

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

***VISCUM ALBUM* AGGLUTININE-I ET RÉPONSE  
INFLAMMATOIRE : MODULATION DE L' APOPTOSE CHEZ  
LES GRANULOCYTES**

Par  
Valérie Lavastre, M.Sc

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

Jury d'évaluation

|   |  |
|---|--|
| Président du Jury et<br>examineur interne | M. Yves St-Pierre, Ph.D.<br>INRS-Institut Armand-Frappier  |
| Examineur externe                         | Mme Sachiko Sato, Ph.D.<br>Centre de recherche en infectiologie du CHUL<br>Université Laval                        |
| Examineur externe                         | M. Sylvain G. Bourgoin, Ph.D.<br>Centre de recherche en rhumatologie et<br>immunologie du CHUL<br>Université Laval |
| Directeur de recherche                    | Denis Girard, Ph.D.<br>INRS-Institut Armand-Frappier   |

## REMERCIEMENTS

Un projet d'une telle envergure ne se réalise jamais sans la contribution de nombreuses personnes.

Je désire tout d'abord exprimer toute ma gratitude à mon directeur de maîtrise et de doctorat, le Dr Denis Girard, pour son encadrement et son support pendant toutes ces années. Ses judicieux conseils ont su guider mon approche tant au niveau scientifique qu'au niveau personnel.

Je remercie également mes collègues de laboratoire, sans qui ces longues heures passées au laboratoire auraient pu paraître interminables. J'ai toujours pu compter sur ces personnes dans les bons comme dans les moins bons moments. Ensemble, nous formions l'équipe LA plus dynamique de l'institut :

Claude Rathé, Éliane Moisan, François Binet, Hélène Cavalli et Sonia Chiasson.

Je veux également remercier ma famille, qui malgré la distance, n'a jamais arrêté de m'encourager dans toutes les choses que j'entreprenais et de croire en moi.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes ayant travaillé aux ressources humaines à l'institut de Pointe-Claire : Francine Leclerc, Josée Labonne, Jocelyne Ash, Louis Sénécal, Jacques Lussier et Daniel Venne. En répondant à mes demandes de toutes sortes, toujours avec un grand sourire, elles ont grandement contribué à la réalisation de mon doctorat.

Je voudrais aussi remercier mes organismes subventionnaires, la Fondation Armand-Frappier, l'Institut de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et le Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) pour leur support financier.

Et finalement, je remercie mon conjoint, Yves Quintal, pour son appui plus qu'indispensable dans cette grande aventure, pour son amour et sa compréhension. Grâce à lui, j'ai réalisé trois autres grands projets qui me tiennent à cœur, soit donner naissance à nos magnifiques enfants, Camille, Megan et Samuel.

# TABLE DES MATIÈRES

|   |    |
|---|----|
| REMERCIEMENTS .....   | ii |
| LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....                           | v  |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS .....                                      | vi |
| RÉSUMÉ .....  | ix |
| INTRODUCTION .....  | x  |
| <br>  |    |
| SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE.....                             | 1  |
| 1. LES GRANULOCYTES .....   | 2  |
| 1.1 Généralités .....   | 2  |
| 1.2 Les neutrophiles.....   | 2  |
| 1.2.1 Pathologies et désordres associés aux neutrophiles.....     | 4  |
| 1.3 Les éosinophiles.....   | 7  |
| 1.4 Les lignées cellulaires à l'image des granulocytes.....       | 8  |
| 2. L'INFLAMMATION.....  | 9  |
| 2.1 Généralités et implication du neutrophile .....               | 9  |
| 2.2 Phagocytose, dégranulation et destruction de la bactérie..... | 12 |
| 2.3 Modèles inflammatoires .....                                  | 15 |
| 2.3.1 Le modèle de la poche d'air murine .....                    | 15 |
| 2.4 Résolution de l'inflammation.....                             | 16 |
| 3. L'APOPTOSE.....  | 18 |
| 3.1 Généralités .....   | 18 |
| 3.2 Voie extrinsèque .....  | 19 |
| 3.3 Voie intrinsèque.....   | 21 |
| 3.4 Les caspases.....   | 22 |
| 3.4.1 Les caspases initiatrices .....                             | 22 |
| 3.4.2 Les caspases effectrices.....                               | 23 |
| 3.4.3 Les caspases inflammatoires.....                            | 24 |
| 3.5 Les substrats des caspases .....                              | 24 |
| 3.6 Modulateurs de l'apoptose .....                               | 25 |
| 3.6.1 Les inducteurs d'apoptose.....                              | 26 |
| 3.6.2 Les inhibiteurs d'apoptose .....                            | 26 |
| 3.7 Méthodes de détection de l'apoptose.....                      | 27 |
| 3.8 Les neutrophiles et les éosinophiles apoptotiques .....       | 30 |
| 4. LES PROTÉINES DU CYTOSQUELETTE .....                           | 33 |
| 4.1 Les microfilaments.....                                       | 33 |
| 4.2 Les filaments intermédiaires.....                             | 35 |
| 4.3 Les microtubules.....   | 36 |
| 5. LA VISCUM ALBUM AGGLUTININE-I.....                             | 38 |
| 5.1 Généralités et distribution des lectines.....                 | 38 |
| 5.2 Purification de la VAA-I.....                                 | 40 |
| 5.3 Structure de la VAA-I et mécanisme d'action.....              | 41 |
| 5.4 Les activités biologiques de la VAA-I .....                   | 46 |
| 5.4.1 Propriétés immunostimulatrices .....                        | 46 |
| 5.4.2 Propriétés cytostatiques/apoptotiques .....                 | 48 |
| 5.5 Les activités pro- et anti-tumorales de la VAA-I .....        | 49 |

|  |               |
|--|---------------|
| <b>SECTION 2 : ARTICLES</b> .....  | <b>53</b>     |
| <b>1.1 ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF VISCUM ALBUM AGGLUTININ-I (VAA-I):<br/>INDUCTION OF APOPTOSIS IN ACTIVATED NEUTROPHILS AND INHIBITION OF<br/>LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED NEUTROPHILIC INFLAMMATION IN VIVO</b> .....       | <b>54</b>     |
| <b>1.2 RESUME EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE</b> .....   | <b>55</b>     |
| <b>1.3 ARTICLE TEL QUE PUBLIE</b> .....  | <b>55</b>     |
| <b>2.1 VISCUM ALBUM AGGLUTININ-I (VAA-I) INDUCES APOPTOSIS AND<br/>DEGRADATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN HUMAN LEUKEMIA PLB-985 AND<br/>X-CGD CELLS VIA CASPASES: LAMIN B<sub>1</sub> IS A NOVEL TARGET OF VAA-I</b> ..... | <b>63</b>     |
| <b>2.2 RESUME EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE</b> .....   | <b>64</b>     |
| <b>2.3 ARTICLE TEL QUE PUBLIÉ</b> .....  | <b>64</b>     |
| <b>3.1 VISCUM ALBUM AGGLUTININ-I INDUCES DEGRADATION OF CYTOSKELETAL<br/>PROTEINS IN LEUKEMIA PLB-985 CELLS DIFFERENTIATED TOWARD NEUTROPHILS:<br/>CLEAVAGE OF NON-MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN-IIA BY CASPASES</b> .....       | <b>76</b>     |
| <b>3.2 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE</b> .....   | <b>77</b>     |
| <b>3.3 ARTICLE TEL QUE PUBLIÉ</b> .....  | <b>77</b>     |
| <b>4.1 VISCUM ALBUM AGGLUTININ-I INDUCES APOPTOSIS AND DEGRADATION OF<br/>CYTOSKELETAL PROTEINS VIA CASPASES IN HUMAN LEUKEMIA EOSINOPHIL AML<br/>14.3 D10 CELLS: DIFFERENCES WITH PURIFIED HUMAN EOSINOPHILS</b> .....      | <b>88</b>     |
| <b>4.2 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE</b> .....   | <b>89</b>     |
| <b>4.3 ARTICLE TEL QUE PUBLIÉ</b> .....  | <b>89</b>     |
| <br><b>CONCLUSION</b> .....  | <br><b>99</b> |
| <b>CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES</b> .....   | <b>108</b>    |
| <b>RÉFÉRENCES</b> .....  | <b>109</b>    |

# LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

## FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Les granulocytes. ....  | 2  |
| <b>Figure 2.</b> Transmigration du neutrophile au site inflammatoire. ....                       | 10 |
| <b>Figure 3.</b> Assemblage et activation de la NADPH oxydase. ....                              | 13 |
| <b>Figure 4.</b> Phases initiatrices de l'apoptose. ....   | 19 |
| <b>Figure 5.</b> Les différentes structures des microfilaments. ....                             | 34 |
| <b>Figure 6.</b> Illustration du ganglioside $G_{M1}$ ....                                       | 44 |
| <b>Figure 7.</b> Schématisation possible du mécanisme d'entrée de la VAA-I dans la cellule. .... | 45 |

## TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1.</b> Composition des granules du neutrophile (membrane et matrice) ....   | 3  |
| <b>Tableau 2.</b> Classement des cytokines synthétisées par le neutrophile ....  | 4  |
| <b>Tableau 3.</b> Les familles de caspase ....   | 23 |
| <b>Tableau 4.</b> Retard et accélération de l'apoptose constitutive chez les neutrophiles et les éosinophiles par des agents spécifiques ou des traitements .... | 31 |
| <b>Tableau 5.</b> Classification des lectines. ....  | 34 |
| <b>Tableau 6.</b> Classification des lectines de plantes ....  | 39 |
| <b>Tableau 7.</b> Les lectines de la <i>Viscum album</i> ....  | 40 |
| <b>Tableau 8.</b> Propriétés immunostimulatrices de la VAA-I ....  | 47 |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **aa** acides aminés
- **ADN** acide désoxyribonucléique
- **AML** *acute myelogenous leukemia*
- **AMPc** adénosine monophosphate cyclique
- **ANCA** *antineutrophil cytoplasmic antibodies*
- **Apaf-1** *apoptotic protease-activating factor-1*
- **ARNm** acide ribonucléique messenger
- **Bax** *Bcl-2-associated X protein*
- **Bcl-2** *B-cell lymphoma-2*
- **Bcl-X<sub>L</sub>** *basal cell lymphoma-extra-large*
- **Bid** *BH3-interacting domain death agonist*
- **Bim** *Bcl-2-interacting mediator of cell death*
- **BPI** *bacterial permeability increasing protein*
- **CAP-18** *cationic antimicrobial protein 18 kDa (cathélicidine ou LL-37)*
- **CAP-37** *cationic antimicrobial protein 37 kDa (azurocidine)*
- **CAP-57** *cationic antimicrobial protein 57 kDa (BPI)*
- **CARD** *caspase recruitment domain*
- **Casp** caspase
- **CR** *complement receptor*
- **CINC** *cytokine-induced chemoattractants*
- **CD** *cluster of differentiation*
- **dATP** désoxy-adénosine triphosphate
- **DcR** *decoy receptor*
- **DD** *death domain*
- **DISC** *death-inducing signalling complex*
- **DR** *death receptor*
- **DMSO** diméthylsulfoxyde
- **EDN** *eosinophil-derived neurotoxin*
- **ECP** *eosinophil cationic protein*
- **EPO** *eosinophil peroxidase*
- **ERGIC** *endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment*

- **FADD** *Fas-associated death domain*
- **fMLP** *formyl-méthionine-leucyle-phénylalanine*
- **G-CSF** *granulocyte-colony-stimulating factor*
- **GM-CSF** *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- **GRO** *growth-related gene product*
- **HGF** *hepatocyte growth factor*
- **HOCL** *acide hypochloreux*
- **ICAM** *intercellular adhesion molecule*
- **ICE** *IL-1 $\beta$  converting enzyme*
- **IL** *interleukine*
- **IL-1Ra** *IL-1 receptor antagonist*
- **INF** *interféron*
- **LAD-I** *leukocyte adhesion deficiency-I*
- **LFA** *lymphocyte function-associated antigen*
- **LGLs** *large granular lymphocytes*
- **LPS** *lipopolysaccharide*
- **LTB<sub>4</sub>** *leukotriène B<sub>4</sub>*
- **Mac-1** *macrophage-1 antigen (CR3)*
- **MBP** *major basic protein*
- **MCP-1** *monocyte chemotactic protein-1*
- **M-CSF** *macrophage colony-stimulating factor*
- **MIP** *macrophage infiltrating protein*
- **ML** *mistletoe lectin*
- **MPO** *myéloperoxydase*
- **MTPAs** *microtubule-targeted tubulin-polymerizing agents*
- **NADPH** *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*
- **NF- $\kappa$ B** *nuclear factor-kappa B*
- **NK** *natural killer*
- **NMHC** *non muscle heavy chain*
- **OPG** *ostéoprotégérine*
- **PAF** *platelet-activating factor*
- **PARP** *poly (ADP-ribose) polymérase*
- **PBMC** *peripheral blood mononuclear cells (lymphocytes et monocytes)*
- **PE** *Pseudomonas eotoxin*

- **PECAM** *platelet-endothelial cell adhesion molecule*
- **PGs** *prostaglandines*
- **RANK** *receptor activator of nuclear factor-kappa B*
- **RIP** *ribosome inactivating protein*
- **ROS** *reactive oxygen species*
- **RT-PCR** *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*
- **SCF** *stem cell factor*
- **TGF** *transforming growth factor*
- **TNP-1** *human acute monocytic leukemia cell line*
- **TNF- $\alpha$**  *tumor necrosis factor-alpha*
- **TNFR** *TNF receptor*
- **TUNEL** *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling assay*
- **VAA-I** *Viscum album agglutinine-I*
- **V-ATPase** *vacuolar-type ATPase*
- **VCAM** *vascular cell adhesion molecule*
- **VIP** *vesicular integral membrane protein*
- **VLA** *very late antigen*
- **VEGF** *vascular endothelial growth factor*
- **X-CGD** *X-chronic granulomatous disease*

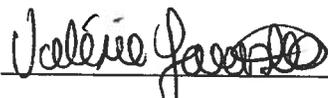
## RÉSUMÉ

Les neutrophiles exercent un rôle primordial lors de l'inflammation. Chez un organisme sain, l'inflammation se résorbe d'elle-même, principalement via l'élimination des neutrophiles apoptotiques. Un dérèglement dans le contrôle de l'apoptose peut entraîner plusieurs maladies graves. Il est donc important de découvrir de nouvelles molécules qui peuvent provoquer l'apoptose de ces cellules.

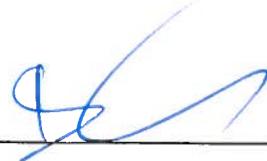
La *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) est une lectine de plante qui appartient au groupe des protéines inactivant le ribosome, tout comme la ricine. La VAA-I possède des propriétés anti-tumorales et peut également provoquer l'apoptose chez différents types cellulaires lorsqu'elle est utilisée à forte concentration (1000 ng/mL). Ainsi, elle entraîne la dégradation de plusieurs protéines du cytosquelette par l'entremise d'un mécanisme dépendant des caspases.

Cette thèse présente principalement les résultats issus de quatre articles scientifiques présentant la VAA-I comme une molécule anti-inflammatoire. En effet, nous avons investigué les propriétés anti-inflammatoires de la VAA-I dans le modèle inflammatoire de la poche d'air murine. Nous avons remarqué que la VAA-I n'induit pas à elle seule le recrutement de cellules. Par contre, en combinaison avec un extrait bactérien, elle est capable de freiner le recrutement cellulaire et ce possiblement en rendant les cellules recrutées apoptotiques.

De plus, la VAA-I est capable d'induire l'apoptose chez un autre type de granulocytes, soit les éosinophiles, et une lignée cellulaire apparentée, les AML (*acute myelogenous leukemia*) 14.3D10. Toutefois, l'apoptose induite dans ces dernières cellules semble influencer différemment la destruction des protéines du cytosquelette et/ou l'activation des caspases, profil jusqu'à ce jour respecté avec les autres types cellulaires.



Valérie Lavastre, M Sc.  
Étudiante



Denis Girard, Ph D.  
Directeur de recherche

## INTRODUCTION

Les granulocytes, principalement les neutrophiles, sont recrutés aux sites inflammatoires en réponse aux d'infections ainsi que dans les tissus endommagés. Pendant l'inflammation aiguë, la production en neutrophiles augmente considérablement grâce à la présence de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, tel le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Toutefois, plusieurs mécanismes de défense employés par ces cellules dans le but d'éliminer les agents étrangers sont potentiellement dangereux dans le tissu hôte. Par exemple, une production excessive en protéases ou en réactifs d'oxygène peut endommager les tissus et entraîner le développement de maladies inflammatoires chroniques. Il est donc important que ces cellules soient efficacement et rapidement éliminées afin d'éviter toutes ces conséquences néfastes.

L'élimination de cellules se fait via un procédé naturel et vital qui permet également de maintenir une quantité adéquate de cellules dans la circulation. Il s'agit de l'apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui permet à l'organisme de détruire les cellules sans que celles-ci ne perdent leur intégrité membranaire jusqu'à une phagocytose subséquente.

Une compréhension des procédés qui régulent l'apoptose des neutrophiles permettrait une meilleure connaissance des pathologies de maladies inflammatoires où l'apoptose des neutrophiles est perturbée et pourrait également nous permettre d'identifier de nouvelles avenues thérapeutiques.

Le cytosquelette est une structure hautement dynamique qui s'adapte à tous les événements qu'une cellule peut subir au cours de son existence. Lors de l'apoptose, certaines protéines du cytosquelette sont clivées par les caspases, protéases principalement activées dans ce processus. De plus, le neutrophile perd certaines propriétés fonctionnelles ainsi que des caractéristiques biochimiques et morphologiques. Ces dernières sont observables par le rapetissement des cellules apoptotiques.

