygénés par la mitochondrie .....	15
Figure 5 Principaux mécanismes d'induction d'apoptose par l'As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	27

Tableau 1 Création d'un état intermédiaire entre l'apoptose et la nécrose selon les niveaux de ROS .....	18
Tableau 2 Principaux événements expliquant l'implication du stress oxydatif dans le cancer .....	21
Tableau 3 Utilisation thérapeutique de l'arsenic et de ses dérivés au cours des siècles ...	23



## Sommaire

Le trioxyde d'arsenic ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) est un nouvel agent anti-cancéreux utilisé dans le traitement des leucémies promyélocyaires aiguës. L'utilisation clinique de cet agent a permis l'observation de cas de neutropénies parmi les patients traités. Cette étude a donc testé l'effet de l' $\text{As}_2\text{O}_3$  sur les neutrophiles humains et démontre que l' $\text{As}_2\text{O}_3$  induit l'apoptose des neutrophiles humains *in vitro* après 24 heures. Les mécanismes d'induction d'apoptose de cet agent sont complexes et encore nébuleux. Tout d'abord, nous montrons que les anions superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) générés par la NADPH oxydase ne sont pas impliqués dans cette induction d'apoptose, mais que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) issu d'une autre source que ce complexe enzymatique semble l'être, comme le montre l'utilisation de la catalase, une enzyme dégradant le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et dont l'emploi a permis d'inhiber l'effet de l' $\text{As}_2\text{O}_3$ . Nous montrons aussi que la NADPH oxydase, enzyme productrice d' $\text{H}_2\text{O}_2$  présente en grande quantité chez les neutrophiles, n'est pas impliquée dans le mécanisme d'action. Nous avons également découvert que l'agent affecte les trois types de filaments du cytosquelette en induisant la dégradation de nombreuses protéines les constituant. Un second agent anti-cancéreux, utilisé cliniquement en Europe, la *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) est également à l'étude dans ce mémoire. Le mécanisme d'action de cet agent pro-apoptotique connu des neutrophiles est approfondi et nous démontrons que la VAA-I induit également l'apoptose des éosinophiles humains par des mécanismes à la fois semblables et différents de ceux retrouvés chez les neutrophiles.



Étudiante



Directeur de recherche



## Introduction

Une des approches modernes de traitement des cancers cherche à éliminer les cellules cancéreuses en activant leur programme interne de mort cellulaire programmée, ou apoptose, de façon à ce que leur élimination se fasse sans provoquer de réaction des différents systèmes du corps humain, à l'origine des effets secondaires sur la santé. Malheureusement, il arrive que les cellules du système immunitaire soient autant affectées que les cellules cancéreuses par l'induction d'apoptose provoquée par ces agents thérapeutiques. Les fonctions du système immunitaire s'en retrouvent affaiblies et l'immunodéficience qui en découle permet le développement de maladies opportunistes.

Les neutrophiles jouent un rôle de premier plan dans l'immunité innée, par leur capacité de détruire rapidement et de façon non spécifique les corps étrangers introduits dans notre milieu interne, et notre santé dépend grandement de leur présence. Outre les plaquettes et les globules rouges, les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes du sang. Pourtant, peu de recherches se penchent sur les effets néfastes des agents anti-cancéreux sur les neutrophiles.

L'étude ici présentée a permis de tester pour la première fois l'action d'un nouvel agent anti-cancéreux faisant l'objet d'intenses recherches actuellement au sein de la communauté scientifique, le trioxyde d'arsenic ( $As_2O_3$ ), sur les neutrophiles humains *in vitro*. Nous nous sommes également penchés sur les mécanismes d'action de cet agent sur les neutrophiles, à la lumière de ce qui est déjà connu chez d'autres types cellulaires.

Le second volet de cette étude traite des mécanismes d'induction d'apoptose de la *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I), un second agent anti-cancéreux dont on connaît les propriétés pro-apoptotiques chez les neutrophiles humains. Nous testons également l'action de cette molécule sur d'autres granulocytes, les éosinophiles, cellules très impliquées dans l'asthme et les réactions allergiques.

La revue de littérature présentée en première partie brossera d'abord un portrait du neutrophile et de ses rôles au sein du système immunitaire. Par la suite, il sera question d'apoptose et des particularités de celle du neutrophile. Un chapitre sur les produits dérivés de l'O<sub>2</sub>, ou radicaux libres, permettra au lecteur de se familiariser avec ces molécules très réactives jouant un rôle complexe au sein des cellules et dont il est question dans les résultats exposés plus loin. Finalement, les deux agents anti-cancéreux ici à l'étude, l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et la VAA-I seront présentés ainsi que les faits importants s'y rapportant. Les méthodes appliquées pour les expériences, les résultats obtenus ainsi que les déductions en découlant sont présentés en deuxième partie sous forme d'articles scientifiques, et une conclusion permet à la toute fin d'avoir une vue d'ensemble sur les éléments majeurs de cette étude.

## **SECTION 1 Synthèse**





# 1. LE NEUTROPHILE : GÉNÉRALITÉS ET APOPTOSE

## 1.1 Généralités sur le neutrophile

### 1.1.1 Situation au sein du système immunitaire

Dès la naissance, nous sommes exposés à un flux continu de microorganismes qui ont le pouvoir d'empêcher le bon fonctionnement de notre organisme. Sans mécanismes de protection contre ces pathogènes, chacun d'entre nous succomberait rapidement à des maladies causées par l'un ou l'autre de ces agents pathogènes. Les humains, les autres vertébrés ainsi que les invertébrés, se protègent contre ces envahisseurs microbiens par un réseau complexe de mesures défensives dénommé système immunitaire. Celui-ci comporte plusieurs niveaux de défense qui permettent de stopper l'infection à différents stades du processus (Goldsby, Kindt et Osborne, 2001). L'immunité, possède deux composantes, l'une non-spécifique et l'autre spécifique. L'immunité non-spécifique, aussi dite naturelle ou innée, est constituée d'un ensemble de mécanismes destinés à éliminer les corps étrangers et elle n'est donc aucunement exclusive à un micro-organisme particulier. Ce volet dépend largement des barrières phagocytaires et inflammatoires qui permettent d'éliminer rapidement les corps étrangers. Les granulocytes sont les principaux acteurs de ces fonctions, ils regroupent les neutrophiles ou polymorphonucléaires, les éosinophiles et les basophiles (Prescott, Harley et Klein, 1995).

À l'inverse, l'immunité spécifique, aussi dite adaptative ou acquise, comporte un éventail infini de réactions hautement spécifiques à un microorganisme donné et ce sont principalement les cellules mononuclées telles que les lymphocytes B et T qui exercent ces fonctions. L'immunité innée est la première à intervenir puisqu'elle est constituée de cellules et molécules constamment produites par l'organisme et donc disponibles à tout moment. L'immunité acquise quant à elle doit être développée suite à la reconnaissance du corps étranger et n'est prête à agir qu'après cinq ou six jours (Goldsby, Kindt et

Osborne, 2001). L'étude dont il est ici question traite des neutrophiles, des cellules jouant surtout un rôle au sein de l'immunité innée, mais qui modulent également les réponses immunes spécifiques via leur production de cytokines, protéines régulant différenciation, maturation, prolifération et apoptose des cellules effectrices du système immunitaire.

La figure 1 représente les principales cellules blanches du sang ou leucocytes et permet de situer les neutrophiles au sein du système immunitaire.

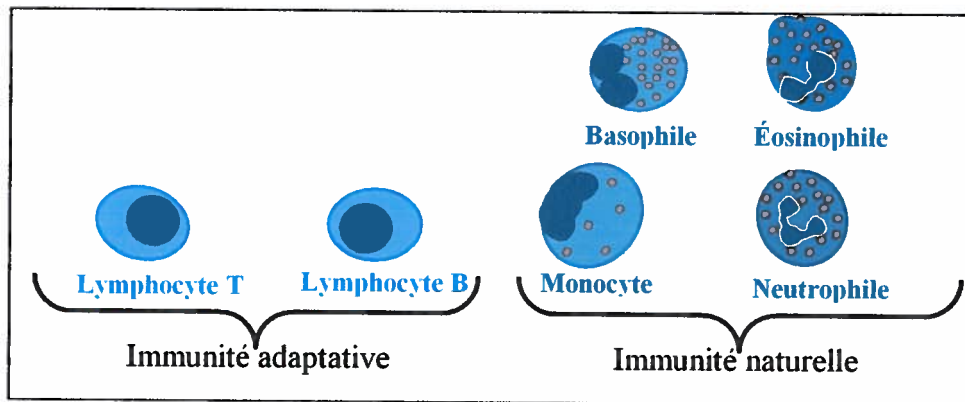


Figure 1 Leucocytes du système immunitaire (inspiré de Goldsby, Kindt et Osborne, 2001)

Les neutrophiles, dont le diamètre est de 10 à 20  $\mu\text{M}$  et le noyau polylobé en forme de fer à cheval, sont les leucocytes les plus abondants du sang humain puisqu'ils représentent environ 70% d'entre eux. Avec les éosinophiles et les basophiles, ils constituent un sous-groupe de leucocytes appelés granulocytes, ainsi désignés car leur cytoplasme comporte un grand nombre de granules visibles au microscope et qui absorbent divers colorants selon leur pH (Roitt et Delves, 1992 et Prescott, Harley et Klein, 1995). Ainsi, les éosinophiles tiennent leur nom d'un colorant acide rouge, l'éosine, qui colorent facilement leurs granules. Les granules des basophiles quant à eux absorbent le bleu de méthylène qui est un colorant basique et les granules des neutrophiles absorbent autant les colorants acides que basiques, d'où leur nom. Les neutrophiles représentent 90% des granulocytes totaux (Goldsby, Kindt et Osborne, 2001).

### 1.1.2 Le neutrophile dans l'inflammation

Les neutrophiles matures étant incapables d'effectuer de division cellulaire, leur abondance découle donc uniquement de leur production quotidiennement par la moelle osseuse, après environ deux semaines de maturation, à un taux moyen de  $10^{11}$  neutrophiles/jour. Ils sont d'abord libérés dans la circulation sanguine et y resteront pendant 7 à 10 heures avant de passer dans les tissus où ils ont une durée de vie de quelques heures seulement ou de quelques jours, selon la présence ou non d'une inflammation dans les tissus où ils se sont infiltrés (Mollinedo, Borregaard et Boxer, 1999). En effet, comme il est détaillé plus loin, la fonction principale des neutrophiles est la phagocytose, un mécanisme de capture de matériel particulaire par les cellules, jouant un rôle crucial dans la réponse inflammatoire (Prescott, Harley et Klein, 1995).

L'inflammation est une réponse physiologique à une série de stimuli tels que les infections et les lésions tissulaires visant entre autre à stimuler et à maintenir une importante activité de phagocytose. Ainsi, divers médiateurs de l'inflammation sécrétés par les macrophages et les cellules endothéliales tels que le facteur alpha nécrosant des tumeurs ou TNF- $\alpha$  de "tumor necrosis factor alpha", l'interleukine-1 ou IL-1, l'IL-6 et d'autres permettent le recrutement rapide (en moins de 6 heures) d'une quantité accrue de neutrophiles et ces derniers sont maintenus en vie afin qu'ils participent à l'élimination du pathogène ou à la réparation des tissus (Goldsby, Kindt et Osborne, 2001). Ainsi, les neutrophiles sont les premières cellules à arriver sur le site d'inflammation et leur production par la moelle osseuse peut augmenter jusqu'à dix fois pour satisfaire à la demande (Mollinedo, Borregaard et Boxer, 1999).

### 1.1.3 La phagocytose

Lors d'une inflammation provoquée par exemple par un microorganisme, ce sont principalement les neutrophiles, aidés des macrophages, qui phagocytent les pathogènes. La phagocytose sert non seulement à ingérer et à digérer des microorganismes entiers, tels que des bactéries ou levures opsonisées, mais elle permet également de supprimer des particules insolubles, des cellules hôtes lésées ou mortes ainsi que des débris cellulaires (Prescott, Harley et Klein, 1995). Lors de la phagocytose, des enzymes lytiques et des

substances bactéricides provenant des granules des neutrophiles sont utilisées pour digérer le matériel ingéré. Deux voies sont utilisées par la cellule pour générer ces substances, soit l'une dépendante de l'oxygène et l'autre indépendante de l'oxygène (Goldsby, Kindt et Osborne, 2001).

La première voie, dépendante de l'oxygène, appelée flambée oxydative, mène à la production d'intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène aussi nommés réactifs oxygénés ou encore ROS de "Reactive Oxygen Species", des molécules très réactives et aux propriétés microbicides. Cette voie débute principalement par la réduction de l'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^-$ ) par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase oxydase (NADPH oxydase), un complexe enzymatique majoritairement localisé dans la membrane plasmique même si certaines de ses composantes se retrouvent dans le cytosol et sur les membranes des diverses granules (Bokoch et Diebold, 2002). Cette enzyme, inactive chez les neutrophiles au repos, s'active lorsque celui-ci est stimulé, c'est alors que les diverses sous-unités cytoplasmiques et membranaires de la NADPH oxydase s'assemblent dans la membrane des phagosomes, invaginations de la membrane plasmique formant une vacuole intracellulaire qui contient la particule phagocytée (Nauseef, 2004). Le superoxyde ainsi produit peut ensuite être transformé en d'autres formes de ROS particulièrement réactives telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) et l'acide hypochloreux (HOCl). Le terme de flambée oxydative est utilisé pour illustrer que la cellule consomme une quantité accrue d'oxygène pendant cette période d'intense production d'intermédiaires réactifs dérivés de l'oxygène (Prescott, Harley et Klein, 1995). La flambée oxydative est souvent accompagnée de la production d'un gaz dérivé de l'azote possédant également une activité antimicrobienne puissante, l'oxyde nitrique (NO). Celui-ci est synthétisé en grande quantité lorsque le neutrophile est activé soit par des composantes de la paroi cellulaire bactérienne, telles que le lipopolysaccharide (LPS) ou par le muramyl dipeptide (MDP) dans le cas des mycobactéries, de concert avec une cytokine, l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Goldsby, Kindt et Osborne, 2001).

La seconde voie de production de substances microbicides, indépendante de l'oxygène cette fois, porte le nom de dégranulation et mène le neutrophile à la production de lysozyme, de défensines et d'autres enzymes hydrolytiques dont les activités de dégradation ne requièrent pas d'oxygène (Roitt, Brostoff et Male, 1997). Le lysozyme, aussi appelé muramidase, est une enzyme qui digère les mucopeptides des parois cellulaires bactériennes se comportant donc comme un agent antibactérien non spécifique. Les défensines constituent quant à elles un groupe de peptides antimicrobiens et cytotoxiques riches en cystéines et chargés positivement, composés d'une trentaine d'acides aminés et formant des canaux perméables aux ions dans les membranes cellulaires bactériennes, détruisant ainsi toutes sortes de bactéries (Abbas, Lichtman et Pober, 1997). Cette seconde voie mène également à la synthèse d'autres enzymes telles que des collagénases, des élastases, des phospholipases, des protéases, des ribonucléases et des désoxyribonucléases.

Toutes ces substances microbicides forment le contenu des granules primaires et secondaires des neutrophiles. Les granules primaires, aussi nommés azurophiles ou lysosomes, sont gros, très denses et contiennent surtout du lysozyme, de la myeloperoxidase et d'autres hydrolases acides. Les granules secondaires ou spécifiques, nettement plus petits, comportent de la lactoferrine et du lysozyme (Prescott, Harley et Klein, 1995). Lors de la phagocytose, les neutrophiles entrent en dégranulation, c'est-à-dire que leurs granules fusionnent avec les phagosomes, vacuoles incluant les microorganismes ingérés, pour former les phagolysosomes où les multiples enzymes, de concert avec les divers réactifs oxygénés, permettront la destruction des corps étrangers. S'il est libéré dans le milieu, le contenu des neutrophiles peut malheureusement causer des lésions tissulaires menant à la persistance de l'inflammation (Roitt, Brostoff et Male, 1997). Afin d'éviter cela et dans le but de résorber l'inflammation, les neutrophiles attirés sur place sont éliminés par apoptose, un processus complexe et primordial à l'intégrité du système immunitaire, dont la section suivante traite en détail.

## 1.2 Le neutrophile en apoptose

### 1.2.1 Généralités sur l'apoptose

Les cellules peuvent trouver la mort par deux principaux processus. Tout d'abord par la nécrose, un processus de dégradation des composantes cellulaires par les protéases et le lysozyme intracellulaire. La destruction de la membrane plasmique de la cellule au cours de ce processus provoque une libération dans le milieu environnant d'une grande quantité de composantes intracellulaires dont plusieurs enzymes et substances très réactives pouvant causer une lésion tissulaire et une inflammation subséquente (Israels et Israels, 1999). Les cellules peuvent également s'éteindre par apoptose, lors d'une série de changements morphologiques associés à la mort cellulaire programmée (Goldsby, Kindt et Osborne, 2001).

Le terme d'apoptose pour décrire cette disparition silencieuse des cellules endommagées ou à la fin de leur vie provient d'un mot grec utilisé pour désigner la chute des feuilles ou pétales mortes. Ce processus est essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire et il est utilisé très fréquemment, que ça soit pour supprimer les cellules redondantes pendant l'embryogénèse, ou pour assurer la réparation des tissus endommagés, ou bien pour détruire les cellules ayant subi des dommages génétiques ou encore pour éliminer des cellules superflues comme c'est le cas des nombreux neutrophiles attirés au site d'inflammation lorsque celle-ci est résolue (Israels et Israels, 1999). Etant donné que les neutrophiles contiennent une quantité particulièrement importante de molécules toxiques tels que des réactifs oxygénés et des protéases dans leurs granules cytoplasmiques, il importe de contrôler leur apoptose et leur élimination silencieuse par les cellules phagocytaires afin de limiter les dommages tissulaires lors de la résolution de l'inflammation. Ainsi, plusieurs études suggèrent que dès leur départ de la moelle osseuse, les neutrophiles sont programmés pour se diriger spontanément en apoptose, sans qu'aucun signal externe ne soit requis, bien que certaines recherches mentionnent que la phagocytose de bactéries accélérerait significativement leur apoptose (Scheel-Toellner *et al*, 2004, Kobayashi et Deleo, 2004 et Maianski *et al*, 2004).

L'apoptose possède certaines caractéristiques morphologiques et biochimiques typiques, suggérant ainsi un fonctionnement commun à la majorité des cellules. En effet, on retrouve fréquemment une condensation des membranes plasmiques et nucléaires, une agrégation de la chromatine du noyau, une fragmentation de l'ADN, une réorganisation du cytosquelette et un rétrécissement de la cellule suivi d'une formation de corps apoptotiques entourés d'une membrane et prêts à être phagocytés par les cellules avoisinantes (Israels et Israels, 1999).

### 1.2.2 Particularités de l'apoptose du neutrophile

L'apoptose des neutrophiles possède certaines particularités et diffère du patron classique sur quelques points. D'abord, le noyau polylobé des neutrophiles change et devient circulaire puisque sa chromatine se condense, modification morphologique très facilement observable au microscope optique à l'aide d'un frottis sanguin. Ensuite, il y a perturbation de la membrane plasmique avec perte de certains récepteurs membranaires caractéristiques tels que l'amas de différenciation 15 ou CD15 de "cluster of differentiation", le CD16, le CD32, le CD35, le CD88 et le CD120b (Nusbaum *et al*, 2004). Il y a également, comme chez d'autres types cellulaires, une expression membranaire soudaine des phosphatidylsérines, un marqueur moléculaire d'apoptose bien connu. Cette nouvelle externalisation facilite la reconnaissance des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et favorise donc leur élimination rapide, en plus de permettre une identification des neutrophiles apoptotiques puisque la présence de phosphatidylsérines à la surface peut être détectée expérimentalement par sa liaison avec l'annexin-V fluorescente. Ensuite, les neutrophiles rétrécissent mais n'effectuent pas de corps apoptotiques et sont phagocytés tels quels (Scheel-Toellner *et al*, 2004). Les neutrophiles apoptotiques affichent également une perte importante de leurs fonctions de bases et ils deviennent incapables d'effectuer la chimiotaxie, la flambée oxydative et la dégranulation (Akgul, Moulding et Edwards, 2000). Finalement, l'apoptose des neutrophiles diffère de celle de la majorité des cellules puisqu'ils sont dépourvus de plusieurs protéines classiques de l'apoptose telles que bcl-2, la caspase-2, le PARP, et d'autres (Nusbaum *et al*, 2004).

### 1.2.3 Voies d'induction d'apoptose

Chez les neutrophiles comme chez d'autres types cellulaires, il existe deux principales voies d'induction d'apoptose connues, soit la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale (Scheel-Toellner *et al*, 2004). La voie extrinsèque nécessite l'activation de récepteurs de mort membranaires appartenant à la famille des récepteurs de TNF tels que le Fas (aussi appelé CD95) ou le récepteur de TNF (TNFR) lui même. Leur liaison à leur ligand respectif (le Fas ligand et le TNF) permet la formation d'un trimère formé du ligand, de son récepteur et d'une protéine cytoplasmique. Cette protéine cytoplasmique possède une affinité pour un domaine intracellulaire du récepteur, le domaine de mort ou "death domain" (DD). Dans le cas du Fas, la protéine cytoplasmique impliquée se nomme la FADD de "Fas associated death domain protein" et dans le cas du TNFR, elle se nomme la TRADD de "TNFR-associated death domain protein". Ces trimères ainsi formés mènent la cellule à l'apoptose via une cascade d'activation des caspases (Akgul et Edwards, 2003). La figure 2 illustre ces deux exemples de voie d'apoptose extrinsèque.

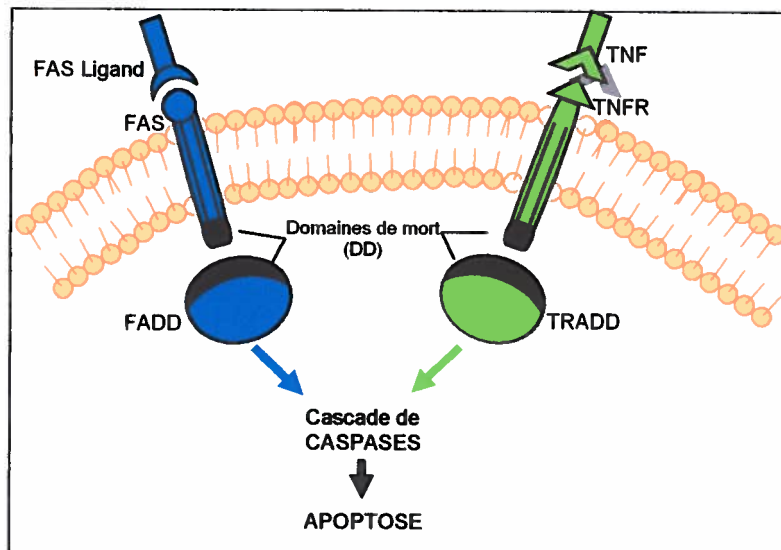
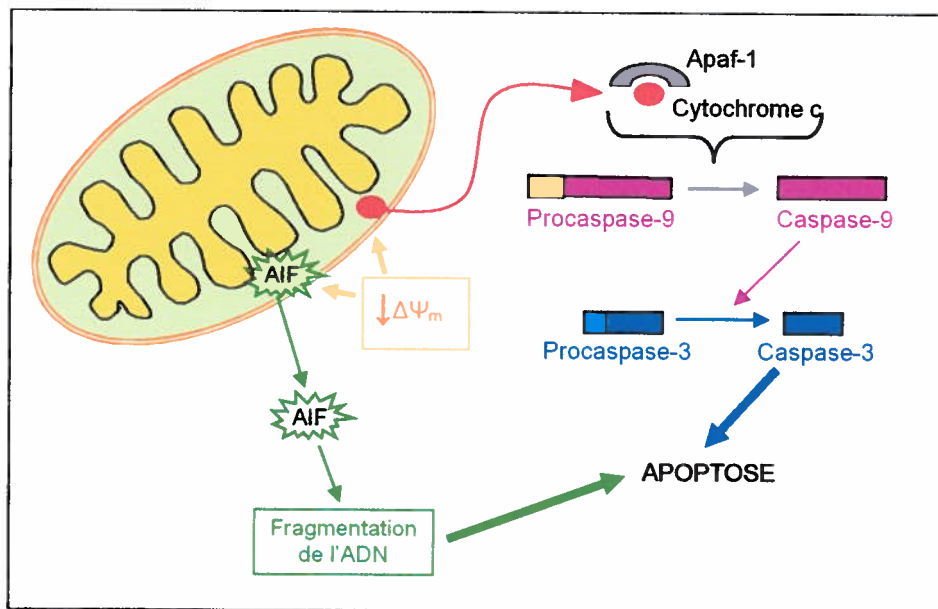


Figure 2 Exemples d'induction d'apoptose par la voie extrinsèque (inspiré de Israels et Israels, 1999)

La voie d'induction d'apoptose intrinsèque requiert quant à elle l'intervention des mitochondries. Cet organelle possède une double membrane plasmique dont l'espace



intermembranaire renferme entre autre la flavoprotéine AIF de “apoptosis-inducing factor” et le cytochrome c (Maiani *et al*, 2004). Lors d’un stimulus apoptotique, on observe une diminution du potentiel de membrane externe mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) qui mène à l’ouverture de ses pores et provoque la sortie du facteur AIF et du cytochrome c dans le cytoplasme. Le facteur AIF se dirige directement au noyau où il provoque une condensation de la chromatine et une fragmentation de l’ADN (acide désoxyribonucléique) causant l’apoptose (Pardo *et al*, 2001). Le cytochrome c, quant à lui, est le seul activateur connu de la protéine cytoplasmique Apaf-1 de “apoptotic protease activating factor-1”. Cette protéine, une fois activée par le cytochrome c, se lie à la pro-caspase-9 cytoplasmique pour l’activer, ce qui déclenche ensuite une cascade d’activation des caspases menant à l’apoptose (Nutt *et al*, 2005). La figure 3 représente cette voie intrinsèque d’induction de l’apoptose.



**Figure 3 Exemples d’induction d’apoptose par la voie intrinsèque (Inspiré de Israels et Israels, 1999)**

#### 1.2.4 Implication du cytosquelette dans l’apoptose

Afin d’accomplir ses différentes fonctions, la cellule doit pouvoir modifier sa forme, par exemple pour effectuer la phagocytose, la division cellulaire ou les changements morphologiques survenant lors de l’apoptose. Cela est rendu possible par un réseau de

filaments formant une structure fibrillaire contenue à l'intérieur du cytoplasme qu'on appelle le cytosquelette. Il contribue grandement à la forme de la cellule et il sert de support interne aux organites cellulaires, permettant ainsi leur déplacement dans la cellule (Bershadsky et Vasiliev, 1988). Ce réseau participe également aux différents mouvements cellulaires tels que retrouvés lors de la mitose, de la méiose, de la contraction musculaire et des battements de cils et de flagelles. Il s'agit donc d'une structure cytoplasmique dynamique ayant la capacité de se réorganiser selon les stimuli reçus, en effectuant rapidement une synthèse de novo de ses différentes protéines clés (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000).

Trois principaux filaments constituent cet important réseau cytoplasmique ; il s'agit des microfilaments, des filaments intermédiaires et des microtubules. Les microfilaments sont formés par des filaments d'actine et ont un diamètre de 5 à 6 nm. La formation de ces filaments se fait par polymérisation de la protéine d'actine, en présence de certains éléments tels que le calcium, le potassium, le magnésium et bien sur de l'énergie sous forme d'ATP. Tous ces éléments sont aussi nécessaires à la dépolymérisation de ces filaments. Certaines protéines permettent de stabiliser ces filaments entre leur phases de polymérisation et dépolymérisation ; on les dénomme collectivement les protéines associées aux microfilaments ou MFAPs de "microfilaments associated proteins" dont on retrouve surtout chez le neutrophile l' $\alpha$ -actinine, la gelsoline, la paxiline et la vinculine. Ces protéines permettent la connexion entre l'actine, le cytoplasme et la membrane, constituant ainsi un complexe tridimensionnel (Kunze et Rustow, 1993).

Les filaments intermédiaires, légèrement plus épais (entre 10 et 11 nm) sont quant à eux constitués soit de vimentine, de desmine ou de kératine, selon le type de cellule, mais on ne retrouve que des filaments intermédiaires de vimentine chez le neutrophile (Edward, 1994). On retrouve également des filaments intermédiaires dans l'enveloppe nucléaire qui sont formés de trois protéines, les lamines A, B et C, mais seule la lamine B a été identifiée chez le neutrophile humain (Yabuki et al, 1999).