Il existe une classe de molécules qui permet d'induire l'apoptose de façon très efficace. Il s'agit des protéines qui inhibent le ribosome. Cette activité stoppe véritablement la synthèse protéique de la cellule et entraîne inévitablement son apoptose. La cycloheximide est un inhibiteur synthétique hautement reconnu et étudié dans le milieu scientifique.

La VAA-I est l'inhibiteur de synthèse protéique sur lequel notre équipe travaille. C'est une lectine issue de la plante de gui qui possède une dualité fonctionnelle. C'est-à-dire qu'utilisée à faible concentration, elle exprimera des caractéristiques pro-inflammatoires et à forte concentration, des propriétés apoptotiques.

Même si les extraits de gui, commercialisés sous le nom d'*Iscador*, sont grandement utilisés en Europe, dans certains cas, cette administration a résulté en de sévères intoxications et de sérieux dommages au foie (Olsnes *et al*, 1982). Afin d'éviter tout effet non désirable, il s'avère donc important de mieux comprendre le mécanisme d'action de la VAA-I à l'intérieur des cellules et encore mieux dans un modèle inflammatoire.

Les deux principaux objectifs de cette thèse sont:

- d'analyser l'effet anti-inflammatoire de la VAA-I dans un contexte inflammatoire
- d'étudier les caractéristiques apoptotiques de la VAA-I chez les granulocytes, principalement l'influence sur les protéines du cytosquelette et l'implication de certaines caspases.

La première section de cette thèse consiste en une revue de littérature regroupant cinq thèmes principaux. Le premier thème abordé présente les cellules qui sont étudiées dans cette thèse. Le second chapitre est consacré au rôle des neutrophiles à l'intérieur de l'inflammation. Le chapitre suivant traite du mécanisme permettant la résolution de l'inflammation, soit l'apoptose. Bien que pendant l'apoptose plusieurs protéines sont influencées, un petit chapitre est consacré à un groupe de protéines qui joue un rôle important dans le maintien de la forme de la cellule, les protéines du cytosquelette. Nous vous présentons comme dernier chapitre, le puissant inducteur d'apoptose utilisé tout au long de cette thèse, la VAA-I.

Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a réellement testé en profondeur le potentiel pro- ou anti-inflammatoire de la VAA-I dans un contexte inflammatoire *in vivo*. De plus, nous savons que la résolution de l'inflammation réside dans l'induction de l'apoptose. Il s'avère essentiel de bien documenter ses actions afin d'en limiter les effets secondaires et d'optimiser les propriétés curatives de la VAA-I.

Le premier article présenté dans cette thèse (Lavastre *et al*, 2004) présente une étude réalisée sur les propriétés anti-inflammatoires de la VAA-I dans un modèle inflammatoire murin.

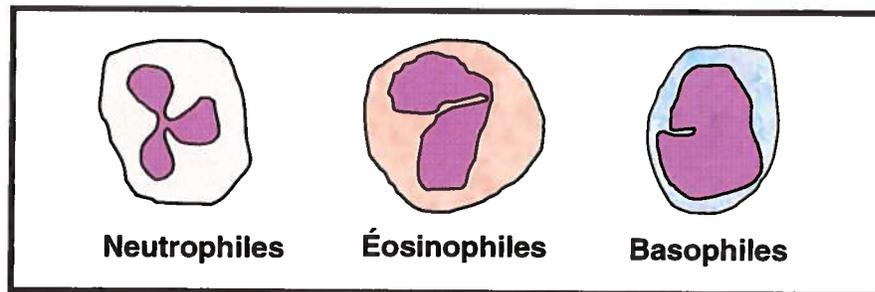
Les trois autres articles (Lavastre *et al*, 2005a, Lavastre *et al*, 2007 et Lavastre *et al*, 2005b) documentent d'avantage l'implication des caspases chez le neutrophile ainsi que d'autres granulocytes dans la dégradation de certaines protéines du cytosquelette.

## **SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE**

# 1. LES GRANULOCYTES

## 1.1 Généralités

Les granulocytes font partie de l'immunité non spécifique. Ils constituent, avec les macrophages, les barrières biologiques de l'organisme contre les infections. Les granulocytes sont constitués des polymorphonucléaires neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles qui représentent respectivement 65%, 2 à 5% et 0,1% de la population leucocytaire. Leur proportion peut varier selon l'état de santé général de l'organisme, c'est-à-dire dans le cas de pathologies ou encore d'allergies. Les granulocytes ont comme propriétés caractéristiques de comporter des granules et de phagocyter. Le qualificatif de ces cellules provient de la couleur de leur cytoplasme après l'ajout du colorant de Romanowsky. Les granules des neutrophiles ne fixent pas le colorant (neutre), ceux des éosinophiles vont fixer l'éosine (acide) et les basophiles, le colorant violet (basique) (Ogilvie, Askenase et Rose, 1980).



**Figure 1. Les granulocytes.** Représentation des granulocytes d'après leur réaction à la coloration de Romanowsky. Les éosinophiles possèdent des granules hautement acides et captent le colorant éosine (rouge), les granules des basophiles sont plutôt basiques et absorbent le colorant violet-bleu. Le contenu des granules du neutrophile n'est ni acide, ni basique. Il ne fixe aucun des colorants et demeure ainsi quasi-transparent.

## 1.2 Les neutrophiles

Le neutrophile est la première ligne de défense contre les infections bactériennes et fongiques. Un être humain en santé génère entre 1 à  $2 \times 10^{11}$  neutrophiles par jour, ce qui lui octroie d'être le leucocyte le plus abondant dans la circulation. Le noyau du neutrophile est typiquement polylobé et possède entre deux à cinq lobes qui sont reliés

par des filaments de chromatine. Pendant sa maturation, le neutrophile fait l'acquisition graduelle de trois types de granules : les granules primaires, secondaires et tertiaires. Ceux-ci lui permettront de réaliser de nombreuses fonctions. Un neutrophile peut comporter de 50 à 200 granules dans son cytoplasme. Le tableau suivant résume la composition de chaque type de granules. Ces derniers sont reconnus pour leur contenu en protéines protéolytiques et bactéricides. De plus, leur membrane contribue au stockage de protéines membranaires qui sont incorporées dans le cytoplasme durant la mobilisation des granules et l'exocytose de leur contenu (Borregaard, 1997).

**Tableau 1. Composition des granules du neutrophile (membrane et matrice) (Faurischou et Borregaard, 2003)**

| Granule primaires ou azurophiles | Granules secondaires ou spécifiques | Granules tertiaires            | Vésicules sécrétrices       |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| cathepsin G                      | lactoferrine                        | gélatinase                     | cytochrome b <sub>558</sub> |
| élastase                         | cathelicidine                       | acétyltransférase              | albumine                    |
| protéinase-3                     | métalloprotéases                    | β <sub>2</sub> -microglobuline | immunoglobuline             |
| CAP-37 (azurocidine)             | (collagénase et gélatinase)         | lysozyme                       | transferrine                |
| CAP-57 (BPI)                     | histaminase                         | cytochrome b <sub>558</sub>    | protéinase 3                |
| défensines                       | héparinase                          | CD11b/CD18                     | CR1                         |
| MPO                              | sialidase                           |                                | CD11b/CD18                  |
| muramidase                       | hCAP-18 (LL-37)                     |                                | alkaline phosphatase        |
| lysozyme                         | β <sub>2</sub> -microglobuline      |                                | CD10, CD13, CD14            |
| α <sub>1</sub> -antitrypsine     |                                     |                                | C1q-R                       |
|                                  |                                     |                                | fMLP-R                      |
|                                  |                                     |                                | leukolysine                 |

**Abréviations :** CAP, *cationic antimicrobial protein*; BPI, *bacterial permeability increasing protein*; MPO, myéloperoxydase; CD, *cluster of differentiation*; CR1, *complement receptor 1*; fMLP-R, formyl-méthionine-leucyle-phénylalanine - *receptor*.

Le neutrophile est le leucocyte qui possède la plus petite demi-vie des leucocytes, c'est-à-dire qu'il survit en général dans la circulation entre 8 à 20 heures. Toutefois, leur présence perdure jusqu'à plusieurs jours s'ils sont présents dans un milieu inflammatoire. Un neutrophile âgé se dirigera spontanément en apoptose en l'absence de cytokines ou d'autres agents pro-inflammatoires.

Lors d'une infection, les neutrophiles circulants sont attirés vers le foyer infectieux par des agents chimioattractants (fMLP, la composante C5a du complément, l'IL-8, le leukotriène B<sub>4</sub>, etc.) qui sont sécrétés par les bactéries ou générés par l'hôte. Les neutrophiles reconnaissent les bactéries préalablement opsonisées. Le neutrophile joue un rôle primordial dans la phagocytose. Le neutrophile invagine sa membrane autour

du microorganisme et il y a alors formation d'un phagosome. Parallèlement à cette phagocytose, des lysosomes cytosoliques (granules) migrent vers le phagosome, fusionnent avec lui pour déverser les hydrolases et autres enzymes lysosomales et protéines cationiques qu'ils contiennent à l'intérieur du phagosome pour digérer la bactérie (Prescott, Harley et Klein, 1995). Ce processus entraîne habituellement la mort du neutrophile via l'apoptose.

Bien qu'il ne soit pas un très grand producteur de cytokines comme les macrophages, les lymphocytes T ou les cellules *natural killer* (NK), le neutrophile a la capacité de synthétiser et de relâcher certaines cytokines aux rôles variés suivant une stimulation (Cassatella, 1995). Cette production est grandement influencée par des agents stimulants comme le lipopolysaccharide (LPS), le zymosan (sucre provenant des parois cellulaires chez les levures) et d'autres cytokines (*tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , interleukine (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF, *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ )). Le tableau suivant représente les différentes cytokines exprimées par le neutrophile (Witko-Sarsat, 2000).

**Tableau 2. Classement des cytokines synthétisées par le neutrophile** (inspiré de Cassatella, 1995)

| Cytokines pro-inflammatoires | Cytokines anti-inflammatoires | Chimiokines    | Facteurs de croissance | Relâchées sous certaines conditions | Sécrétion mtigée |
|------------------------------|-------------------------------|----------------|------------------------|-------------------------------------|------------------|
| TNF- $\alpha$                | IL-1Ra                        | IL-8           | INF- $\alpha$          | M-CSF                               | IL-6             |
| IL-1 $\alpha$                |                               | GRO- $\alpha$  | INF- $\beta$           | IL-3                                | MCP-1            |
| IL-1 $\beta$                 |                               | MIP-1 $\alpha$ | G-CSF                  | GRO- $\beta$                        | GM-CSF           |
| IL-12                        |                               | MIP-1 $\beta$  | FasLigand              | IL-18                               | SCF              |
|                              |                               | CINC           | CD30Ligand             | TGF- $\alpha$                       | INF- $\gamma$    |
|                              |                               |                | VEGF                   | oncostatine                         |                  |
|                              |                               |                | HGF                    | neurotrophines                      |                  |

**Abréviations:** IL-1Ra, *IL-1 receptor antagonist*; GRO, *growth-related gene product*; MIP, *macrophage infiltrating protein*; CINC, *cytokine induced chemoattractant*; INF, *interféron*; G-CSF, *granulocyte-colony-stimulating factor*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; HGF, *hepatocyte growth factor*; M-CSF, *monocyte chemotactic protein-1*; MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*; SCF, *stem cell factor*.

### 1.2.1 Pathologies et désordres associés aux neutrophiles

La plupart des pathologies associées aux neutrophiles se manifeste par la présence d'infections bactériennes récurrentes venant du fait que ces cellules comportent un ou plusieurs mécanismes anti-bactériens déficients ou encore lorsque le patient manifeste une neutropénie. Certaines sont directement en lien avec les granules ou leur contenu.

Par exemple, des granules anormalement gros, syndrome de Chédiak-Higashi, empêche l'initiation d'une réponse inflammatoire. La déficience en MPO résulte en un désordre génétique atteignant une personne sur deux milles (Abramson et Wheeler, 1993).

La maladie du *leukocyte adhesion deficiency*-(LAD)-1 est un désordre autosomique et récessif qui affecte environ une personne sur un million. Cette maladie résulte en des mutations (majoritairement des mutations faux-sens et non-sens) dans la région du gène CD18 (ou sous-unité  $\beta$ 2) encodé dans le chromosome 21q22.3 (Weitzman *et al*, 1991). CD18 est la sous-unité commune de trois intégrines (*lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1), *macrophage-1 antigen* (Mac-1) et p150,95), respectivement associée avec  $\alpha$ L $\beta$ 2/ CD11a,  $\alpha$ M $\beta$ 2/CD11b et  $\alpha$ X. Comme les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  s'apparient en tant que précurseur intracellulaire, la présence d'une mutation dans la sous-unité  $\beta$  prévient grandement cette liaison et le transport des sous-unités à la surface cellulaire. Elle peut affecter la rigidité structurale de la sous-unité  $\beta$  et influencer soit les mouvements inter domaines ou la relation quaternaire avec l'autre sous-unité (Arnaout *et al*, 1993). De plus, un apprêtage incorrect de l'ARNm (épissage incorrect ou ARNm instable) entraîne une forme tronquée ou instable de la sous-unité  $\beta$  (Anderson, Kishimoto et Smith, 1997). Dans le cas du LFA-1, une sous expression de la sous-unité  $\beta$  entraîne la diminution des intégrines à l'intérieur du radeau peptidique (*lipid raft*), qui joue un rôle dans l'activité régulatrice positive des intégrines et qui est responsable de la formation de complexes d'intégrines avec d'autres protéines membranaires (CD82 et CD63) (Hogg *et al*, 2002). Le défaut ou l'absence de ces molécules d'adhésion à la surface des leucocytes diminuent grandement leur habileté à adhérer aux cellules endothéliales avec les sélectines et ainsi à migrer au site d'infection (Cox et Weathers, 2008). La maladie se manifeste cliniquement par des infections bactériennes récurrentes de la bouche, de la peau et du tractus respiratoire ainsi qu'une susceptibilité plus grande pour les infections fongiques.

Un défaut au niveau du fonctionnement de la *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH)-oxydase se caractérise par une maladie orpheline héréditaire grave appelée la *X-chronic granulomatous disease* (X-CGD). Cette maladie rare reliée

au chromosome-X est associée à une déficience en gp91<sub>phox</sub> (70%), p47<sub>phox</sub> (30%) ou p22<sub>phox</sub> et p67<sub>phox</sub> (2 à 3%) (prévalence : 1/200,000). Elle est caractérisée par des infections sévères et récidivantes, résultat d'une incapacité des phagocytes à produire des dérivés oxygénés toxiques (Hiraoka *et al*, 1998).

Plusieurs maladies comme la polyangéite microscopique, la granulomatose de Wegener et l'angéite granulomateuse allergique sont reconnues collectivement comme des vasculites associées à des *antineutrophil cytoplasmic antibodies* (ANCA). Les ANCA sont des anticorps anti-cytoplasmiques de neutrophiles. Les deux principales cibles des ANCA sont la MPO et la protéinase 3, molécules présentes dans les granules des neutrophiles. Ces anticorps dirigés contre les protéines du soi peuvent entraîner le développement de vasculites et de glomérulonéphrites systémiques (Hartman *et al*, 1990 ; Osaki, 2007).

Une diminution en nombre de neutrophiles (neutropénie) peut être congénitale ou liée à d'autres facteurs (chimiothérapie ou infection). Cet état provoque les mêmes caractéristiques qu'un patient possédant des neutrophiles inefficaces.

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune inflammatoire chronique très fréquente puisqu'elle affecte entre 0,5 et 1% de la population adulte (Kitsis et Weissman, 1991). Cette maladie systémique se manifeste le plus souvent localement au niveau de l'articulation : douleur, rougeur, formation d'un œdème tissulaire, hypervascularisation, augmentation du liquide synovial, présence de cytokines pro-inflammatoires et infiltration de différentes cellules inflammatoires (macrophages, fibroblastes, lymphocytes T, cellules dendritiques et neutrophiles). Les neutrophiles représentent 80% des cellules infiltrées dans le synovium et dans les tissus articulaires. Ils s'accumulent à la jonction pannus-cartilage, premier site d'érosion du cartilage, et contribuent directement à sa destruction (Wipke et Allen, 2001 ; Gougerot-Pocidallo et Halbwachs-Mecarelli, 2005). Depuis plusieurs d'années, des avancées majeures ont été réalisées pour comprendre les facteurs cruciaux dans la régulation des cellules osseuses et l'érosion destructive de l'os. C'est sans grande surprise que nous apprenions que ces facteurs sont exprimés par les cellules inflammatoires, incluant le neutrophile, présentes dans le joint. Le relâchement rapide de facteurs, notamment le *receptor activator of nuclear factor-κB* (RANK), le RANK

ligand (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG), de protéases et de formes réactives de l'oxygène par les neutrophiles dans les joints, supplémente celui produit par les autres cellules inflammatoires présentes dans le tissu synovial (Poubelle *et al*, 2007). La présence accrue de RANK/RANKL/OPG stimule la formation des ostéoclastes qui contribuent à l'érosion rapide des os durant la maladie (Haynes, 2008). Ainsi, la présence accumulée de neutrophiles activés aux joints et dont l'apoptose est dérégulée provoque cette maladie (Hallet *et al*, 2008).

### 1.3 Les éosinophiles

Dans le cadre de ce projet, le deuxième type de granulocytes étudiés est l'éosinophile. Comparativement aux neutrophiles, on retrouve très peu d'éosinophiles (5%) dans la circulation, la plus grande majorité se retrouvant dans les tissus. Tout comme les neutrophiles, ce sont des cellules qui ont une assez courte demi-vie dans la circulation sanguine. Incubés *in vitro*, après 24 heures et sans l'ajout d'agoniste, on retrouve environ 40% d'éosinophiles en apoptose spontanée (Dewson, Cohen et Wardlaw, 2001). Par contre, dans les tissus, ils peuvent survivre jusqu'à une dizaine de jours. Ils possèdent un noyau bilobé et sont de taille et de complexité granulocytaire semblables aux neutrophiles. Bien qu'ils puissent phagocyter les micro-organismes et les digérer, leur premier rôle est d'attaquer les parasites. L'activité cytotoxique de ces cellules implique la fusion entre ses granules et sa membrane. Ils se lient aux larves et libèrent par dégranulation des protéines toxiques pour le parasite. Leurs granules contiennent entre autre de l'histaminase, de la *major basic protein* (MBP), de l'*eosinophil cationic protein* (ECP), de l'*eosinophil-derived neurotoxin* (EDN), de la lysophospholipase, de la collagénase, de l'*eosinophil peroxidase* (EPO) et de la catalase (Rothenberg et Hogan, 2006).

Une concentration élevée en éosinophiles peut être attribuable à plusieurs facteurs : infection parasitaire, allergie, asthme, maladies inflammatoires de la peau (lupus), leucémie ou cancer. Dans le cas d'une inflammation allergique, les éosinophiles sécrètent des protéines (MBP, ECP, EDN, EPO) et des cytokines (IL-4, IL-5, IL-8, TNF- $\alpha$ ) qui endommagent l'épithélium des bronches, résultant ainsi en une hyperactivité. Lors d'une infection parasitaire (par exemple, l'helminthe *Paragonimus westermani*), le parasite est reconnu pour induire l'apoptose des éosinophiles assez

rapidement. Parallèlement à la production dans la moelle osseuse et au recrutement sélectif des éosinophiles aux sites inflammés, le contrôle sur leur apoptose est ultime puisqu'il influence l'importance des éosinophiles dans le milieu. Les éosinophiles jouent un rôle important dans plusieurs maladies inflammatoires. En condition normale, l'éosinophile se dirige spontanément en apoptose et c'est en présence de cytokines pro-inflammatoires (IL-3, IL-5, GM-CSF) qu'il peut survivre plus longtemps (Min *et al*, 2004).

#### **1.4 Les lignées cellulaires à l'image des granulocytes**

Dans ce doctorat, trois types de lignées cellulaires sont utilisés. Les PLB-985 et les X-CGD sont des cellules promyélocytaires humaines qui sont à l'image des neutrophiles (Hiraoka *et al*, 1998 ; Pedruzzi *et al*, 2002). L'ajout de diméthylsulfoxyde (DMSO) pendant cinq jours permet à ces cellules d'être différenciées en neutrophiles matures. Suite à une recombinaison homologue du gène responsable de la fabrication de la sous-unité gp91-phox chez les PLB-985, des chercheurs ont créé une lignée déficiente (X-CGD) et incapable de générer la production de radicaux libres après différenciation et en présence d'un stimulant (Hiraoka *et al*, 1998). Cette lignée a la capacité de mimer la granulomatose septique chronique. L'utilisation de ces deux lignées nous offre un excellent modèle *in vitro* pour étudier le rôle potentiel de la NADPH-oxydase dans l'apoptose des phagocytes.

Les AML 14.3D10 (3D10) sont quand à elles des cellules dites éosinophiliques. Elles expriment les granules et l'éotaxine des éosinophiles mais n'expriment aucunement les récepteurs associés aux chimiokines présents chez les éosinophiles matures. Toutefois, l'ajout d'IL-3, d'IL-5 et de GM-CSF résulte en une différenciation en éosinophiles matures à plus de 70%. Les cellules différenciées développent une activation fonctionnelle accrue en migrant et en adhérant aux cellules épithéliales via l'acquisition de récepteurs aux chimiokines (CCR-1 et CCR-3) (Zimmermann *et al*, 2000).

## 2. L'INFLAMMATION

### 2.1 Généralités et implication du neutrophile

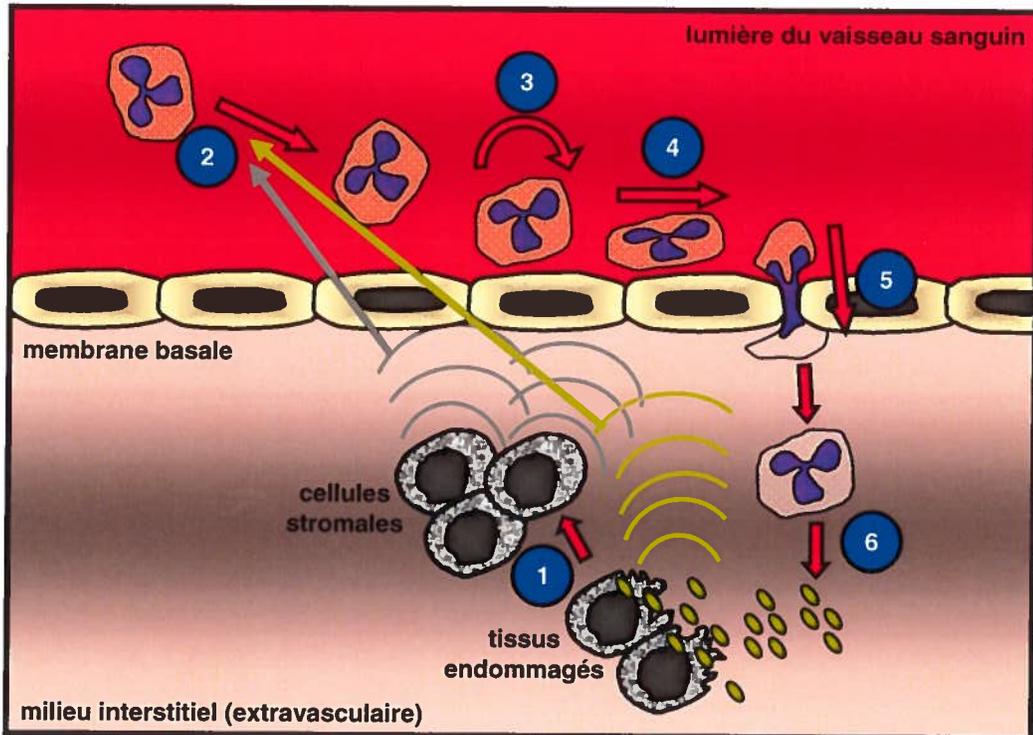
L'inflammation est le procédé de base par lequel le corps répond à une infection ou à une irritation. Elle se manifeste par l'apparition d'une douleur, de chaleur, d'enflure et d'une rougeur. Elle conduit normalement vers la réparation et le rétablissement des structures et des fonctions des tissus endommagés contribuant au maintien de l'homéostasie. Elle se manifeste par l'apparition de plusieurs éléments majeurs : augmentation du flux sanguin, accumulation et activation de cellules inflammatoires d'origine hématopoïétique, augmentation de la perméabilité capillaire suivi par l'élimination de débris cellulaires, des particules étrangères et des cellules inflammatoires (Roit, Brostoff et Male, 1994). Ces procédés sont principalement orchestrés par les médiateurs inflammatoires. Ce sont des molécules solubles qui sont sécrétées par les cellules ou générées dans le plasma à partir des protéines de la matrice qui agissent directement sur les cellules inflammatoires cibles par l'entremise de récepteurs spécifiques. Il s'agit principalement de cytokines, de chimiokines, de médiateurs lipidiques (spécialement mais non exclusivement dérivés de l'acide arachidonique) (Henson, 2005).

Le rôle des neutrophiles dans une réaction inflammatoire typique est clairement établi. Ils s'accumulent dans les foyers inflammatoires et peuvent s'associer aux éosinophiles, aux lymphocytes et aux macrophages pour former des granulomes. Il est l'acteur le plus important et le plus étudié dans la réponse inflammatoire. Etant les principaux phagocytes circulants, les neutrophiles sont les premiers et les plus abondants des leucocytes libérés au site d'infection. En plus de jouer un rôle prépondérant dans la défense de l'organisme, le neutrophile est impliqué dans la pathogenèse des tissus inflammés en plus d'être responsable de certaines maladies inflammatoires persistantes (Seely, Pascual et Christou, 2003).

#### *La diapédèse*

La figure 2 illustre la diapédèse des neutrophiles au foyer inflammatoire. Les neutrophiles qui circulent dans le sang, possèdent un rôle bien particulier de

surveillance en vue de l'élimination des microorganismes. L'évènement initial qui permet au neutrophile de traverser la barrière endothéliale est l'apparition de nouvelles molécules d'adhésion sur l'endothélium adjacent au site inflammé.



**Figure 2. Transmigration du neutrophile au site inflammatoire.** La marginalisation (2) du neutrophile du vaisseau sanguin jusqu'au site inflammatoire s'effectue grâce au gradient chimiotactique (1) engendré par les bactéries et les cellules endommagées (demi-cercles et flèche verts) ainsi que les cellules stromales activées (macrophages, cellules épithéliales et endothéliales) (demi-cercles et flèche gris). Le roulement (3) et l'étalement (4) (via les sélectines et intégrines) du leucocyte s'effectuent à proximité des cellules endothéliales. La diapédèse (5) implique un désassemblage provisoire des jonctions endothéliales de la membrane basale. Une fois le neutrophile traversé, il procède à l'élimination du pathogène (6) (Witko-Sarsat *et al.* 2000; Luster, Alon et von Andrian, 2005).

La libération de médiateurs pro-inflammatoires par les tissus endommagés résulte en une extravasation locale du leucocyte. L'endothélium sécrète plusieurs facteurs : *platelet-activating factor* (PAF), leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) et une variété de chimiokines. Parmi celles-ci, l'IL-8 est un agent majeur chimiotactique des neutrophiles. De plus, les produits bactériens (LPS ou peptides formylés) possèdent un grand pouvoir d'attraction. L'interaction entre les sélectines présentes chez le leucocyte (L-sélectine) et les cellules endothéliales (E- et P-sélectine) rend possible le roulement du neutrophile le long des vaisseaux sanguins. Ce mouvement permet au neutrophile d'être en étroite relation avec l'endothélium et ainsi, en présence de médiateurs

inflammatoires, la cellule est activée. Ce n'est qu'une fois dans cet état que l'adhésion ferme du neutrophile provoque l'arrêt de la cellule (Kvietys et Sandig, 2001). Sous l'activation des récepteurs couplés aux protéines-G, les intégrines leucocytaires ( $\beta$ 1 (*very late antigen* (VLA)-1 à 6) et  $\beta$ 2 (LFA-1, Mac-1 et CD11c/CD18 (CR4)) se lient aux membres de la superfamille des immunoglobulines présents sur les cellules endothéliales: l'*intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 et -2 et la *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) (Dejana, 2006 ; Petri et Bixel, 2006). D'autres molécules d'adhésion (comme les *platelet-endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)-1) sont également impliquées dans la diapédèse. Cette adhésion permet l'étalement du leucocyte et par la suite la transmigration. Elle a habituellement lieu préférentiellement entre deux cellules endothéliales adjacentes où une discontinuité des jonctions serrées et adhérentes est observée ; il s'agit de la voie paracellulaire (Luster, Alon et von Adrian, 2005). Les jonctions adhérentes consistent en des complexes vasculaires-endothéliaux (VE)-cadhérine/cathénine entre les cellules endothéliales. Les jonctions serrées sont des protéines transmembranaires multiples, incluant les occludines, les claudines-1 et-2, ainsi que des protéines associées comme les ZO-1, -2 et -3, qui relient ces jonctions aux protéines du cytosquelette (Kvietys et Sandig, 2001).

Des études plus récentes ont révélées que possiblement cette transmigration n'était pas seulement exclusive à la voie paracellulaire. Ainsi, l'observation de certaines sections a suggéré qu'un peu moins de 10% des transmigrations peut également s'effectuer à travers des régions qui ne sont pas nécessairement associées aux jonctions cellulaires (Petri et Bixel, 2006). Des observations en microscopie électronique ont démontré que le neutrophile pouvait pénétrer à l'intérieur de la cellule endothéliale. Les neutrophiles adoptaient une conformation de cloche avec une constriction au niveau de l'endothélium. Ceci indique que le leucocyte est coincé dans un pore circulaire dont le diamètre est limité. Cette voie transcellulaire a été observée principalement *in vivo* sans être toutefois démontrée *in vitro* (Kvietys et Sandig, 2001).

Pendant la diapédèse, le neutrophile modifie sa conformation continuellement pour s'adapter au passage. Cette modification s'effectue grâce aux différentes protéines du cytosquelette qui constitue la partie dynamique de la cellule. L'actine semblent être impliquée et les protéines ezrine, radizine et moesine sont également importantes pour

relier et contrôler le mouvement de ICAM-I à la surface cellulaire (Dejana, 2006). Dans une autre étude, l'équipe de Nieminen (Nieminen *et al*, 2006) a même avancé la possibilité que certains filaments intermédiaires, notamment la vimentine, étaient importants dans la diapédèse des leucocytes.

### ***La chimioattraction***

Par la suite, le leucocyte requière un gradient chimioattactant afin de compléter le processus de transmigration. Les agents chimioattractants sont des molécules solubles qui confèrent la direction ou le mouvement cellulaire. Les cellules migrent dans la direction où la concentration est plus élevée. Ces agents proviennent de sources variées : sous-produits bactériens, facteurs du complément et chimiokines produits par les cellules inflammatoires et non. La locomotion du leucocyte à travers la matrice extracellulaire s'effectue est médiée par les  $\beta$ 2-intégrines de même que les  $\beta$ 1- et  $\beta$ 3-intégrines (Burg et Pillinger, 2001 ; Witko-Sarsat *et al*, 2000). Emmagasines majoritairement dans les granules du neutrophile, ces intégrines sont rapidement exprimées à la surface membranaire suivant leur stimulation par les agents chimioattractants. Le mouvement requière une formation continue de nouveaux contacts. Ainsi, les  $\beta$ 3-intégrines une fois exprimées sont endocytosées lorsqu'elles atteignent l'arrière de la cellule et finalement recyclées vers l'avant.

## **2.2 Phagocytose, dégranulation et destruction de la bactérie**

Le neutrophile, ainsi que l'éosinophile, sont deux cellules qui ont la capacité de phagocyter. La phagocytose des neutrophiles implique deux types de récepteurs : les récepteurs Fc $\gamma$  (CD32 (Fc $\gamma$ RIIa) et CD16 (Fc $\gamma$ RIIIb)) et les récepteurs du complément (CR1 (CD35) et Mac-1). L'englobement de la bactérie permet la formation d'un phagosome. Tel que mentionné auparavant, les molécules anti-microbiennes du neutrophile sont emmagasinées dans ses granules. Pour qu'une élimination de l'agent étranger soit efficace, il est nécessaire de fusionner ces dernières avec le phagosome pour qu'il y ait formation d'un phagolysosome (Burg et Pillinger, 2001).

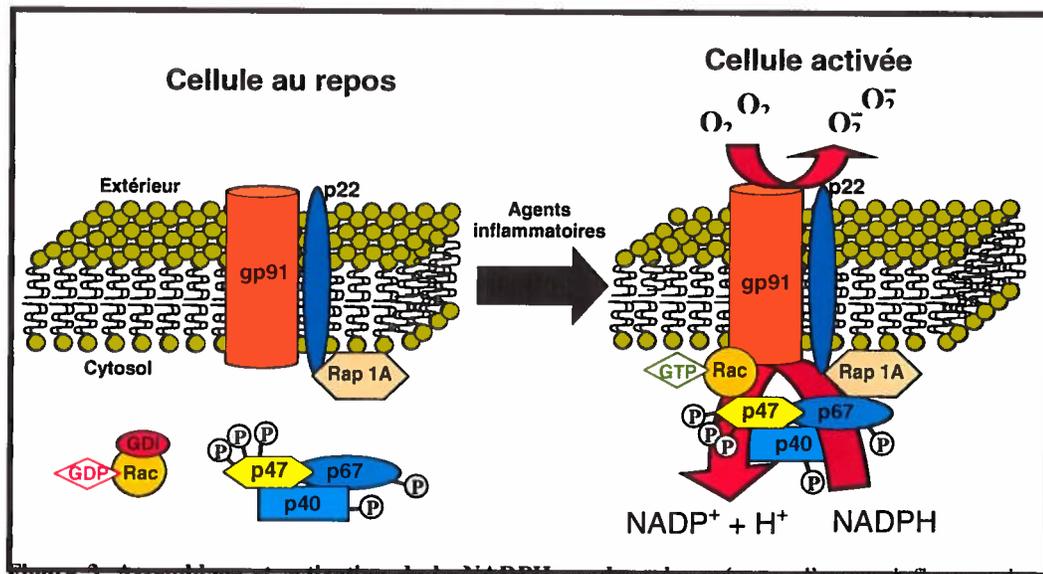


Figure 3. Assemblage et activation de la NADPH oxydase. La présence d'agents inflammatoires provoque l'activation du neutrophile qui favorise l'assemblage de la NADPH-oxydase. Les sous-unités gp91 et p22, présentes dans la membrane, représentent respectivement la grosse et la petite chaîne du cytochrome  $b_{558}$ . La translocation vers la membrane de deux sous-unités cytosoliques, p67 et p47, une protéine accessoire, p40, ainsi que la protéine Rac-GTP, complète l'assemblage de la NADPH-oxydase. Une fois active, l'enzyme peut générer le superoxyde ( $O_2^-$ ) et participer à la destruction des bactéries (inspiré de Assari, 2006).