Finalement, les microtubules sont les filaments les plus épais du cytosquelette puisqu'ils ont un diamètre de 25 nm. Ils sont formés par l'assemblage d'  $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline en une structure polaire dont une des deux extrémités est positive et où la croissance se fait plus rapidement puisqu'on y retrouve des molécules de GTP (guanine triphosphate) pouvant être hydrolysées en GDP (guanine diphosphate) lors de l'ajout de tubuline (Kunze et Rustow, 1993). La kinésine et la dynéine sont deux protéines associées aux microtubules ou MTAPs de "microtubules associated proteins" qui sont essentielles au transport des molécules sur ces filaments (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000).

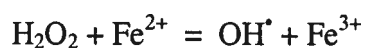
L'intégrité du cytosquelette est essentielle à la structure de la cellule et à sa capacité de remplir ses diverses fonctions, de proliférer et d'effectuer des divisions cellulaires. En effet, lors de la mitose par exemple, le mouvement des microtubules est nécessaire à un bon attachement des chromosomes au fuseau mitotique, à leur alignement correct sur la plaque équatoriale ainsi qu'à leur migration subséquente. Un mauvais fonctionnement des microtubules bloque alors les cellules en métaphase et les mène à l'apoptose (Jordan, 2002). D'autres évidences démontrent également que le cytosquelette est affecté par l'apoptose. Récemment, il a été montré chez le neutrophile que la caspase-3 activée scindait la gelsoline pour générer des fragments protéiques qui perturbent les filaments d'actine, provoquant des changements morphologiques associés à l'apoptose (Habeck, 1999). La vimentine semble également touchée dans le phénomène d'apoptose puisqu'il a été démontré qu'elle était rapidement fragmentée par les caspases lors des phases précoces de l'apoptose dans de nombreux types cellulaires (Buyn et al, 2001). Ces changements importants dans l'intégrité du cytosquelette sont-ils seulement une des nombreuses conséquences de l'apoptose ou bien exercent-ils une fonction nécessaire au bon déroulement du mécanisme ? Pour l'instant, aucune étude n'a mis en évidence un rôle précis du cytosquelette dans l'apoptose, mais il n'est pas exclu qu'il puisse tout de même jouer un rôle de façon indirecte. Des études plus approfondies sur la question sont donc nécessaires pour éclaircir les connaissances à ce sujet.

## 2. LES ROS DANS L' APOPTOSE ET LE CANCER

### 2.1 Formation de ROS par le métabolisme cellulaire

La section portant sur la phagocytose nous a permis de discuter de la production de ROS pendant la flambée oxydative chez les neutrophiles. En effet, la production majeure de ROS chez les neutrophiles passe par la NADPH oxydase suite à diverses stimulations (Nauseef, 2004). Cependant, les ROS sont également générés par le métabolisme cellulaire lors de la production d' adénosine triphosphate (ATP) par les mitochondries pendant la respiration cellulaire (Vejrazka, Micek et Stipek, 2005). La formation d' ATP nécessite en effet la création d' un gradient d' électrons de part et d' autre de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient est généré lors d' un transport d' électrons à travers une chaîne de cinq complexes protéiques (numérotés de I à V) situés dans la membrane interne mitochondriale (voir figure 4).

Certains électrons s' échappent régulièrement des complexes I et III et réagissent avec l' oxygène pour former des  $O_2^-$  dans le cytosol comme dans la matrice mitochondriale (Raha et Robinson, 2000). Dans les deux cas, ces  $O_2^-$  sont transformés en  $H_2O_2$ , soit par la superoxyde dismutase cytosolique couplée au cuivre et au zinc (CuZnSOD ou SOD-1) ou par la superoxyde dismutase intramitochondriale couplée au manganèse (MnSOD ou SOD-2). Dans les deux compartiments, le  $H_2O_2$  peut ensuite être transformé en eau par la glutathione peroxidase (GPX-1) ou par la catalase, deux enzymes qui jouent donc ainsi un rôle d' antioxydants. Sous certaines conditions, notamment en présence d' ions de cuivre ou de fer, il arrive également que le  $H_2O_2$  soit transformé en une forme particulièrement réactive de ROS, le  $OH^*$  selon une réaction chimique dite de Fenton dont voici l' équation (Moldovan et Moldovan, 2004) :



La mitochondrie est l'organe cellulaire où s'accumule le plus de complexes  $Fe^{2+}$ , ce qui signifie qu'une grande quantité des  $O_2^-$  produits y sont effectivement transformés en  $OH^\bullet$ . La figure 4 illustre la formation de ROS par les mitochondries pendant la respiration cellulaire et leurs conséquences sur l'ADN dont traite la section suivante.

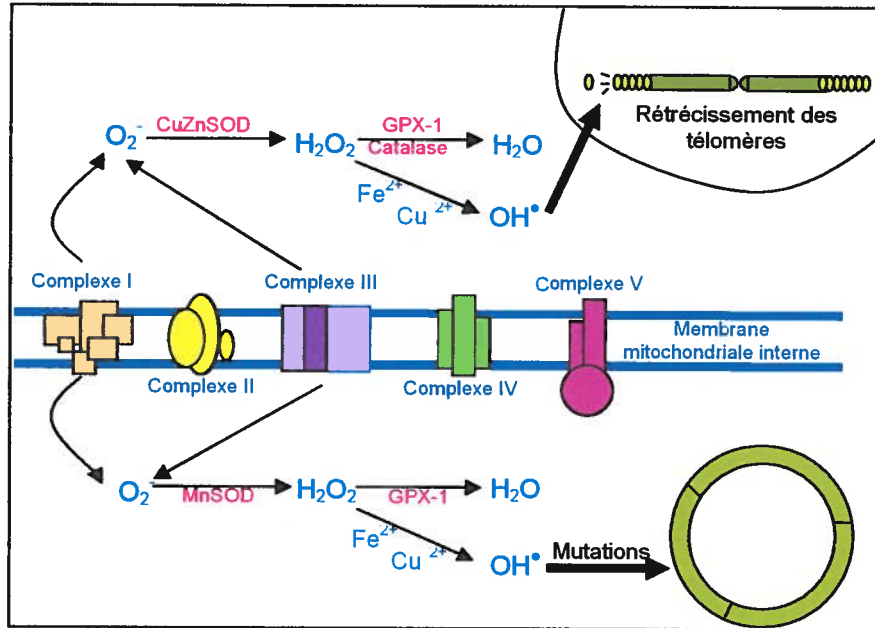


Figure 4 Formation de réactifs oxygénés par la mitochondrie (inspiré de Raha et Robinson, 2004)

En conditions normales la production d'  $O_2^-$  par la mitochondrie est estimée à environ 1% de la quantité totale d'électrons circulant dans la chaîne de transport des électrons (Barzilai et Yamamoto, 2004).

Les transferts d'électrons ne sont pas exclusifs aux mitochondries. Malgré ce que l'on serait porté à croire, chez la majorité des types cellulaires, ce n'est pas par la chaîne de transport des électrons que s'effectuent la majorité des transferts d'électrons, mais bien par l'activité des cytochromes *P450* (Venditti, 1998). Les cytochromes *P-450* sont une famille d'enzymes impliquées dans l'oxydation d'une grande variété de composés exogènes tels que les drogues, les médicaments, divers carcinogènes ou d'autres xénobiotiques, dans le but de modifier leur propriétés afin de réduire leur toxicité (Zangar, Davydov et Verma, 2004). La plupart du temps, ces enzymes catalysent une mono oxygénation, c'est-à-dire le transfert d'un seul atome d'oxygène, et cela a lieu à

proximité du réticulum endoplasmique de la cellule puisque plusieurs protéines de ces complexes enzymatiques sont ancrées dans la membrane externe du réticulum endoplasmique (Archakov et Bachmanova, 1990).

Un apport constant d'électrons aux cytochromes *P450*, provenant de molécules de NADPH, est nécessaire à l'activation de l'oxygène et à son insertion subséquente dans la molécule à oxyder. Pendant ce mécanisme, une portion significative des molécules d'oxygène activées, donc d' $O_2^-$ , s'évade continuellement du complexe enzymatique et représente une source importante de production de ROS au sein des cellules (Zangar, Davydov et Verma, 2004). Le niveau de production de ROS selon cette troisième voie est influencé par divers facteurs tels que le type de substrat à oxyder, le pH, les forces ioniques et la concentration intracellulaire d'oxygène (Blanck et al, 1991).

## **2.2 Rôles et dommages causés par les ROS**

Quelle que soit leur voie de production, les ROS ont plusieurs fonctions et de multiples impacts sur les cellules. D'abord évidemment, ils participent activement à la destruction des particules étrangères chez les divers phagocytes, notamment chez le neutrophile. Les ROS jouent également un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et ils sont des seconds messagers bien connus de la signalisation cellulaire (Finkel, 1998). En effet, selon leur concentration, les ROS peuvent soit accélérer le cycle cellulaire, soit induire son arrêt momentané ou définitif, ou encore induire l'apoptose et même la nécrose (Boonstra et Post, 2004). Les ROS sont également indirectement impliqués dans la phosphorylation de diverses protéines via leur capacité d'activer des protéines kinases qui elles-mêmes phosphorylent certaines protéines. Enfin les ROS régulent également l'activité de certains facteurs de transcription (Karlsson et Dahlgren, 2002).

Sous des conditions pathologiques ou suite à différents traitements tels qu'une stimulation avec des polluants, la fumée de cigarette et d'autres carcinogènes, le taux de production de ROS peut augmenter significativement au sein de la cellule. Celle-ci subit alors un stress oxydatif où une quantité anormale de ROS s'accumule dans le cytosol,

dépassant ainsi les capacités des antioxydants (Boonstra et Post, 2004). Parmi les différentes formes de ROS, c'est le  $\text{OH}^\bullet$  qui est le plus néfaste pour les cellules car il altère leurs lipides, leurs protéines et leur ADN cellulaire et mitochondrial. En effet, le  $\text{OH}^\bullet$  cause une oxydation des bases azotés de l'ADN et de nombreux bris dans les deux brins dont il résulte des erreurs d'appariement lors de la réplication (Lloyd, Phillips et Carmichael, 1997). La forte production de  $\text{OH}^\bullet$  dans les mitochondries fait de l'ADN mitochondrial une cible vulnérable aux effets délétères de ce ROS (voir figure 4). De plus, celui-ci est particulièrement sensible à cause de l'absence de protéines d'histones, de sa proximité de la chaîne de transport d'électrons et de l'absence d'un mécanisme complet de réparation de l'ADN mitochondrial (Cejas et al, 2004). Les dommages ainsi causés à l'ADN mitochondrial causent des mal fonctionnements à la chaîne de transport des électrons, et donc augmentent à nouveau sa production de ROS et ainsi de suite. L'ADN mitochondrial code des protéines essentielles à la phosphorylation oxydative et de nombreuses études ont détecté des taux élevés de mutations dans l'ADN mitochondrial lors de la carcinogénèse (Fliss et al, 2000). Les dommages causés par le  $\text{OH}^\bullet$  à l'ADN cellulaire se soldent par un raccourcissement accru des télomères à chaque division mitotique (voir figure 4) dont les conséquences sont exposées dans la section sur les ROS et le vieillissement (Moldovan et Moldovan, 2004).

### **2.3 Rôle des ROS dans l'apoptose**

Les premières données suggérant un effet pro-apoptotique des ROS sont apparues au cours des années 1990 lors de la découverte que les antioxydants inhibaient la mort des cellules T (Sandstrom et Buttke, 1993 et Sandstrom, Mannie et Buttke, 1994). Des recherches sur d'autres types cellulaires ont par la suite suggéré que les ROS pouvaient induire la mort cellulaire soit par apoptose ou par nécrose, dépendamment du niveau de ROS présent dans la cellule. En effet, une forte concentration de ROS induit la peroxidation des lipides qui peut amener la mort des cellules non seulement par apoptose mais également par nécrose. Par contre, de faibles concentrations de ROS créent le plus souvent des changements importants dans la signalisation cellulaire qui se soldent plutôt en apoptose qu'en nécrose (Tripathi et Hildeman, 2004). Comme les niveaux de

production des ROS ne sont pas tout ou rien, il va de soit que la forme de mort cellulaire associée ne soit pas non plus uniquement l'apoptose ou uniquement la nécrose, mais plutôt un état intermédiaire entre ces deux formes. Plusieurs observations expérimentales permettent de confirmer cette hypothèse et montrent que ce modèle est plausible (Hildeman et al, 1999). Le tableau 1 regroupe les diverses données recueillies à ce sujet.

Niveaux de ROS		
APOPTOSE	Etat Intermédiaire	NÉCROSE
Rétrécissement de la cellule		
Externalisation des phosphatidylsérines	Externalisation des phosphatidylsérines	Destruction de la membrane plasmique
Activation des caspases	Activation <b>partielle</b> des caspases	Inactivation des caspases
Chute du $\Delta\Psi_m$	Gonflement et rupture des mitochondries	Gonflement et rupture des mitochondries
Condensation et fragmentation de l'ADN	Fragmentation <b>partielle</b> de l'ADN	Très peu de changement au noyau

**Tableau 1** Création d'un état intermédiaire entre l'apoptose et la nécrose selon les niveaux de ROS (inspiré de Tripathi et Hildeman, 2004)

Lorsqu'ils induisent l'apoptose, les ROS le font tant par la voie intrinsèque que par la voie extrinsèque. En effet, une des conséquences du stress oxydatif dans la cellule est la formation de pores dans la membrane mitochondriale interne, aux endroits où elle est en contact avec la membrane mitochondriale externe. Ces pores de perméabilité sont nommés mPTPs de "mitochondrial permeability transition pores" et permettent la libération dans le cytosol de divers facteurs pro apoptotiques de l'espace intermembranaire des mitochondries, comme le cytochrome c et le AIF faisant partie de la voie intrinsèque comme vu précédemment (Ermak et Davies, 2002). La formation de mPTPs est aussi favorisée par une forte concentration cytosolique d'ions  $Ca^{2+}$  que les ROS augmentent en favorisant leur influx à travers la membrane plasmique (Duchen, 2004).



La voie extrinsèque d'induction d'apoptose est également modulée par les ROS. En effet, l'expression du Fas ligand par la cellule est dépendante de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (de "nuclear factor kappa-B") par les ROS (Tripathi et Hildeman, 2004). Ainsi, une augmentation de la production de ROS intracellulaire mène à une activation de NF- $\kappa$ B, qui permet alors l'expression accrue du Fas ligand, élément essentiel à l'induction d'apoptose par Fas.

#### **2.4 Rôle des ROS dans le vieillissement**

On retrouve dans la littérature de nombreuses études reliant le processus de vieillissement à la production de ROS. En effet les recherches sur différentes espèces animales ont permis de tracer des graphiques affichant une relation inversement proportionnelle entre l'espérance de vie et la production de ROS (Harman, 1981, Tolmasoff *et al*, 1980, Feuers, 1998 et Kostic *et al*, 1997). Il a également été démontré que les animaux au métabolisme de base élevé produisaient davantage de ROS et avaient une espérance de vie plus courte que les animaux ayant un faible métabolisme de base (Raha et Robinson, 2000, Barja et Herrero, 2000). Ainsi, plus le métabolisme est rapide, plus la chaîne de transport des électrons est active et plus il y a de production de ROS par les mitochondries, menant à des dommages cellulaires à l'origine du vieillissement. Le lien entre les ROS et le vieillissement est confirmé par le fait que des drosophiles surexprimant la CuZnSOD et la catalase et donc qui dégradent particulièrement efficacement les ROS, ont une espérance de vie de l'ordre 40% plus longue que leurs congénères sauvages (Orr et Sohal, 1998).

L'action des ROS sur les télomères fournit une autre preuve de leur rôle dans le vieillissement. En effet, il est bien connu que chaque division cellulaire est accompagnée d'une réduction de la taille des télomères, série de séquences répétées à chaque extrémité des chromosomes (Kruk, Rampino et Bohr, 1995). Les divisions cellulaires répétées ne sont donc possibles que jusqu'à ce que le raccourcissement des télomères ait atteint une

certaine limite à partir de laquelle la cellule ne peut plus proliférer (Bodnar *et al*, 1998). Ainsi, il existe une très forte corrélation entre le nombre de séquences répétées dans les télomères et l'âge de l'individu, et le raccourcissement des télomères est désormais un phénomène associé au vieillissement (Raha et Robinson, 2000 et Von Zglinicki *et al*, 2000). Des expériences menées sur des fibroblastes humains ont montré que l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à des cellules en division faisait passer le raccourcissement de leurs télomères de 30 paires de bases (pb) à 90 pb par division cellulaire, suggérant clairement que les ROS accentuent le phénomène de vieillissement (Von Zglinicki *et al*, 2000).

## **2.5 Impacts des ROS sur l'apparition et le traitement du cancer**

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'exposition chronique à des agents stimulant la production de ROS, tels que certains pesticides, des taux élevés de pollution atmosphérique, des minerais inorganiques comme la silice cristalline, ou encore certains métaux comme le chrome, augmentait les risques d'apparition de cancers (Safi, 2002, Kyrtopoulos *et al*, 2001 et Ding *et al*, 2000). En effet, les dommages créés à l'ADN du noyau par les ROS, notamment par le OH<sup>\*</sup>, ne causent pas uniquement un raccourcissement accru des télomères, mais également des mutations pouvant altérer certains gènes codant des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, menant à une prolifération incontrôlée accompagnée d'une élévation du métabolisme, des évènements associés à la carcinogenèse (Cebulska-Wasilewska, 2003). Bien que l'augmentation de la production de ROS intracellulaire soit souvent considérée comme l'origine du caractère cancéreux, le stress oxydatif en est également une conséquence. Cause ou conséquence, les cellules cancéreuses sont connues pour être métaboliquement très actives et sous un stress oxydatif constant (Cejas *et al*, 2004). Le tableau 2 résume les découvertes clés qui ont permis de relier le stress oxydatif avec le cancer et de déterminer ses causes et ses conséquences probables.

Evidences d'un stress oxydatif chez les cellules cancéreuses	Mécanismes possibles d'apparition du stress oxydatif	Conséquences du stress oxydatif
Production accrue de ROS	Métabolisme cellulaire augmenté	Prolifération incontrôlée due à l'oxydation de molécule clés de la signalisation cellulaire
Accumulation de produits métaboliques des dommages causés par les ROS (ADN, protéines et lipides)	Mal fonctionnement de la chaîne de transport des électrons mitochondriale	Mutation de l'ADN cellulaire
Surexpression des enzymes anti-oxydantes (SOD, catalase, GPX-1)	Signaux oncogènes ( <i>ras</i> , <i>rac</i> , <i>c-myc</i> ) activent la NADPH oxydase	Altération de protéines et enzymes (cytochrome c, catalase et GPX-1)

**Tableau 2 Principaux évènements expliquant l'implication du stress oxydatif dans le cancer** (inspiré de Pelicano, Carney et Huang, 2004)

Le stress oxydatif constamment subit par les cellules cancéreuses est une caractéristique pouvant être exploitée dans une optique thérapeutique. En effet, puisque celles-ci produisent des taux élevés de ROS, il est logique qu'elles soient plus sensibles à une augmentation additionnelle de ROS et plus dépendantes de la présence d'anti-oxydants (Zhou *et al*, 2003 et Hileman *et al*, 2003). Ainsi, une des approches modernes de traitement des cancers fait appel à des agents qui causent une augmentation de la production cellulaire de ROS, tuant préférentiellement les cellules cancéreuses subissant un stress oxydatif constant.

### 3. AGENTS ANTI-CANCÉREUX: MODES D'ACTION DE CES INDUCTEURS D'APOPTOSE

#### 3.1 Généralités

Le traitement des cancers cherche à éliminer les cellules cancéreuses en activant leur apoptose, de façon à ce que leur élimination soit silencieuse et ne provoque pas d'inflammation. Cette induction d'apoptose se doit évidemment d'être la plus spécifique possible envers les cellules néfastes afin de minimiser les conséquences sur l'organisme, et c'est de cela que relève toute la difficulté du défi. Or, les cellules cancéreuses se distinguent entre autre par leur grande activité métabolique et leur forte prolifération (Dwarakanath, Khaithan et Mathur, 2004). Ainsi, différentes voies métaboliques particulièrement actives chez les cellules cancéreuses peuvent être ciblées par les agents anticancéreux. C'est le cas de la réplication de l'ADN, de la division cellulaire, de la respiration et de la synthèse de divers réactifs (Shah et Schwarts, 2003 et Mani *et al*, 2004).

Parmi les fonctions ou composantes cellulaires ciblées par la plupart des agents anticancéreux à l'étude actuellement, on retrouve entre autre la production de ROS, la synthèse des protéines et le cytosquelette. Les deux agents anti-cancéreux à l'étude dans ce mémoire, le trioxyde d'arsenic (ou  $As_2O_3$ ) et la *Viscum album* agglutinine-1 ou (VAA-1) exercent leurs effets en interférant avec une ou plusieurs de ces fonctions ou composantes cellulaire. Les sections qui suivent présentent ces deux agents anti-cancéreux et exposent les diverses données recueillies jusqu'à ce jour à leur sujet.

## 3.2 Le trioxyde d'arsenic

### 3.2.1 Origine et utilisation thérapeutique

L'arsenic est un élément naturellement retrouvé dans l'air, l'eau et divers types de sols, où on le retrouve la plupart du temps complexé au soufre pour former l'arsenic rouge ( $As_2S_2$ ) ou l'arsenic jaune ( $As_2S_3$ ). Un traitement à la chaleur permet de dissocier l'arsenic du soufre pour le complexer à l'oxygène et ainsi en faire un composé nettement plus soluble nommé arsenic blanc ou encore trioxyde d'arsenic ( $As_2O_3$ ) (Miller *et al*, 2002). L' $As_2O_3$  exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire d'une liaison aux protéines à haute teneur en groupements sulfhydryl (Soignet *et al*, 1998).

L'utilisation thérapeutique de l'arsenic et de ses dérivés remonte à il y a plus de 2400 ans, pendant la Grèce antique où ils étaient utilisés pour soigner les patients souffrant d'un mal diffus et inexpliqué. On retrouve par la suite des traces de leur utilisation médicale au cours des siècles jusqu'à aujourd'hui, et ce dans plusieurs applications thérapeutiques très différentes (Shen *et al*, 1997). Le tableau 3 présente les événements clés de l'utilisation thérapeutique de l'arsenic et de ses dérivés au cours des siècles.

Année	Évènements clés	Références
400 av JC	Hippocrate emploie l'arsenic rouge comme remède contre les ulcères	Aronson, 1994
50 av JC	L'arsenic jaune sert de base à des crèmes épilatoires	Aronson, 1994
14 <sup>ème</sup> siècle	Angelus Salva traite la peste avec diverses formes d'arsenic	Konkola, 1992
16 <sup>ème</sup> siècle	Jean de Gorris utilise l'arsenic comme déodorant	Miller <i>et al</i> , 2002
17 <sup>ème</sup> siècle	Lentilius et Friceius emploient l'arsenic pour traiter la malaria	Konkola, 1992
19 <sup>ème</sup> siècle	Utilisation contre l'asthme, l'eczéma, l'anémie et le psoriasis	Haller, 1975
20 <sup>ème</sup> siècle	Emploi dans traitements contre la syphilis La médecine chinoise utilise l'arsenic et ses dérivés depuis des centaines d'années notamment pour dévitaliser les dents malades et soigner diverses maladies comme le psoriasis, la syphilis et les rhumatismes	Miller <i>et al</i> , 2002

Tableau 3 Utilisation thérapeutique de l'arsenic et de ses dérivés au cours des siècles

Depuis la dernière décennie, on a découvert à l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> un potentiel thérapeutique important, notamment dans le traitement des leucémies promyélocytaires aiguës ou APL de "acute promyelocytic leukemia" (Miller *et al*, 2002). En effet, quatre doses quotidiennes d'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pendant 35 jours permettent la guérison complète de 85% des patients nouvellement diagnostiqués comme souffrant d'APL (Chou *et al*, 2005). De ce fait, l'utilisation de cet agent vient récemment d'être approuvée par la "food and drug administration" aux Etats-Unis d'Amérique (Miller *et al*, 2002).

### 3.2.2 Induction d'apoptose

La majorité des études cliniques montrent que l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> exerce son action via l'induction d'apoptose des cellules cancéreuses de l'APL (Strulan *et al*, 2003). Plusieurs études réalisées *in vitro* montrent que l'agent déclenche également l'apoptose des cellules NB-4, une lignée cellulaire de promyélocytes issue d'un patient souffrant d'APL (Rojewski *et al*, 2002). L'action pro-apoptotique *in vitro* de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> n'est pas restreinte aux cellules NB-4 puisqu'il induit également l'apoptose d'une variété d'autres types cellulaires issus de carcinomes des ovaires, de la prostate et d'autres types de leucémies myéloïdes (Uslu *et al*, 2000 et Wang *et al*, 1999).

### 3.2.3 Mécanisme d'action impliquant les ROS

Plusieurs mécanismes d'action ont été suggérés pour expliquer l'apoptose induite par l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chez différents types cellulaires. Entre autres, figure l'augmentation de la production de ROS. En effet, de nombreuses publications suggèrent que l'agent augmenterait le niveau intracellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via une stimulation de la NADPH oxydase alors que d'autres suggèrent que l'agent agirait directement sur les mitochondries pour y stimuler la formation d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Miller *et al*, 2002, Zhou *et al*, 2003 et Chou *et al*, 2005). Deux différentes conséquences découleraient de cette augmentation des ROS intracellulaire. D'abord, il y aurait une diminution du ΔΨ<sub>m</sub> menant à une libération de cytochrome c provoquant l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque.

Deuxièmement, la haute teneur en  $H_2O_2$  favoriserait la réaction de Fenton, libérant ainsi de grandes quantités de  $OH^\bullet$  activant spécifiquement certaines protéines kinases déclenchant l'apoptose (Zhou *et al*, 2003).

Mais cette augmentation de la production de ROS par l' $As_2O_3$  ne semble pas faire l'unanimité au sein de la communauté scientifique. En effet, une étude réalisée sur des cellules de carcinome ovarien et de la prostate a testé l'implication des ROS en utilisant la BHA ou "butylated hydroxyanisole" (Uslu *et al*, 2000). La BHA est un antioxydant très répandu dans l'alimentation et il est reconnu pour inhiber la chaîne mitochondriale de transport des électrons aux complexes I et III qui sont notamment ceux dont s'échappent les électrons à l'origine de la production de ROS par les mitochondries (voir figure 4) (Fusi, Sgaragli et Murphy, 1992 et Uslu *et al*, 2000). Cette étude montre que l'utilisation de la BHA n'empêche pas l'induction d'apoptose par l' $As_2O_3$  chez ces deux types cellulaires et suggère donc que l'action de l' $As_2O_3$  n'implique pas la production de ROS par la mitochondrie (Uslu *et al*, 2000). Des études plus approfondies sur le sujet seront donc nécessaires pour confirmer les effets de l' $As_2O_3$  sur la production de ROS.

#### 3.2.4 Mécanisme d'action impliquant le cytosquelette

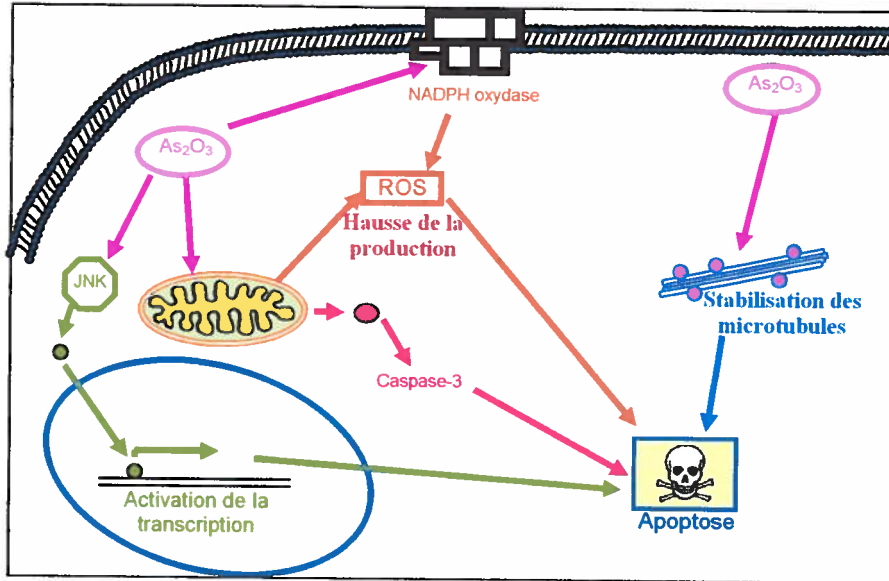
Un second mécanisme d'action, impliquant le cytosquelette cette fois, a également été suggéré pour expliquer l'induction d'apoptose par l' $As_2O_3$  chez les divers types cellulaires. En effet, il est bien connu que l'agent se lie aux protéines à haute teneur en groupement sulfhydryl, ce qui est le cas de plusieurs protéines du cytosquelette dont la tubuline (Li et Broome, 1999). Des études de chromatographie démontrent que l' $As_2O_3$  possède une forte affinité pour l' $\alpha$ -tubuline et la  $\beta$ -tubuline. Le site de liaison de l' $As_2O_3$  à la tubuline n'est pas précisément connu, mais nous savons néanmoins que l'agent se lie à deux résidus cystéines de la tubuline (Ling *et al*, 2002). Les effets de cette liaison aux microtubules sont complexes et un nombre croissant de publications suggère que l'agent exercerait une inhibition de la polymérisation des microtubules dépendante de sa concentration, jusqu'à atteindre une inhibition totale à fortes concentrations (Ling *et al*,

2002, Carré *et al*, 2002 et Halicka *et al*, 2002). Il a été suggéré que l'agent bloque le site de liaison au GTP sur la tubuline et inhibe ainsi la polymérisation des filaments. Une telle stabilisation des microtubules anéanti la dynamique des microtubules et bloque alors les cellules en métaphase, les menant ensuite à l'apoptose. L'inhibition de la polymérisation des microtubules active également une cascade de gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose (Li et Broome, 1999).

### 3.2.5 Autres mécanismes d'action

L' $\text{As}_2\text{O}_3$  semble également induire l'apoptose par l'intermédiaire de la "c-Jun N-terminal kinase" ou JNK. L'activation de cette kinase joue un rôle important dans de nombreuses voies d'induction d'apoptose puisqu'elle phosphoryle un grand nombre de facteurs de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes directement impliqués dans l'apoptose (Huang *et al*, 1999). Dans les cellules au repos, la JNK phosphatase maintient à un niveau basal l'activité de JNK. Comme elle contient de nombreux groupements thiols, la JNK phosphatase est une cible pour l' $\text{As}_2\text{O}_3$  qui inhibe son activité et permet donc une hausse de l'activité de JNK, induisant ainsi l'apoptose (Porter, Fanger et Vaillancourt, 1999). La figure 5 illustre les principaux mécanismes d'action proposés dans la littérature jusqu'à aujourd'hui pour expliquer l'induction d'apoptose par l' $\text{As}_2\text{O}_3$  chez de nombreux types cellulaires.





**Figure 5 Principaux mécanismes d'induction d'apoptose par l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Ainsi, grâce à son puissant pouvoir pro-apoptotique sur divers types de cellules cancéreuses, l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> est devenu un agent anti-cancéreux efficace dans le traitement de nombreux cancers dont les leucémies myéloïdes et certains types de tumeurs solides (Sturlan *et al*, 2003). Malheureusement, des études montrent que son utilisation thérapeutique peut mener à une neutropénie, c'est-à-dire une diminution de la quantité de neutrophiles dans le sang (Hussein *et al*, 2004). Malgré ce fait, on ne retrouve dans la littérature aucune étude traitant du potentiel pro-apoptotique de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sur les neutrophiles humains. La présente étude a été réalisée afin d'explorer les effets de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sur les neutrophiles humains et dans l'espoir de définir son mécanisme d'action, à la lumière des mécanismes proposés dans la littérature pour d'autres types cellulaires.

### 3.3 La *Viscum album* agglutinine-I

#### 3.3.1 Origine et utilisation thérapeutique

La VAA-I est une lectine obtenue de la plante de gui. Les lectines sont des protéines qui se lient de façon spécifique à la partie glycanne des carbonhydrates dont font partie les glycoprotéines, les glycolipides, les oligosaccharides et les polysaccharides (Hajto *et al*, 2003). On retrouve des lectines en grande quantité dans tous les organismes vivants. Les lectines sont classées selon leur spécificité à un type de sucre, et la VAA-I est reconnue pour lier spécifiquement le D-galactose (Hajto *et al*, 2005).

Parmi les lectines de gui, la VAA-I est la plus connue et la plus répandue, puisqu'on l'utilise depuis plus de 60 ans en Europe, principalement en Allemagne et en Suisse, dans les thérapies contre le cancer (Dietrich *et al*, 1992). La purification de la molécule se fait à partir d'extraits aqueux de gui et nécessite trois principales étapes, soit l'immunoprécipitation, l'élution sur colonne de résine et finalement la dialyse. Comme la VAA-I possède une forte affinité pour les galactoses, cette caractéristique peut être utilisée lors des immunoprécipitations où ces sucres sont couplés à des billes et permettent ainsi l'isolation de la molécule par élution. Des étapes ultérieures de dialyse servent ensuite de supprimer les sucres afin d'obtenir la VAA-I pure (Hajito, Hostanska et Gabius, 1989).

De nos jours, la VAA-I est largement utilisée dans le traitement de nombreux cancers, majoritairement les cancers du sein et du poumon (Fritz *et al*, 2004 et Siegle *et al*, 2001), puisqu'elle interfère avec la synthèse protéique et qu'elle affecte la prolifération et la différenciation cellulaire et qu'elle peut induire l'apoptose (Myung-Sunny *et al*, 2003).

#### 3.3.2 Structure et mécanisme d'action

D'un poids de 63 kDa, la VAA-I est composée de deux chaînes distinctes, la chaîne A de 29 kDa et la chaîne B qui pèse 34 kDa. La chaîne A (domaine enzymatique) confère à la

molécule sa propriété d'inhibitrice de la synthèse protéique (Myung-Sunny *et al*, 2003). En effet, la VAA-1 appartient à une famille de protéines qu'on dénomme RIP ou "ribosome-inactivating protein" puisqu'elles empêchent le facteur d'élongation 2 de se lier au ribosome et stoppe ainsi la synthèse protéique (Fritz *et al*, 2004). D'autres lectines de plantes comme la ricine, l'abrine et la modiccine font également partie de cette famille et elles partagent de nombreuses homologues structurales avec la VAA-I (Hajto *et al*, 2003).

C'est la chaîne A de la VAA-I qui permet l'inhibition de la synthèse protéique puisqu'elle interfère avec la sous unité S28 de l'ARN ribosomal (Wiedlocha *et al*, 1991). Elle y coupe le lien glycosidique de l'adénine 4323 de la séquence GAGA de l'ARN ribosomal et stoppe la synthèse protéique puisque cette coupure empêche le facteur d'élongation de se lier au ribosome (Hajto *et al*, 2005).

Comme mentionné précédemment, la VAA-I possède une forte affinité pour le D-galactose, un glucide présent à la surface de la grande majorité des cellules. Cette caractéristique lui est conférée par sa chaîne B (domaine lectine) dont la conformation permet une liaison spécifique au D-galactose. En conséquence, la présence de VAA-I dans une culture cellulaire provoque l'agglutination des cellules les unes sur les autres, d'où son nom d'agglutinine (Krauspenhaar *et al*, 1999). Son attachement à la surface des cellules par la chaîne B permet à la VAA-I de pénétrer dans le cytoplasme de ces dernières par un phénomène d'endocytose (Gabiuis *et al*, 1992). Le passage de la molécule dans l'appareil de Golgi provoque la dissociation des deux chaînes, ce qui permet ensuite à la chaîne A d'exercer son inhibition ribosomale. Une seule molécule de VAA-I suffit à induire la mort d'une cellule puisque le procédé enzymatique d'inactivation ribosomale est très efficace (Bocci, 1993).

### 3.3.3 Induction d'apoptose

La VAA-I est donc un agent pro-apoptotique reconnu chez de très nombreux types cellulaires dont les lymphocytes, les monocytes, les thymocytes et d'autres (Hostanska *et al*, 1996, Hajto *et al*, 2005). Des études précédemment effectuées dans notre laboratoire ont permis de démontrer que la VAA-I induisait fortement l'apoptose des neutrophiles humains (Savoie *et al*, 2000). Une étude ultérieure nous a permis de déterminer que cette apoptose altérait le potentiel de membrane mitochondrial. Nous avons aussi observé une hausse de la production intracellulaire de radicaux libres, mais ce phénomène ne s'est pas avéré essentiel à l'induction d'apoptose. Finalement, nous avons démontré que les caspases étaient impliquées dans la dégradation des protéines du cytosquelette lors de l'apoptose induite par la VAA-I (Lavastre *et al*, 2002).

Malgré que l'action pro-apoptotique de la VAA-I soit bien connue et que son mécanisme commence à être expliqué, il reste encore des progrès à faire afin de maîtriser ce processus complexe d'induction d'apoptose. De plus, les capacités de la VAA-I d'induire l'apoptose chez d'autres types de granulocytes n'ont toujours pas été étudiées. Les résultats présentés dans ce mémoire permettent donc d'approfondir ces deux champs de recherche.

## SECTION 2 Articles



## 1. ARTICLE 1

### **Titre**

Arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) is a new human neutrophil pro-apoptotic agent: role of reactive oxygen species, caspases and de novo protein synthesis.

### **Auteurs**

François Binet, Hélène Cavalli, Éliane Moisan et Denis Girard

### **Soumis pour publication à**

*Blood*

### **Contribution personnelle**

Cet article a deux auteurs principaux puisque leur contribution à l'article est identique, chaque auteur ayant généré la moitié des résultats présentés. Plutôt que de publier chacun notre propre article, nous avons décidé de présenter nos résultats conjointement dans un article bien étoffé, puisque les deux études se complétaient parfaitement.

J'ai donc effectué toutes les expériences concernant l'induction d'apoptose des neutrophiles humains par l' $\text{As}_2\text{O}_3$ , c'est-à-dire, l'isolation des neutrophiles à partir de sang humain, leur incubation avec l' $\text{As}_2\text{O}_3$ , puis l'exécution des protocoles de détection du clivage du CD16 et de l'expression de phosphatidyl sérines, et d'évaluation de l'apoptose en cytologie. J'ai également effectué les expériences avec l'inhibiteur de caspase z-VAD-FMK pour étudier l'implication des caspases dans l'apoptose induite par cet agent. J'ai aussi réalisé les expériences d'immunobuvardage de type Western afin de mettre en évidence la fragmentation de certaines protéines du cytosquelette.

Ensuite, j'ai testé la production d' $\text{O}_2^-$  par les neutrophiles après stimulation avec l' $\text{As}_2\text{O}_3$  par spectrophotométrie et j'ai travaillé avec des lignées cellulaires (PLB-985 et PLB-985 d  ficiennes en  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ ) afin de déterminer l'implication de la production de ROS via la

NADPH oxydase dans l'induction d'apoptose par l' $\text{As}_2\text{O}_3$ . Finalement, j'ai aidé à la réalisation du manuscrit et contribué à sa correction.

### **Contribution des autres auteurs**

François Binet : Il a réalisé toutes les expériences concernant la synthèse de protéines de novo par les neutrophiles suite à un traitement avec l' $\text{As}_2\text{O}_3$ . Il a donc effectué les gels d'électrophorèse en deux dimensions, les immunoprécipitations, ainsi que les expériences avec la cycloheximide, un inhibiteur bien connu de la synthèse protéique. Finalement, il a aussi effectué les expériences concernant l'annexin-1 et aidé à la réalisation du manuscrit et contribué à sa correction.

Éliane Moisan : Elle a testé la production d'autres ROS par le neutrophile stimulé avec l' $\text{As}_2\text{O}_3$  à l'aide de la cytométrie en flux. Elle a également contribué à la correction du manuscrit.

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



## 1.1 Résumé de l'article 1 en Français

Le trioxyde d'arsenic ou AT de l'anglais "arsenic trioxide" est un agent anticancéreux qui induit l'apoptose chez différentes cellules en prolifération ou en court de différenciation. Cependant, l'effet de cet agent sur les cellules différenciées, comme les neutrophiles, est très peu connu. Etant donné qu'une neutropénie a été observée chez certains patients cancéreux traités avec l'AT, nous avons émis l'hypothèse que cet agent pouvait induire également l'apoptose des neutrophiles humains, phénomène jusqu'ici non exploré. En effet, notre étude a permis de déterminer que l'AT induisait bel et bien l'apoptose des neutrophiles et que ce processus était inhibé par un inhibiteur de caspases à large spectre. Nous avons également démontré que l'AT ne provoquait pas de production d'anions superoxyde via l'activation de la NADPH oxydase par les neutrophiles et que cet agent induisait l'apoptose de façon identique chez les lignées cellulaires PLB-985 et PLB-985 déficientes en gp91<sup>phox</sup>. Nous avons également observé avec surprise que l'AT induisait une synthèse des protéines de novo chez les neutrophiles et que la cycloheximide (CHX) supprimait partiellement l'effet pro-apoptotique de l'agent. Nous avons ensuite identifié une des protéines ainsi nouvellement synthétisées, la protéine cytosolique annexin-1, à l'aide de la spectrométrie de masse. A notre grande surprise, nous avons remarqué que la synthèse de novo de cette protéine était également augmentée avec des agents anti-apoptotiques, tels que le GM-CSF et le dexaméthasone. Mais contrairement à ces derniers, l'AT augmente significativement la libération d'annexin-1 déjà présente dans la cellule, mais ce phénomène n'est pas affecté par la CHX. En conclusion, l'AT est un inducteur l'apoptose des neutrophiles humains, les caspases et la synthèse de protéines de novo semblent impliquées dans cette apoptose, mais ce n'est pas le cas de l'annexin-1 nouvellement synthétisée.

## 1.2 Texte original de l'article 1

**Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) is a new human neutrophil pro-apoptotic agent: role of reactive oxygen species, caspases and de novo protein synthesis.**

**François Binet<sup>‡</sup>, Hélène Cavalli<sup>‡</sup>,   liane Moisan, Denis Girard<sup>\*</sup>**

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

<sup>‡</sup>*F.B. and H.C. contributed equally to this study.*

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

**Categories: Phagocytes or Immunobiology**

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

**Running title: Induction of neutrophil apoptosis by arsenic trioxide.**

**Word counts:**

**-Abstract: 198 words**  
**-Text: 4987 words**

<sup>1</sup>*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 M. Sc. CIHR award, EM holds a PhD FRSQ award, and DG is a Scholar from FRSQ.*

## ABSTRACT

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

## INTRODUCTION

Arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ; AT) is effective in the treatment of various cancers, especially of acute promyelocytic leukemia (APL)<sup>1,2</sup>. In the last decade, several reports have indicated that AT acts principally by inducing cell apoptosis not only in APL, but in a variety of cells including non-APL acute myeloid leukemia cells, myeloma cells, chronic myeloid leukemia cells and various solid tumor cells<sup>3</sup>. In addition, AT was found to induce apoptosis in a variety of myeloid cell lines including NB4, HL-60, PLB-985 and U937<sup>4-7</sup> and in some immune cells such as B and T lymphocytes<sup>8,9</sup>. Curiously, the effect of AT on neutrophil apoptosis has never been studied, despite the fact that neutropenia is a common occurrence following cancer therapy, resulting in recurrent infections in patients. Moreover, an immunotoxicological study reported that neutropenia was marked after exposure to arsenic compounds<sup>10</sup>. More recently, in a phase II study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, 67% of the patients experienced grade 3 or 4 neutropenia<sup>11</sup>. Also, in another phase II trial, 11/16 multiple myeloma patients treated with AT developed cytopenia, five associated with infectious complications<sup>12</sup>. Taken together, these observations attest to the importance of studying potential pro-apoptotic effects of AT in human neutrophils.

AT is known to induce cell apoptosis via reactive oxygen species and to activate caspases<sup>2,5,9,13-16</sup>, whereas the involvement of mitochondria in AT-induced apoptosis is still controversial<sup>4,17</sup>. Also, AT was found to inhibit the release of cytochrome *c*, a component highly involved in caspase activation and cell apoptosis. The cytoskeleton, especially the microtubules, is an important cellular target for arsenic, probably due to the fact that cytoskeletal components possess a high sulfhydryl protein content<sup>17</sup>. The toxicity of AT is partly explained by its ability to bind and inactivate several sulfhydryl-containing proteins and enzyme systems<sup>17</sup>. AT was previously found to induce cell differentiation when used at a low concentration (generally 0.5-5  $\mu\text{M}$ ), while it induces cell apoptosis (or necrosis) at concentration greater than 5  $\mu\text{M}$  in a variety of cell lines<sup>1,5,7,17-19</sup>. Interestingly, the concentrations used in the majority of in vitro studies are in the range of clinically achievable concentrations<sup>3,19</sup>.

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

## MATERIALS AND METHODS

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

**Cell lines.** Wildtype (WT) human promyelocytic cell lines PLB-985 and PLB-985 deficient (KO) in gp91<sup>phox</sup>, mimicking X-linked chronic granulomatous disease by their inability to generate O<sub>2</sub><sup>-</sup> via NADPH oxidase, were a gift from Dr. Y. Pommier (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland). Cell lines were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, in RPMI-1640 complete medium supplemented with 10% FCS and antibiotics; 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY). Cells were cultivated at a cell density between 2 x 10<sup>5</sup>/mL and 1 x 10<sup>6</sup>/mL and the medium was changed three times/week.

**Assessment of apoptosis by cytology or CD16 expression.** Freshly isolated human neutrophils (100 μL of a 10 x 10<sup>6</sup> cells/ml suspension in RPMI 1640 supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 17-24h in the presence or absence of increasing concentrations of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and apoptosis was evaluated by cytology. Preparations of neutrophils were centrifuged using a Cyto-tek® centrifuge (Miles Scientific, Elkhart, IN), as previously described<sup>20,21</sup>, and were stained with Hema-Stain staining kit according to the manufacturer's instructions. The cells were examined by light microscopy at 400× final magnification. Apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristically dark-stained pyknotic nuclei.

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

**Degradation of gelsolin.** Cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml in 24 well plate) were incubated with or without 1000 ng/ml VAA-I in the presence or absence of 50  $\mu$ M z-VAD-FMK<sup>20,21</sup> or the diluent (<1% DMSO) for the indicated period of time and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer and gelsolin cleavage was monitored as previously described<sup>20,21</sup>. Protein loading was systematically verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup> production.** O<sub>2</sub><sup>-</sup> production was performed by colorimetric assay (reduction of cytochrome *c*), as previously published<sup>26,27</sup>. Briefly, neutrophils ( $1 \times 10^6$  cells/ml in HBSS supplemented with 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>) were incubated in the presence or absence of 10  $\mu$ g/ml superoxide dismutase (SOD) (Sigma-Aldrich Canada) with 130  $\mu$ M cytochrome *c* (Sigma-Aldrich Canada) for 5, 15 or 30 min at 37°C in the presence of buffer, 10<sup>-7</sup> M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), used as positive control, or increasing concentrations of AT. The absorbance of cytochrome *c* was monitored at 550 nm and the number of O<sub>2</sub><sup>-</sup> anions produced was calculated by the difference between corresponding wells with or without SOD using an extinction coefficient of 21.1.

**Measurement of ROS production by DHR 123.** Mitochondrial ROS production was assessed with dihydrorhodamine 123 (DHR123) as previously described<sup>28,29</sup>. Briefly,

neutrophils were incubated at a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml in HBSS-0.3% BSA containing  $1 \mu\text{M}$  DHR123 (Molecular Probes) for 5 minutes at  $37^\circ\text{C}$  before adding stimuli. Buffer, AT ( $1\text{--}20 \mu\text{M}$ ), PMA ( $10^{-7} \text{ M}$ ) or a mixture of AT + PMA, was then added and cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for another 15, 30, 45 or 60 minutes. ROS production was analysed by FACScan by detecting fluorescence in the green channel at 530/30 nm (FL1). 10,000 events per sample were analyzed.

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

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

**Two dimensional gel electrophoresis.** Metabolic labeling was performed as described above in the presence or absence of AT ( $5 \mu\text{M}$ ), CHX ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) or GM-CSF ( $65 \text{ ng/ml}$ ) for 22h as previously published<sup>26,30</sup>. For CHX treatment, cells were pre-incubated 30 min before addition of the agonists. Cell lysates were then prepared in lysis buffer (Chaps 4%, Tris 40 mM, urea 8M, aprotinin  $20\mu\text{g/mL}$ , pepstatin  $20\mu\text{g/mL}$ , leupeptin  $20\mu\text{g/mL}$ , EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 1%) and isoelectrofocusing was performed (strip pH 3-



10 linear, IPGphor Pharmacia Biotech) followed by SDS-PAGE. An equivalent of  $2 \times 10^6$  cells was loaded per strip. After electrophoresis, gels were stained with Coomassie blue, dried, and exposed to Kodak film X OMAT-RA at  $-80^\circ\text{C}$  for 3-5 days.

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

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

**Western blot of annexin-1.** Neutrophils (200  $\mu\text{l}$  of a  $10 \times 10^6$  cells/ml) were incubated in RPMI 1640-HEPES-penicillin-streptomycin supplemented with 10% autologous serum for 24h at  $37^\circ\text{C}$  with buffer, AT (5  $\mu\text{M}$ ), GM-CSF (65 ng/ml), dexamethasone (1  $\mu\text{M}$ ) or

cycloheximide (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Cells were harvested, centrifuged and cellular debris were discarded. An equivalent volume of 2x Laemmli sample buffer was added to the supernatant. An equivalent of 15  $\mu\text{l}$  of the supernatant was loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA). Nonspecific sites were blocked with 2% skim milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 190 mM NaCl, 0.15% Tween 20) overnight at 4°C. The mouse anti-annexin-1 antibody (1  $\mu\text{g/ml}$ ) was added for 1 h at room temperature followed by washes with TBS-Tween. The membrane was then incubated with a HRP-labeled goat anti-mouse secondary antibody at 1:10,000 dilution in TBS-Tween + 1% nonfat dry milk for 45 min at room temperature followed by washes. The annexin-1 protein was revealed as above and quantified using a Fluor-S MultiImager (Bio-Rad) and the Multi-Analyst version 1.1 program (Bio-Rad).

## RESULTS

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

*AT induces neutrophil apoptosis by a mechanism independent of NADPH activation.* Because AT is known to induce ROS production in a variety of cells<sup>2,9,14</sup> but has never been studied in neutrophils, and since ROS are involved in AT-induced cell apoptosis<sup>14,18</sup>, we investigated the potential of AT to induce  $\text{O}_2^-$  in human neutrophils. Unexpectedly, we found that AT, at a concentration of 1, 5, 10 or 20  $\mu\text{M}$ , did not increase  $\text{O}_2^-$  production after 5-30 min (**Fig. 2A**). For simplicity, only the results obtained after 15 min of treatment are illustrated. However, cells were responsive, since, as expected<sup>27</sup>, PMA significantly increased  $\text{O}_2^-$  production. In addition, we investigated potential mitochondrial ROS production by flow cytometry using the DHR123 probe in AT-induced neutrophil cells. As illustrated in **Fig. 2B**, AT, in contrast with the positive control PMA, did not induce ROS production. For simplicity, we illustrated results obtained only after 15 min of stimulation with AT (1-20  $\mu\text{M}$ ), but similar results were obtained after 30, 45, and 60 min (*data not shown*). Interestingly, addition of AT in these

experiments did not inhibit the ability of PMA to induce ROS. Although we present data with PMA + AT5, similar results were obtained with all concentrations of AT studied and for the same time-courses (*data not shown*).

To further support the observation that AT does not induce  $O_2^-$  production via NADPH activation, we verified the response for up to 24h.  $O_2^-$  production was never increased in four different experiments (*data not shown*). These results suggest that ROS generated via NADPH activation are not involved in AT-induced apoptosis. To further support this observation, we next investigated if AT induced apoptosis in human X-CGD cells<sup>32</sup> that do not generate ROS via NADPH since they are deficient in gp91<sup>phox</sup>. As illustrated in **Fig. 3**, AT induced apoptosis at same potency in both WT PLB-985 and X-CGD (or PLB-985 KO) cells, confirming the hypothesis that generation of ROS via NADPH activation is not involved in AT-induced apoptosis.

*AT induces de novo protein synthesis in neutrophils.* In order to better elucidate the mode of action of AT, and because AT did not increase  $O_2^-$  production via NADPH activation or via mitochondria, we next investigated the possibility that this drug inhibited de novo protein synthesis, an event that we have observed when the plant lectin VAA-I induces neutrophil apoptosis<sup>20,21</sup>. Unexpectedly, we found that AT is a potent inducer of de novo protein synthesis in neutrophils (**Fig. 4A**). Despite the fact that an equivalent number of proteins was loaded, as judged by Coomassie blue staining, treatment of cells with the protein synthesis inhibitor CHX completely inhibited de novo protein synthesis. When freshly isolated cells were loaded in parallel, virtually no newly synthesized polypeptide was observed despite the fact that an equivalent amount of proteins was loaded as visualized by Coomassie blue staining. Because several newly synthesized polypeptides were observed in response to AT treatment, we then performed two-dimensional gel electrophoresis in order to get a more detailed analysis of its effect. As illustrated in **Fig. 4B**, AT induced de novo protein synthesis of numerous polypeptides, as compared to

control cells which synthesize some proteins when isolated and cultivated in vitro for more than 18h<sup>21,26</sup>. Interestingly, the profile of newly synthesized proteins induced by AT was different from the one induced by GM-CSF, a cytokine known to delay neutrophil apoptosis and to induce de novo protein synthesis<sup>21,23,26</sup>. This attests to the complexity of the mode of action of AT and indicates that the proteins involved in induction of apoptosis are distinct from those involved in delay of neutrophil apoptosis. Next, we decided to answer whether or not CHX treatment inhibited the effect of AT. As illustrated in **Fig. 5A**, the ability of AT to induce de novo protein synthesis was markedly inhibited by CHX treatment, confirming the specificity of our assay. Moreover, as illustrated in **Fig. 5B**, addition of CHX in AT-induced neutrophils was found to reverse induction of apoptosis as assessed by monitoring CD16 shedding and cytology (data not shown). This indicates that among the newly synthesized polypeptides induced by AT, some are involved in induction of neutrophil apoptosis.

*AT induces de novo protein synthesis of annexin-1 in neutrophils.* To better elucidate the mode of action of AT, we decided to initiate identification of some proteins modulated by this drug. We selected one spot tentatively identified as actin as an internal control and another unknown spot to be identified. The peptide sequences of the first spot were: -AVFPSIVGR; -GYSFTTTAER and -SYELPDGQVITIGNER (with a Mascot score of 93), revealing that this protein is effectively actin (3907622-NCBI) (asterisk in **Fig. 6A**). The other spot (arrow) was randomly selected, but was chosen because its synthesis was reproducibly increased in response to AT treatment. The spot was identified as annexin-1 (442631-NCBI) and the peptide sequences were: -ALYEAGER; -TPAQFDADELRL and -SEDFGVNEDLADSDAR (with a Mascot score of 177). The molecular mass of the spot was ~30 kDa instead of ~38 kDa, or the ~32 kDa cleaved form reported in the literature<sup>33-35</sup>, with an isoelectric point of ~5. As illustrated, the densitometric analysis revealed that the intensity of actin was slightly decreased with treatment of AT ( $0.8 \pm 0.04$ , mean  $\pm$  SEM, n=4) when compared with control cells (spontaneous apoptosis). The densitometric analysis demonstrated that AT significantly

increased de novo protein of ANXA1 by a factor of  $4.7 \pm 0.8$ , whereas the synthesis of actin was slightly decreased when compared to control cells.

Because the de novo protein synthesis of annexin-1 (ANXA1) has never been reported in metabolically labeled-neutrophils, we next studied its intracellular synthesis in response to AT or different neutrophil agonists known to modulate the apoptotic rate by immunoprecipitation. Dexamethasone (Dex) was selected, based on the fact that ANXA1 is well-recognized as a glucocorticoid-inducible protein<sup>34,36</sup>. As illustrated in **Fig. 6B**, there is a basal level of ANXA1 synthesis in the cytosol of cells undergoing spontaneous apoptosis and AT further increases this synthesis. Of note, 4 bands (denoted a, b, c, and d, in the figure) of molecular masses ranging from ~28-38 kDa were detected. However, we found that both GM-CSF and Dex, two anti-apoptotic agents in neutrophils, also increased de novo synthesis of ANXA1, suggesting that newly synthesized ANXA1 is not involved in AT-induced neutrophil apoptosis. Using the same approach, we failed to detect metabolically-labeled (radioactive) ANXA1 in the extracellular milieu when neutrophils were treated with AT (n=4, *data not shown*).