La dégranulation des vésicules dans le phagolysosome est l'élément clé de l'activité anti-microbienne. Son efficacité chez le neutrophile dépend de deux principaux événements qui ont lieu lorsque ce dernier est stimulé. Le premier événement consiste en la génération de *reactive oxygen species* (ROS) par la flambée oxydative. Cette explosion respiratoire est à l'origine de la bactéricidie des neutrophiles (Selvaraj *et al*, 1966). L'association des protéines membranaires (gp91<sub>phox</sub>, p22<sub>phox</sub> (cytochrome  $b_{558}$ ) et des facteurs solubles (p40<sub>phox</sub>, p47<sub>phox</sub> et p67<sub>phox</sub>) permet l'assemblage d'un complexe enzymatique multi-protéique : la NADPH-oxydase (figure 3). Cet événement est dépendant de l'oxygène et convertit cette molécule en radicaux libres (anions superoxydes ( $O_2^-$ )). L'action de la superoxyde dismutase permet une conversion rapide des anions en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La MPO, présente dans les granules azurophiles, possède le pouvoir de reconverter le peroxyde en un acide dont l'action est encore plus destructrice pour les bactéries que lui-même, soit l'acide hypochloreux (HOCl). Le HOCl oxyde de nombreuses molécules comme les acides aminés, les nucléotides et les hémoprotéines. En plus d'aider à la destruction des bactéries, le HOCl peut entraîner également de graves blessures au tissu hôte. Il inactive entre autre rapidement l' $\alpha$ -1 antiprotéinase qui s'avère être l'inhibiteur

circulant principal des sérines protéases, jouant notamment un rôle dans l'amplification de l'inflammation (Witko-Sarsat *et al*, 2000).

Le deuxième évènement consiste quant à lui à la libération de toutes les protéines et enzymes anti-microbiennes contenues dans les granules. Leur présence dans les granules sous forme latente permet de contrôler leur activation jusqu'à leur libération lors de la dégranulation. Cette libération permet entre autre d'augmenter la perméabilité membranaire des bactéries la rendant plus sensible aux enzymes du neutrophile.

Des médiateurs pro-inflammatoires (comme le GM-CSF et le LPS) prolongent davantage la vie des neutrophiles au foyer inflammatoire en augmentant la stabilité mitochondriale, en réduisant l'activité de la caspase-3 (Watson *et al*, 1999) et finalement en diminuant l'expression du gène *Bcl-2-associated X protein* (Bax), membre de la famille pro-apoptotique *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2) (Dibbert *et al*, 1999).

La maturation du phagolysosome s'organise de façon à éliminer convenablement et efficacement le pathogène. Ainsi, le cocktail anti-microbien (enzymes hydrolytiques, peptides cationiques, NADPH-oxydase) se retrouve dans un milieu graduellement acide (pH < 5.5). Cette habileté d'acidifier le contenu est fondamentale à la fonctionnalité du phagosome. Créant un environnement relativement hostile pour la croissance microbienne, l'acidification améliore l'efficacité des autres composantes microbiennes. Par exemple, les enzymes hydrolytiques qui sont très sensibles au pH requièrent un milieu acide pour une activité optimale. Cet état contribue également à la maturation de procédés impliqués dans le trafic des vésicules.

L'acidification est dépendante de la *vacuolar-type* ATPase (V-ATPase), complexe enzymatique multimérique qui est associé avec la membrane du phagosome naissant. La V-ATPase est une pompe active qui transforme l'énergie de l'ATP hydrolysé en protons à travers la membrane du phagosome (Steinberg, Huynh et Grinstein, 2007).

## 2.3 Modèles inflammatoires

Les modèles d'animaux sont d'une extrême utilité lorsqu'il s'agit d'étudier les bases physiologiques de l'inflammation. La réponse inflammatoire *in vivo* implique des interactions multiples entre différentes cellules qui peuvent s'avérer plus difficiles à étudier *in vitro*. L'étiologie complexe de l'inflammation a permis le développement de plusieurs modèles expérimentaux. On peut les classer en deux grandes catégories : soit les modèles qui simulent une inflammation aiguë ou encore chronique (Winyard et Willoughby, 2003).

Brièvement, il existe plusieurs modèles qui nous permettent de simuler une inflammation aiguë chez le rat ou la souris. En induisant un œdème dans la patte de l'animal à l'aide de divers produits comme la carragénine (Winter, Risley et Nuss, 1962), l'histamine (Amann *et al*, 1995) ou la formaline (Turner, 1965) ou encore dans l'oreille grâce au xylène (Junping *et al*, 2005), à l'acide arachidonique (Romy, Ledon et Gonzalez, 1998), au PMA (Griswold, Martin et Badge, 1998) ou à l'oxazolone (Evans, Hossack et Thomson, 1971), on arrive à recréer ce type d'inflammation. De plus, une augmentation de la perméabilité vasculaire peut être induite par l'acide acétique dans ces mêmes animaux (Whittle, 1964). Enfin, une cavité propice à l'inflammation peut être introduite sous-cutanée via la formation d'une poche d'air. L'agent irritant peut être de la carragénine (Selye, 1953) ou du LPS (Vandal *et al*, 2003). Ce modèle inflammatoire, utilisé dans le premier article présenté dans cette thèse (Lavastre *et al*, 2004), est plus amplement décrit en 2.3.1.

L'implantation sous-cutanée d'un corps étranger (une boulette de coton compressée (Godlstein *et al*, 1976) ou de petites tiges de verre (diamètre de 6mm) stérilisées (Vogel, 1996)) dans un rat entraîne une inflammation de type chronique. L'introduction de ces objets dans la peau de l'animal provoque l'apparition d'un tissu connectif non différencié (Winyard et Willoughby, 2003).

### 2.3.1 Le modèle de la poche d'air murine

Hans Selye fut le premier à décrire le modèle de la poche d'air en 1953 chez les rats (Selye, 1953). Ce modèle consiste à injecter de l'air stérile sous la surface dorsale

d'un animal (rat ou souris). Cet influx crée une cavité stérile dans l'attente de l'injection d'un stimulus pouvant provoquer une réponse inflammatoire. L'injection d'air doit s'étaler sur une période de cinq jours afin de permettre le développement en périphérie d'une couche de cellules concentrée en fibroblastes, macrophages et mastocytes. Cette couche comporte des manifestations semblables au mécanisme inflammatoire présent dans les tissus synoviaux. En effet, des chercheurs ont démontré que la perturbation mécanique du tissu connectif permettait une organisation cellulaire similaire au tissu synovial suite aux observations obtenues en microscopie électronique ou encore avec un colorant (haematoxyline ou éosine). Ainsi, une structure dynamique étroitement liée à la membrane synoviale est formée après cinq jours (Edwards, Sedgwick et Willoughby, 1981). Cette cavité, utilisée comme une «chambre de culture» permet de concentrer l'effet uniquement à l'intérieur de la poche puisque la couche cellulaire tapissant la cavité interne empêche la diffusion du produit injecté.

Cette technique a comme avantage une étonnante faisabilité ainsi qu'une bonne reproductibilité. La poche d'air nous permet de recueillir, de quantifier et d'identifier facilement les leucocytes dans la cavité. Elle offre la possibilité d'effectuer différentes analyses biochimiques (morphologie et activité enzymatique) sur l'exsudat constitué de nombreuses cellules inflammatoires ayant infiltré la poche et d'un fluide dans lequel elles baignent, et ce à partir d'une variété de molécules injectées. Dans le cadre de ce doctorat, l'utilisation du LPS comme molécule inflammatoire nous permet d'obtenir un nombre très élevé de neutrophiles à court terme, ce qui comporte un net avantage par rapport aux autres techniques (Colville-Nash et Lawrence, 2003).

#### **2.4 Résolution de l'inflammation**

Un programme coordonné de résolution de l'inflammation s'initie dans les premières heures de la réponse inflammatoire. Lorsqu'il y a eu destruction du stimulus étranger, il y a diminution progressive du recrutement de neutrophiles, la mort cellulaire est engagée et il y a un rétablissement progressif de la population à un niveau basal. Peu à peu, les neutrophiles meurent par apoptose et se font phagocyter par les macrophages. Conséquemment, cette phagocytose promouvoit la clairance des neutrophiles et le relâchement de cytokines réparatrices (TGF- $\beta$ 1) et anti-inflammatoires comme l'IL-

10, l'IL-4 et l'IL-13, synthétisées par le macrophage. Ceci affecte la production en cytokines des neutrophiles et ces derniers sécrètent l'IL-1Ra qui est une cytokine anti-inflammatoire (Witko-Sarsat *et al*, 2000). Le programme anti-inflammatoire se termine finalement par la migration des macrophages vers les vaisseaux lymphatiques (Serhan et Savill, 2005).

La reconnaissance par les macrophages et l'élimination efficace des granulocytes apoptotiques sans que ceux-ci relâchent dans le milieu extracellulaire leur contenu chimiotactique s'avèrent primordiales dans la résolution de l'inflammation. Une régulation adéquate et rapide de l'apoptose est donc vitale. Un mauvais contrôle dans ce processus entraîne une accumulation et une persistance des cellules au site inflammatoire résultant en des maladies inflammatoires chroniques. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont développées afin d'améliorer la clairance des cellules apoptotiques et ainsi la résolution de l'inflammation.

### 3. L'APOPTOSE

#### 3.1 Généralités

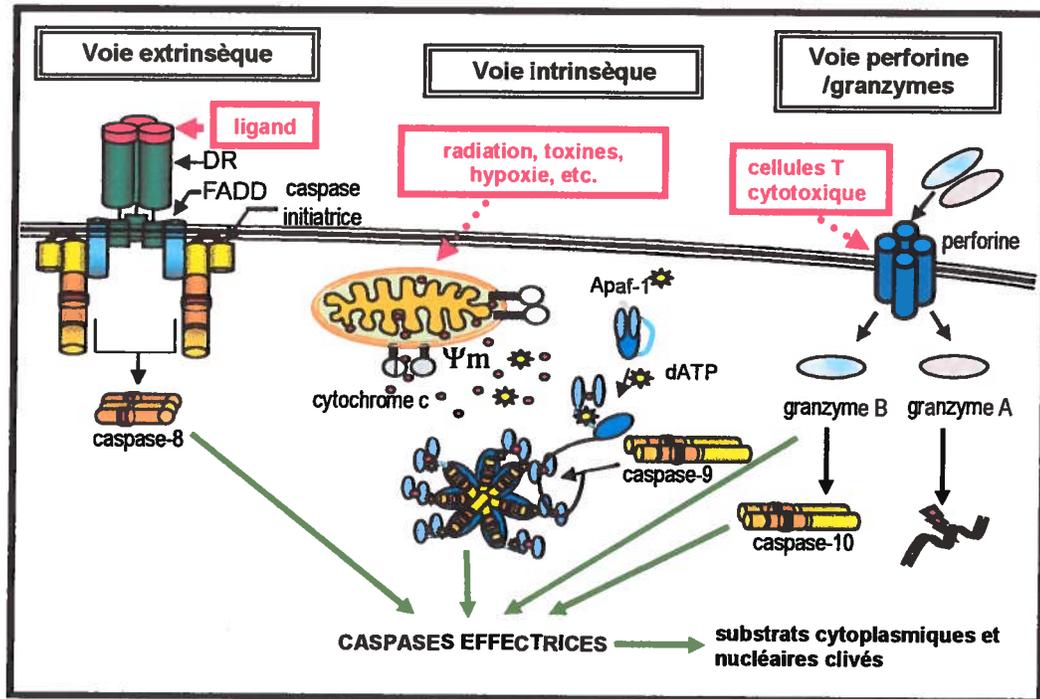
Le terme «apoptose» fut employé pour la première fois par Kerr et ses collaborateurs en 1972 (Kerr, Wyllie et Currie, 1972) afin de décrire une mort cellulaire morphologiquement distincte et particulière. Ce terme est issu du mot grec *apoptosis* (*apo* : loin de, qui marque un achèvement et *ptosis* : chute). Cette mort cellulaire programmée est généralement décrite par des particularités morphologiques et des mécanismes biochimiques distincts.

L'apoptose est considérée comme une composante vitale dans une variété de procédés biologiques incluant le maintien de l'homéostasie cellulaire, la régénération tissulaire, le fonctionnement du système immunitaire ainsi que le développement embryonnaire (Elmore, 2007).

Quoi qu'au niveau morphologique et biochimique l'apoptose puisse se distinguer de la nécrose, il y a un chevauchement entre les deux procédés. En effet, elles partagent les mêmes réseaux biochimiques qui sont décrits comme le « continuum apoptose-nécrose » (Zeiss, 2003). Qu'une cellule meurt par apoptose ou par nécrose dépendra en partie de la nature du signal, du type de tissus, du stage de développement ou encore du milieu physiologique. Par contre, l'apoptose est un procédé grandement impliqué dans la résolution de l'inflammation. Les cellules apoptotiques sont ainsi ingérées sagement par les macrophages sans dommage pour l'organisme (Elmore, 2007).

L'apoptose est contrôlée par une série d'évènements biochimiques qui entraîne la cellule à mourir de façon ordonnée. C'est un mécanisme qui est remarquablement conservé entre les espèces. L'apoptose peut être initiée principalement par deux types de facteurs, soit les facteurs extrinsèques ou la voie des *death receptor* (DR) et les facteurs intrinsèques ou la voie de la mitochondrie (Los, Wesselborg et Schulze-Osthoff, 1999). Il existe également une autre voie additionnelle (classée dans la voie

extrinsèque). Celle-ci, qui implique la perforine et les granzymes (A ou B), s'effectue via les lymphocytes T cytotoxiques.



**Abréviations :**  $\Psi_m$ , potentiel membranaire mitochondrial ; FADD, *Fas-associated death domain* ; Apaf-1, *apoptotic protease-activating factor-1*, dATP: désoxy-adénosine triphosphate.

**Figure 4. Phases initiatrices de l'apoptose.** Cette figure illustre les premières étapes des principales voies d'activation de l'apoptose : la voie des DR, la voie de la mitochondrie et celle des perforine/granzymes. La voie d'activation dépendra du stimulus cytotoxique reçu. Pour que la voie des DR soit activée, un ligand (exemple, FasL ou CD95L sur les cellules T cytotoxiques) doit fixer le récepteur (récepteur Fas). Ainsi, il y a recrutement d'une caspase (caspase-8) et autotrotéolyse de cette dernière. La voie de la mitochondrie est activée par une déstabilisation de son potentiel membranaire. La déstabilisation de la mitochondrie ainsi créée provoque la libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome via l'activation de la caspase-9. Finalement, les cellules T cytotoxiques peuvent activer la voie des perforine/granzymes. Chaque voie active une caspase initiatrice (-8, -9 ou -10) qui à son tour active les caspases effectrices (Hengartner, 2000 ; Sadowski-Debbing *et al*, 2002 ; Elmore, 2007).

### 3.2 Voie extrinsèque

Cette voie est responsable de l'élimination des cellules non désirées pendant le développement, l'éducation du système immunitaire et l'immunosurveillance (Boatright et Salvesen, 2003). Elle initie l'apoptose par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires : les DR ou récepteurs de mort. Ceux-ci font partie des membres de la superfamille des TNF-R. Ces membres partagent la même caractéristique, soit de contenir une à cinq séquences répétées riches en cystéines à l'intérieur de leur

domaine extracellulaire ainsi qu'un domaine cytoplasmique communément appelé le *death domain* (DD) (Ashkenazi et Dixit, 1998). Le DD est essentiel pour la transduction intracellulaire du signal apoptotique. On retrouve dans cette famille plusieurs couples ligand/récepteur: FasL/FasR (CD95L/CD95), TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 et Apo2L/DR5 (Elmore, 2007).

### ***Signalisation par le CD95***

Un des DR qui détient un rôle très significatif dans le système immunitaire est le CD95 (ou Fas). Cette molécule est exprimée par plusieurs types cellulaires. Son expression peut être augmentée par des cytokines (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) mais aussi par l'activation des lymphocytes T. L'apoptose via le CD95 est engendrée directement par son ligand naturel, le CD95L, qui est une molécule transmembranaire de type II associée au TNF exprimée entre autres par les lymphocytes T cytotoxiques (Krammer, 1999). Suite à la liaison à son ligand, des protéines adaptatrices cytoplasmiques sont recrutées et se lient parfaitement au récepteur. Dans le cas du CD95, il s'agit du FADD. Ce dernier s'associe à son tour avec la caspase-8 via une dimérisation du DR. La formation d'un tel *death-inducing signalling complex* (DISC) ou complexe de signaux de mort entraîne l'autocatalyse et l'activation de la caspase-8, rendant cette dernière apte à activer des caspases effectrices telle la caspase-3.

### ***La voie des perforine/granzymes***

Le système CD95/CD95L est la voie prédominante des lymphocytes T cytotoxiques pour induire l'apoptose chez les cellules cibles (Brunner *et al*, 2003). Par contre, ces cellules ainsi que les cellules NK partagent une autre voie cytotoxique qui est critique pour la défense contre les microbes et les cellules transformées : il s'agit de la voie des perforine/granzymes. Parce qu'elle fait intervenir un agent provenant de l'extérieur (granzyme B), cette voie peut être aussi incluse dans la voie extrinsèque (Stennicke et Salvesen, 2000). Ainsi, après la reconnaissance de la cellule cible, des granules cytotoxiques sont exocytosés et relâchent leur contenu dans cette dernière pour induire l'apoptose. Les granules contiennent des protéines qui perturbent l'intégrité de la membrane cellulaire, soit la perforine, ainsi qu'une famille de sérines protéases connues comme étant les granzymes (Lieberman, 2003). Ainsi, la granzyme B, une fois à l'intérieur de la cellule, scinde des protéines aux résidus d'aspartate, comme la caspase-10. Des études ont également démontré que la granzyme B pouvait utiliser la

voie intrinsèque afin d'amplifier les signaux de mort en induisant la libération de cytochrome c (Barry et Bleackley, 2002 ; Russell et Ley, 2002). De plus, la granzyme B peut directement activer les caspases effectrices. La granzyme A, quant à elle, active en parallèle une voie indépendante des caspases en scindant l'ADN simple brin (Martinvalet *et al*, 2005) en plus de pouvoir déstabiliser le potentiel mitochondrial par un mécanisme encore inconnu à ce jour (Lieberman, 2003).

### 3.3 Voie intrinsèque

La voie intrinsèque est utilisée pour éliminer les cellules en réponse à des radiations, à des agents chimiothérapeutiques ou encore à un dommage subit par la mitochondrie. L'activation de la voie de la mitochondrie se fait via la déstabilisation de son potentiel transmembranaire, ce qui entraîne une distribution différente des protéines à sa surface. Cette dépolarisation est le résultat de la présence de facteurs intrinsèques comme la perte de protéines anti-apoptotiques, l'activation de p53, l'irradiation, la présence de ROS ou les dommages dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Los *et al*, 1999). Suite à la perte de la protéine anti-apoptotique (famille Bcl-2) à la surface membranaire de la mitochondrie entraînant une altération de la perméabilité, il y a libération du cytochrome c dans le cytosol. Ce dernier s'associe à l'Apaf-1 qui est une protéine de 130 kDa consistant en trois domaines distincts. En présence de dATP, l'Apaf-1 recrute la pro-caspase-9 via une région spécifique (*caspase recruitment domain (CARD)*), formant ainsi l'apoptosome tout en activant la caspase-9. La caspase-9 maintenant activée quitte l'apoptosome et peut à son tour cliver d'autres caspases (Cohen, 1997).

L'activation de la cascade des caspases est considérée comme l'élément central de la machinerie apoptotique. Elle débute par l'autoactivation des caspases initiatrices et l'activation des caspases inflammatoires et effectrices. Bien qu'il existe deux voies d'initiation, il est important de comprendre qu'elles ne sont pas indépendantes l'une de l'autre. Ainsi, des études ont démontré que la caspase-8 pouvait amplifier la voie de la mitochondrie via le clivage de la protéine anti-apoptotique *BH3-interacting domain death agonist (Bid)* (famille Bcl-2) (Hengartner, 2000). Le fragment de Bid perméabilise la membrane de la mitochondrie et accélère son désassemblage (Lassus, Opitz-Araya et Lazebnik, 2002).

### 3.4 Les caspases

Les caspases forment une famille d'endoprotéases qui ont la particularité de cliver leur substrat après un résidu aspartique (D). Leur nom provient du fait qu'elles sont spécifiquement des cystéines aspartases. Une activation non régulée des caspases pourrait être létale pour la cellule. C'est pourquoi elles sont synthétisées sous la forme d'un précurseur latent – un zymogène. Cette protéine correspond à une séquence particulière: un pro-domaine de régulation de longueur variable en N-terminal suivi de deux sous-unités, p10 et p20, cette dernière contenant un domaine catalytique. Le corps du centre catalytique est formé par une séquence conservée de cinq acides aminés : QACXG. Ces procaspases requièrent un événement d'activation. Suite à la coupure du pro-domaine près d'un résidu aspartate bien précis, elle se convertissent en caspases actives. Certains auteurs ont démontré que plusieurs caspases étaient actives sous forme d'un hétérotétradimère contenant deux sites actifs (Hengartner, 2000). La spécificité du substrat des caspases (sauf la -2) est déterminée par une séquence de quatre acides aminés qui sont présents au site de clivage (Budihardjo *et al*, 1999 ; Cohen, 1997 ; Donepudi et Grütter, 2002).

Selon leur structure et leur fonction, les caspases sont divisées en trois familles dont deux sont associées directement à l'apoptose et l'autre impliqué dans l'inflammation: les caspases initiatrices, les caspases effectrices et celles associées à l'élaboration de cytokines (Cohen, 1997). Ces caspases sont représentées brièvement dans le tableau 3.

#### 3.4.1 Les caspases initiatrices

Les caspases initiatrices sont les premières à être activées dans l'apoptose et constituent la première étape qui permet d'activer les caspases effectrices. Les caspases initiatrices possèdent un long pro-domaine dont certaines régions sont associées à des récepteurs ou des protéines adaptatrices. Pour être activées, les caspases-8 et -10 doivent être recrutées par un récepteur transmembranaire (DR). Un clivage croisé entre deux caspases initiatrices est effectué pour compléter l'activation. Par contre, ce clivage n'est pas essentiel à la formation du site actif. Ainsi l'activation de la caspase-9 requière un arrangement particulier à l'intérieur de l'apoptosome

(complexe composé de l'Apaf-1 et de cytochrome c) ainsi qu'une dimérisation procurant une surface compatible avec l'organisation catalytique du site actif (Boatright et Salvesen, 2003). Même si la caspase-9 est la caspase initiatrice la plus commune dans la voie intrinsèque, une étude récente a démontré que la caspase-2 est requise dans les réponses apoptotiques suite notamment au dommage de l'ADN (Lassus, Opitz-Araya et Lazebnik, 2002).

**Tableau 3. Les familles de caspase (inspiré de Budihardjo *et al*, 1999)**

|  | Synonymes            | Caractéristiques/substrats             |
|--|----------------------|--|
| <b><i>Caspases initiatrices</i></b>                    |                      |  |
| Caspase-2  | Nedd2, ICH1          | Absente chez le neutrophile            |
| Caspase-8  | FLICE, MACH          | Associée à Fas, TNFR I                 |
| Caspase-9  | MCH6, ICELAP6        | Activée par l'apoptosome               |
| Caspase-10   | FLICE2, MCH4         | Associée à DR4, activée par granzyme B |
| <b><i>Caspases effectrices</i></b>                     |                      |  |
| Caspase-3  | CPP32, YAMA, Apopain | Rôle clé dans l'apoptose               |
| Caspase-6  | MCH2                 | Clive la membrane nucléaire            |
| Caspase-7  | MCH3, CMH, ICELAP3   | Homologue à 52% avec Casp3             |
| Caspase-14   | MICE                 | Clivée par aucune autre caspase        |
| <b><i>Caspases inflammatoires (famille de ICE)</i></b> |                      |  |
| Caspase-1  | ICE                  | Clive pro-IL-1 $\beta$                 |
| Caspase-4  | TX, ICH2, ICERII     | Clivée par Casp8                       |
| Caspase-5  | TY, ICERIII          | Homologue à 77% avec Casp4             |
| Caspase-11   | -                    | Rôle négligeable dans l'apoptose       |
| Caspase-12   | -                    | Activée par le stress dans le RE       |
| Caspase-13   | ERICE                | Clivée par Casp8 et granzymeB          |

**Abréviations:** TNFR, *tumor necrosis factor receptor*; ICE, IL-1 $\beta$  *converting enzyme*, Casp, caspase.

### 3.4.2 Les caspases effectrices

Les caspases effectrices sont principalement activées par les caspases initiatrices et occasionnellement par d'autres protéases sous certaines conditions. Ces caspases clivent presque exclusivement des protéines de la machinerie cellulaire essentielle au maintien de la vie plutôt que d'activer d'autres caspases. La caspase-3 joue un rôle bien particulier dans la phase d'exécution de l'apoptose. La forme active de cette caspase est un marqueur important lors de l'identification des cellules apoptotiques. C'est la caspase à laquelle on attribue le plus grand nombre de substrats clivés. La

caspase-7 est identifiée, tout comme la caspase-3, comme une caspase exécutive, et de par le fait qu'elle lui soit homologue à près 52%, elles partagent de nombreux substrats. Le rôle apparent de la caspase-3 dans l'activation de la caspase-7 est d'enlever la partie N-terminale. Toutefois, la raison ainsi que son influence sur l'activation demeurent encore inconnues (Stennicke et Salvesen, 2000). Ces deux caspases se retrouvent dans le cytosol sous forme de dimère avant même leur activation et leur clivage est essentiel pour leur activation. Ces caspases possèdent un pro-domaine beaucoup plus petit que les caspases initiateuses. La caspase-6, un peu moins étudiée que les autres caspases effectrices, reconnaît principalement les protéines nucléaires (Boatright et Salvesen, 2003).

### **3.4.3 Les caspases inflammatoires**

Ces caspases sont aussi connues sous la famille des ICE puisqu'elles sont impliquées dans la maturation de plusieurs cytokines inflammatoires (comme l'IL-1 ou l'IL-18). Par exemple, l'utilisation de l'inhibiteur de caspase-1 Ac-YVAD-CHO prévient la production de l'IL-1 $\beta$  chez les monocytes, suggérant ainsi que cette caspase est en réalité une enzyme qui élabore l'IL-1 $\beta$  (Thornberry *et al*, 1992). Cette affirmation fut confirmée plus tard en utilisant des souris déficientes en caspase-1 qui étaient incapables d'exprimer l'IL-1 (Kuida *et al*, 1995). Ces caspases promouvoient l'assemblage de complexes multiprotéiniques, connus sous le nom d'inflammasome, qui sont requis lors de l'activation des caspases inflammatoires. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine CARD à l'intérieur de leur partie N-terminale, tout comme la caspase-9. Elles sont moins impliquées que les deux autres familles dans l'apoptose. Seule la caspase-1 aurait un rôle à jouer dans l'apoptose des thymocytes. (Martinon et Tschopp, 2007).

### **3.5 Les substrats des caspases**

L'activation biochimique des composantes clés lors de l'apoptose est responsable du changement morphologique de la cellule, de la destruction de la membrane nucléaire, du dommage à la mitochondrie, de la condensation de la chromatine, de la fragmentation de l'ADN et finalement de la formation de corps apoptotiques (Budihardjo *et al*, 1999). Ainsi, durant la phase exécutive de l'apoptose, plusieurs

protéines sont clivées. La poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), polymérase impliquée dans la réparation de l'ADN, est reconnue pour être possiblement le substrat le plus étudié des caspases. Présente chez la plupart des cellules, elle peut même servir d'indicateur d'apoptose. La DNA-PK et la U1-70 kDa, impliquées respectivement dans la réparation de l'ADN double brin et l'épissage de l'acide ribonucléique messager (ARNm), sont également dégradées pendant l'apoptose. Il est à noter qu'aucune de ces protéases n'est exprimée par le neutrophile (Ward *et al*, 1999). Finalement un groupe important de protéines est grandement affecté par les caspases, les protéines du cytosquelette. Qu'elles soient impliquées dans la formation de corps apoptotiques (fodrine) ou dans le mouvement des protéines membranaires, leur dégradation est particulièrement apparente du fait que la cellule diminue en taille lors de son apoptose.

### **3.6 Modulateurs de l'apoptose**

La régulation de l'apoptose joue un rôle essentiel dans la modulation de l'inflammation. Un mauvais fonctionnement de cette régulation est impliqué dans un grand nombre de maladies cliniques. Les facteurs qui influencent l'apoptose sont nombreux. Il existe deux grandes classes de facteurs : soit les facteurs qui retardent l'induction d'apoptose (inhibiteurs) et les facteurs qui dirigent les cellules en apoptose (inducteurs).

Les molécules présentes au tout début de l'inflammation sont des molécules qui activent les granulocytes et qui par conséquent retardent leur apoptose. Ces inhibiteurs d'apoptose sont constitués des cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF, G-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-15, INF- $\gamma$ ), du LPS et des fragments du complément C5a. Tout ceci a pour conséquence de prolonger la vie des granulocytes afin d'augmenter leur capacité à détruire les agents étrangers (chimioattraction, dégranulation, génération de superoxydes, etc.) (Akgul, Moulding et Edwards, 2001). Conséquemment, après avoir éliminé les microorganismes, il est primordial d'arrêter le processus inflammatoire pour éviter des complications. La libération de médiateurs anti-inflammatoires (TGF- $\beta$  et IL-10) (ou inducteur d'apoptose) par le macrophage a donc pour effet de ralentir progressivement cette inhibition d'apoptose.

Alternativement, plusieurs études se concentrent sur l'élimination des cellules par l'activation de leur apoptose.

### 3.6.1 Les inducteurs d'apoptose

Le récepteur Fas, présent à la surface de la plupart des cellules, est responsable du contrôle des réponses immunitaires. Chez les granulocytes, cette liaison contrôlerait le nombre de neutrophiles circulant dans la circulation sanguine (Santos-Beneit et Mollinedo, 2000). Fas fait partie d'une superfamille, la famille des récepteurs du TNF ou DR qui regroupe plusieurs membres : TNFR1 et 2, OX40 (CD134), CD40, CD27, CD30, DR3/Apo3, *decoy receptor* 1 (DcR1), DcR2, DR4 et DR5. La liaison du récepteur avec son ligand (respectivement, FasL, OX40L (pour OX40 et CD40), CD27L, CD30L, Apo3L et Apo2L/TRAIL pour les quatre derniers) induit inévitablement l'apoptose de la cellule (Ashkenazi et Dixit, 1998). Par contre, son rôle chez les neutrophiles est controversé. L'apoptose des granulocytes peut également être accélérée *in vitro* par plusieurs inhibiteurs de synthèse protéique, suggérant ici l'existence d'une ou de plusieurs molécules qui pourraient réguler leur survie (Ward *et al.*, 1999). L'actinomycine D et la cycloheximide (respectivement inhibiteur de transcription et de translation) sont d'excellents exemples. Un milieu hypoxique ou la présence de certains anti-oxydants (par exemple, la catalase) peuvent également entraîner le retard de l'apoptose (Akgul, Moulding et Edwards, 2001).

### 3.6.2 Les inhibiteurs d'apoptose

En plus des cytokines pro-inflammatoires décrites plus-haut, d'autres agents tels les chimiokines (IL-8) ou les glucocorticoïdes (dexaméthasone) sont également reconnus pour prolonger la vie des neutrophiles. Ces derniers, qui stimulent aussi la synthèse protéique, nous amènent à la conclusion que la survie du neutrophile pourrait être régulée par l'expression de protéines nouvellement synthétisées (Cox, 1995).

Une catégorie bien particulière de molécules utilisées dans ce doctorat possède la capacité d'inhiber l'apoptose différemment selon la dose : les inhibiteurs synthétiques de caspases. Ces inhibiteurs sont de petits polypeptides synthétisés particulièrement dans le but de masquer le site actif des caspases et ainsi d'empêcher leur action.

L'utilisation de ces peptides ou macromolécules a permis de définir le rôle central des caspases dans l'inflammation et l'apoptose des mammifères. Elles ont la capacité de lier ce site de façon réversible ou non. La conception de tels inhibiteurs consiste à attacher à la séquence de reconnaissance un groupement fonctionnel comme un aldéhyde (CHO), un chlorométhylcétone (CMK) ou encore un fluorométhylcétone (FMK). La séquence permettant la reconnaissance du substrat par la caspase détermine la spécificité de l'inhibiteur. Les inhibiteurs les plus efficaces possèdent une séquence de reconnaissance de quatre peptides. (Garcia-Calvo *et al*, 1998 ; Misaghi *et al*, 2004).

### **3.7 Méthodes de détection de l'apoptose**

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer l'apoptose des cellules. En effet, une variété de critères peut être examinée. Les altérations morphologiques, la fragmentation de l'ADN, la détection des caspases, l'identification des substrats clivés, les altérations de la membrane cellulaire, les extraits totaux ainsi que l'évaluation du potentiel mitochondrial en sont d'excellents exemples (Elmore, 2006).

#### ***Altérations morphologiques***

La coloration des cellules grâce à l'éosine, nous permet de distinguer les cellules apoptotiques des cellules non apoptotiques. Cette méthode est efficace par contre l'état de la cellule doit toutefois être confirmée par une autre méthode. Sous le microscope, on observera une cellule généralement plus petite qu'une cellule non apoptotique et parfois la formation de corps apoptotiques, caractéristique exceptionnellement absente chez le neutrophile. La morphologie du noyau chez le neutrophile change selon l'état. Le noyau polylobé observé en condition normale adoptera une conformation dite pycnotique lors de l'apoptose. En effet, la condensation de sa chromatine provoquera une agrégation d'ADN au centre de la cellule qui sera facilement observable au microscope optique. Bien que certains granules intracellulaires pourraient porter à confusion, une observation au microscope à transmission électronique (MTE) confirmerait l'état apoptotique. En plus d'observer une condensation du matériel génétique, une fragmentation de l'ADN, une membrane cellulaire intacte, une désorganisation des organelles cytoplasmiques, de grosses

vacuoles claires ainsi que du bourgeonnement à la surface cellulaire sont également observables au MTE (White et Cinti, 2004).

L'apoptose peut être également évaluée visuellement par la mise en évidence de la fragmentation et de la condensation de l'ADN en marquant le noyau des cellules avec différents produits tel que les colorant DAPI et Hoechst 33342. La détection de l'état apoptotique s'effectue cette fois-ci en examinant les noyaux au microscope à fluorescence.

### ***Fragmentation de l'ADN***

La technique du *DNA ladder* (échelle d'ADN) est utilisée pour visualiser les produits de clivages des endonucléases activées pendant l'apoptose (Wyllie, 1980). Cette méthode consiste à extraire l'ADN d'un lysat cellulaire homogène et à lui faire subir une électrophorèse sur gel d'agarose. La coupure ordonnée de l'ADN (entre les nucléosomes à chaque 180 paires de bases) lors de l'apoptose se présente sous forme d'échelle après révélation au bromure d'éthidium. Ceci, contrairement à la nécrose qui se caractérise par une bavure ou un *smear*. Cette méthode est facile à utiliser et détecte l'état apoptotique jusqu'à une sensibilité de  $1 \times 10^6$  cellules. Pour un nombre plus restreint de cellules, cette technique n'est pas recommandée (Elmore, 2007).

L'utilisation des fragments d'ADN peut servir à l'identification d'une cellule apoptotique. Dans la méthode du *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling* (TUNEL), les extrémités 3' des brins d'ADN sont marquées par des nucléotides spécifiques (dUTP) à l'aide de l'enzyme désoxyribonucléotidyle transférase terminale (Abbas, Lichtman, Pober, 1997). Le dUTP peut quant à lui être marqué à son tour par une variété de sondes qui sont détectables soit par microscopie optique, microscopie à fluorescence ou encore par cytométrie en flux. Cette technique est rapide (trois heures) et très sensible car elle peut détecter l'état apoptotique dans aussi peu qu'une centaine de cellules par la cytométrie ou encore individuellement par la microscopie. Toutefois, cette technique s'avère assez coûteuse et malheureusement de faux positifs peuvent être observés car les cellules nécrotiques et les cellules en processus de réparation d'ADN seront également marquées positivement. Pour toutes ces raisons, il est essentiel de combiner cette méthode avec une autre (Elmore, 2007).