Because of the above results suggesting that de novo synthesized ANXA is not involved in AT-induced neutrophil apoptosis, we next decided to monitor ANXA1 expression in the external milieu from non-metabolically-labeled AT-induced cells, by western blot, since addition of recombinant human ANXA1 in cultures was previously found to induce neutrophil apoptosis<sup>37</sup>. As illustrated in **Fig. 7A**, ANXA1 was barely detected in the external milieu from cell undergoing spontaneous apoptosis (20h-aged), whereas its expression was increased following induction of apoptosis by AT (see arrows in the figure). Interestingly, the levels of expression of ANXA1 remained similar whether cells were incubated with AT alone or in the presence of the protein inhibitor CHX, demonstrating that this release of ANXA1 originates from the pre-existing pool and not via the newly synthesized one. Equivalent loading was verified by monitoring the presence of plasma gelsolin (bottom panel) as well as by staining the membranes at the end of experiments (*data not shown*). In contrast with intracellular gelsolin, the anti-

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

## DISCUSSION

In this study, we established for the first time that AT was a potent inducer of human neutrophil apoptosis. This was confirmed by cytometry by monitoring CD16 shedding on neutrophil cell surface and by cytology. In addition, the apoptotic state of the cells was confirmed by the ability of AT to induce the degradation of the cytoskeletal protein gelsolin, an event known to occur via activation of caspases<sup>20,21,31</sup>. We have also demonstrated that AT induced neutrophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism, since addition of the pan caspase inhibitor was found to reverse the morphological changes typical of apoptotic neutrophils, as well as the degradation of gelsolin. These results concur with those published in several reports, attributing a role of caspases in AT-induced cell apoptosis<sup>2,5,15,17</sup>. With the present results, this role can also be attributed to neutrophils. Although several studies have reported that AT induced ROS production, we demonstrated herein that AT did not induce O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in neutrophils, as assessed by the classical colorimetric assay based on the reduction of ferrocytochrome *c*. Interestingly, using a flow cytometric approach (DHR123) used to measure the mitochondrial ROS production<sup>28,29</sup>, we also demonstrated that AT did not produce ROS. Therefore, our results imply that mitochondria are not involved in AT-induced neutrophil apoptosis or, at least, they are not involved via ROS generation. Interestingly, it was reported recently that treatment of 4 μM AT inhibited the release of cytochrome *c* from isolated mitochondria<sup>19</sup>. In our present study, co-incubation of PMA with 5 μM AT did not decrease ROS production induced by PMA, limiting the role of ROS production through mitochondria in AT-induced neutrophil apoptosis. In order to eliminate the potential involvement of ROS production through NADPH activation, the major route for production of ROS in neutrophils, we investigated the ability of AT to induce apoptosis in the human promyelocytic PLB-985 cell line deficient in gp91<sup>phox</sup>. This cell line mimics the X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD) a disease characterized by recurrent infections, since neutrophils from these patients cannot generate ROS because of absence of NADPH activation<sup>32</sup>. AT induced apoptosis in these cells at the same potency as in the wild type. Thus, AT induced apoptosis by a mechanism that is independent of ROS generation through NADPH activation. However, this does not rule



out the possibility that ROS, generate by other route(s), are somewhat involved in AT-induced neutrophil apoptosis.

Neutrophils are mature non-dividing cells known to spontaneously undergo apoptosis without any apparent stimulation<sup>38,39</sup>. In these cells, the common caspase substrates such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), the small ribonucleoprotein U1-70 kDa, and the NuMA protein (nuclear/mitotic apparatus) are not detected<sup>38,39</sup>. Moreover, the antiapoptotic Bcl-2 and caspases-2 proteins are absent in neutrophils and the release of cytochrome c in the cytosol is not evident. These cells are known to possess few mitochondria (<sup>39,40</sup>). However, it was recently suggested that neutrophils contain barely detectable levels of cytochrome c as well as other mitochondrial proteins<sup>41</sup>. Moreover, it was demonstrated that these cells have a lowered threshold requirement for cytochrome c in the apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1)-dependent cell death pathway, and that low levels of cytochrome c are retained for induction of apoptosis rather than for mitochondrial respiration<sup>41</sup>. This latter observation is in agreement with our data, which indicate that AT does not generate mitochondrial ROS production. Also, in preliminary experiments using MitoTracker GreenFM dye in immunofluorescence assays, we failed to detect any significant differences of mitochondrial structure in AT-induced neutrophils when compared with control cells (*data not shown*).

Knowing that several agents, such as GM-CSF, IL-4, IL-15, heme, fibronectin and sodium butyrate, which suppress or delay human neutrophil apoptosis, require de novo protein synthesis<sup>26,30,42-44</sup>, and that we have recently documented that, inversely, the anticancer agent VAA-I, an inhibitor of protein synthesis, induces neutrophil apoptosis<sup>20,21</sup>, the results of our present study are paradoxical, since AT simultaneously induced de novo protein synthesis and apoptosis. The role of de novo protein synthesis in AT-induced neutrophil apoptosis is supported by the fact that treatment of cells with CHX partially reversed AT-induced CD16 shedding (**Fig. 5B**) and apoptosis as assessed by cytology (*data not shown*). Interestingly, the profiles of the newly synthesized polypeptides observed in response to GM-CSF or AT are quite different, indicating that

distinct sets of proteins are involved in either delay of neutrophil apoptosis or induction of apoptosis by various agents. Clearly, as judged by the results obtained following 2D-SDS-PAGE, the mode of action of AT is complex, since numerous proteins are synthesized. Among the proteins we identified, annexin-1 or ANXA1, was newly synthesized in response to AT treatment. Although few studies have reported de novo synthesis of ANXA1, there was no previous evidence until now to support de novo synthesis of ANXA1 at the polypeptide level in human neutrophils. ANXA1 is known to possess powerful anti-inflammatory activities that are largely due to its ability to inhibit cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), which plays a key role in the production of the potent inflammatory mediators prostaglandins and leukotrienes<sup>36</sup>. ANXA1 is expressed in large amounts in the cytosol of human neutrophils, where a large proportion is localized in the cytoplasmic (gelatinase) granules<sup>36</sup>. Of note, ANXA1 does not possess a signal peptide and is therefore not exported through the classical secretory pathway, but rather is externalized from the cells to the cell surface via exocytosis. Herein, we demonstrated that AT increased de novo synthesis of ANXA1 in the cytosol. Interestingly, four polypeptides were detected by immunoprecipitation with the anti-ANXA1 antibody. This suggests that newly synthesized ANXA1 is cleaved over time. Cleavage of the ~38 kDa form of ANXA1 to a 32 kDa form has been reported in several studies, and these appear to be the two classical forms. However, other studies, not necessarily performed in neutrophils, have reported different ANXA1 polypeptides of 31, 33, 36, 37, 38 kDa and also a form of ~50 kDa. Moreover, different spots of ANXA1 have been observed in 2D-SDS-PAGE in fragile X syndrome harboring pI in the range of 5-7<sup>45</sup>. The spot which we identified had a Mr of ~30 kDa with an unconventional pI of ~5.2. We speculate that this represents a fragment of native newly synthesized ANXA1. It is important to mention that we performed our experiments following 20-24h of culture. Of note, we detected the more conventional 38 kDa polypeptide by western blot and several fragments by immunoprecipitation. The lysis buffers differ when we perform 2D-SDS-PAGE vs 1D-SDS-PAGE. Several years ago, a study reported proteolysis of lipocortin (ancient terminology of ANXA1) with elastase generating more than 10 fragments ranging from 8-38 kDa<sup>46</sup>. Nevertheless, the significant point is that this newly synthesized pool of ANXA1 was not released into the external milieu. In contrast, we found that AT

increased the release of pre-existing ANXA1 into the external milieu, and this was not inhibited by CHX. Furthermore, expression of ANXA1 in the external milieu did not vary, whether neutrophils underwent spontaneous apoptosis or if this process was delayed by GM-CSF or Dex. In addition to the fact that we did not observe necrotic cells by the trypan blue exclusion assay under any conditions, inhibiting cell death with GM-CSF and Dex further supports the notion that the released ANXA1 was not due to cell necrosis. One would imagine that ANXA1 expression would decrease in response to the two anti-apoptotic agents, but this was not the case. Knowing that exogenous addition of recombinant human ANXA1 to human neutrophils induced apoptosis after 6h<sup>37</sup>, it is tempting to speculate that AT induced neutrophil apoptosis via the release of ANXA1. However, no one has reported this. We were unable, in four separate experiments, to induce neutrophil apoptosis by treating them with undiluted collected supernatants from 24h-aged or AT-induced neutrophils (François Binet, *unpublished observations*). Despite the above results, and even if ANXA1 is known to possess pro-apoptotic effect in neutrophils<sup>47,48</sup>, we cannot conclude whether or not ANXA1 is involved in the ability of AT to induce neutrophil apoptosis. According to the several spots that were detected by 2D-SDS PAGE, we believe that it is probably the participation of several proteins that, at a particular threshold of expression, govern the neutrophil life-span.

We conclude that AT is a potent inducer of neutrophil apoptosis and that this may be responsible for the neutropenia reported in cancer patients treated with this drug. Its mode of action is certainly very complex and we provide evidence here that AT induces neutrophil apoptosis by a mechanism that is caspase-dependent, but independent of ROS production via NADPH activation and mitochondria. We propose also that newly synthesized polypeptides are involved in AT-induced apoptosis, an identification of these proteins in future will shed light on the mode of action of AT. Finally, our results provide new information on the potential role of AT as an anti-inflammatory drug, based at least on its ability to increase ANXA1 production. The role of ANXA1 in inflammation was recently clearly established using ANXA1 KO mice; these mice exhibited an exaggerated response to pro-inflammatory stimuli and a partial or complete resistance to the anti-inflammatory effects of glucocorticoids<sup>49,50</sup>.

## **ACKNOWLEDGEMENTS.**

We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

## REFERENCES

1. Wang HY, Liu SX, Zhang M. Gene expression profile changes in NB4 cells induced by arsenic trioxide. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24: 646-650.
2. Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 2002; 62: 3893-3903.
3. Sturlan S, Baumgartner M, Roth E, Bachleitner-Hofmann T. Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells. *Blood.* 2003; 101: 4990-4997.
4. Korper S, Nolte F, Thiel E, Schrezenmeier H, Rojewski MT. The role of mitochondrial targeting in arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloid cell lines. *Br. J. Haematol.* 2004; 124: 186-189.
5. Zuo L, Li J, Yang Y, Wang X, Shen T, Xu CM, Zhang ZN. Sodium selenite induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia-derived NB4 cells by a caspase-3-dependent mechanism and a redox pathway different from that of arsenic trioxide. *Ann Hematol.* 2004 Oct 6 [Epub ahead of print]
6. Fernandez C, Ramos AM, Sancho P, Amran D, de Blas E, Aller P. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate may both potentiate and decrease the generation of apoptosis by the antileukemic agent arsenic trioxide in human promonocytic cells. Regulation by extracellular signal-regulated protein kinases and glutathione. *J Biol Chem.* 2004; 279: 3877-3884.

7. Rojewski MT, Baldus C, Knauf W, Thiel E, Schrezenmeier H. Dual effects of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Br. J. Haematol.* 2002;116: 555-563.
8. Rousselot P, Labaume S, Marolleau JP, Larghero J, Noguera MH, Brouet JC, Femand JP. Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients. *Cancer Res.* 1999; 59: 1041-1048.
9. Gupta S, Yel L, Kim D, Kim C, Chiplunkar S, Gollapudi S. Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2: 711-719.
10. Lisiewicz J. Immunotoxic and hematotoxic effects of occupational exposures. *Folia Med Cracov.* 1993; 34: 29-47.
11. Hussein MA, Saleh M, Ravandi F, Mason J, Rifkin RM, Ellison R. Phase 2 study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2004 ; 125: 470-476.
12. Munshi NC, Tricot G, Desikan R et al. Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia.* 2002; 16: 1835-1837.
13. Park IC, Park MJ, Woo SH et al. Tetraarsenic oxide induces apoptosis in U937 leukemic cells through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Int. J. Oncol.* 2003; 23: 943-948.
14. Woo SH, Park IC, Park MJ et al. Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells. *Int. J. Oncol.* 2002; 21: 57-63.

15. Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. *Cancer Invest.* 2004; 22: 389-400.
16. Sordet O, Liao Z, Liu H et al. Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2004;279: 33968-33975.
17. Li YM, Broome JD. Arsenic targets tubulins to induce apoptosis in myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 1999; 59: 776-780.
18. Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Zeng Y. Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Int. J. Mol. Med.* 2003;11: 479-484.
19. Carre M, Carles G, Andre N et al. Involvement of microtubules and mitochondria in the antagonism of arsenic trioxide on paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 63: 1831-1842.
20. Lavastre V, Pelletier M, Saller R, Hostanska K, Girard D. Mechanisms involved in spontaneous and Viscum album agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: Viscum album agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J. Immunol.* 2002; 168: 1419-1427.
21. Savoie A, Lavastre V, Pelletier M, Hajto T, Hostanska K, Girard D. Activation of human neutrophils by the plant lectin Viscum album agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68: 845-853.
22. Stringer RE, Hart CA, Edwards SW. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br. J. Haematol.* 1996; 92: 169-175.

23. Sakamoto C, Suzuki K, Hato F et al. Antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and cyclic AMP on human neutrophils: protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent mechanisms and the role of the Janus kinase-STAT pathway. *Int. J. Hematol.* 2003; 77: 60-70.
24. Moulding DA, Hart CA, Edwards SW. Regulation of neutrophil FcγRIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *J Leukoc Biol.* 1999; 65: 875-882.
25. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc γ RIII) expression. *J. Immunol.* 1994; 153: 1254-1263.
26. Girard D, Paquet ME, Paquin R, Beaulieu AD. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood.* 1996; 88: 3176-3184.
27. Pelletier M, Roberge CJ, Gauthier M, Vandal K, Tessier PA, Girard D. Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 2001; 70: 367-373.
28. Stocks SC, Ruchaud-Sparagano MH, Kerr MA, Grunert F, Haslett C, Dransfield I. CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 2924-2932.
29. Falcone FH, Rossi AG, Sharkey R, Brown AP, Pritchard DI, Maizels RM. *Ascaris suum*-derived products induce human neutrophil activation via a G protein-coupled receptor that interacts with the interleukin-8 receptor pathway. *Infect Immun.* 2001; 69: 4007-4018.



30. Bouchard A, Ratthe C, Girard D. Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 893-900.
31. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997; 278: 294-298.
32. Hiraoka W, Vazquez N, Nieves-Neira W, Chanock SJ, Pommier Y. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 1961-1968.
33. Rhee HJ, Kim GY, Huh JW, Kim SW, Na DS. Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 3220-3225.
34. Croxtall JD, Flower RJ. Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 3571-3575.
35. Solito E, de Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol.* 2001; 133: 217-228.
36. Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res.* 2004; 53: 125-132.
37. Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J.* 2003; 17: 1544-1546.

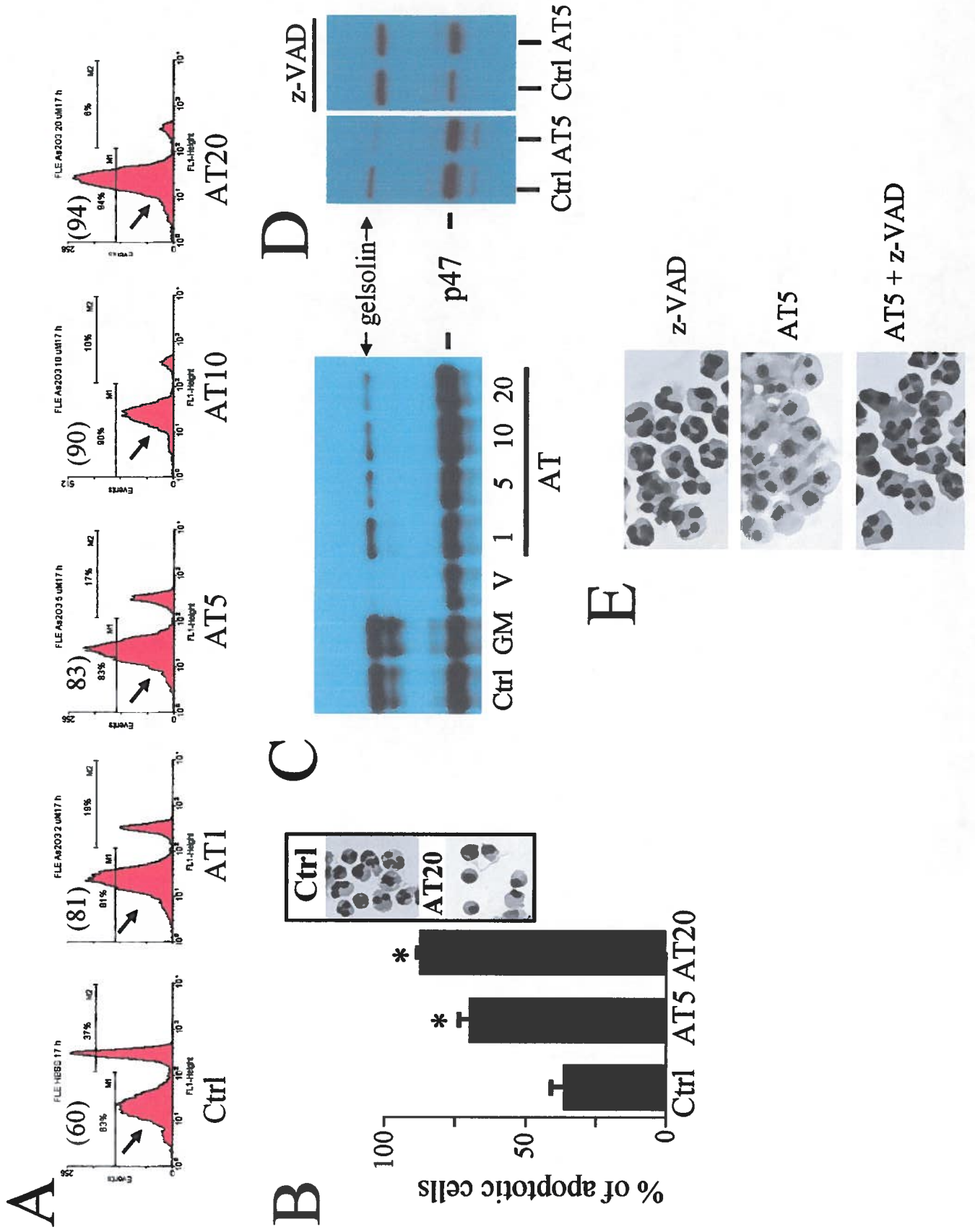
38. Sanghavi DM, Thelen M, Thornberry NA, Casciola-Rosen L, Rosen A. 1998. Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Lett.* 1998; 422: 179-184.
39. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001; 487: 318-322.
40. Simon HU. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences. *Immunol Rev.* 2001;179: 156-162.
41. Murphy BM, O'Neill AJ, Adrain C, Watson RW, Martin SJ. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 625-632.
42. Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graca-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol.* 2004; 173: 2023-2030.
43. Wagner C, Pioch M, Meyer C, Iking-Konert C, Andrassy K, Hansch GM. Differentiation of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic infections and chronic inflammatory diseases: evidence of prolonged life span and de novo synthesis of fibronectin. *J. Mol. Med.* 2000;78: 337-345.
44. Girard D, Paquin R, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J.* 1997; 325: 147-153.

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

## FIGURE LEGENDS

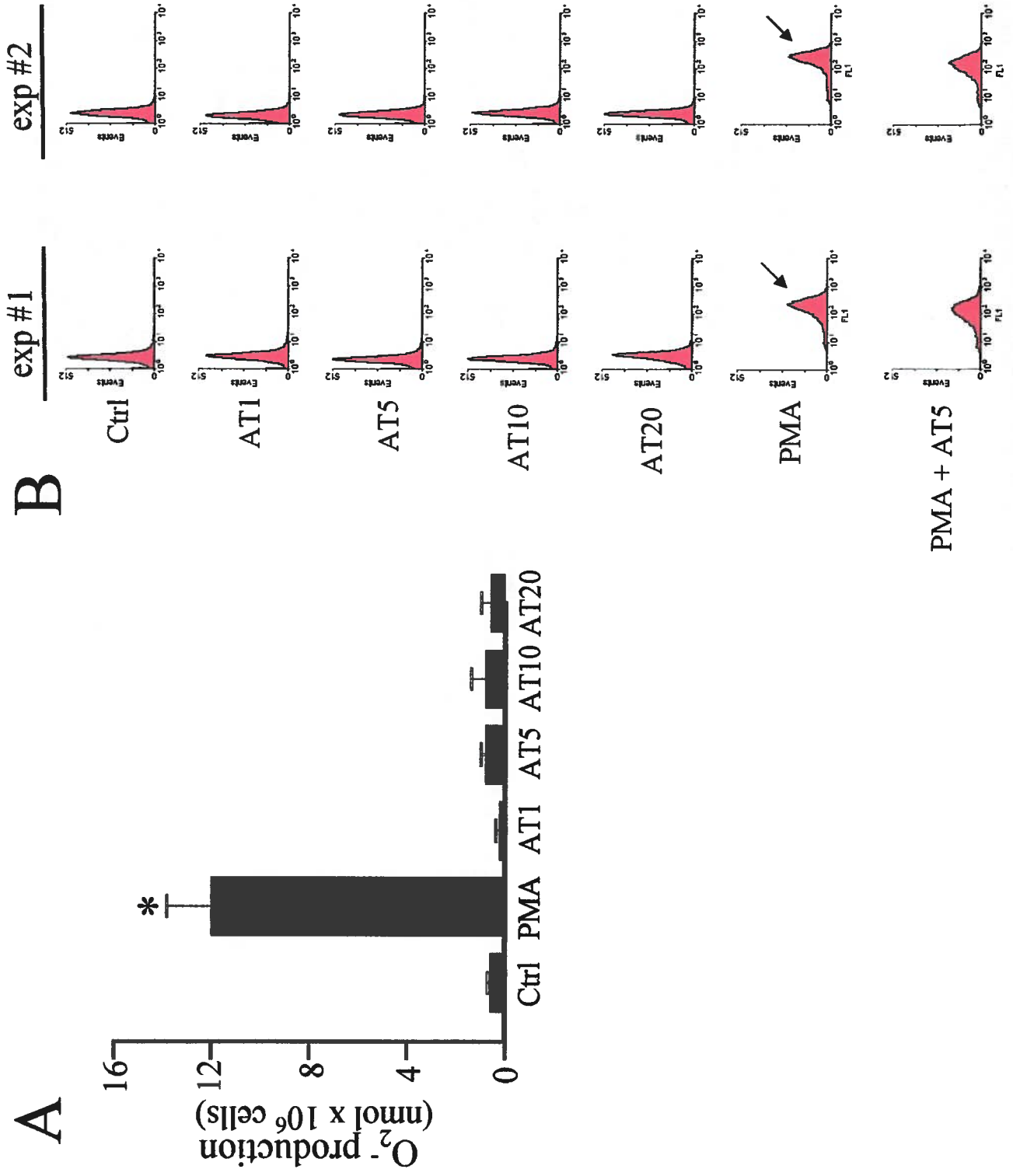
**Figure 1.** *Arsenic trioxide induces apoptosis in human neutrophils via caspases.* Freshly isolated human neutrophils ( $10 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with buffer (Ctrl) or with arsenic trioxide (AT) at a concentration of 1 (AT1), 5 (AT5), 10 (AT10) or 20  $\mu$ M (AT20), for 17h and apoptosis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

**FIGURE 1**



**Figure 2.** *AT does not induce superoxide production and other reactive oxygen species in neutrophils.* Cells were isolated and incubated in the presence of an increasing concentration of AT (1-20  $\mu\text{M}$ ), with PMA (used as a positive control) or with buffer (Ctrl), and superoxide production ( $\text{O}_2^-$ ) (A) and ROS generation (B) were assessed by a colorimetric reaction and flow cytometry, respectively, as described in Materials and Methods. A, results are means  $\pm$  SEM (n=5). B, two separate experiments (exp #1 and exp #2) were performed. Arrows indicated the production of ROS induced by PMA (shift of the fluorescence to the right). \*,  $p < 0.05$  by ANOVA.