### ***Détection des caspases et identification de substrats clivés***

L'activation des caspases peut être détectée par une variété de méthodes incluant les immunobuvardages de type Western, les immunoprécipitations ainsi qu'en immunohistochimie. Il en va de même pour les substrats clivés. Des anticorps pour la forme active et inactive de la caspase ainsi que pour les substrats sont disponibles sur le marché. Des ensembles de détection existent également pour les 13 caspases connues (Gurtu, Kain et Zhang, 1997). Il est également possible de coupler un conjugué fluorescent à un inhibiteur de caspase pour détecter l'activité de celle-ci. L'inhibiteur se lie à la caspase et la marque ainsi (Grabarek, Amstad et Darzynkiewicz, 2002). Ces méthodes requièrent la nécessité d'obtenir un lysat cellulaire afin de pouvoir libérer les enzymes et les protéines. Les principaux avantages sont de pouvoir cibler spécifiquement les caspases (initiatrices ou effectrices) ainsi que d'être rapide. Par contre, l'intégrité cellulaire est perdue ; ce qui ne nous permet pas de localiser les événements apoptotiques ou de déterminer le type de cellules qui est en apoptose (Elmore, 2007).

La méthode du *polymerase chain reaction* (PCR) nous permet de déterminer le profil génétique d'au moins 112 gènes utilisés dans l'apoptose. Les gènes anti-apoptotiques peuvent également être repérés à l'aide de cette méthode. Toutefois, l'interprétation de ces résultats peut être confuse due au nombre considérable de gènes analysés ainsi qu'à une méthodologie complexe (Hofmann *et al*, 2001).

### ***Altération de la membrane cellulaire***

L'altération de la surface membranaire est un signal qui permet l'identification de cellules apoptotiques. Dans le cas des cellules ayant la capacité de phagocyter (dans ce doctorat, les neutrophiles et les éosinophiles), une diminution des récepteurs de phagocytose Fc $\gamma$ RIIIb (CD16) peut facilement être détectée à l'aide d'un anticorps liant spécifiquement ce récepteur, l'anti-CD16. Une diminution de la fixation de l'anticorps révèle une augmentation de l'apoptose.

De plus, il y a translocation d'une autre molécule présente habituellement sur la membrane interne, la phosphatidylsérine, vers l'extérieur lors de l'apoptose. Ce phénomène peut être facilement mesuré en cytométrie en flux ou encore en microscopie à fluorescence par une augmentation de la fixation avec l'annexine-V

couplé à son fluorochrome. L'avantage de cette technique est qu'elle est sensible et qu'elle a l'habileté de confirmer l'activité des caspases initiatrices. Le désavantage est que les cellules nécrotiques peuvent également être marquées par l'annexine-V. C'est pourquoi cette méthode est souvent couplée à une autre méthode impliquant un colorant de viabilité cellulaire (marquage au propidium iodide ou bleu de trypan) (Elmore, 2007).

### ***Évaluation du potentiel mitochondrial***

Cette méthode détecte principalement l'apoptose induite par la voie intrinsèque principalement lors des événements précoces. La transition de perméabilité mitochondriale, la dépolarisation de la membrane, le flux calcique ( $Ca^{2+}$ ), le statut redox de la mitochondrie ainsi que la production de radicaux libres par la mitochondrie peuvent être suivis par la microscopie confocale. Le principal désavantage de cette technique est que ces paramètres peuvent également être aperçus pendant la nécrose (Bedner *et al*, 1999). Des colorants sont utilisés pour marquer le relâchement du cytochrome c ou encore la présence des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bid) ou anti-apoptotiques (Bcl-2) régulatrices. Toutefois, cette coloration peut affecter l'interaction entre les protéines et le cytochrome c est instable lorsqu'il est relâché dans le cytoplasme (Goldstein *et al*, 2000). Donc d'autres méthodes seraient essentielles pour confirmer l'état apoptotique.

### **3.8 Les neutrophiles et les éosinophiles apoptotiques**

Le contrôle de l'apoptose chez les granulocytes suscite un vif intérêt dans la recherche scientifique. En effet, les granulocytes démontrent des réactions différentes par rapport aux autres leucocytes face aux mêmes agents. Conséquemment, il existe aussi des différences dans le contrôle de l'apoptose entre les éosinophiles et les neutrophiles. En effet, les neutrophiles s'enlignent spontanément (en culture) plus rapidement en apoptose (50 à 70% d'apoptose en 24 heures) que les éosinophiles (même taux mais en 48 heures). Ceci démontre possiblement un mécanisme de contrôle différent de l'apoptose entre les deux types cellulaires (Ward *et al*, 1999; Akgul, Moulding et Edwards, 2001). Une même molécule, les glucocorticoïdes (dexaméthasone), déclenche l'apoptose chez les thymocytes et les éosinophiles mais inhibe l'apoptose chez les neutrophiles (Ward *et al*, 1999). Malgré des études

controversées (Tsuchida *et al*, 1995 ; Murray *et al*, 1997 ; Liu *et al*, 1996), le TNF- $\alpha$  induit l'apoptose à l'intérieur des dix-huit premières heures de contact chez le neutrophile (Van den Berg *et al*, 2001) mais pas chez les éosinophiles (Qin *et al*, 2007). De plus, l'IL-5 influence différemment ces cellules en inhibant l'apoptose chez les éosinophiles sans trop affecter celle des neutrophiles (Hoontrakoon *et al*, 2002 ; Cassatella et McDonald, 2000). Le tableau récapitulatif suivant nous présente certains agents et traitements qui influencent différemment l'apoptose des deux granulocytes.

**Tableau 4. Retard et accélération de l'apoptose constitutive chez les neutrophiles et les éosinophiles par des agents spécifiques ou des traitements (inspiré de Ward *et al*, 1999b)**

|              | Retard de l'apoptose   | Références  | Accélération de l'apoptose  | Références   |
|--------------|--|---|---|--|
| Neutrophiles | agents qui accélèrent l'AMPc cytosolique (PGs)                               | Rossi <i>et al</i> , 1995; Yasui <i>et al</i> , 1997                          | oxyde nitrique  | Wong, Rossi et Chilvers, 1997 ; Blaylock <i>et al</i> , 1998 |
|              | agents qui augmentent le $[Ca^{2+}]_i$                                       | Cousin, Haslett et Rossi, 1997; Whyte <i>et al</i> , 1993                     | FasL et anti-Fas  | Iwai <i>et al</i> , 1994 ; Tsuyuki <i>et al</i> , 1995       |
|              | glucocorticoïdes (dexaméthasone)   | Meagher <i>et al</i> , 1996   | TNF- $\alpha$   | Ward <i>et al</i> , 1999a, Murray <i>et al</i> , 1997        |
|              | agonistes des neutrophiles (LPS, fMLP, PAF, LTB <sub>4</sub> , GM-CSF, etc.) | Rossi et Haslett, 1997 ; Ward <i>et al</i> , 1999; Hannah <i>et al</i> , 1995 | inhibiteurs de synthèse protéique (actinomycine D, cycloheximide) | Meagher <i>et al</i> , 1996; Bessho <i>et al</i> , 1994      |
|              | hypoxie  | Hannah <i>et al</i> , 1995  | inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (gliotoxine)                        | Ward <i>et al</i> , 1999a                                    |
| Éosinophiles | agents qui accélèrent l'AMPc cytosolique (PGs)                               | Rossi et Haslett, 1997, Meagher <i>et al</i> , 1996                           | FasL et anti-Fas  | Yasui <i>et al</i> , 1997 ; Tsuyuki <i>et al</i> , 1995      |
|              | agonistes d'éosinophiles (IL-5, GM-CSF)                                      | Hallsworth <i>et al</i> , 1996; Yasui <i>et al</i> , 1997                     | agents qui augmentent le $[Ca^{2+}]_i$                            | Cousin, Haslett et Rossi, 1997                               |
|              |  |   | glucocorticoïdes (dexaméthasone)                                  | Meagher <i>et al</i> , 1996                                  |
|              |  |   | inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (gliotoxine)                        | Ward <i>et al</i> , 1999a                                    |

**Abréviations :** AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; PGs, prostaglandines ;  $[Ca^{2+}]_i$ , concentration libre en  $Ca^{2+}$  intracellulaire; NF- $\kappa$ B, *nuclear factor*  $\kappa$ B.

Le neutrophile est une cellule qui comporte bien des particularités par rapport aux autres types cellulaires en ce qui concerne l'apoptose. Premièrement, c'est une cellule

qui ne possède ni la caspase-2 et très peu de mitochondries. Deuxièmement, le neutrophile n'exprime pas les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et *basal cell lymphoma-extra-large* (Bcl-X<sub>L</sub>) à maturité. Troisièmement, il exprime constitutivement les protéines pro-apoptotiques Bax, Bid, Bak et Bad. Ces protéines ont habituellement une longue durée de vie et l'absence de Bcl-2 et la présence des protéines pro-apoptotiques chez le neutrophile pourraient expliquer pourquoi ces derniers possèdent une aussi petite durée de vie (Akgul, Moulding et Edwards, 2001). Les éosinophiles quant à eux expriment les protéines anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub>, Bax et en très petite quantité la protéine Bcl-2 (Scheel-Toellner *et al*, 2004).

Par contre, le neutrophile possède l'ARNm d'A1 et la protéine Mcl-1 dont la perte graduelle de cette dernière serait responsable de son apoptose spontanée (Scheel-Toellner *et al*, 2004). De plus, d'autres facteurs ont été mesurés comme une déstabilisation du potentiel membranaire de la mitochondrie, la libération de cytochrome c en condition non physiologique (Pryde *et al*, 2000) ainsi que l'activation de la caspase-3. Les neutrophiles expriment certains DR comme le TNFR1, le récepteur de TRAIL, le CD95 et son ligand. Par contre, leur implication dans l'apoptose spontanée ne semble pas être prépondérante. Même si certains chercheurs ont démontré que l'ajout d'un inhibiteur de caspase-8 freinait l'apoptose spontanée, et que cette dernière est seulement activée lorsqu'elle est associée aux récepteurs, il s'avère important de clarifier exactement son rôle et son implication au sein de l'apoptose des neutrophiles (Daigle et Simon, 2001; Renshaw *et al*, 2003).

Les neutrophiles sont la principale défense contre les bactéries et champignons tandis que les éosinophiles possèdent principalement un rôle anti-parasite. De nouvelles stratégies pro- ou anti-apoptotique pourraient être développées en considérant le mécanisme de ces pathogènes utilisé pour contrecarrer la défense exercée par ces cellules. Les différences et les similitudes entre les neutrophiles et les éosinophiles en réponse à des agents anti- ou pro-apoptotiques démontrent qu'il y a effectivement un potentiel pour le développement d'agents comportant des spécificités afin d'éliminer ces deux types de granulocytes de façon sélective. Ces stratégies demandent une recherche fondamentale plus approfondie sur les actuels médiateurs physiologiques qui gouvernent l'apoptose des granulocytes de façon *in vitro* et *in vivo* (Ward *et al*, 1999b).

#### 4. LES PROTÉINES DU CYTOSQUELETTE

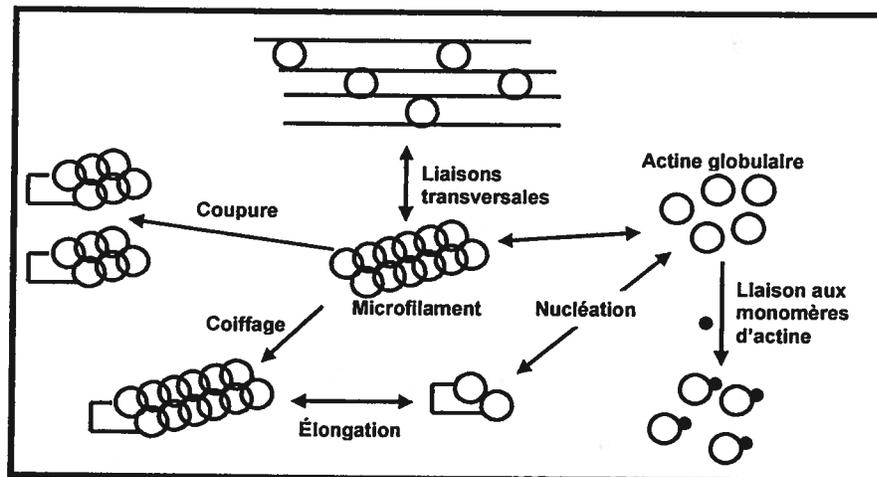
Le cytosquelette représente un réseau tridimensionnel à travers le cytoplasme et le noyau qui est hautement structuré et organisé en trois composantes distinctes. Il est constitué des microfilaments, des microtubules et des filaments intermédiaires. La composition en protéines du cytosquelette est caractéristique pour chaque type cellulaire ou tissu et fournit une machinerie requise pour le métabolisme de la cellule. Plusieurs organelles ont une association particulière avec les différents types de filaments comme la mitochondrie, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. Les rôles du cytosquelette sont nombreux. Il est essentiel pour plusieurs fonctions cellulaires incluant le transport de vésicules, les interactions cellulaires, les interactions extracellulaires avec la matrice par l'association de récepteurs de surface, la mobilité cellulaire, le recyclage des récepteurs, la phagocytose et le cycle cellulaire. De plus, une variété de protéines sont associées au cytosquelette (dynéine, kinésine, profiline, gelsoline, myosine, vinculine, etc.). Elles peuvent agir à titre d'exemple comme protéines stabilisatrices, motrices ou adaptatrices. (Edwards, 1994; Atencia, Asumendi et García-Sanz, 2000).

Bien que le cytosquelette soit sujet à des changements drastiques lors de l'apoptose, une liste des protéines du cytosquelette connues pour être affectées ou dissociées est loin d'être établie. Il s'avère important de détailler cette liste d'autant plus que certaines protéines du cytosquelette pourraient conduire à la formation d'auto-anticorps dans les maladies auto-immunes. C'est le cas de la vimentine dont des auto-anticorps dirigés contre cette protéine sont présents dans 80% des cas chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde. L'origine de ces auto-anticorps demeure encore inconnue mais certaines études ont démontré que l'expression de fragments de vimentine apparus suite au clivage de celle-ci à la surface de certaines cellules pourrait expliquer l'apparition de ce phénomène (Mor-Vaknin *et al*, 2003; Boilar *et al*, 2003).

##### 4.1 Les microfilaments

La composante la plus dynamique du cytosquelette est sans contredit les microfilaments qui sont directement impliqués dans le mouvement cellulaire et la

phagocytose. Ils possèdent un diamètre se situant entre 4 et 7 nm. La molécule d'actine est une protéine globulaire dont la concentration est très importante dans la cellule (5 à 8% des protéines totales chez le neutrophile). Cette protéine a été grandement étudiée chez les neutrophiles et est reconnue pour être clivée lors de l'apoptose (Brown, Bailey et Savill, 1997). Environ 50% de l'actine est présente sous forme filamenteuse tandis que l'autre proportion est maintenue sous forme de monomère soluble (ou globulaire). Son assemblage se fait principalement d'un côté (extrémité positive ou *barbed end*), ce qui confère une polarité au filament. Une multitude de protéines sont associées ou liées à l'actine afin de réguler le procédé d'assemblage (la polymérisation et la dépolymérisation) (Rogers, Morris et Blake, 1992).



**Figure 5. Les différentes structures des microfilaments.** Principales étapes de formation et de dissociation des microfilaments (inspiré de Rogers, Morris et Blake, 1992)

Certaines protéines se lient aux extrémités des filaments d'actine. Ce coiffage inhibe l'association des monomères d'actine et ainsi l'élongation du filament. La nucléation est l'étape majeure de régulation pour l'élaboration des filaments. Plusieurs protéines régulent ce procédé. Entre autre, la gelsoline (84 kDa) est reconnue pour coiffer deux monomères d'actine et ainsi produire un site propice à l'élongation. Par contre, cette protéine joue un autre rôle qui est paradoxal. En coiffant l'actine, elle peut également scinder en deux les filaments. La profiline est la protéine la plus connue pour maintenir le pool d'actines globulaires disponibles pour la formation des filaments. Elle lie l'actine et altère l'équilibre entre les monomères et les filaments d'actine. Il existe un groupe de protéines qui sert de pont entre plusieurs filaments. L'expression

de ces protéines affecte grandement la structure des microfilaments. De ce groupe, la vinculine (130 kDa), la paxilline (68kDa) et la fodrine (235-240kDa) permettent l'ancrage de l'actine à la membrane et sont souvent connues sous le nom de protéines adaptatrices (Rogers, Morris et Blake, 1992).

Dans notre laboratoire, nous avons démontré que lors de l'apoptose spontanée des neutrophiles et de celle induite par la VAA-I (Savoie *et al*, 2000 ; Lavastre *et al*, 2002a), le toxaphène (Lavastre *et al*, 2002b), le tributylétain (Lavastre et Girard, 2002b) ainsi que par le trioxyde d'arsenic (Binet *et al*, 2006), certaines protéines associées aux microfilaments sont fragmentées comme la gelsoline et la paxilline. A l'inverse, le GM-CSF et le chlorure de méthylmercure (utilisé à faible dose) qui sont reconnus pour retarder l'apoptose maintiennent l'expression de ces mêmes protéines intacte (Moisan, Kouassi et Girard, 2003). Et cela, comparativement à la vinculine qui n'est pas dégradée dans ces mêmes conditions.