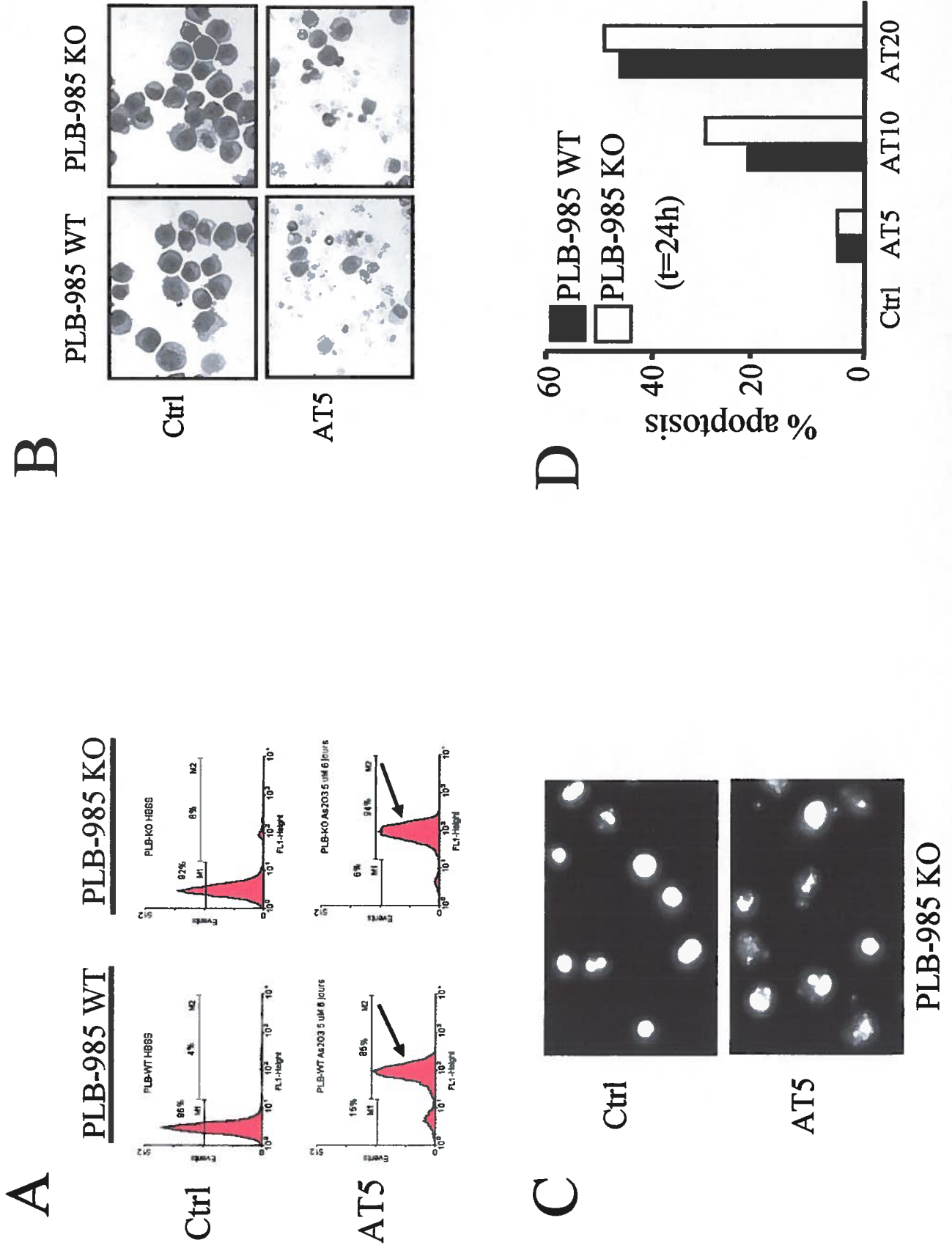
FIGURE 2



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

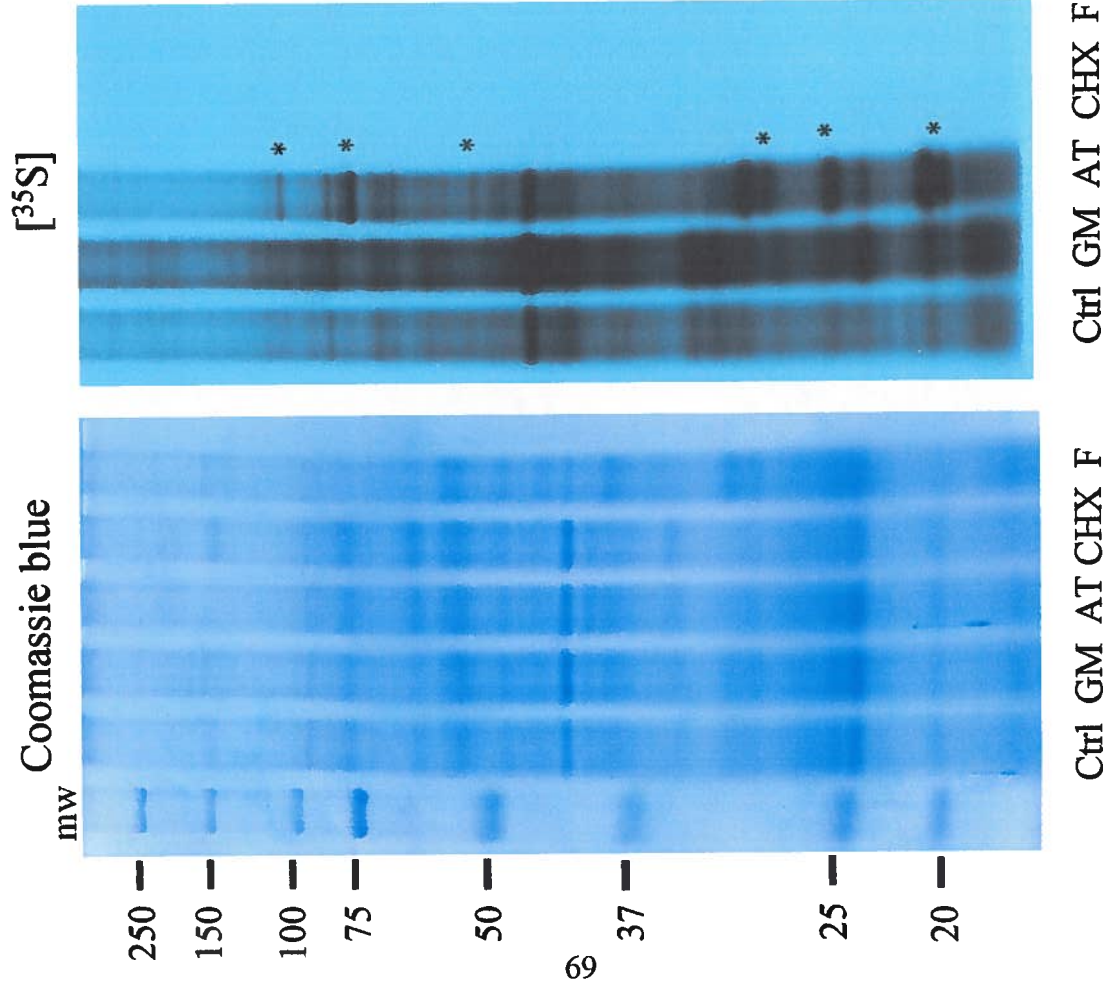


**FIGURE 3**

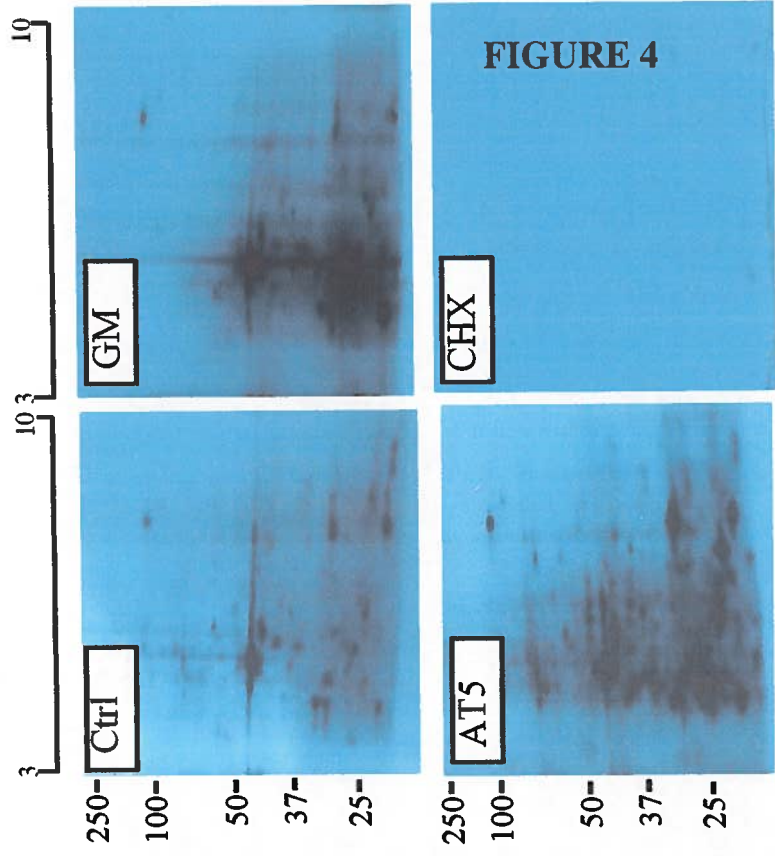


**Figure 4.** *AT induces de novo protein synthesis in human neutrophils.* Freshly isolated human neutrophils were metabolically labeled with 125  $\mu$ Ci of the Redivue Pro-Mix L- $^{35}$ S] *in vitro* cell labeling mix and incubated with buffer (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF (GM), 5  $\mu$ M AT, 10  $\mu$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

**A**



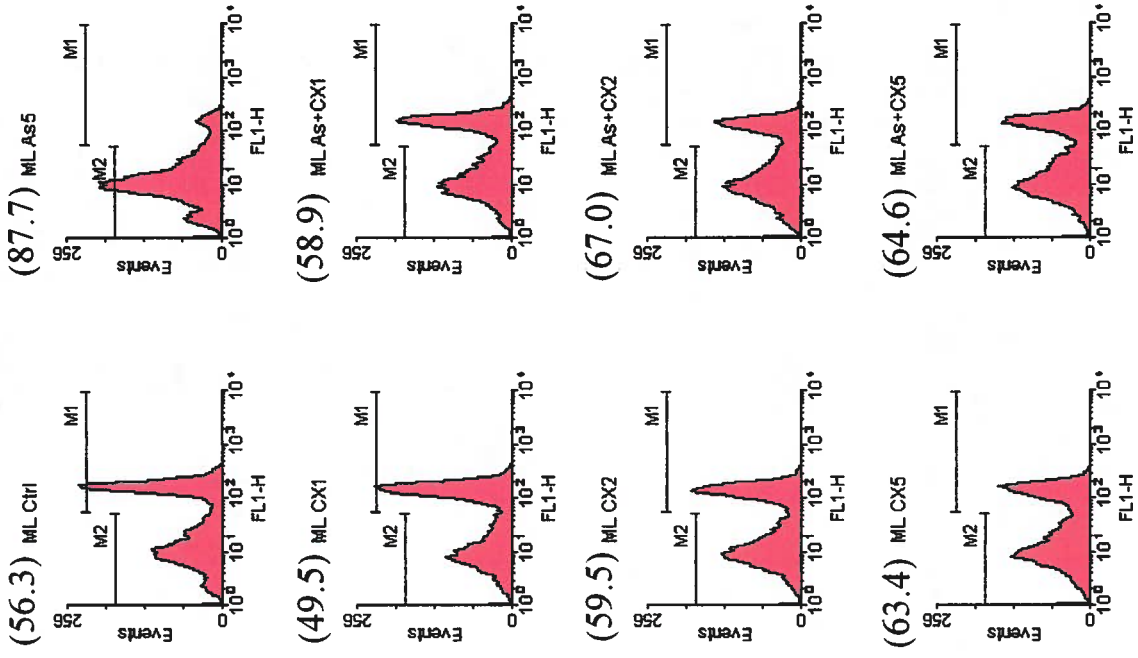
**B**



**FIGURE 4**

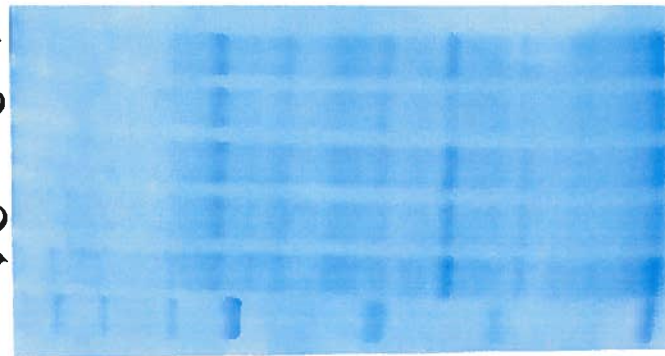
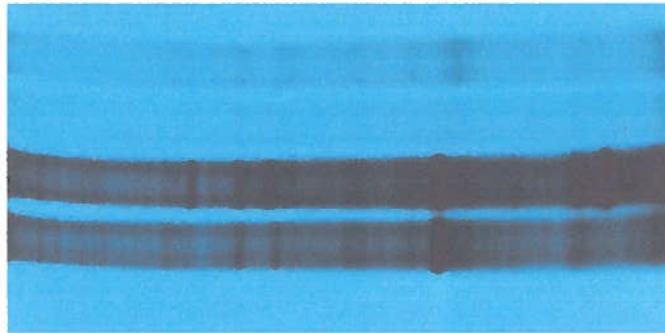
**Figure 5.** *Role of protein synthesis in AT-induced neutrophil apoptosis.* A, cells were metabolically labeled as in legend of Figure 5 and CHX was added with AT (5  $\mu$ M) in order to inhibit AT-induced de novo protein synthesis. Results are from one representative experiment out of 3. B, Cells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

**FIGURE 5**



**B**

F  
 Ctl AT CHX AT + CHX  
 F  
 Ctl AT CHX AT + CHX

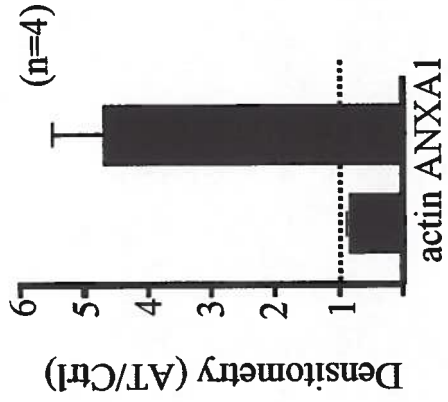
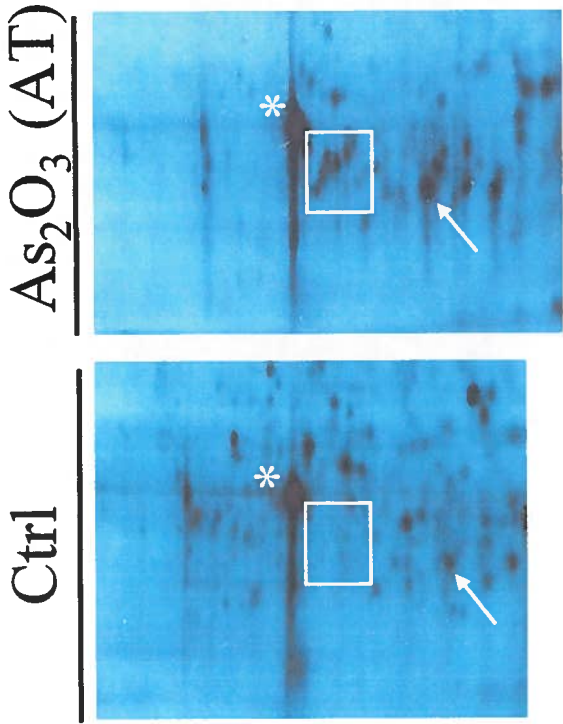


mw

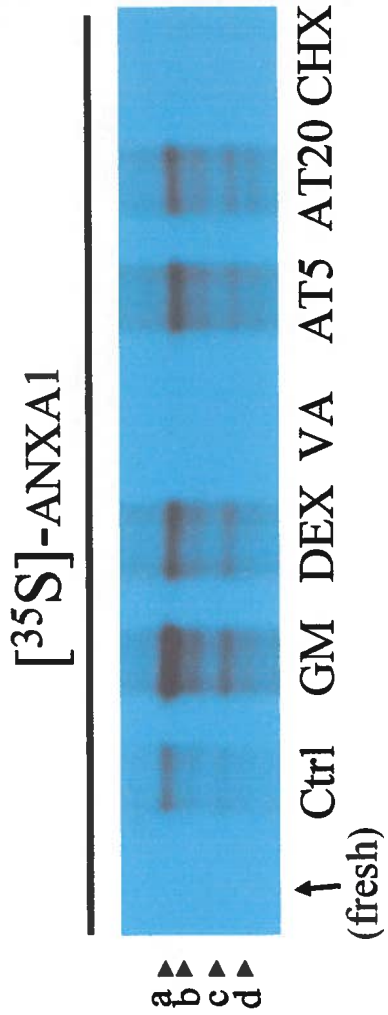
**A**

**Figure 6.** *Arsenic trioxide induces de novo protein synthesis of annexin-1 in human neutrophils.* A, freshly isolated human neutrophils were incubated for 22h with buffer (Ctrl or spontaneous apoptosis) or with 5  $\mu$ M of the pro-apoptotic drug arsenic trioxide ( $As_2O_3$  or AT) in the presence of 125  $\mu$ Ci of the Redivue Pro-Mix L- $[^{35}S]$  in vitro cell labeling mix, and 2D-SDS-PAGE and identification of annexin-1 (arrow) was performed as detailed in Materials and Methods. \*, actin; box, a group of unidentified polypeptides newly synthesized in response to AT. The densitometric analysis (right part of the figure) was performed as described in Materials and Methods. B, immunoprecipitation was performed with the anti-ANXA1 antibody using metabolically-labeled cell lysates, in order to monitor de novo synthesis of ANXA1 in response to buffer (Ctrl), the anti-apoptotic agents GM-CSF (GM) and dexamethasone (Dex), the pro-apoptotic agents arsenic trioxide (AT5) and VAA-I (VA), or the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). The letters a, b, c, and d illustrate four fragments of ANXA1 of about 38, 33, 30 and 28 kDa, respectively. Results are from one representative experiment out of 4.

**A**



**B**

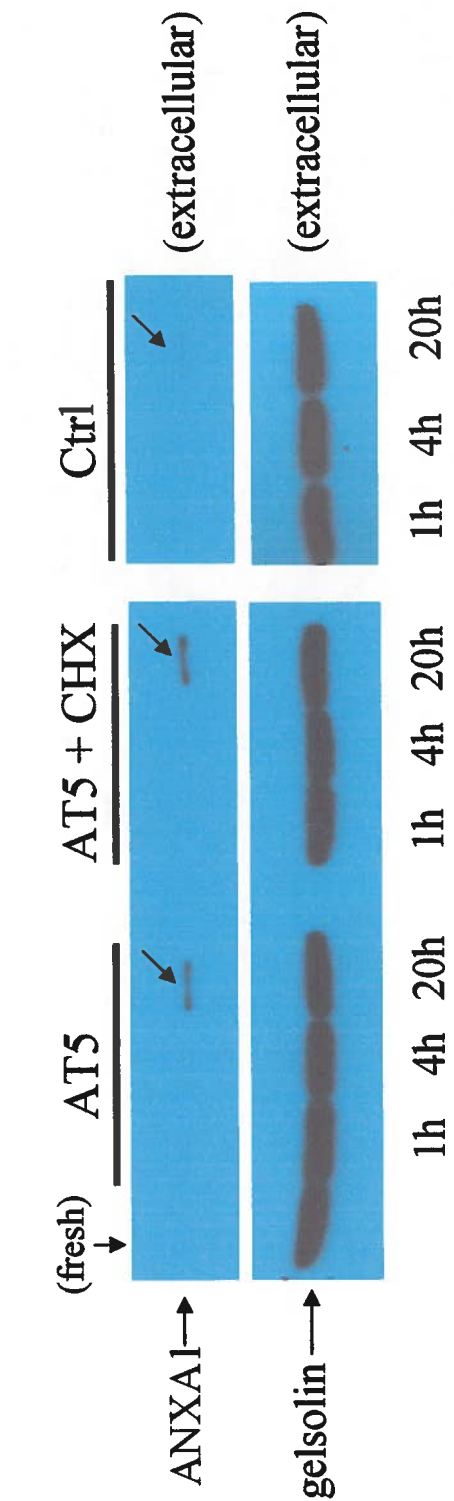


**FIGURE 6**

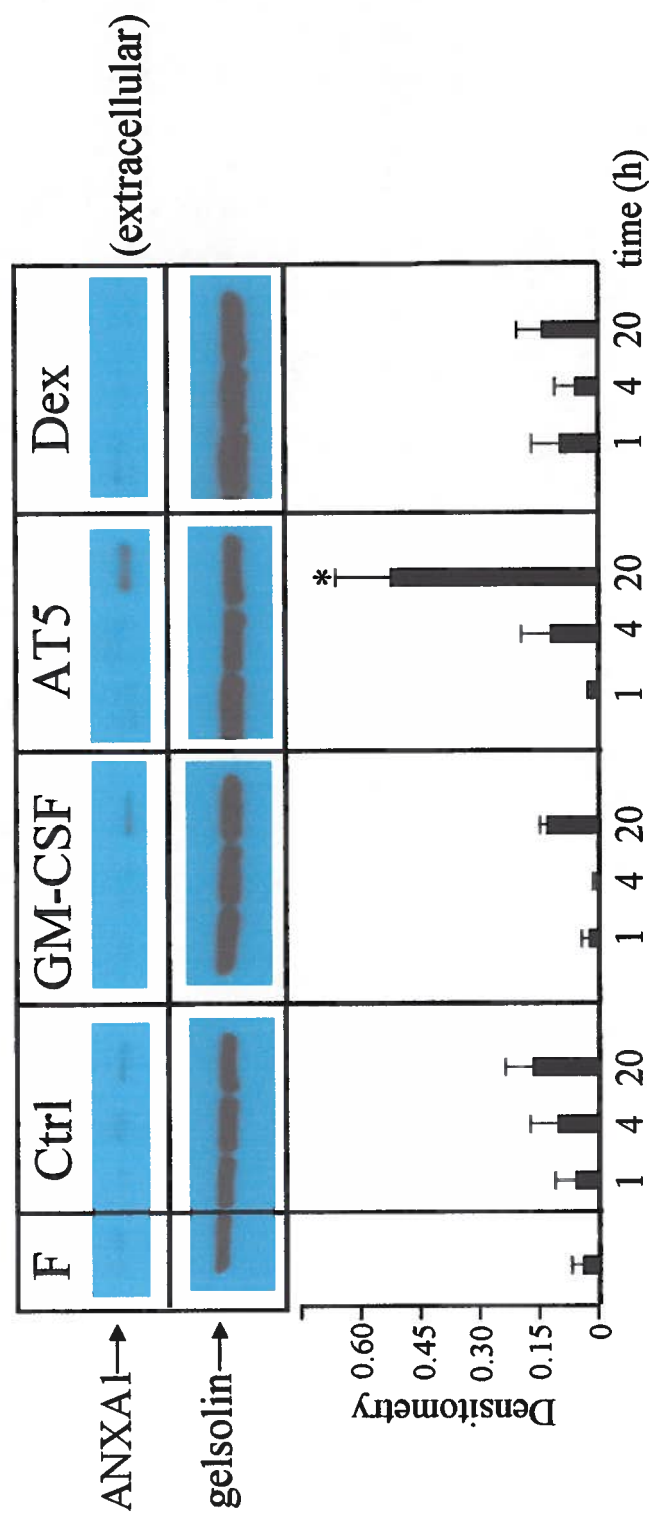
**Figure 7. Arsenic trioxide (AT) induces the release of pre-existing ANXA1.** A. Freshly isolated neutrophils were incubated for the indicated period of times with buffer (Ctrl), AT5 in the presence or absence of cycloheximide (CHX) and the supernatants were harvested as described in Materials and Methods in order to detect the presence of ANXA1 (arrows) by western blot. In parallel, the plasma gelsolin was monitor in order to verify protein loading. Note that treatment with CHX did not alter ANXA1 release. Results are from one representative experiment out of 4.

B, Cells were treated as above in the presence of buffer GM-CSF, AT or dexamethasone (Dex) and the release of ANXA1 was assessed by western blot as well as the level of expression of plasma gelsolin. Results are from one representative experiment out of 4. Bottom, results of the densitometric analysis indicating that AT significantly induced the release of ANXA1. Results are means  $\pm$  SEM (n=4).





**B**



**FIGURE 7**



## **2. ARTICLE 2**

### **Titre**

Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-COD cells via caspases: lamin **B**<sub>1</sub> is a novel target of VAA-I.

### **Auteurs**

Valérie Lavastre, Sonia Chiasson, Hélène Cavalli, Denis Girard

### **Sous presse dans**

*Leukemia Research*

### **Contribution personnelle**

J'ai réalisé les expériences concernant l'implication des caspase-6 et -8 dans la dégradation de la vimentine et de la gelsoline induite par la VAA-I. J'ai donc effectué les expériences d'immunobuvardage de type Western avec les divers inhibiteurs de caspases. Ces expériences sont importantes pour l'article car elles ont permis de montrer la sélectivité des caspases vis-à-vis des protéines du cytosquelette. En effet, la caspase-6 est impliquée dans la dégradation de la gelsoline mais pas dans celle de la vimentine, alors que la caspase-8 n'est quant à elle pas impliquée dans ces dégradations. Finalement, j'ai contribué à la correction du manuscrit.

### **Contribution des autres auteurs**

Valérie Lavastre : Elle est l'auteur principal de l'article, elle a réalisé la majorité des expériences présentées, notamment les tests d'apoptose des PLB-985 et X-CGD avec la VAA-1, les expériences de dégradation de la gelsoline, l'implication des caspases dans l'apoptose, la dégradation de la lamine-B en fonction du temps d'incubation et le rôle de plusieurs caspases dans la dégradation de la lamine-B. Elle a également aidé à la rédaction et à la correction du manuscrit.

Sonia Chiasson: Elle a effectué les expériences sur l'expression des caspases -3 et -8 par les PLB-985 et les X-CGD. Pour ce faire, elle a dû réaliser des expériences de RT-PCR avec les cellules stimulées avec de la VAA-1. Elle a également contribué à la correction du manuscrit.

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

## 2.2 Résumé de l'article 2 en Français

La Viscum album agglutinine-(VAA-1) est un puissant inducteur d'apoptose et possède une activité anti-tumorale importante. Nous avons déterminé que les cellules PLB-985 et leurs semblables déficientes en  $gp^{91}_{plwx}$ , les X-CGD (désordre chronique granulomateux), étaient similairement sensibles à l'induction d'apoptose par la VAA-1, comme nous l'ont montré les expériences de cytologie, de fragmentation de l'ADN et de dégradation de la gelsoline, une protéine du cytosquelette. Les deux types cellulaires se sont avérés exprimer la caspase-3 et la caspase-8, et celles-ci sont activées par la VAA-1. Nous démontrons finalement que la lamine B<sub>1</sub> est une nouvelle cible de la VAA-1 puisque cette protéine du cytosquelette est également fragmentée lors de l'apoptose induite par cet agent, phénomène bloqué par des inhibiteurs de caspases exécutrices et de caspase-6, mais préservé malgré l'utilisation d'un inhibiteur de caspase-8.

## 2.3 Article 2 tel qu'il sera publié sous peu

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

### 3. ARTICLE 3

#### **Titre**

Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils.

#### **Auteurs**

Valérie Lavastre, Sonia Chiasson, Hélène Cavalli, Denis Girard

#### **Publié dans**

*British Journal of Haematology*, vol. 130 (4), p. 527-535.

#### **Contribution personnelle**

Cet article est le second où je figure comme co-auteur. J'ai contribué à la réalisation d'une figure, celle portant sur la dégradation de la gelsoline chez les éosinophiles humains et j'ai aidé Valérie Lavastre dans les expériences menant à la réalisation des autres figures de l'article. La figure que j'ai réalisée seule montre que les protéases impliquées dans l'apoptose et la dégradation de la gelsoline induites par la VAA-I ne sont pas les mêmes chez les éosinophiles que chez les cellules de la lignée humaine de type éosinophile, les AML14.3D10. Ces résultats nous informent que les AML14.3D10 diffèrent des éosinophiles isolés à partir du sang humain et nous avisent qu'il faut être prudent lors de l'extrapolation des données obtenues avec les AML aux éosinophiles. J'ai également aidé à la correction de ce manuscrit.

#### **Contribution des autres auteurs**

Valérie Lavastre : Elle est l'auteur principal, elle a donc effectué la majorité des expériences, notamment celles d'induction d'apoptose des AML par la VAA-I, la dégradation de la gelsoline, de la paxilline, de la vimentine et de la lamine B<sub>1</sub> mais pas de la vinculine ni de l' $\alpha$ -tubuline, et l'implication des caspases dans chacun des cas. Elle a

également montré que la VAA-I induisait l'apoptose des éosinophiles humains et elle a contribué à la correction du manuscrit.

Sonia Chiasson : Elle a effectué les expériences d'expression des caspases chez les AML par technique de RT-PCR et elle a contribué à la correction du manuscrit.

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

### 3.1 Résumé de l'article 3 en Français

Malgré qu'une panoplie d'agents soient reconnus pour induire l'apoptose des neutrophiles humains, on en connaît très peu qui l'induisent chez les éosinophiles. Comme ces derniers sont des granulocytes jouant un rôle de premier plan dans l'inflammation et les réactions allergiques telles que l'asthme, nous nous sommes penchés sur ces cellules et nous sommes demandés si la *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I), un agent pro-apoptotique, allait induire leur apoptose. Nous avons déterminé que la VAA-I induisait l'apoptose des cellules de la lignée humaine de type éosinophile, les AML14.3D10 (3D10) et que ces cellules exprimaient les caspases-1,-2,-3,-4,-7,-8,-9 et- 10. La VAA-I a aussi induit la dégradation de plusieurs protéines du cytosquelette dont la gelsoline, phénomène bloqué par un inhibiteur des caspases exécutrices, le z-VAD-FMK (z-VAD). La paxilline, la vimentine et la lamine B<sub>1</sub> ont également été dégradées par les caspases chez les 3D10 activées. La VAA-I a aussi activé les caspases-3 et -8, mais un inhibiteur de caspase-8 n'a pas pu bloquer l'apoptose induite par la VAA-I comme l'a fait le z-VAD avec succès. Nous démontrons aussi que la VAA-I induit l'apoptose des éosinophiles humains isolés du sang humain, phénomène accompagné par une dégradation de la gelsoline et de la lamine B<sub>1</sub>. Contrairement aux 3D10, la dégradation de la lamine B<sub>1</sub> ainsi que l'apoptose chez les éosinophiles n'ont pas été bloquées par le z-VAD. Nous concluons que la VAA-I est un puissant inducteur d'apoptose des éosinophiles humains et que des protéases autres que celles inhibées par le z-VAD chez les 3D10 sont impliquées dans cette apoptose et cette dégradation de la lamine B<sub>1</sub>. Conséquemment, la VAA-I pourrait être un agent utilisé pour réduire le nombre d'éosinophiles dans certaines maladies où ils sont impliqués.

### 3.2 Article 3 tel que publié



# *Viscum album* agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils

Valérie Lavastre, Sonia Chiasson, Hélène Cavalli and Denis Girard

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

## Summary

Although there are several agents that induce neutrophil apoptosis, few are known as inducers of eosinophil apoptosis. As eosinophils are potent effector cells contributing to allergic inflammation and asthma, we investigated whether the pro-apoptotic agent *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) could induce eosinophil apoptosis. VAA-I was found to induce apoptosis in eosinophilic AML14.3D10 (3D10) cells and that these cells expressed caspases-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9 and -10. VAA-I-induced gelsolin degradation was reversed by the pan-caspase inhibitor *N*-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl ketone (z-VAD). Also, paxillin, vimentin and lamin B<sub>1</sub> were cleaved by caspases in VAA-I-induced 3D10 cells. VAA-I activated caspase-3 and -8 in 3D10 cells but, unlike z-VAD, treatment with a caspase-8 inhibitor slightly reversed apoptosis. Treatment of purified human eosinophils with VAA-I was found to induce apoptosis, degradation of gelsolin and lamin B<sub>1</sub>, but unlike 3D10 cells, cleavage of lamin B<sub>1</sub> and cell apoptosis was not reversed by z-VAD. We conclude that VAA-I is a potent inducer of eosinophil apoptosis and that proteases other than those inhibited by z-VAD in 3D10 cells are involved in VAA-I-induced peripheral blood eosinophil apoptosis and lamin B<sub>1</sub> cleavage. Thus, VAA-I represents a potential candidate for the reduction of the number of eosinophils in diseases where they play important roles.

**Keywords:** AML14.3D10 cells, eosinophils, caspases, cytoskeleton.

Received 11 April 2005; accepted for publication 1 June 2005

Correspondence: Dr Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6.  
E-mail: denis.girard@iaf.inrs.ca

The mistletoe lectin *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) is a 63-kDa galactoside-specific plant lectin that belongs to the family of type II ribosome-inactivating proteins, which have been extensively applied in clinical fields as anticancer adjuvants (Olsnes *et al*, 1982). The VAA-I molecule consists of two distinct subunits, the A chain (29 kDa) and the B chain (34 kDa). The A chain confers the property of inhibition of protein synthesis to the VAA-I molecule by acting as a ribosome-inactivating agent. This is caused by RNA-glycosidase activity that inhibits *N*-glycosylation of a single adenine within a universally conserved GAGA sequence on the 28S rRNA (Hostanska *et al*, 1995, 1997). The B chain allows the VAA-I molecule to bind to terminal galactoside residues on membranes of various cells. Extracts from mistletoe are widely used in the treatment of a variety of cancers and are known to modulate non-specific immune functions, such as the increase

in number and activity of natural killer cells and induction of cytokine production (Hajto *et al*, 1990, 1997, 1998).

*Viscum album* agglutinin-I was recently found to be a potent inducer of apoptosis in different cells including human granulocyte neutrophils (Hostanska *et al*, 1997; Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002). Caspases were also found to be involved in the degradation of cytoskeletal proteins in VAA-I-induced human neutrophil apoptosis (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002). Although VAA-I is known to induce apoptosis in neutrophils, its ability to induce such responses is presently unknown in other granulocyte cells.

Eosinophils are known to play a pivotal role in the pathogenesis of asthma and allergic diseases (Gleich, 2000). These cells have been found to express the common caspase-3, -6, -7, -8 and -9 (Dewson *et al*, 2001) and to undergo apoptosis in different conditions. Apoptosis of eosinophils and

subsequent elimination by phagocytes is thought to be crucial for the resolution of airway inflammation, which occurs with asthma. As of this, and as fewer pro-apoptotic agents have been identified in eosinophils than in neutrophils, the identification of new agents that can induce eosinophil apoptosis represents an important step for the development or improvement of therapeutic strategies that target eosinophils.

The human AML14.3D10 (3D10) cell line was recently established and has rapidly become an important laboratory tool for studying eosinophil cell physiology (Paul *et al*, 1994; Baumann & Paul, 1998; Qin *et al*, 2002). Except for caspase-3 and -8 (Qin *et al*, 2002), the expression of other caspases in 3D10 cells has never been examined. In the present study, we were interested in determining whether VAA-I could induce eosinophil apoptosis and investigating the expression of various caspases in 3D10 cells. We also investigated the potential role of caspases in the degradation of cytoskeletal proteins in response to VAA-I treatment. In addition to caspase-3 and -8, we found that 3D10 cells express caspases-2, -4, -7, -9 and -10 at the mRNA level. We demonstrated in this study that VAA-I induced apoptosis in 3D10 cells and in human eosinophils and that caspases are involved in the degradation of different, but not all, cytoskeletal proteins that we have tested. In particular, unlike neutrophils and 3D10 cells, treatment with the pan caspase inhibitor, *N*-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-methyl-fluoromethyl ketone (*z*-VAD-fmk), did not reverse VAA-I-induced apoptosis and degradation of lamin B<sub>1</sub> in eosinophils.

## Materials and methods

### Chemicals and agonists

The monoclonal antibodies (mAbs) to human cytoskeletal proteins (anti-gelsolin, clone GS-2C4; anti-paxillin, clone PXC-10; anti-vinculin, clone Vin-11-5; anti-vimentin, clone Vim 13.2; anti- $\alpha$ -tubulin, clone B-5-1-2, anti- $\beta$ -tubulin, clone 2-28-33 and VAA-I) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, Canada). The pan caspase inhibitor *z*-VAD-fmk and the caspase-8 inhibitor-I (IETD-CHO) were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA) and were dissolved in endotoxin-tested dimethyl sulphoxide (DMSO; Sigma) at a final concentration of 0.1% (v/v) as previously published (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002). The polyclonal anti-lamin B<sub>1</sub> antibody (clone C-20) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); the mAb anti-procaspase-8 was from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA); and the rabbit anti-procaspase-3 polyclonal antibody was purchased from BD Pharmingen, San Diego, CA, USA.

### Cell cultures and differentiation

Human eosinophilic 3D10 cells were generated and kindly provided by Drs C. C. Paul and M. Baumann (Wright State University, Dayton, OH, USA (Paul *et al*, 1994; Baumann &

Paul, 1998), myelomonoblastic cell line PLB-985 and X-CGD cells [prepared from PLB-985 cells after disruption of the X-chromosome-linked gp91-phox gene; these cells do not generate reactive oxygen species (ROS)] (Hiraoka *et al*, 1998) were a gift from Dr Y. Pommier (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA). HL-60 cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). HL-60, PLB-985 and X-CGD cells were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 complete medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics; 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA); for 3D10 cells,  $5 \times 10^{-5}$  mol/l  $\beta$ -mercaptoethanol and 1 mmol/l sodium pyruvate were added to the medium. Cells were cultivated at a cell density between  $2 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$ /ml and the medium was changed three times per week. Before performing the different experiments, cell viability was systematically verified by trypan blue exclusion and was routinely >98%.

### Granulocyte isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc, QC, Canada), as previously described (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to our institutionally approved procedures. Experiments were performed when cell purity was >95% as verified by cytology from cytocentrifuged preparations coloured by the Hema 3 Stain Set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ, USA). Cell viability was verified by trypan blue exclusion and was always >98%.

When >5% of contaminating eosinophils were detected in some preparations, eosinophils were separated from neutrophils by negative immunomagnetic selection using anti-human CD16-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Purity and viability after eosinophil isolation were routinely >99% as assessed as above.

### Assessment of apoptosis by cytology

Cells ( $1 \times 10^6$ /ml) were untreated or treated with 1000 ng/ml VAA-I for 18 h and cytocentrifuged preparations of 3D10 cells ( $\approx 200 \mu$ l) were performed as described above; cells were examined by light microscopy at 400 $\times$  final magnification. In other experiments, apoptosis was assessed by staining DNA with Hoechst reagent. Briefly, an aliquot of 200 000 cells was harvested and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then fixed in 25% ethanol, stained with Hoechst (5.6  $\mu$ g/ml) and incubated at 37°C for 30 min and observed with a Leica fluorescent microscope (Deerfield, Wetzlar, Germany). Images were digitalised using IMAGEPRO PLUS software version 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Cells harbouring characteristic segmented nuclei

were scored as apoptotic. For the experiments with human eosinophils, apoptosis was assessed by flow cytometry according to the fluorescein isothiocyanate (FITC)-annexin V binding assay as described previously (Savoie *et al*, 2000).

#### Visualisation of DNA fragmentation by agarose gels

Cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in the presence or absence of VAA-I (1000 ng/ml) for 12 h, harvested and washed twice with PBS. The pellets were treated with lysis buffer containing 50 mmol/l Tris-HCl pH 8, 20 mmol/l EDTA, 2% sodium dodecyl sulphate (SDS; Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) and 100 µmol/l proteinase K (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) for 2 h at 60°C. Cells were then put on ice for 10 min and 1.5 mol/l NaCl was added for protein precipitation. The cells were centrifuged and RNase (20 µg/ml; Sigma) was added to the supernatant and incubated for 1 h at 37°C. DNA was precipitated with 100% ethanol for 30 min at -20°C. After centrifugation, the DNA pellets were washed with 70% ethanol, air-dried and mixed in TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 1 mmol/l EDTA). DNA was subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel containing ethidium bromide at 60 V for 2 h and visualised under UV light. The presence of apoptosis was indicated by the appearance of a characteristic DNA ladder formation.

#### Reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from human 3D10, HL-60 and neutrophil cells using the absolutely RNA reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). For the RT reaction, total RNA (500 ng) was primed with random primer pd(N)<sub>6</sub> (Amersham, Baie d'Urfé, QC, Canada) and reverse-transcribed into cDNA with 200 units of Moloney-murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), according to manufacturer's instructions, in a final volume of 25 µl. The mixture was incubated at 37°C for 1 h. PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR System model 2400 (Perkin Elmer Wallac/Can, Wood Bridge, ON, Canada). PCR mixtures (25 µl) contained 1 µl of the RT reaction, 10 pmol of each primer, each dNTP (0.1 mmol/l), 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> and 0.5 unit of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The primers used to amplify caspase mRNA are listed below (Santos-Beneit & Mollinedo, 2000):

Caspase-1 Forward 5'-CGACAAGGTCCTGAAGGAGA-3'  
Reverse 5'-CATCTGGCTGCTCAAATGAA-3'  
Caspase-2 Forward 5'-CAGTTACCTGCACACCGAGTCAC-  
GG-3'  
Reverse 5'-AGCCGCATATCATGTCTGAGCGCG-3'  
Caspase-3 Forward 5'-TTTGTGTTGTGTGCTTCTGAGCC-3'  
Reverse 5'-ATTCTGTTGCCACCTTTCGG-3'  
Caspase-4 Forward 5'-TCGGGTCATGGCAGACTCTATGC-3'  
Reverse 5'-ATGCACAGTCCGCAGATTCCC-3'

Caspase-7 Forward 5'-CGATCCATCAAGACCACCCG-3'  
Reverse 5'-GGAATAGGCGAAGAGGAAGTCAGC-3'  
Caspase-8 Forward 5'-GGGACAGGAATGGAACACA-  
CTTGG-3'  
Reverse 5'-TCAGGATGGTGAGAATATCATCGCC-3'  
Caspase-9 Forward 5'-AACAGGCAAGCAGCAAAGTT-3'  
Reverse 5'-TCCATCTGTGCCGTAGACAG-3'  
Caspase-10 Forward 5'-TGCTGAGTGAGGAAGACCC-3'  
Reverse 5'-CCTCTGTGGTCCGATTTCAT-3'

As internal controls, β-actin cDNA and 18S cDNA were amplified by PCR using primers: 5'-GCGGGA-AATC-GTGGTGACATT-3' (forward) and 5'-GATGGAGTTGA-AGGTAGTTTC-GTG-3' (reverse) for β-actin and primers 5'-TCCGATAACGAACGAGACTC-3' (forward) and 5'-CAG-GGACTTAATCAACGCAA-3' (reverse) for 18S. After 3-min incubation at 95°C, PCR reactions were carried out for 30 s at 94°C, 30 s for annealing and 45 s at 72°C (the number of cycles varied between 26 and 35, depending on the linear phase of amplification for each gene or in order to see a specific isoform); followed by further incubation for 7 min at 72°C. The annealing step was carried out at 60°C with 35 PCR cycles (caspase-1); 69°C, 26 cycles (caspase-2); 65°C, 28 cycles (caspase-3); 69°C, 35 cycles (caspase-4); 67°C, 35 cycles (caspase-7); 69°C, 30 cycles (caspase-8); 69°C, 38 cycles (caspase-9); 68°C, 38 cycles (caspase-10); 62°C, 19 cycles (β-actin); 56°C, 10 cycles (18S). The PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis and visualised by ethidium bromide staining. The expected sizes of PCR products for each gene were as follows: caspase-1 (1076 bp), caspase-2 (325 bp), caspase-3 (400 bp), caspase-4 (502 bp), caspase-7 (537 bp), caspase-8 (558 and 694 bp), caspase-9 (492 bp), caspase-10 (514, 551 and 643 bp), β-actin (232 bp) and 18S (315 bp).

#### Western blot and degradation of cytoskeletal proteins

Cells ( $1 \times 10^6$  or  $10 \times 10^6$  cells/ml for neutrophils in 24-well plates) were incubated with or without 1000 ng/ml VAA-I in the presence or absence of 50 µmol/l z-VAD-fmk (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002) or the diluent (<1% DMSO) for the indicated period of time and then harvested for the preparation of cell lysates in Laemmli's sample buffer. Aliquots corresponding to 225 000 cells were loaded and subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred from the gel to polyvinylidenedifluoride membranes. Non-specific sites were blocked with 1% bovine serum albumin in TBS-Tween (25 mmol/l Tris-HCl, pH 7.8, 190 mmol/l NaCl, 0.15% Tween-20) overnight at 4°C. Membranes were incubated with monoclonal anti-human cytoskeletal antibodies [anti-gelsolin (1:2000); anti-paxillin (1:500); anti-vinculin (1:50); anti-vimentin (1:1000); anti-α tubulin (1:500) or anti-lamin B<sub>1</sub> (1:500)] for 1 h at room temperature followed by washing and incubated with a horseradish peroxidase-labelled sheep anti-mouse IgG (1:20 000) (Bio/Can) for 1 h at

room temperature in fresh blocking solution as previously documented (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002). Membranes were washed three times with TBS-Tween and bands were revealed with the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system (Amersham; Pharmacia Biotech Inc). Protein loading was systematically verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments.

*Activation of caspase-3 and -8*

In some experiments, activation of caspase-3 (AML cells) and caspase-8 (AML, PLB-985, neutrophils) was assessed by monitoring the cleavage of the procaspase-3 or procaspase-8 forms by immunoblotting under various conditions, as indicated in the corresponding figure legend.

**Results**

*VAA-I induces apoptosis in human eosinophilic AML14.3D10 cells*

As illustrated in Fig 1A, 1000 ng/ml VAA-I induced morphological changes typical of apoptotic cells without inducing apparent cell necrosis, as assessed by trypan blue exclusion after 24 h of treatment (data not shown). DNA isolated from 3D10 cells treated for 12 h with VAA-I showed typical DNA fragmentation of apoptotic cells in the form of a ladder pattern, whereas control cells did not reveal DNA fragmentation (Fig 1B). As shown in Fig 1B, the apoptotic state and degradation of DNA were confirmed by Hoechst staining. To determine whether VAA-I had a specific effect on 3D10 cells, we isolated DNA from PLB-985 cells (WT and KO). As shown

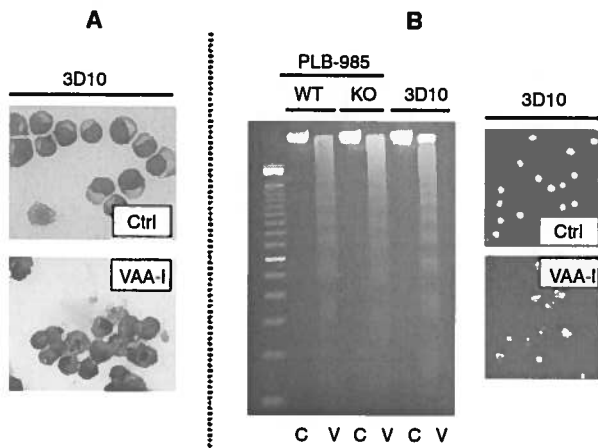


Fig 1. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces apoptosis in AML14.3D10 (3D10) cells. 3D10, PLB-985 WT or KO cells were incubated in the presence (V) or absence (control, Ctrl or C) of 1000 ng/ml VAA-I for 18 h (A) or 12 h (B) and apoptosis was assessed by cytology and by DNA fragmentation as described in *Materials and methods*. Results are from one representative experiment of 10 (A) or three (B).

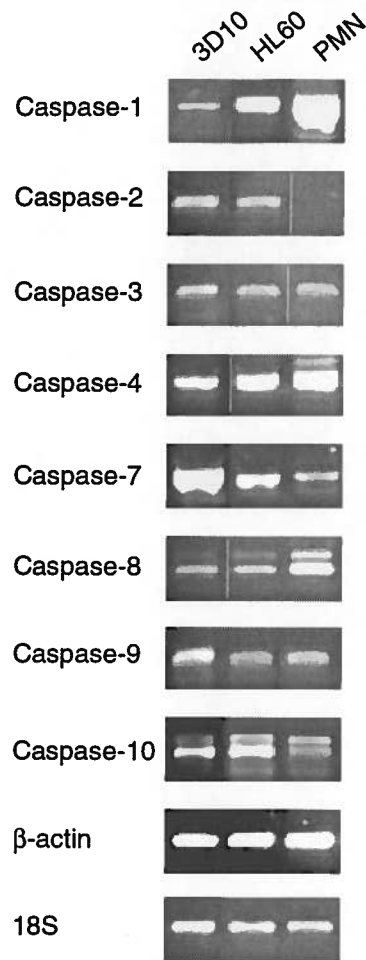


Fig 2. Expression of caspases in human eosinophilic AML14.3D10 (3D10) cells. Total RNA was purified from 3D10 and HL-60 cells and from neutrophils (PMN) and subjected to semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis with oligonucleotide primers specific for each gene as described in *Materials and methods*. Results are representative of at least three different experiments.

in Fig 1B, DNA fragmentation was also observed in these cells and, as PLB-985 KO cells are deficient in gp91<sup>phox</sup> (Hiraoka *et al*, 1998), these results demonstrated that VAA-I induced DNA degradation by a mechanism that was independent of ROS generation through activation of NADPH.

*Expression of caspases in human eosinophilic AML14.3D10 cells*

Reverse transcription-PCR analysis revealed that 3D10 cells expressed the common caspases-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9 and -10 at the mRNA level (Fig 2). When compared with human neutrophils, this eosinophilic cell line differs in regard to caspase-2 expression. However, when compared with promyelocytic HL-60 cells, caspase expression (including caspase-2) was similar between these two cell lines. 3D10 cells expressed

two isoforms of caspase-8 and caspase-10, whereas at least three caspase-10 isoforms were detected in HL-60 cells and neutrophils.

#### VAA-I induces the degradation of the cytoskeletal protein gelsolin

We recently demonstrated that VAA-I induced the degradation of gelsolin in mature human neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002). In order to determine whether gelsolin was cleaved by VAA-I in eosinophilic 3D10 cells and to determine whether caspase-3-like activity occurs (Kothakota *et al*, 1997), cells were treated with VAA-I for 18 h in the presence or absence of z-VAD-fmk and immunoblotting was performed with corresponding cell lysates. As illustrated in Fig 3, VAA-I induced gelsolin degradation via caspases. Note the disappearance of the cleaved fragment when z-VAD-fmk was added to the culture (arrowhead, lanes 4 and 5 Fig 3) as well as the reappearance of the native form of gelsolin in lane 6. Activation of caspase-3 in VAA-I-induced 3D10 cells was further supported by the cleavage of the procaspase-3 form (Fig 3, inset).

#### VAA-I induces the degradation of paxillin and vimentin via caspases, but not vinculin or $\alpha$ -tubulin

*Viscum album* agglutinin-I was previously found to induce the degradation of other cytoskeletal proteins in mature human neutrophils (Lavastre *et al*, 2002), but this has never been studied in eosinophils. VAA-I induced the degradation of paxillin (Fig 4A), another microfilament-associated protein (MFAP), as well as the intermediate filament (INFIL) protein vimentin, via caspases (Fig 4B). Degradation of cytoskeletal protein by caspases caused by VAA-I-induced eosinophil apoptosis is not a general mechanism, because the MFAP vinculin (Fig 4C),  $\alpha$ -tubulin (Fig 4D) and  $\beta$ -tubulin (data not shown) were not cleaved by caspases or other proteases.

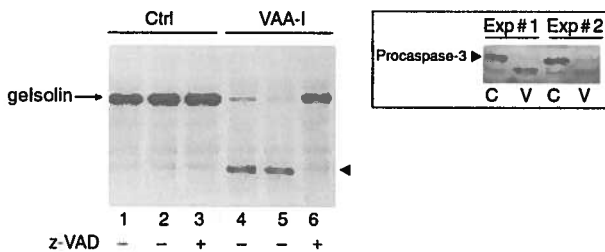


Fig 3. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces cleavage of gelsolin by a caspase-dependent mechanism in AML14.3D10 cells. Cells were incubated with or without VAA-I in the presence (+) or absence (-) of 50  $\mu$ mol/l *N*-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl ketone and expression of gelsolin was performed as described in *Materials and methods*. Results are from one of four representative experiments. Lanes 2 and 5, 0.1% dimethyl sulphoxide. Inset, activation of caspase-3 by VAA-I (V) as assessed by immunoblotting. Results are from two different experiments.

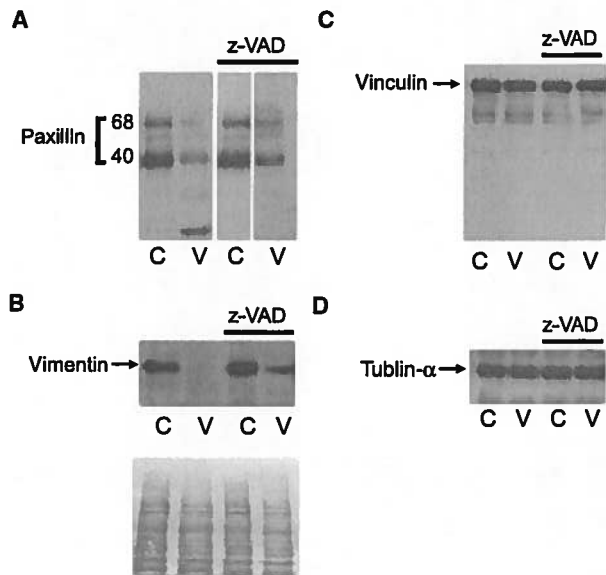


Fig 4. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces the degradation of paxillin and vimentin via caspases in AML14.3D10 cells. Cells were treated as described in the legend to Fig 3. in the presence of 0.1% dimethyl sulphoxide (C) or VAA-I (V) and potential degradation of paxillin (A), vimentin (B), vinculin (C) and tubulin- $\alpha$  (D) were assessed by immunoblotting as described in *Materials and methods*. Bottom panel in (B); one example of a corresponding Coomassie blue to illustrate equivalent loading of proteins. Results are from one of at least three experiments.

#### *Viscum album* agglutinin-I induced the degradation of the INFIL protein lamin B<sub>1</sub> via caspases

Knowing that VAA-I induced the degradation of the INFIL protein vimentin in 3D10 cells, we investigated the potential degradation of another INFIL protein lamin B<sub>1</sub>, known to be expressed in human neutrophils (Yabuki *et al*, 1999). As cleavage of lamin B coincides with the onset of DNA fragmentation (Kihlmark *et al*, 2001), we monitored its potential degradation over time. As shown in Fig 5A, lamin B<sub>1</sub> was degraded in 3D10 cells, generating a fragment of  $\approx$ 46 kDa (p46) after 5 h of treatment. After 18 h, the native protein ( $\approx$ 67 kDa) was almost completely degraded and was barely detectable. Of note, lamin B<sub>1</sub> was degraded only when cells were induced to undergo apoptosis with a treatment of 1000 ng/ml, whereas treatment with 10 ng/ml (a concentration that does not induce apoptosis) did not promote lamin B<sub>1</sub> cleavage. Degradation of DNA was clearly observed after 5 h of treatment (Fig 5B). We then investigated the role of caspase in VAA-I-induced lamin B<sub>1</sub> cleavage. Lamin B<sub>1</sub> degradation was reversed by the addition of z-VAD-fmk (Fig 5C), demonstrating that caspases are involved in this process. VAA-I activates caspase-8 in human eosinophilic 3D10 cells. Having established that VAA-I activated caspases-3 in 3D10 cells (this report), we examined whether or not VAA-I activated caspase-8, as it has been previously found that this VAA-I activates caspase-8 in human leukaemic

T cells (Jurkat) and the BJAB cell line (Bantel *et al*, 1999) and that both caspases-3 and -8 were reported to be critically involved in the regulation of neutrophil, but not eosinophil,

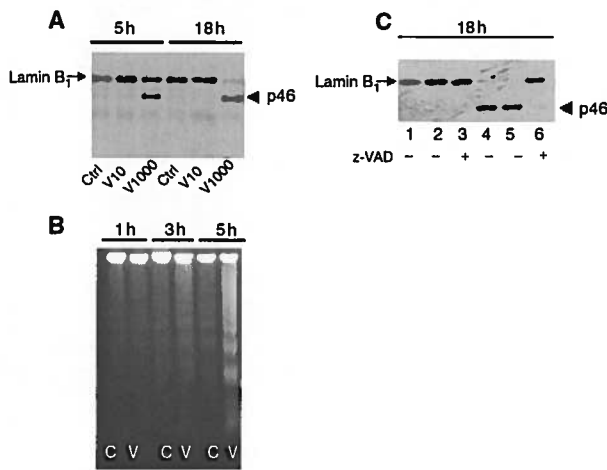


Fig 5. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces the degradation of lamin B<sub>1</sub> in eosinophil AML14.3D10 (3D10) cells via caspases. (A) 3D10 cells were treated with 0 (Ctrl), 10 (V10) or 1000 (V1000) ng/ml VAA-I, lamin B<sub>1</sub> was monitored and DNA fragmentation was assessed (B) as described in *Materials and methods*. (C) 3D10 cells were treated with (lanes 4, 5, 6) or without (lanes 1, 2, 3) VAA-I in the presence or absence of *N*-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl ketone. Cells were incubated with buffer (lanes 1 and 4) while the diluent was used in all other lanes. Results are from one of three (A, B) and four representative experiments (C).

apoptosis (Daigle & Simon, 2001). VAA-I activated caspase-8 at a concentration of 1000 ng/ml (but not at 10 ng/ml) after 18 h (but not 5 h) of treatment (Fig 6A), consistent with the apoptotic state of the cells. We then verified whether or not VAA-I also activated caspase-8 in other cells. VAA-I activated caspase-8 in human neutrophils (Fig 6B) and in PLB-985 cells (Fig 6C) after 18 h. We have previously reported that VAA-I can induce apoptosis in PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2002). As illustrated in Fig 6D, pretreatment of 3D10 cells with z-VAD-fmk reversed the pro-apoptotic effect of VAA-I, whereas treatment with the caspase-8 inhibitor only partially inhibited it.

*VAA-I induces apoptosis in human peripheral blood eosinophils and the degradation of cytoskeletal proteins: role of caspases?*

Knowing that VAA-I induces apoptosis of 3D10 eosinophil cells, we investigated whether it could similarly induce apoptosis in peripheral blood eosinophils. As illustrated in Fig 7A, VAA-I was found to induce eosinophil apoptosis, as assessed by monitoring the number of annexin-V positive cells [and by cytology (data not shown)]. In contrast to 3D10 cells, VAA-I-induced eosinophil apoptosis was not reversed by pretreatment with z-VAD, indicating that proteases other than those inhibited by z-VAD exist in these cells. Also, the role of caspases in VAA-I-induced gelsolin degradation was not reversed by treatment with z-VAD (Fig 7B).