Les myosines constituent une superfamille de protéines motrices associées à l'actine. Elles sont regroupées principalement en 15 classes. Les myosines conventionnelles qui forment des filaments dans les cellules musculaires et non musculaires forment la classe II et elles sont nommées les *non muscle heavy chain* (NMHC) et la NMHC-IIA est l'isoforme retrouvée chez les neutrophiles (Sellers, 2000). Elle représente 1% des protéines totales du neutrophile et est requise pour le mouvement vectoriel similaire au mouvement musculaire (Edwards, 1994).

#### **4.2 Les filaments intermédiaires**

Les deux seuls représentants des filaments intermédiaires présents chez les granulocytes sont les filaments de type vimentine (58 kDa) et les lamines nucléaires (70 kDa). Leur diamètre (entre 8 et 12 nm) est plus grand que les microfilaments mais moins élevé que les microtubules d'où leur appellation. Les filaments intermédiaires possèdent une grande stabilité chimique. La vimentine (57 kDa) forme avec les lamines nucléaires (70 kDa) un réseau périnucléaire. Chez les astrocytes, la vimentine est essentielle à l'assemblage du réseau des protéines acides fibrillaires et gliales, un autre filament intermédiaire, ainsi qu'à la production de myéline dans le système nerveux périphérique (Galou *et al*, 1997). Le rôle de la vimentine chez le neutrophile

n'est pas clairement établi. Les lamines nucléaires tapissent la surface interne de la membrane nucléaire (Fuchs et Weber, 1994). La protéolyse de l'enveloppe nucléaire est rendue possible grâce au clivage de ces protéines qui constituent cette enveloppe. Ces coupures ont lieu quand même tôt dans le processus afin de permettre l'entrée d'endonucléases à l'intérieur du noyau. Il existe trois types de lamines (A, B et C) mais seules les lamines B sont présentes chez le neutrophile.

De nouveaux rôles pour les filaments intermédiaires ont été récemment découverts, notamment l'action modulatrice de l'adhésion et la croissance cellulaire ainsi qu'une certaine résistance aux différentes formes de stress et à l'apoptose (Marceau *et al*, 2007).

### 4.3 Les microtubules

Ce dernier type de filaments, dont le diamètre est approximativement de 25 nm, forme une structure tubulaire et est composée d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -tubuline (55 kDa). De par leur polarité (tout comme les microfilaments), leur polymérisation et leur dépolymérisation s'effectuent principalement sur un seul côté (extrémité positive). Les assemblages et désassemblages des microtubules sont contrôlés par une balance établie entre des protéines stabilisatrices et déstabilisatrices qui leur sont associées (Mollinedo et Gajate, 2003). Ils forment un support squelettique pour les microfilaments, établissent le fuseau mitotique pendant la division cellulaire et contrôlent la position des organelles et des protéines (Atencia, Asumdi et Garcia-Sanz, 2000). Parmi ces protéines, plusieurs sont des agents régulateurs lors du processus apoptotique et leur libération des microtubules affecte leurs activités. *Bcl-2-interacting mediator of cell death* (Bim), membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2, est une protéine séquestrée par les microtubules via son interaction avec la dynéine, protéine motrice des microtubules. Elle joue un rôle dans l'apoptose induite par les agents anti-cancéreux, puisqu'une fois libérée lors de l'apoptose, elle provoque la libération de cytochrome c par la mitochondrie.

Une autre protéine transportée par les microtubules et associée à la dynéine, p53, transloque vers le noyau durant l'apoptose. Ce transport influence la transcription de deux protéines, ainsi elle augmente la transcription de Bax tout en diminuant celle de

Bcl-2. Cela provoque indubitablement une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale (Estève, Carré et Braguer, 2007).

Lors de l'apoptose, le désassemblage des microtubules est accompagné d'une déphosphorylation des protéines associées, par exemple la protéine tau. Cette dernière est requise pour stabiliser la structure et fournit la base du transport intraneuronal (Atencia, Asumdi et Garcia-Sanz, 2000).

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur l'effet des *microtubule-targeted tubulin-polymerizing agents* (MTPAs) (paclitaxel, taxane, taxotère, taxol). Ces MTPAs occupent un rôle central dans le traitement contre le cancer de la peau. Ainsi, suivant leur liaison à la  $\beta$ -tubuline, les MTPAs dérangent le taux de polymérisation de la tubuline et inhibent le cycle cellulaire via l'activation de la voie intrinsèque (Bhalla, 2003).

Contrairement aux autres protéines du cytosquelette, les microtubules ne sont pas dégradés dans le processus apoptotique. Par contre, certains chercheurs ont remarqué qu'ils pouvaient être partiellement dépolymérisés et réorganisés pendant ce phénomène (Van Engeland *et al*, 1997).

## 5. LA VISCUM ALBUM AGGLUTININE-I

### 5.1 Généralités et distribution des lectines

À ce jour, les lectines sont définies comme des protéines ou des glycoprotéines qui possèdent au moins un domaine non-catalytique qui lie spécifiquement et irréversiblement un monosaccharide ou un oligosaccharide (Peumans et Van Damme, 1995). Elles jouent également des rôles clés dans plusieurs procédés biologiques. Le site de reconnaissance des sucres est nommé le *carbohydrates-recognition domain* (CRD). La liaison d'une lectine à ces résidus de sucres est aussi spécifique qu'une reconnaissance antigénique ou enzymatique. Plusieurs lectines sont également reconnues pour agglutiner les érythrocytes *in vitro* d'où leur appellation d'agglutinines. Les lectines sont présentes partout ; dans les microorganismes, les champignons, les plantes, les animaux et les humains (Franz, 1986).

**Tableau 5. Classification des lectines** (inspirée de Dodd et Drickamer, 2001)

| Groupe                   | Ligands typiques          | Fonctions   | Source                          | Exemples                          |
|--------------------------|---------------------------|---|---------------------------------|-----------------------------------|
| calnexine, calréticuline | Glc, Man, oligosaccharide | retiennent les glycoprotéines mal repliées (chaperonne) | eucaryotes                      | calréticuline humaine             |
| lectine de type-L        | variés                    | triage de protéines                                     | plantes (légumineuses), animaux | ERGIC-53, VIP-36                  |
| lectine de type-P        | mannose-6-phosphate       | trafic intracellulaire                                  | eucaryotes                      | récepteur indépendant des cations |
| lectine de type-C        | variés                    | adhésion, immunité innée                                | animaux                         | sélectines, collectines           |
| galectines               | B-galactoside             | adhésion, agrégation, prolifération, épissage           | animaux                         | galectine-I                       |
| lectine de type-I        | acide sialique            | adhésion  | animaux                         | superfamille des immunoglobulines |
| lectine de type-R        | variés                    | enzymatique   | animaux, plantes, bactéries     | ricine, VAA-I                     |

**Abréviations :** ERGIC, *endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment* ; VIP, *vesicular integral membrane protein*.

Les lectines de plantes ont fait l'objet d'une classification élaborée par l'équipe de Peumans et Van Damme selon laquelle ces protéines se distinguent dans la spécificité des sucres reconnus et leur origine (Peumans et Van Damme, 1998).

**Tableau 6. Classification des lectines de plantes** (inspiré de Peumans et Van Damme, 1998 ; Peumans *et al*, 2001)

| Type de lectine           | Caractéristiques                                   | Exemples   |
|---------------------------|--|--|
| lectine des légumineuses  | lectines les plus communes                         | <i>Phaseus vulgaris</i> phytohémagglutinine  |
| lectine liant la chitine  | domaine <i>hevein</i> (polypeptide de 43 aa)       | latex de l'arbre caoutchouc ( <i>Hevea brasiliensis</i> )  |
| RIP                       | RIP-I<br>une chaîne (B)                            | tritine ( <i>Triticum aestivum</i> ), RIP d'orge ( <i>Hordeum vulgare</i> ), RIP d'épi ( <i>Zea mais</i> )                                   |
|                           | RIP-II<br>deux chaînes (A et B), les plus toxiques | ricine ( <i>Ricinus communis</i> ), modeccine ( <i>Adenia digitata</i> ), abrine ( <i>Abrus precatorius</i> ), VAA-I ( <i>Viscum album</i> ) |
| lectine liant le mannose  | plantes monocot                                    | snowdrop ( <i>Galanthus nivalis</i> )  |
| famille des jacalines     | protéine de stockage                               | jackfruit  |
| famille des amaranthines  | -  | espèces d' <i>Amaranthus</i>   |
| lectines phloème cucurbit | lie la chitine                                     | cucurbitacées  |

**Abréviations :** aa, acides aminés ; RIP, *ribosome inactivating protein*.

Les lectines jouent deux rôles majeurs à l'intérieur des plantes. Lorsqu'elles sont présentes en grande quantité dans la plante, elles sont utilisées pour emmagasiner des protéines qui peuvent être mobilisées pour sa croissance et son développement. Le second rôle leur sert à se protéger contre les attaques des herbivores, des insectes, des humains ou autres pathogènes en retardant leur croissance ou en étant carrément toxiques pour les prédateurs (Murdock et Shade, 2002). Elles sont localisées principalement dans trois parties de la plante soit les graines, les feuilles et racines.

#### ***La Viscum album et l'Isador***

La lectine que nous avons utilisée dans cette thèse provient de la plante de gui européen (*Viscum album*), famille des *Lorenthaceae*, qui est une plante hémiparasitaire. On retrouve le gui rattaché à différentes espèces d'arbres comme les pommiers, les pins, les sapins, les peupliers et les chênes. Son nom provient du fait que cette plante possède des baies blanches (*album*) qui baignent dans une substance gluante, la viscine (*Viscum*) et a été longtemps utilisée pour ses vertus médicinales. L'iscador est composé d'extraits fermentés de la plante de gui qui sont traités par un procédé mécanique spécial qui repose sur des bases anthroposophiques et spirituelles. Il existe différentes préparations d'Isador dépendamment de l'arbre parasité. Bien que l'Isador a démontré une activité immunomodulatrice, son efficacité et sa sécurité furent controversées (Augustin *et al*, 2005 ; Niwa *et al*, 2003). Ainsi, ces extraits sont administrés comme traitement complémentaire contre le cancer (Mikeska *et al*, 2005;

Stoeva *et al*, 1999 ; Büssing *et al*, 2008 ; Grossarth-Maticcek et Zeigler, 2008) et suite à l'ablation chirurgicale de la tumeur (Maldacker, 2006). La lectine est principalement utilisée pour améliorer la qualité de vie des patients, l'efficacité du système immunitaire et réduire les effets secondaires de la chimio- ou radiothérapie (Horneber *et al*, 2008). Ce médicament est le plus utilisé en médecine oncologique en Allemagne et en Suisse. Ces extraits sont composés de plusieurs substances actives : viscotoxines, polysaccharides, oligosaccharides, alkaloïdes, protéines de Vester et trois classes distinctes de lectines : *mistletoe lectin* (ML)-1, ML-II et ML-III (Franz, Ziska et Kindt, 1981). Ces dernières, localisées dans les feuilles de la plante (précisément les vacuoles), diffèrent en taille et en spécificité (Grossarth-Maticcek *et al*, 2001 ; Franz, 1986).

**Tableau 7. Les lectines de la *Viscum album* (Franz, 1986)**

| Lectine | Masse (kDa) | Composition                | Spécificité de reconnaissance      |
|---------|-------------|----------------------------|------------------------------------|
| ML-I    | 115 (2X 63) | tétradimère (29 et 34kDa)  | D-galactose                        |
| ML-II   | 60          | hétérodimère (32 et 27kDa) | D-galactose/N- acétylgalactosamine |
| ML-III  | 50          | hétérodimère (30 et 25kDa) | N-acétylgalactosamine              |

La lectine la plus étudiée dans la plante de gui, identifiée comme le principal ingrédient pharmacologique actif depuis la fin des années 1980 et qui fait l'objet de ma thèse est la ML-I (Hajto, Hostanska et Gabius, 1989). ML-II et ML-III semblent être des produits de dégradation de ML-I (Hajto *et al*, 2005). Selon les auteurs, la ML-I est aussi connue sous l'appellation de viscumine ou *Viscum album* agglutinine-I (VAA-I) (Timoshenko, Cherenkevich et Gabius, 1995).

## 5.2 Purification de la VAA-I

Étant donné que la plante de gui produit la VAA-I en très petite quantité, les extraits totaux (Isador) de la plante sont préférentiellement utilisés pour ses activités immunostimulatrices (Habeck, 2002). Par contre, afin de mesurer l'effet exclusif de la VAA-I et non des autres composantes, il est essentiel de la purifier.

La méthode qui permet d'isoler la VAA-I de la feuille de gui se rapporte à une technique qui a été publiée à la fin des années soixante-dix (Ziska, Franz et Kindt, 1978). Ainsi, une certaine quantité d'extraits de feuilles de la plante *Viscum album* est mélangée à une solution salée aqueuse (NaCl). Après s'être débarrassé du culot, le surnageant est passé sur une colonne de sépharose. Trois éluions suivies d'un passage sur une colonne d'affinité pour les sucres spécifiques aux différentes lectines s'enchaînent afin d'obtenir les trois lectines séparément. La VAA-I est récoltée grâce à une dernière élution réalisée avec une solution salée contenant des résidus de galactosides. Finalement, une dialyse est nécessaire pour obtenir une protéine purifiée afin d'enlever tout sucre et tout sel. Il est possible d'effectuer la séparation *in situ* des deux sous-unités de la protéine en scindant les ponts disulfures grâce au  $\beta$ -mercaptoéthanol (5%) et en effectuant une séparation chromatographique (Franz, 1986).

Selon les méthodes de purification, le temps de la récolte de la plante et l'arbre parasité, les différentes préparations de VAA-I résultantes peuvent révéler des effets variables (Beuth *et al*, 1992). Il est d'autant plus important de baser notre étude sur une préparation de VAA-I stable et bien contrôlée, c'est-à-dire celle commercialement vendue par Sigma.

### 5.3 Structure de la VAA-I et mécanisme d'action

La VAA-I consiste en deux chaînes protéiques reliées par des ponts disulfures. La chaîne A ou cytotoxique, où réside l'activité enzymatique, possède une masse moléculaire de 29 kDa. La chaîne B ou immunostimulatrice, pèse environ 34 kDa et reconnaît les sucres, plus particulièrement les résidus de galactoses qui sont présents à la surface des cellules (Krauspenhaar *et al*, 1999). L'activité cytotoxique de la VAA-I permet de la classer dans la famille des RIP soit les protéines qui inactivent le ribosome et par le fait même la synthèse protéique de manière irréversible. Plus précisément, il s'agit d'une RIP de type II (RIP-II) du fait qu'elle possède deux chaînes (Stirpe *et al*, 1992).

Jusqu'à maintenant, plus d'une quinzaine de RIP-II ont été identifiées dont la VAA-I, la ricine, l'abrine et la modécine. Les lectines du groupe RIP-I sont beaucoup moins

toxiques que les RIP-II du fait qu'elle ne possèdent pas la chaîne B des RIP-II et par conséquent ont une moins grande propension à pénétrer à l'intérieur de la cellule (Barbieri, Batelli et Stirpe, 1993 ; Van Damme *et al*, 2001).

L'analyse structurale, physique et biologique de la VAA-I révèle beaucoup de similitudes avec la ricine. Les deux lectines partagent des structures similaires. Leurs séquences en acides aminés possèdent des homologies (41% pour la chaîne A et 64% pour la chaîne B) (Bantel *et al*, 1999 ; Krauspenhaar *et al*, 1999). Lustik fut l'un des premiers auteurs à remarquer des ressemblances fonctionnelles entre les deux lectines. L'inoculation intra péritonéale des lectines (10 µg par kg de masse corporelle) a supprimé la tumeur chez les ascites de souris. Elles ont démontré les mêmes changements morphologiques sur les cellules tumorales bien que la ricine révélait des effets plus cytotoxiques que la VAA-I (Lustik, 1975). Cette différence réside dans le fait qu'elles interagissent différemment avec les sucres (transport intracellulaire et libération de la molécule dans le cytoplasme) et qu'elles occupent différemment les sites de liaisons à la surface cellulaire (Stirpe *et al*, 1980). La différence de toxicité entre les deux lectines peut également être attribuable à l'organisation tridimensionnelle des molécules selon les concentrations utilisées (Franz, Ziska et Kindt, 1981). Ainsi, la ricine se retrouve sous forme d'un hétérodimère tandis que la VAA-I peut être représentée sous un tétradimère (deux hétérodimères (A-B)(B-A)) (Moisenovich *et al*, 2001 ; Niwa *et al*, 2003).

#### ***L'activité cytotoxique : la chaîne A***

La chaîne A est un puissant agent qui inactive irréversiblement le ribosome. Elle doit absolument être séparée de l'autre chaîne pour exercer ses fonctions à l'intérieur des cellules. La chaîne A comprend 3 domaines distincts et son site actif est formé à l'interface de ces domaines (Krauspenhaar *et al*, 1999)

L'activité spécifique de cette chaîne est plus précisément une ARN N-glycosidase. En fait, elle supprime la N-glycosidation sur l'adénine à la position 4324 (A<sub>4324</sub>) présente à l'intérieur d'une séquence conservée G-A-G-A située à l'intérieur de l'ARN ribosomal 28 S de la grosse sous-unité du ribosome (Endo, Tsurugi et Franz, 1988 ; Stirpe *et al*, 1992). Le mécanisme de reconnaissance entre l'adénine et la RIP-II, l'action catalytique et pourquoi une dépurination d'une simple adénine permet l'arrêt

de la synthèse protéique ne sont pas encore bien compris (Niwa *et al*, 2003). Toutefois, cette unique omission rend la grosse sous-unité inapte à lier le facteur d'élongation-2 et ainsi par conséquent abolit toute synthèse protéique. Des études ont démontré expérimentalement qu'une simple chaîne A pouvait inactiver approximativement 50 ribosomes en dix minutes (Olsnes *et al*, 1982).