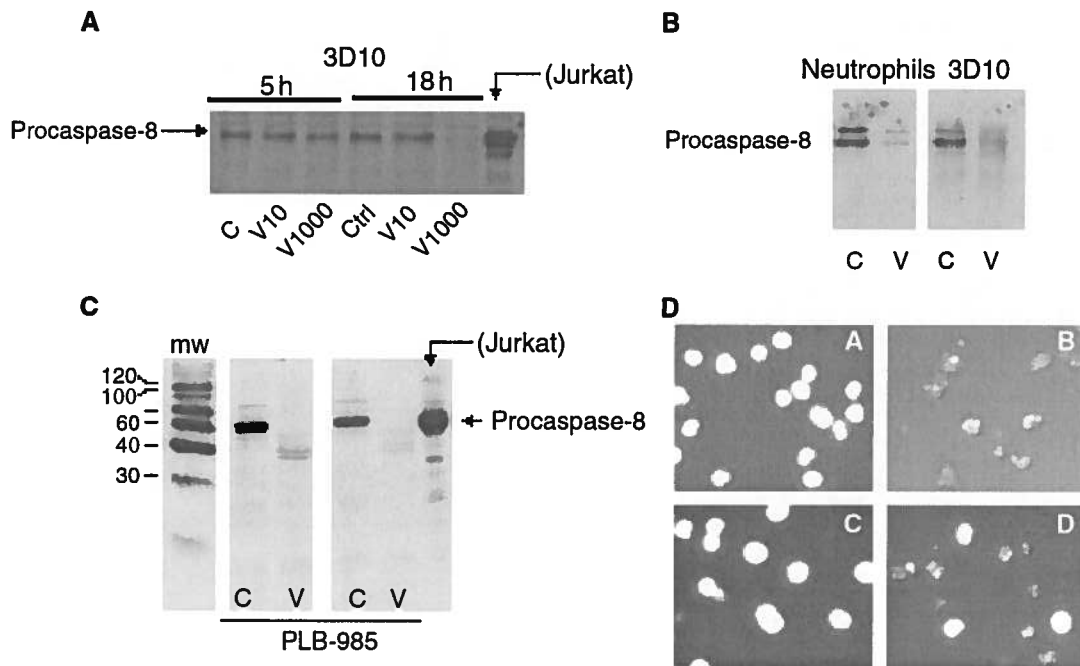
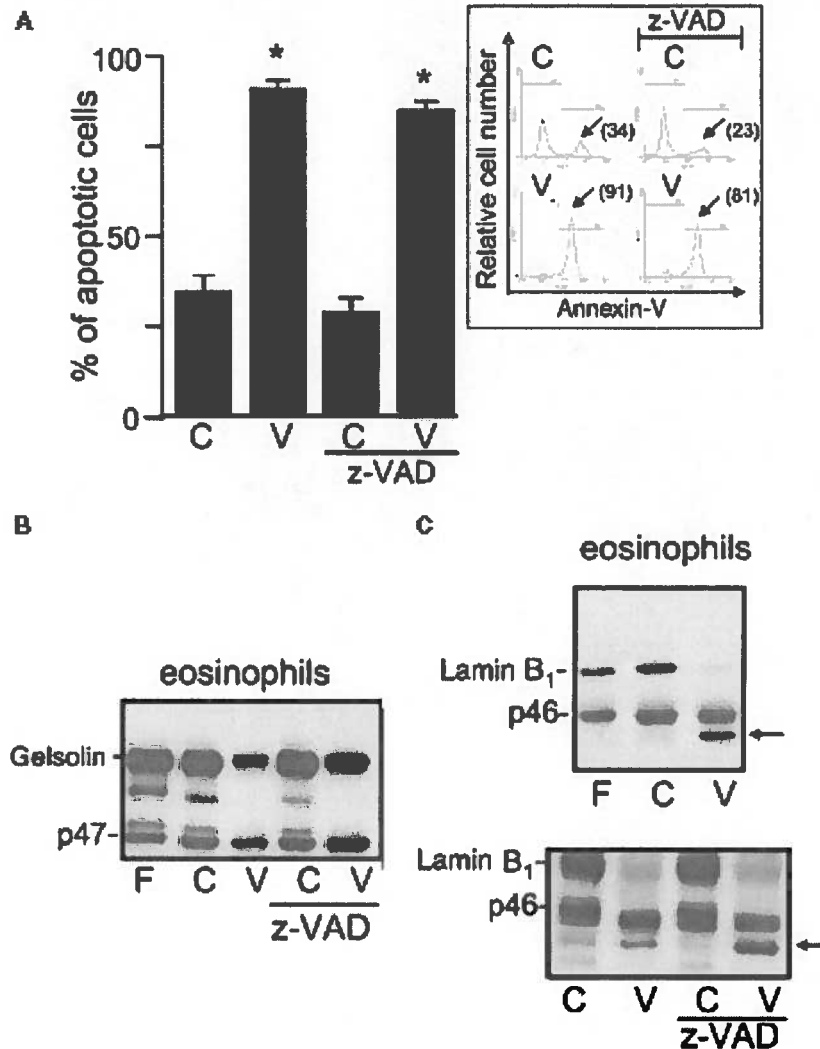


Fig 6. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces caspase-8 activation in AML14.3D10 (3D10) cells. 3D10 cells, neutrophils, or PLB-985 cells were incubated with buffer (C) or 1000 ng/ml VAA-I (V) if not specified and expression of procaspase-8 (A–C) was assessed as described in *Materials and methods*. Results are from one of at least three representative experiments. (D) 3D10 cells were pretreated with diluent (A, B), *N*-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl ketone (C) or IETD-CHO and then treated with VAA-I. Apoptosis was assessed by fluorescence observation after Hoechst staining. Results are from one of five representative experiments.



**Fig 7.** *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human peripheral blood eosinophils. Eosinophils were isolated as described in *Materials and methods* and were treated for 24 h with VAA-I (V) or buffer (C) in the presence (+) or absence (-) of *N*-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl ketone (z-VAD). (A) Apoptosis was evaluated by flow cytometry [FITC-annexin-V; mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ )]. Inset, representative data. The percentages of apoptotic cells are shown in parentheses. \* $P < 0.05$  by ANOVA. (B) and (C) Immunoblotting was performed with the anti-gelsolin or anti-lamin B<sub>1</sub> antibody respectively. Results are from one of four (B) or three representative experiments (C). (F) Freshly isolated cells. Note that z-VAD did not reverse VAA-I-induced gelsolin and lamin B<sub>1</sub> degradation.

## Discussion

This study was performed to better understand the mechanisms by which VAA-I induces cell apoptosis. In addition, because it was previously reported that the MFAP gelsolin was cleaved by caspase-3 during neutrophil apoptosis (Kothakota *et al*, 1997) and because we recently found that this phenomenon also occurred in VAA-I-induced human neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002), we investigated the role of caspases in the degradation of other cytoskeletal proteins during VAA-I-induced cell apoptosis in another granulocytic cell, the eosinophil.

We demonstrated that human eosinophilic 3D10 cells express, in addition to caspase-3 and caspase-8 (Qin *et al*,

2002), mRNA for caspases-1, -2, -4, -7, -9, and -10. In addition, we demonstrated for the first time that VAA-I induced apoptosis in these eosinophil cells at the same potency as in human neutrophils (>98%) by a caspase-dependent mechanism. With respect to neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002), VAA-I induced degradation of paxillin, gelsolin and vimentin, but not vinculin or  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin. This confirms that the pro-apoptotic effects of VAA-I and its ability to induce cytoskeletal breakdown previously observed (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002) are not restricted to neutrophils. Because 3D10 cells, but not neutrophils, express caspase-2, and VAA-I exerts the same effects in both cells, our results suggest either that the presence of caspase-2 is not obligatory for the induction of apoptosis and cleavage of the

cytoskeletal proteins, or that neutrophils express an as yet unidentified protease(s) with caspase-2-like activity. Interestingly, using Jurkat cell-free extracts immunodepleted of either caspase-3, -6 or -7, it was recently demonstrated that removal of caspase-6 or -7 had no effect on cleavage of different proteins, including gelsolin and vimentin during apoptosis (Slee *et al*, 2001). In contrast, extracts depleted of caspase-3 were incapable of supporting the proteolysis of both gelsolin and vimentin (Slee *et al*, 2001). In the present study, the fact that addition of z-VAD-fmk during VAA-I-induced 3D10 cell apoptosis reversed apoptosis as well as the cleavage of gelsolin, vimentin and paxillin (and lamin B<sub>1</sub>, see above), points to a pivotal role of caspase-3 as an executioner caspase in 3D10 cells.

In this study, we have demonstrated that lamin B<sub>1</sub> is a target of VAA-I in human eosinophils. A fragment of  $\approx 46$  kDa (p46) was observed in eosinophil 3D10 cells. The fragment p46 that we observed in the above cells confirms a previous study, which reported that lamin B<sub>1</sub> was cleaved into a fragment of 46 kDa in Fas-ligated Jurkat cells (Greidinger *et al*, 1996). Interestingly, the fragment that we observed in VAA-I-induced 3D10 cells disappeared when cells were treated with the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk. Interestingly, degradation of lamin B<sub>1</sub> occurred rapidly in 3D10 cells and this was consistent with one study reporting that lamin B<sub>1</sub> degradation occurs after 3 h in anti-Fas + cycloheximide-induced Jurkat cell apoptosis (Greidinger *et al*, 1996). When studying sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during Buffalo rat liver cell apoptosis, it was reported that the disappearance of certain proteins, including lamin B, coincided with onset of DNA fragmentation (Kihlmark *et al*, 2001). Herein, lamin B<sub>1</sub> was cleaved after 5 h of treatment with VAA-I and this was also coincident with DNA fragmentation in 3D10 cells. Lamin B and vimentin, another member of the INFIL family, are both known to be cleaved rapidly during apoptosis (Morishima, 1999; Kihlmark *et al*, 2001; Slee *et al*, 2001). We have also observed that vimentin is rapidly cleaved (within 3–5 h) in VAA-I-induced human neutrophils (V. Lavastre, unpublished observation). Our observation, that lamin B<sub>1</sub> is cleaved in 3D10 cells prior to activation of caspase-8, indicates that caspase-8 is not involved in the events leading to lamin B<sub>1</sub> degradation. Interestingly, lamin B<sub>1</sub> degradation appears to be an excellent marker of VAA-I-induced cell apoptosis, which coincides with DNA fragmentation. We propose to study lamin B<sub>1</sub> degradation as an early marker in not only VAA-I-induced cell apoptosis, but also in human neutrophils undergoing spontaneous apoptosis.

We also demonstrated that VAA-I induced apoptosis in human peripheral blood eosinophils as well as the degradation of gelsolin and lamin B<sub>1</sub>. However, treatment of eosinophils with z-VAD did not prevent cell apoptosis (using eight different blood donors) as well as degradation of gelsolin and lamin B<sub>1</sub>. This suggests that proteases other than those normally inhibited by z-VAD are involved in VAA-I-induced apoptosis in eosinophils and that this is not limited to

caspases. Interestingly, a critical role of mitochondria, but not caspases, has been reported in glucocorticoid-induced human eosinophil apoptosis (Létuvé *et al*, 2002). No matter which protease is involved, our results clearly indicate that even if VAA-I induced eosinophilic 3D10 cell apoptosis, as in peripheral blood eosinophils, the cell line is different from that of peripheral blood eosinophils, at least in terms of the proteases that are differentially activated by VAA-I.

*Viscum album* agglutinin-I acts as a very potent inducer of cell apoptosis and this offers an interesting potential therapeutic strategy in the treatment of a variety of disorders. The results presented in this report demonstrate that VAA-I is a potent inducer of 3D10 and eosinophil cell apoptosis and its use may provide a useful therapeutic approach to reduce the number of eosinophils in diseases where these cells play an important role.

## Acknowledgments

The authors thank Mary Gregory for reading this manuscript.

This study was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Valérie Lavastre holds a PhD CIHR award and Denis Girard is a scholar from FRSQ.

## References

- Bantel, H., Engels, I.H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K. & Wesselborg, S. (1999) Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Research*, **59**, 2083–2090.
- Baumann, M.A. & Paul, C.C. (1998) The AML14 and AML14.3D10 cell lines: a long-overdue model for the study of eosinophils and more. *Stem Cells*, **16**, 16–24.
- Daigle, I. & Simon, H.U. (2001) Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis. *International Archives of Allergy and Immunology*, **126**, 147–156.
- Dewson, G., Cohen, G.M. & Wardlaw, A.J. (2001) Interleukin-5 inhibits translocation of Bax to the mitochondria, cytochrome c release, and activation of caspases in human eosinophils. *Blood*, **98**, 2239–2247.
- Gleich, G.J. (2000) Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **105**, 651–663.
- Greidinger, E.L., Miller, D.K., Yamin, T.T., Casciola-Rosen, L. & Rosen, A. (1996) Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Letters*, **390**, 299–303.
- Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. & Gabius, H.J. (1990) Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Research*, **50**, 3322–3326.
- Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J. & Saller, R. (1997) Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anti-Cancer Drugs*, **8** (Suppl. 1), S43–S46.
- Hajto, T., Hostanska, K., Weber, K., Zinke, H., Fischer, J., Mengs, U., Lentzen, H. & Saller, R. (1998) Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured



- human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes *in vitro* and *in vivo*. *Natural Immunity*, **16**, 34–46.
- Hiraoka, W., Vazquez, N., Nieves-Neira, W., Chanock, S.J. & Pommer, Y. (1998) Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation*, **102**, 1961–1968.
- Hostanska, K., Hajto, T., Spagnoli, G.C., Fischer, J., Lentzen, H. & Herrmann, R. (1995) A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Natural Immunity*, **14**, 295–304.
- Hostanska, K., Hajto, T., Weber, K., Fischer, J., Lentzen, H., Sütterlin, B. & Saller, R. (1997) A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Natural Immunity*, **15**, 295–311.
- Kihlmark, M., Imreh, G. & Hallberg, E. (2001) Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis. *Journal of Cell Science*, **114**, 3643–3653.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. & Williams, L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**, 294–298.
- 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.
- Létuvé, S., Druilhe, A., Grandsaigne, M., Aubier, M. & Pretolani, M. (2002) Critical role of mitochondria, but not caspases, during glucocorticosteroid-induced human eosinophil apoptosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **26**, 565–571.
- Morishima, N. (1999) Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action. *Genes Cells*, **4**, 401–414.
- Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. & Pihl, A. (1982) Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 13263–13270.
- Paul, C.C., Ackerman, S.J., Mahrer, S., Tolbert, M., Dvorak, A.M. & Baumann, M.A. (1994) Cytokine induction of granule protein synthesis in an eosinophil-inducible human myeloid cell line, AML14. *Journal of Leukocyte Biology*, **56**, 74–79.
- Qin, Y., Camoretti-Mercado, B., Blokh, L., Long, C.G., Ko, F.D. & Hamann, K.J. (2002) Fas resistance of leukemic eosinophils is due to activation of NF-kappa B by Fas ligation. *Journal of Immunology*, **169**, 3536–3544.
- Santos-Beneit, A.M. & Mollinedo, F. (2000) Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **67**, 712–724.
- 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.
- Slee, E.A., Adrain, C. & Martin, S.J. (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7320–7326.
- Yabuki, M., Miyake, T., Doi, Y., Fujiwara, T., Hamazaki, K., Yoshioka, T., Horton, A.A. & Utsumi, K. (1999) Role of nuclear lamins in nuclear segmentation of human neutrophils. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, **31**, 77–84.

## Discussion-Conclusion

Ce mémoire porte sur l'activation des neutrophiles humains par deux agents anti-cancéreux, le trioxyde d'arsenic ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) et la *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I); il comporte donc deux volets, un pour chacun des agents. C'est dans le cadre d'un stage universitaire que les premières expériences sur la VAA-I ont été effectuées, puis de façon ponctuelle par la suite, le projet original de cette étude portant sur l' $\text{As}_2\text{O}_3$ . L' $\text{As}_2\text{O}_3$  est un nouvel agent anti-cancéreux utilisé en clinique pour le traitement des leucémies promyélocyaires aiguës dont les mécanismes d'action sont encore très mal connus.

Les expériences réalisées pour le premier article (**article 1**) ont permis de démontrer pour la première fois que  $5 \mu\text{M}$  d' $\text{As}_2\text{O}_3$  induisait l'apoptose des neutrophiles humains après 24 heures de stimulation *in vitro*. Des études effectuées sur d'autres types cellulaires suggèrent que cet agent augmenterait le niveau intracellulaire de  $\text{H}_2\text{O}_2$  via une stimulation de la NADPH oxydase alors que d'autres proposent qu'il agirait directement sur les mitochondries pour y stimuler la formation d' $\text{O}_2^-$  (Miller *et al*, 2002, Zhou *et al*, 2003 et Chou *et al*, 2005). D'autres auteurs avancent par contre que les ROS ne sont pas impliqués chez certains types cellulaires, faisant ainsi planer l'incertitude sur la question (Uslu *et al*, 2000). Nous avons donc décidé d'explorer l'implication des ROS dans l'apoptose des neutrophiles induite par l' $\text{As}_2\text{O}_3$ , en débutant par la production d' $\text{O}_2^-$ . Nous avons ainsi démontré qu'il n'y avait pas de production d' $\text{O}_2^-$  par les neutrophiles via la NADPH oxydase (**article 1**), ce qui ne signifiait cependant pas qu'une autre source d' $\text{O}_2^-$  ou encore une autre forme de ROS, telle que le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , puissent être impliquées.

Afin de vérifier cette dernière éventualité, nous avons utilisé la catalase, enzyme dégradant le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau et en oxygène. Nous avons constaté avec surprise que la catalase inhibait l'apoptose induite par l' $\text{As}_2\text{O}_3$  chez les neutrophiles (voir la **figure 1** en annexe), ce qui signifiait indirectement qu'il devait y avoir une production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Étant donné que chez les neutrophiles la production majeure d' $\text{H}_2\text{O}_2$  passe par la NADPH oxydase, nous avons décidé de tester l'implication de cette enzyme à l'aide des lignées cellulaires PLB-985 et PLB-985 déficientes en  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ , une sous unité de la NADPH oxydase,

essentielle à son fonctionnement. Nos résultats montrent que l'apoptose induite chez les deux types cellulaires est similaire (**article 1**), ce qui montre que la production d' $H_2O_2$  par la NADPH oxydase n'est pas nécessaire à l'induction d'apoptose par l' $As_2O_3$  chez les PLB-985, des cellules immatures dans la lignée des neutrophiles.

Ensuite, nous avons utilisé la BHA, un inhibiteur des complexes I et III mitochondriaux (Fusi, Sgaragli et Murphy, 1992 et Uslu *et al*, 2000) afin de déterminer si cet organite pouvait être une source de production d' $H_2O_2$  par les neutrophiles activés avec l' $As_2O_3$ . Les résultats obtenus nous montrent que la BHA n'empêche pas l'agent d'induire l'apoptose des neutrophiles (voir la **figure 2** en annexe), et nous suggère donc qu'il n'y a pas de stimulation de la production d' $H_2O_2$  par les mitochondries.

Notre exploration de l'implication des ROS dans le mécanisme d'action de l' $As_2O_3$  sur les neutrophiles nous a donc suggéré qu'une production de  $H_2O_2$  était impliquée, et qu'elle ne provenait probablement pas de la NADPH oxydase ni de la mitochondrie. Des expériences supplémentaires pourraient éventuellement nous permettre d'identifier cette source, notamment en testant l'implication des cytochromes P450, un complexe enzymatique connu pour générer des ROS. En effet, cette famille d'enzymes catalysant une série de réactions d'oxydation et de réduction au cours desquelles des métabolites sont rendus davantage hydrosolubles afin d'être plus facilement éliminés, libère une quantité importante de ROS dans le cytoplasme (Zangar, Davydov et Verma, 2004). Il serait donc pertinent d'utiliser certains inhibiteurs à large spectre des cytochromes P450 comme l'aminobenzotriazole (ABT) simultanément à l' $As_2O_3$  sur les neutrophiles humains en culture afin de tester une éventuelle implication de ce complexe enzymatique dans le mécanisme d'action de cet agent.

Un autre mécanisme d'action de l' $As_2O_3$  proposé dans la littérature met en cause le cytosquelette (Ling *et al*, 2002, Carré *et al*, 2002 et Halicka *et al*, 2002). En effet, comme nous le mentionnons dans la première partie de ce mémoire, des études suggèrent que l'agent agirait comme stabilisateur de microtubules (Li et Broome, 1999). Nous nous sommes donc demandé si les microtubules ou d'autres composantes du cytosquelette étaient affectés chez les neutrophiles. Nos résultats montrent qu'en effet, plusieurs

composantes de ce réseau sont affectées par l'agent, c'est notamment le cas des microtubules puisque la stimulation des neutrophiles avec de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> cause la dégradation de l'α-tubuline, une des deux formes de la tubuline, polypeptide globulaire constituant les microtubules (voir la **figure 3A** en annexe), phénomène renversé par l'ajout de catalase.

Les filaments intermédiaires sont également affectés puisque la lamine B, une protéine associée à ces filaments, est dégradée en présence d'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (voir la **figure 3B** en annexe), tout comme la gelsoline, une protéine associée aux filaments intermédiaires (**article 1**). Les trois types de filaments du cytosquelette sont donc affectés par les traitements avec l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, et les ROS semblent avoir un rôle à jouer dans ce phénomène puisque l'ajout de catalase renverse cet effet. Cependant, il est possible que les ROS n'aient pas un effet direct sur les composantes du cytosquelette et que l'absence de dégradation soit tout simplement une conséquence de l'inhibition de l'apoptose causée par la catalase.

Il serait intéressant de poursuivre notre étude sur le cytosquelette et l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en explorant les effets de l'agent sur des constituants majeurs du cytosquelette tels que les dynéines et les kinésines (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000). Ces deux classes de protéines sont en effet essentielles à plusieurs fonctions du cytosquelette, comme le transport des organites le long des microtubules, la mitose et la méiose (Li et Broome, 1999 et Ling *et al.*, 2002). Une altération de ces protéines suite à un traitement des neutrophiles à l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> suggèrerait un fonctionnement possiblement altéré de chacune de ces fonctions nécessaires à la survie de toute cellule, ce qui pourrait éventuellement être mis en lien avec l'induction d'apoptose des neutrophiles par l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

L'activation des caspases est connue pour être impliquée de façon générale dans les processus d'induction d'apoptose (Janicke et al. 1998 et Lopez-Hernandez et al. 2003). De plus, la gelsoline est reconnue pour être un substrat de la caspase-3 chez plusieurs types cellulaires dont les neutrophiles (Kothakota, Azuma, Reinhard et al. 1997 et Savoie et al. 2000). Nous avons donc décidé d'explorer l'implication des caspases dans l'apoptose et la dégradation des protéines du cytosquelette sous l'effet de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Nous avons ainsi déterminé que les caspases exécutrices (caspases-1, -3, -4 et -7) jouaient un

rôle dans l'induction d'apoptose des neutrophiles par l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> puisque l'ajout d'un inhibiteur de ces caspases, le z-VAD, a empêché l'apoptose d'avoir lieu (voir la **figure 2** en annexe). De plus, nous avons remarqué que ce même inhibiteur bloquait la dégradation de la gelsoline (**article 1**) et d'autres protéines du cytosquelette, ce qui confirme que ces protéines sont des substrats des caspases chez les neutrophiles.

Fait intéressant, l'**article 1** montre également que l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induit une synthèse des protéines *de novo* et que la cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, inhibe partiellement l'apoptose induite par cet agent chez les neutrophiles. La synthèse des protéines *de novo* est donc probablement impliquée dans le mécanisme d'induction d'apoptose de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Il serait bien entendu intéressant d'approfondir notre compréhension de ce phénomène par des expériences supplémentaires en cherchant par exemple à identifier une ou plusieurs des protéines dont la synthèse est activée par un traitement avec l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

La voie d'induction d'apoptose de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> via une diminution de l'activité de la JNK phosphatase, telle que proposée dans la littérature (Huang *et al*, 1999 et Porter, Fanger et Vaillancourt, 1999) et expliquée dans la section 1 du présent mémoire, serait une autre avenue qu'il serait intéressant d'explorer afin de poursuivre notre compréhension des mécanismes d'action de cet agent sur les neutrophiles humains. En effet, cette voie éventuelle d'induction d'apoptose n'a pas encore été abordée chez les neutrophiles humains alors qu'un protocole d'immunoprécipitation suivi d'un immunobuvardage de type Western pourrait nous indiquer du moins si le traitement des neutrophiles à l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> influence ou non la phosphorylation de JNK.

L'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> peut donc maintenant s'ajouter à la liste d'agents pro-apoptotiques pour les neutrophiles humains, ce qui pourrait expliquer les cas de neutropénie observés parmi les patients leucémiques traités avec cet agent. Cette observation laisse présager que d'autres cellules du système immunitaire puissent également être affectées par l'agent et cela constitue évidemment une limite à son utilisation clinique puisqu'il pourrait en résulter une toxicité générale supérieure aux effets bénéfiques anticancéreux recherchés.

Le second volet de ce mémoire porte sur les mécanismes d'action de la VAA-I. Nous avons tenté d'approfondir les connaissances de ses mécanismes d'action, notamment chez les PLB-985. La VAA-I est reconnue pour stimuler la production de ROS par la NADPH oxydase chez la plupart des granulocytes (Hostanska *et al*, 1996, Hajto *et al*, 2005). Cependant, des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que ce n'était pas le cas des neutrophiles (Lavastre *et al*, 2002). Nous avons donc été vérifier s'il y avait une production de ROS par la NADPH oxydase chez les PLB-985, étant donné que ce sont des cellules immatures dans la lignée des neutrophiles. À l'aide de leurs semblables, les PLB-985 déficientes en gp91<sup>phox</sup>, nous avons déterminé que la production de ROS par la NADPH oxydase n'était pas essentielle à l'apoptose induite par la VAA-I (**article 2**).

Étant donné que les caspases sont des médiateurs connus de l'apoptose induite par la VAA-I (Savoie *et al*, 2000), nous avons cherché à déterminer lesquelles étaient impliquées chez les PLB-985. Nous avons ainsi montré que la caspase-3 et la caspase-8 étaient toutes deux activées lors d'un traitement avec la VAA-I (**article 2**). Nous avons ensuite entrepris d'étudier les effets de la VAA-I sur la lamine B, une protéine associée aux filaments intermédiaires, et nous avons découvert que l'agent induisait sa dégradation et que ce phénomène impliquait la caspase-6, mais pas la caspase-8 (**article 2**).

Les expériences réalisées pour le troisième article (**article 3**) ont quant à elles permis d'étendre aux éosinophiles les connaissances que nous avons des effets de la VAA-I sur les cellules du système immunitaire. Comme on pouvait s'y attendre, la VAA-I induit également l'apoptose des éosinophiles humains ainsi que des cellules de type éosinophile, les AML 14.3 D10 (**article 3**). Les caspases exécutrices sont fortement impliquées dans l'apoptose induite par la VAA-I chez les AML14.3D10 (**article 3**), mais ce n'est étrangement pas le cas chez les éosinophiles. En effet, nous avons constaté avec surprise, que le z-VAD n'inhibait pas l'apoptose induite par cet agent chez les éosinophiles (**article 3**). Cela suggère donc que, contrairement à ce qu'on retrouve chez les neutrophiles et les AML14.3D10, d'autres protéases que les caspases-1, -3, -4 et -7 sont impliquées chez les éosinophiles. Ces résultats nous indiquent que la VAA-I active différentes protéases selon les types cellulaires, et ils nous informent qu'il faut rester prudent lors de l'extrapolation des découvertes effectuées chez un type cellulaire à un

autre, même dans le cas de types cellulaires fortement apparentés comme les AML14.3D10 et les éosinophiles.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont donc apporté plusieurs éléments importants pour la compréhension des mécanismes d'action de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et de la VAA-I. Une connaissance approfondie des mécanismes d'induction d'apoptose de ces agents pourrait améliorer leur utilisation et diminuer leurs conséquences néfastes sur le système immunitaire. Il reste encore beaucoup de travail à faire avant de maîtriser leur mécanismes d'action, mais les résultats présentés dans ce mémoire ont permis de sonder quelques voies d'apoptose de ces deux agents, notamment celle des ROS, des caspases et du cytosquelette, et ainsi de fournir des éléments nécessaires à la poursuite des recherches dans ce domaine.

Le fait que l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et la VAA-I induisent l'apoptose de cellules clés du système immunitaire telles que les neutrophiles et les éosinophiles ne doit pas être perçu uniquement comme des lacunes de ces agents. En effet, la réduction du nombre de neutrophiles peut s'avérer bénéfique et même permettre le traitement de désordres ou de maladies reliées à l'inflammation chronique telle que l'arthrite rhumatoïde. La réduction du nombre d'éosinophiles peut quant à elle aider à guérir certaines allergies chroniques ou l'asthme. Nos résultats fournissent donc également des éléments utiles à l'avancement des recherches pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et des allergies, en plus de contribuer à améliorer notre compréhension des mécanismes d'action de ces agents anti-cancéreux, dans le but de potentialiser leur utilisation et de réduire leurs effets secondaires.





## Références

ABBAS, A. K., A. H. Lichtman et J. S. Pober. 1997. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia : Pennsylvania, 494 p.

AKGUL, C. Et S. W. Edwards. 2003. "Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors". Cellular Molecular Life Sciences, vol. 60, p. 2402-2408.

AKGUL, C., D. A. Moulding et S. W. Edwards. 2001 "Molecular control of neutrophil apoptosis". FEBS Letters, vol. 487, p. 318-322.

ARONSON, S. M. 1994. "Arsenic and old myths". Rhode Island Medicine, vol.77, p. 233-234.

ATENCIA, R., A. Asumendi et M. Garcia-Sanz. 2000. "Role of cytoskeleton in apoptosis". Vitamins and Hormons, vol. 58, p. 267-297.

BARJA, G. et A. Herrero. 2000. "Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals". FASEB Journal, vol. 14, p. 312-318.

BARZILAI, A. et K-I. Yamamoto. 2004. "DNA damage responses to oxidative stress". DNA repair, vol 3, p. 1109-1115.

BAUER, MK., M. Vogt, M. Los, J. Siegel, S. Wesselborg et K. Schulze-Osthoff. 1998. "Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression". Biology and Chemistry, vol. 273, p. 8048-8055.

BERSHADSKY A. D. et J. M. Vasiliev. 1988. Cytoskeleton . New York : Plenum Press. 298 p.

BLANCK, J., O. Ristau, A. A. Zhukov, A. I. Archakov, H. Rein et K. Ruckpaul. 1991. "Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway". Xenobiotica, vol. 21, p. 121-135.

BOCCI, V. 1993. "Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy". Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, vol. 7, p. 1-6.

BODNAR, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lishtsteiner et W. E. Wright.1998. "Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells". Science, vol.279, p. 349-352.

BOKOCH, GM. et BA. Diebold. 2002. "Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase" Blood, vol. 100, p. 2692-2696.

BOONSTRA, J. et J. A. Post. 2004. "Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells". Gene, vol. 337, p. 1-13.

BROWN, GE., MQ. Stewart, H. Liu, VL. Ha et MB. Yaffe. 2003. "A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(3)P and PKCδ in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase". Molecular Cell, vol. 11, p. 35-47.

BUTTKE, TM. et PA. Sandstrom. 1995. "Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes". Free Radicals Research, vol. 22, p. 389-397.

CARRÉ, M., G. Carles, N. André, S. Douillard, J. Circolini, C. Briand et D. Braguer. 2002. "Involvement of microtubules and mitochondria in the antagonism of arsenic trioxide on paclitaxel-induced apoptosis". Biochemical Pharmacology, vol. 63, p. 1831-1842.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A. 2003. "Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology". Mutation research, vol. 544, p. 289-306.

CEJAS, P., E. Casado, C. Belda-Iniesta, J. De Castro, E. Espinosa, A. Redondo, M. Sereno, M. A. Garcia-Cabezas, J. A. F. Vara, A. Dominguez-Caceres, R. Perona et M. Gonzalez-Baron. 2004. "Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer". Cancer Causes and Control, vol. 15, p. 707-717.

CHEN, Y-C., S-Y. Lin-Shiau et J-K. Lin. 1998. "Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis". Journal of Cellular Physiology, vol. 177, p. 324-333.

CHOU, W. C., H. Y. Chen, S. L. Yu, L. Cheng, P. C. Yang et C. V. Dang. 2005. "Arsenic suppresses gene expression in promyelocytic leukemia cells partly through Sp1 oxidation". Blood, vol. 106, p. 304-310.

CHOU, W. C. et C. V. Dang. 2005. "Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies". Current Opinion in Hematology, vol. 12, p. 1-6.

CLARK, RA., KG. Leidal, DW. Pearson et WM. Nauseef. 1987. "NADPH oxidase of human neutrophils: subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system". Journal of Biological Chemistry, vol. 262, p. 4065-4074.

DEVADAS, S., L. Zaritskaya, SG. Rhee, L. Oberley, MS. Williams. 2002. "Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: Selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression". Journal of Experimental Medecine, vol. 195, p. 59-70.

- DIETRICH, J. B., G. Ribereau-Gayon, M. L. Jung, H. Frantz, J. P. Beck et R. Anton. 1992. "Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins : homology with ricin-like plant toxins and single chain ribosome-inhibiting-proteins ". Anticancer Drug, vol. 3, p. 507-511.
- DING, M., X. Shi, V. Castranova et V. Vallyathan. 2000. "Predisposing factors in occupational lung cancer: inorganic minerals and chromium". Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society Environmental Toxicology and Cancer, vol. 19, p. 129-138.
- DUCHEN, MR. 2004. "Roles of mitochondria in health and disease". Diabetes, vol. 53, p. S96-S102.
- DUROCHER, D., S.P. Jackson. 2001. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? ". Current Opinion in Cell Biology, vol. 13, p. 225-231.
- DWARAKANATH, B. S., D. Khaithan et R. Mathur. 2004. "Inhibitors of topoisomerases as anticancer drugs: problems and prospect". Indian Journal of Experimental Biology, vol. 42, p.649-659.
- EDWARDS S. W. 1994. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. New York : Cambridge University Press. 299 p.
- ERMAK, G. et KJ. Davies. 2002. "Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death". Molecular Immunology, vol. 38, p. 713-721.
- FEUERS, R. 1998. "The effect of dietary restriction on mitochondrial function in aging". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 854, p. 192-201.
- FINKEL, T. 1998. "Oxygen radicals and signaling". Current Opinion in Cell Biology, vol. 10, p. 248-253.
- FLISS, MS., H. Usadel, Ol. Caballero, L. Wu, M. R. Buta, S. M. Eleff, J. Jen et D. Sidransky. 2000. "Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids". Science, vol. 287, p. 2017-2028.
- FRITZ, P., J. Dippon, T. Kierschke, I. Siegle, A. Mohring, A. Moisa et T. E. Murdter. 2004. "Impact of mistletoe lectin binding in breast cancer". Anticancer Research, vol. 24, p. 1187-1192.
- FUSI, F., G. Sgaragli et PM. Murphy. 1992. "Interaction fo butylated hydroxyanisole with mitochondrial oxidative phosphorylation". Biochemical Pharmacology, vol. 43, p. 1203-1208.

GABIUS, S., S. S. Josshi, K. Kayser et H-J. Gabius. "The galactoside-specific lectin from mistletoe as biological response modifier". 1992. International Journal of Oncology, vol. 1. p. 705-708.

GOLDSBY A. R., T.J.Kindt et B.A. Osborne. 2001. Immunologie. Paris : Dunod, 660 p.

HAJTO, T., T. Berki, B. Ferenc et N. Péter. 2003. "Galactoside-specific plant lectin *Viscum album* agglutinin-I induces enhanced proliferation and apoptosis of murine thymocytes *in vivo*". Immunology Letters, vol. 86, p. 23-27.

HAJTO, T., K. Hostanska, T. Berki, L. Palinkas, F. Boldizsar et P. Németh. 2005. "Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* agglutinin-I): Overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications". Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2, p. 59-67.

HAJTO, T., K. Hostanska et H. J. Gabius. 1989. "Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vivo* in rabbits and patients". Cancer Research, vol. 49, p. 4803-4808.

HALICKA, H. D., P. Smolewski, Z. Darzynkiewicz, W. Dai et F. Traganos. 2002. "Arsenic trioxide arrests cells early in mitosis leading to apoptosis". Cell Cycle, vol.1, p.201-209.

HALLER, J. S. 1975. "Therapeutic mule: the use of arsenic in the nineteenth century materia medica". Pharmacy in History, vol. 17, p. 87-100.

HALLIWELL, B. et J. M. C. Gutteridge. 1990. "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview". Methods in Enzymology, vol. 186, p. 1-85.

HALLIWELL B. et J. M. C. Gutteridge. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press, 1098 p.

HARMAN, D. 1981. "The aging process". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 78, p. 7124-7128.

HILDEMAN, DA., T. Mitchell, TK. Teague, P. Henson, BJ. Day, J. Kappler et PC. Marrack. 1999. "Reactive oxygen species regulate activation-induced death in T cell apoptosis". Immunity, vol. 10, p. 735-744.

HILEMAN, E. O., J. Liu, M. Albitar, M. J. Keating et P. Huang. 2003. "Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity". Cancer Chemotherapy and Pharmacology, vol. 53, p. 209-219.

- HOSTANSKA, K., T. Hajto, K. Weber, J. Fischer, H. Lentzen, B. Sutterlin et R. Saller. 1997. "A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes". Natural Immunity, vol. 15, p. 295-311.
- HUANG, C., W-Y. Ma et J. Li. 1999. "Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway". Cancer Research, vol. 59, p. 3053-3058.
- HUSSEIN, M.A., M. Saleh, F. Ravandi, J. Mason, R. M. Rifkin et R. Ellison. 2004. "Phase 2 study of arsenic trioxide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma". British Journal of Haematology, vol. 125, p. 470-476.
- ISRAELS, L. G. et E. D. Israels. 1999. "Apoptosis". Stem Cells, vol.17, p. 306-313.
- JANICKE, RU., P. Ng, ML. Sprengard et AG. Porter. 1998. "Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substates in apoptosis". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 15540-15545.
- JORDAN, R. 2002. "Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin". Current Medical Chemicals Anti-Cancer Agents, vol. 2, p. 1-17.
- KARLSSON, A. et C. Dahlgren. 2002. "Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes". Antioxidant Redox Signaling, vol. 4 p. 49-60.
- KOBAYASHI, S. D. et F. R. DeLeo. 2004. "An apoptosis differentiation programme in human polymorphonuclear leucocytes". Biochemical Society, vol. 32, p. 474-476.
- KONKOLA, K. 1992. "More than a coincidence? The arrival of arsenic and the disappearance of plague in early modern Europe". Journal of Histology and Medicine Allied Sciences, vol. 47, p. 186-209.
- KOSTIC, V., V. Jackson-Lewis, F. De Bilbao, M. Dubois-Dauphin et S. Przedborski. 1997. "Bcl-2: Prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis". Science, vol.277, p. 559-562.
- KOTHAKOTA, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang et K. Chu. 1997. "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis". Science, vol. 278, p. 294-298.
- KRAUSPENHAAR, R., S. Eschenburg, M. Perbandt, V. Kornilov, N. Konareva, I. Mikailova, S. Stoeva, R. Wacker, T. Maier, T. Singh, A. Mikhailov, W. Voelter et C. Betzel. 1999. "Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 257, p. 418-424.

KRUK, P. A., N. J. Rampino et V. A. Bohr. 1995. "DNA damage and repair in telomeres: relation to aging". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 258-262.

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

KYRTOPOULOS, SA., P. Georgiadism, H. Autrup, NA. Demopoulos, A. Haugen, K. Katsouyanni, B. Lambert, S. Auvrebo, R. Sram, G. Strphanou et J. Topinka. 2001. "Biomarkers of genotoxicity of urban air pollution. Overview and descriptive data from a molecular epidemiology study on populations exposed to moderate-to-low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons: The AULIS project". Mutation Research, vol. 496, p. 207-213.

LAVASTRE, V., M. Pelletier, S. Reinhard, K. Hostanska et D. Girard. 2002. "Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutini-I (VAA-I)-induced human neutrophil apoptosis: VAA-I accelerates the loss of the antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of the cytoskeletal paxilin and vimentin proteins via caspases". Journal of Immunology, vol. 168, p. 1419-1427.

LI, YM. et JD Broome. 1999. "Arsenic targets tubulin to induce apoptosis in myeloid leukemia cells". Cancer Research, vol. 59, p. 776-780.

LING, YH., J-D. Jiang, J. F. Holland et R. Perez-Soler. 2002. "Arsenic trioxide produces polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines". Molecular Pharmacology, vol. 62, p. 529-538.

LLOYD, DR., DH. Phillips and PL. Carmichael. 1997. "Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack". Chemical Research in Toxicology, vol. 10, p. 393-401.

LOPEZ-HERNANDEZ, FJ., MA. Ortiz, Y. Bayon et FJ. Piedrafita. 2003. "Z-FA-fmk inhibits effector caspases but not initiator caspase 8 and 10, and demonstrates that novel anticancer retinoid-related molecules induce apoptosis via the intrinsic pathway". Molecular Cancer Therapies, vol. 2, p. 255-263.

MAIANSKI, NA., AN. Maianski, TW. Kuijpers et D. Roos. 2004. "Apoptosis of neutrophils". Acta Haematology, vol. 111, p. 56-66.

MANI, S et al. 2004. "The clinical development of new mitotic inhibitors that stabilize the microtubule". Anticancer Drugs, vol.15, p. 553-558.

MILLER, WH. Jr., H. M. Schipper, J. S. Lee, J. Singer et S. Waxman. 2002. "Mechanism of action of arsenic trioxide". Cancer Research, vol. 62, p. 3893-3903.

MOLDOVAN, L., K. Irani, NI. Moldovan, T. Finkel et PJ. Goldschmidt-Clermont. 1999. "The actin cytoskeleton reorganization induced by Rac1 requires the production of superoxyde". Andioxidant Redox Signaling, vol. 1, p. 29-43.

MOLDOVAN, L. et N. I. Moldovan. 2004. "Oxygen free radicals and redox biology of organelles". Histochemistry Cellular Biology, vol. 122, p. 395-412.

MOLLINEDO, F., N. Borregaard et L. A. Boxer. 1999. "Novel trends in neutrophils structure, function and development". Immunology Today, vol. 20, p. 535-537.

MYUNG-SUNNY, K., L. Jienny, L. Kang-Min, Y. Sei-Hoon, C. Sujinna, C. Sang-Young, K. Tae-Young, J. Won-Hun et P. Raekil. 2003. "Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells". Life Sciences, vol. 73, p. 1231-1243.

NUSBAUM, P., C. Lainé, S. Seveau, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mercarelli. 2004. "Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization". Biochemical Society, vol. 32, p. 477-479.

NUTT, LK.,V. Gogvadze, W. Uthaisang, B. Mirnikjoo, DJ. McConkey et S. Orrenius. 2005. "Indirect effects of Bax and Bak initiate the mitochondrial alterations that lead to cytochrome c release during arsenic trioxyde-induced apoptosis". Cancer Biology Therapies, vol. 4, p. 4.

ORR, W. C. et R. S. Sohal. 1998. "Extension of life-span by overexperssion of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*". Science, vol. 263, p. 1128-1130.

PARDO, J., P. Perez-Galan, S. Gamen, I. Marzo, I. Monleon, A. Kaspar, S. Susin, G. Kroemer, A. Krensky, J. Naval et A. Anel. 2001. "A role fo the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis". The Journal of Immunology, vol. 167, p. 1222-1229.

PELICANO, H., L. Feng, Y. Zhou, J. Carew, E. Hileman, W. Plunkett, M. Keating et P. Huang. 2003. "Inhibition of mitochondrial respiration". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 37832-37839.

PORTER, A. C., G. R. Fanger et R. R. Vaillancourt. 1999. "Signal transduction pathways regulated by arsenate and arsenite". Oncogene, vol. 18, p. 7794-7802.

PRESCOTT L., J. P. Harley et D. A. Klein. 1995. Microbiologie. Bruxelles : DeBoeck Université, 1014 p.

RAHA, S. et B. H. Robinson. 2000. "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing". TIBS, vol. 25, p. 502-508.

ROITT I. M., J. Rostoff et D. K. Male. 1994. Immunologie. Bruxelles : DeBoeck Université, 406 p.

ROJEWSKI, M. T., C. Baldus, W. Knauf, E. Thiel et H. Schrezenmeier. 2002. "Dual effects of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation". British Journal of Haematology, vol. 116, p. 555-563.

SAFI, JM. 2002. "Association between chronic exposure to pesticides and recorded cases of human malignancy in Gaza Governorates". The Science of the total environment, vol. 284, p. 75-82.

SANDSTROM, PA. et TM. Buttke. 1993. "Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90, p. 4708-4712.

SANDSTROM, PA., MD. Mannie et TM. Buttke. 1994. "Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxydants: oxidative stress as a mediator of apoptosis". Journal of Leucocyte Biology, vol.55, p. 221-226.

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

SCHEEL-TOELLNER, D., K. Q. Wang, P. R. Webb, S. H. Wong, R. Craddock, L. K. Assi, M. Slamon et J. M. Lord. 2004. "Early events in spontaneous neutrophil apoptosis". Biochemical Society, vol. 32, p. 461-464.

SHACKELFORD, R. E., W. K. Kaufmann et R. S. Pauls. 2000. "Oxidative stress and cell cycle checkpoint function". Free Radicals Biology and Medicine, vol. 28, p. 1387-1404.

SHAH, MA. et GK. Schwartz. 2003. "Cyclin-dependent kinases as targets for cancer therapy". Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, vol. 21 p. 145-170.

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. Shou, 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 in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients". Blood, vol. 89, p. 3354-3360.



- SIEGLE, I., P. Fritz, M. McClellan, S. Gutzeit et T. E. Murdter. 2001. "Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells". Anticancer Research, vol. 21, p. 2687-2691.
- SOIGNET, S. L., P. Maslak, Z. G. Wang, S. Jhanwar, E. Calleja, L. J. Dardashti, D. Corso, A. DeBlasio, J. Gabrilove, D. A. Scheinberg, P. P. Pandolfi et R. P. Jr. Warrell. 1998. "Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukaemia with arsenic trioxide". New England Journal of Medicine, vol. 339, p. 1341-1348.
- STURLAN, S., M. Baumgartner, E. Roth et T. Bachleitner-Hofmann. 2003. "Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells". Blood, vol. 101, p. 4990-4997.
- TOLMASOFF, J. M., T. Ono et R. G. Cutler. 1980. "Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 77, p. 2777-2781.
- TRIPATHI, P. et D. Hildeman. 2004. "Sensitization of T cells to apoptosis- A role for ROS". Apoptosis, vol. 9, p. 515-523.
- 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". Clinical Cancer Research, vol. 6, p. 4957-4964.
- VEJRAZKA, M., R. Micek et S. Stipek. 2005. "Apoptosis inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1722, p. 143-147.
- VENDITTI, P., C. M. Daniele, T. De Leo et S. Di Meo. 1998. "Effect of phenobarbital treatment on characteristics determining susceptibility to oxidants of homogenates mitochondria and microsomes from rat liver". Cellular Physiology and Biochemistry, vol. 8, p. 328-338.
- VON ZGLINICKI, T., R. Pilger et N. Sitte. 2000. "Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts". Free Radicals Biology and Medicine, vol. 28, p. 64-74.
- WANG, Z. G., R. Rivi, L. Delva, A. Konig, D. A. Scheinberg, C. Gambacorti-Passerini, J. L. Gabrilove, R. P. Jr. Warrell et P. P. Pandolfi. 1999. "Arsenic trioxide and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML-RARalpha independent manner". Blood, vol. 92, p. 1497-1504.
- WIEDLOCHA, A., K. Sandvig, H. Walzel, C. Radzikowsky et S. Olnes. "Internalization and action of an immunotoxin containing mistletoe lectin A-chain". 1991. Cancer Research, vol. 51, p. 916-920.

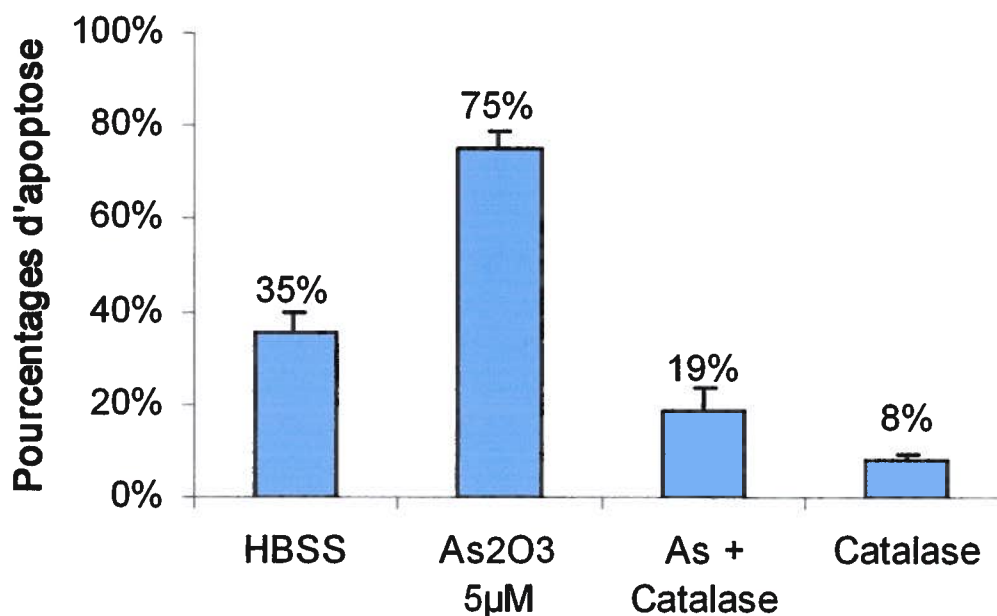
YABUKI, M., Miyake T, Doi Y, Fujiwara T, Hamazaki K, Yoshioka T, A. A. Horton et K. Utsuni. 1999. "Role of nuclear lamins in nuclear segmentation of human neutrophils". Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR, vol. 31, p. 77-84.

ZANGAR, R. C., D. R. Davydov et S. Verma. 2004. "Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome *P450*". Toxicology and applied Pharmacology, vol. 199, p. 316-331.

ZHOU, H., E. O. Hileman, W. Plunkett, M. J. Keating et P. Huang. 2003. "Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents". Blood, vol 101, p. 4098-4104.

## **ANNEXE Résultats non publiés**

**Figure 1**

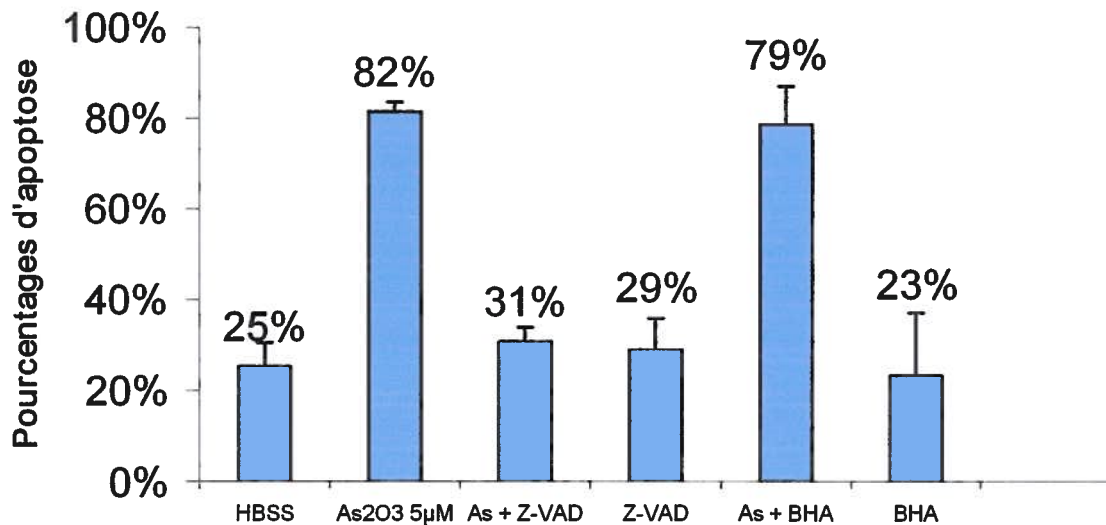


**Figure 1** Effet de la catalase sur l'induction d'apoptose des neutrophiles humains par l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tel que vu en cytologie

Les neutrophiles fraîchement isolés du sang humain ont été incubés dans 100 µL de RPMI 1640 additionné de 10% de sérum autologue à une concentration de  $10 \times 10^6$  cellules/mL, pendant 17-24 heures, en présence ou non de tampon HBSS, d'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5 µM et de catalase 2000 unités/mL. La préparation de neutrophiles a ensuite été centrifugée sur lame, puis teinte avec les colorants de l'ensemble Hema-Stain, et les cellules ont été examinées au microscope à un grossissement de 400x. Les neutrophiles présentant un ou plusieurs noyaux pycnotiques foncés ont été comptés comme apoptotiques. Un minimum de 200 cellules a été compté pour chaque échantillon.

Cette figure montre que l'ajout de catalase à l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> permet de supprimer totalement l'induction de l'apoptose induite par ce dernier chez les neutrophiles humains, ce qui suggère que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soit impliqué dans le mécanisme d'induction d'apoptose de cet agent. L'apoptose spontanée avec le témoin HBSS est de 35%, ce qui est parfaitement dans les normes, étant donné que les neutrophiles ne se divisent pas et qu'ils se dirigent spontanément en apoptose après 24 heures. On remarque ici que l'ajout de catalase seule permet également de réduire l'apoptose spontanée, ce qui concorde avec le fait que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soit impliqué dans les mécanismes d'apoptose spontanée. Ces résultats sont analysés plus en détail dans la section discussion-conclusion du présent mémoire (page 104).

**Figure 2**



**Figure 2** Effet de la BHA sur l'induction d'apoptose des neutrophiles humains par l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tel que vu en cytologie

La méthode employée pour la réalisation de cette figure est la même que celle décrite à la page précédente pour la figure 1. Seuls les inhibiteurs varient. Nous avons ici utilisé le Z-VAD à une concentration finale de 500 µM et la BHA à 50 µM.

Cette figure nous montre que la BHA, contrairement à la catalase, n'empêche par l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> d'induire l'apoptose des neutrophiles humains. Cela nous suggère que la production de ROS par les mitochondries n'est probablement pas impliquée dans l'induction d'apoptose de cet agent. Les caspases quant à elles semblent jouer un rôle important dans ce phénomène d'apoptose induite par l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, comme le montrent les résultats obtenus avec l'inhibiteur de caspases exécutrices, le z-VAD. Ces résultats sont analysés plus en détail dans la section discussion-conclusion du présent mémoire (pages 105-106).

**Figure 3A**

**Catalase**

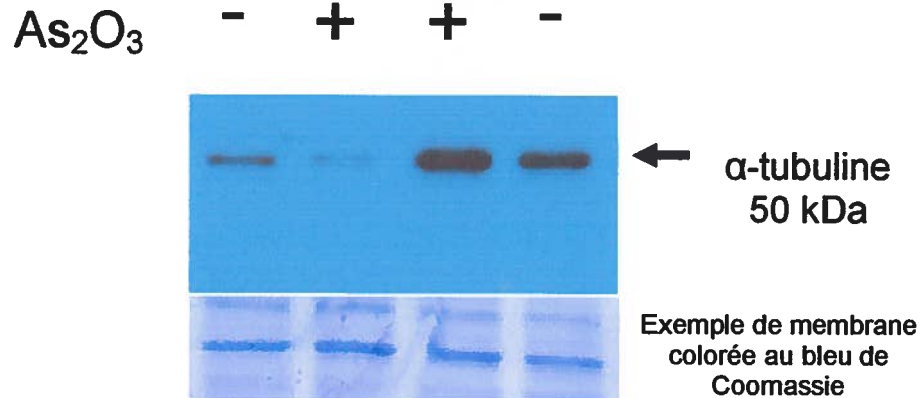


Figure 3A Dégradation de l' $\alpha$ -tubuline suite à une stimulation avec l' $\text{As}_2\text{O}_3$  et effet de la catalase sur cette dégradation

**Figure 3B**

**Catalase**

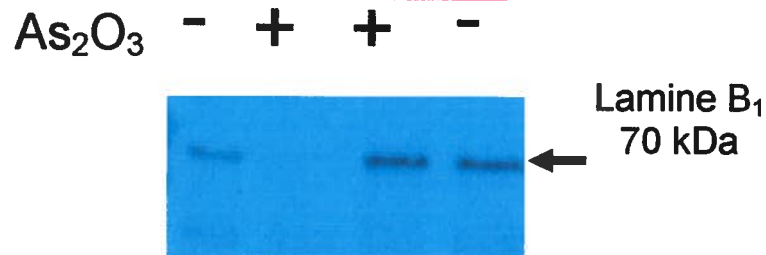


Figure 3B Dégradation de la lamine B<sub>1</sub> suite à une stimulation avec l' $\text{As}_2\text{O}_3$  et effet de la catalase sur cette dégradation

Les neutrophiles fraîchement isolés du sang humain ont été incubés selon les mêmes conditions que celles décrites à la figure 1 de la présente annexe (page 122), en présence ou absence de tampon HBSS, d' $\text{As}_2\text{O}_3$  5 $\mu\text{M}$  et de catalase 2000 unités/mL. Suite à l'incubation, les cellules ont été récoltées et lysées à l'aide du tampon de Laemmli et la dégradation de l' $\alpha$ -tubuline et de la lamine-B<sub>1</sub> ont été déterminées par un protocole d'immunobuvardage de type Western. L'équivalence dans la quantité de protéines chargées dans les puits nous est confirmée par coloration systématique des membranes au bleu de Coomassie à la fin des expériences.

Cette figure nous montre que l'ajout de catalase empêche l' $\text{As}_2\text{O}_3$  de causer la dégradation de protéines associées aux microtubules et aux filaments intermédiaires. Ces résultats sont analysés en détail dans la section discussion-conclusion du présent mémoire (page 106).