#### ***Les sites de reconnaissances : la chaîne B***

La chaîne B permet à la VAA-I de se lier à la cellule grâce aux résidus de galactose terminant les glycolipides et les glycoprotéines qui sont présents à la surface cellulaire via une pochette peu profonde et préformée (Rini, 1995). Cette chaîne semble être la duplication d'un produit d'un gène d'une ancienne unité de 40 résidus qui liait les galactoses (Robertus et Ready, 1984). Elle consiste en deux domaines principaux comportant une configuration similaire, chacun divisé en quatre sous-domaines, selon lesquels trois sont homologues (Ye *et al*, 2006). La liaison aux sucres est exécutée par deux sites de liaisons ou pochettes situés dans le sous-domaine  $\alpha 1$  et  $\gamma 2$  de la chaîne B, séparés par environ 62 Å. Un potentiel troisième site de reconnaissance aux galactoses fut également observé (Mikeska *et al*, 2004). La liaison est favorisée par un réseau de liaisons hydrogènes, des forces de van der Waals, ainsi que des contacts hydrophobiques (Quioco 1989 ; Mikeska *et al*, 2004). Les groupements 4'- et 3'-hydroxyles des monosaccharides affectent grandement la liaison avec la lectine. Le groupement 2'-hydroxyle, présent sur le sucre, agit plutôt comme stabilisateur du complexe lectine-sucre (Lee, Gabius et Lee, 1994 ; Mikeska *et al*, 2004). Ainsi, présent en tétradimère, la VAA-I offre en fait six sites de liaisons aux sucres.

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur des études de liaison de la lectine aux sucres. Ainsi, l'utilisation de l'ionisation électronique et de la spectroscopie de masse a permis de démontrer que la VAA-I comportait aussi une affinité aux acides sialiques avec une préférence marquée pour les gangliosides et glycoprotéines comportant des résidus de Neu5Ac- $\alpha$ -2-6Gal- $\beta$ -1-4GlcNac, considéré comme étant le vrai récepteur de la VAA-I, présents à la surface des granulocytes (Wu *et al*, 1995 ; Müthing *et al*, 2004). Ceci est contraire à la ricine qui elle n'est nullement spécifique aux acides sialiques. Ainsi, la VAA-I est spécifique aux galectines avec une certaine affinité pour les GalNac. Les gangliosides furent identifiés la première fois par une équipe allemande à la surface des cellules ganglionnaires du cerveau, d'où leur appellation.

Ils sont formés d'oligoglycocéramides contenant des résidus d'acide N-acétylneuraminique (acide sialique ou Neu5Ac) unis via un lien glycosidique à une ou plusieurs unités monosaccharides ou encore à un autre résidu d'acide sialique (Leverly, 2005). La figure suivante présente la forme la plus commune de monosialo-gangliosides : le ganglioside  $G_{M1}$ . Les auteurs concluent même que la VAA-I devrait plutôt être considérée comme une lectine liant les acides sialiques.

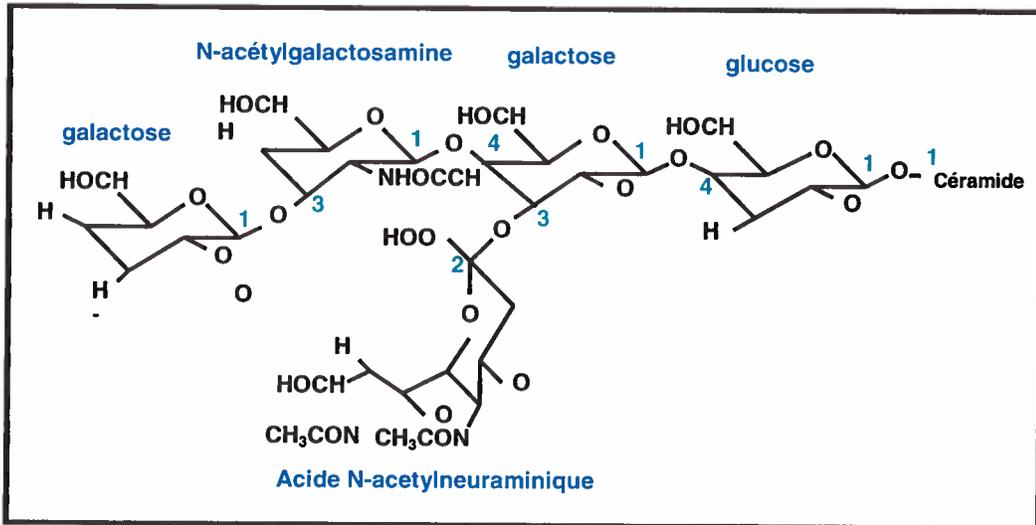
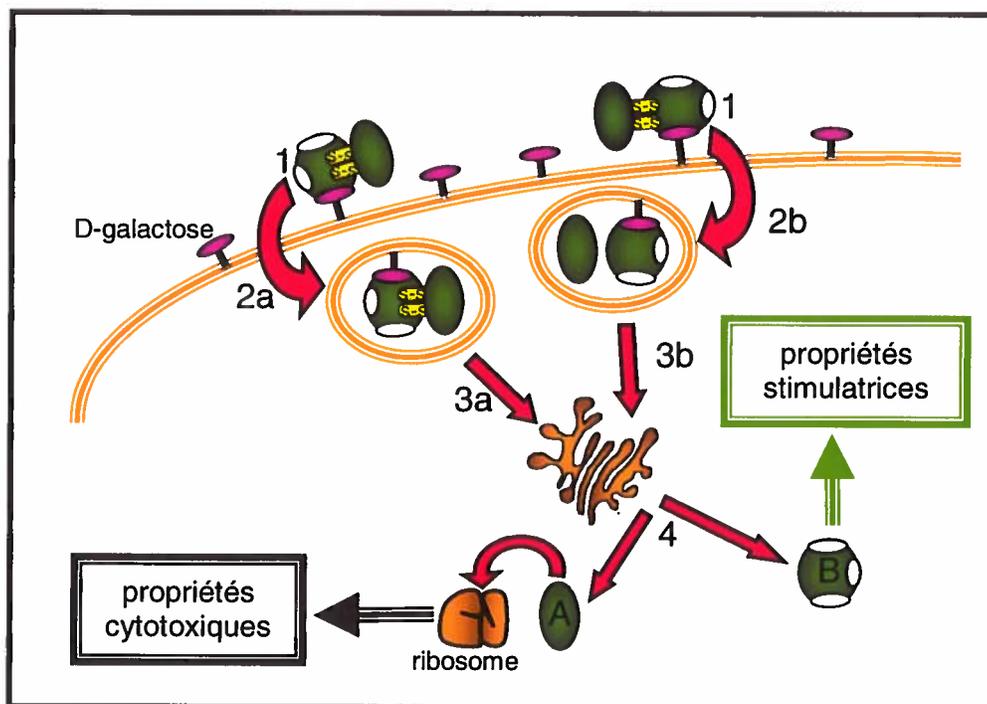


Figure 6. Illustration du ganglioside  $G_{M1}$  (inspiré de Leverly, 2005)

Or, cette affirmation fut révoquée l'année d'avant par des évidences en essais solide-phase. Ces chercheurs ont démontrés que chaque site de liaison en vérité ne comportait pas une très grande spécificité aux GalNac. En effet, l'espace n'est pas suffisamment grand pour un groupement N-acétyle dans le site N-terminal car il est bloqué par deux résidus (Asp27 et Lys41) qui forment des liens hydrogènes avec le groupement 2'-hydroxyle (Niwa *et al*, 2003). En fait, une certaine ambiguïté existe lorsque l'étude porte sur la spécificité d'un unique site de liaison qui utilise des données biochimiques par rapport à une vue d'ensemble de la lectine comportant l'interaction avec les autres sites de liaison. Ces préférences peuvent toutefois expliquer le potentiel immunostimulateur de la VAA-I envers certaines sous-populations de leucocytes (Müthing *et al*, 2004).



**Figure 7. Schématisation possible du mécanisme d'entrée de la VAA-I dans la cellule.** La VAA-I, présentée avec ses trois sites possibles de liaison, fixe les résidus de D-galactoses présents à la surface cellulaire (1). Elle est soit endocytosée dans son intégralité (2a) et subit une dissociation des deux chaînes dans l'appareil de Golgi (3a) ou encore sa dissociation s'effectue avant son internalisation (2b) et est ensuite transportée vers cet appareil (3b). Une fois dissociée, la chaîne A inactive le ribosome et la chaîne B stimule les fonctions pro-inflammatoires de la cellule (4) (Lavastre *et al.*, 2002a).

### ***Transport et séparation des chaînes***

Suite à la liaison aux sucres, la VAA-I est ensuite transportée dans une vésicule vers l'appareil de Golgi. Le transport rétrograde de la molécule à l'intérieur de l'appareil de Golgi jusqu'au réticulum endoplasmique est rendu possible grâce à la chaîne B qui interagit avec les récepteurs circulants dans les compartiments internes. Ce transport est essentiel à l'activité biologique de la VAA-I puisque l'utilisation d'un inhibiteur du transport vésiculaire, la brefeldine A, empêche l'apoptose induite dans les neutrophiles (Lavastre *et al.*, 2002a) et les cellules T Jurkat (Bantel *et al.*, 1999). Afin que la VAA-I puisse exercer ses fonctions, il est primordial que les deux chaînes soient séparées (Krauspenhaar *et al.*, 1999). À ce sujet, les études se contredisent sur la localisation de cette séparation. Ainsi, certains chercheurs (Agapov *et al.*, 1999 ; Mikeska *et al.*, 2004 ; Niwa *et al.*, 2003) stipulent que la séparation des deux chaînes s'effectue à la surface cellulaire, et ce avant même que la lectine soit transloquée à l'intérieur du cytosol, tandis que d'autres (Krauspenhaar *et al.*, 1999 ; Utsumi, Aizono et Funatsu, 1987) affirment que l'hétérodimère doit résister à la dégradation pendant

qu'il traverse les lysosomes et l'appareil de Golgi et ainsi les deux chaînes doivent demeurer liées jusqu'à cet organelle. Toutefois, les deux groupes sont convaincus que les liens qui unissent les deux chaînes doivent absolument être coupés pour que la lectine puisse octroyer sa toxicité. La translocation des deux chaînes séparées dans le cytoplasme permet donc à la VAA-I d'exercer ses caractéristiques bien précises, soit d'activation ou d'inhibition (Moisenovich *et al*, 2002 ; Wesch, Rapak et Olsnes, 1999).

#### **5.4 Les activités biologiques de la VAA-I**

L'interaction de la lectine à son ligand, présent à la surface cellulaire, joue un rôle important dans les effets pro-inflammatoires. Les différentes études démontrent que la VAA-I lie préférentiellement les monocytes au détriment des lymphocytes. Ainsi, chez les lignées de monocytes (*human acute monocytic leukemia cell line* (THP-1)), la VAA-I augmente les concentrations de l'inositol phosphatase et du phosphatidylinositol, indiquant l'implication de signaux de transduction à l'intérieur des monocytes. Chez les neutrophiles, les effets de la VAA-I n'impliquent aucunement les événements reliés à la phosphorylation des tyrosines (Savoie *et al*, 2000).

##### **5.4.1 Propriétés immunostimulatrices**

La VAA-I exerce différents effets et ce dépendamment de la dose utilisée. Lorsque la VAA-I est utilisée à de faibles concentrations (de 1 à 100 ng/mL), l'effet immunostimulateur de la protéine est prédominant. Le tableau suivant consiste en un résumé de différentes études *in vitro* et *in vivo* révélant les effets stimulateurs à l'intérieur de plusieurs types cellulaires.

Fait intéressant, utilisée de 1 à 10 mg/mL, la VAA-I peut stimuler la sécrétion d'insuline. D'ailleurs des thés (1g/400 mL d'infusion) fabriqués dans les années cinquante à base de feuille de gui étaient utilisés pour traiter le diabète. (Gray et Flatt, 1999). Ainsi administrée, la lectine s'est avérée à démontrer des propriétés médicinales bénéfiques comme une habileté à ralentir la pression sanguine et le

rythme cardiaque, une stimulation du système immunitaire, une relaxation des spasmes ainsi que des effets diurétiques.

**Tableau 8. Propriétés immunostimulatrices de la VAA-I**

| DOSE   | CELLULES                             | EFFET   | RÉFÉRENCE   |
|--|--------------------------------------|---|---|
| 50 pg/mL   | lignées cellulaires promyélocytaires | production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ )   | Vehmeyer <i>et al</i> , 1998                        |
| 50 à 100 ug/mL   | lymphocytes                          | production de radicaux libres, annexine-V positive (présence d'apoptose)                                    | Büssing, Schaller et Pfüller, 1998                  |
| 2 ug/mL (chaîne B)   | cellules T Jurkat                    | libération de calcium   | Walzel <i>et al</i> , 2001                          |
| 0,1 à 10 ng/mL   | cellules dendritiques et précurseurs | maturation, développement   | Stein, Büssing et Schietzel, 2002                   |
| En présence du virus herpes simplex, 1 ug  | lymphocytes T                        | adjuvant mucosal, prolifération, production d'IL-5  | Lavelle <i>et al</i> , 2002                         |
| 0,1 à 20 ug/mL   | neutrophiles                         | production d' O <sub>2</sub>  | Timoshenko et Gabius, 1993                          |
| Non toxiques   | cellules NK                          | augmentation de la cytotoxicité   | Tabiasco <i>et al</i> , 2002                        |
| 0,33 mg/kg de poids corporel d'extraits de <i>V. album</i> et 1,6 ng/kg de poids corporel de VAA-I | lymphocytes de patients cancéreux    | augmentation de la réparation de l'ADN  | Kovacs, Hajto et Hostanska, 1991                    |
| 10 ng/mL   | PBMC                                 | production d'IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  | Hajto <i>et al</i> , 1990                           |
| 1-10 ng/mL   | PBMC                                 | augmentation de l'ARNm d'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GM-CSF, IL-10 | Hajto <i>et al</i> , 2005                           |
| 0,25-1 ng/kg (dans les lapins)   | cellules NK                          | augmentation de la cytotoxicité   | Hajto, Hostanska et Gabius, 1989                    |
|  | neutrophiles                         | augmentation de la phagocytose  |   |
|  | LGLs                                 | augmentation de leur nombre   |   |
| 50 ng/mL (dans les rats) et <i>in vitro</i>  | celules NK                           | augmentation de leur nombre et de leur cytotoxicité   | Hajto <i>et al</i> , 1998 ; Müller et Anderer, 1990 |
|  | monocytes                            | production d'IL-12  |   |

**Abréviations:** LGLs, *large granular lymphocyte* ; PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*.

La production de cytokines par la VAA-I chez les lapins concorde bien avec celle observée chez des patients atteints de cancer. En fait, la production de cytokines pyogéniques (TNF- $\alpha$  et IL-6) peut facilement être observée par l'augmentation de la température du corps humain. Ainsi, une augmentation de la température fut observée chez des patientes atteintes du cancer du sein après une unique injection de VAA-I. Cet effet peut être jugé comme un procédé potentiellement bénéfique dans le mécanisme de défense (Hajto *et al*, 1990 ; Hajto et Hostanska, 1985).

#### 5.4.2 Propriétés cytostatiques/apoptotiques

À plus forte concentration (100 ng/mL et plus), la VAA-I induit l'apoptose dans plusieurs types cellulaires. Chez la lignée cellulaire des promonocytes U-937, elle induit l'augmentation de calcium cytosolique, l'expression du récepteur H<sub>1</sub> (histamine) et celui du complément C5a. (Wenzel-Seifert, Lentzen et Seifert, 1997). L'augmentation de calcium intracellulaire joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose puisqu'elle entraîne l'activation des certaines endonucléases (dépendantes du calcium) responsables de la fragmentation de l'ADN. L'augmentation des deux récepteurs est un processus qui accélère cet événement. La VAA-I induit l'apoptose aussi chez d'autres types cellulaires : monocytes, lignées monocytaires THP-1, thymocytes murins et lymphocytes (Hostanska *et al*, 1996-97).

Plusieurs chercheurs tentent d'élucider la voie d'activation de l'apoptose de la VAA-I chez différentes cellules. Chez les cellules T Jurkat, la VAA-I induit l'apoptose via l'activation de la caspase-8, tout en étant indépendante des signaux impliquant les DR (Bantel *et al*, 1999). Cette apoptose est également indépendante du p53. En effet, l'équipe de Hostanska (2003) a testé la VAA-I sur des lignées cancéreuses murines dont la protéine p53 était déficiente. Ils ont remarqué que l'activité proliférative cellulaire était inhibée par la VAA-I. Cette induction était toutefois dépendante de la déstabilisation de la membrane mitochondriale et l'activation de la caspase-3.

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse à ce sujet et tente d'élucider le mode d'action principalement chez le neutrophile. Bien que la VAA-I lie les sucres de la plupart des cellules du système immunitaire, ce sont les granulocytes et les

monocytes qui démontrent une meilleure affinité (Hajto *et al*, 2005 ; Hostanska *et al*, 1995).

Nous avons remarqué que la VAA-I (1000 ng/mL) induit l'apoptose des neutrophiles via l'activation des caspases. Cette induction n'est pas dépendante de la flambée oxydative ni de la perturbation du potentiel mitochondrial. Certaines protéines du cytosquelette sont dégradées par les caspases comme la gelsoline, la vimentine et la paxilline mais pas la vinculine ni la tubuline (Lavastre *et al*, 2002a). Le traitement avec le tyrphostin B42 (inhibiteur de tyrosine kinases) n'empêche pas l'apoptose induite par la VAA-I. Ceci suggère que cette apoptose est indépendante de l'activation des tyrosines kinases. Également, l'apoptose dans ces mêmes cellules implique l'activation de la caspase-3 (Savoie *et al*, 2000). Notre équipe a également démontré que la diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 était grandement diminuée (Lavastre *et al*, 2002). De plus, nous avons démontré que la VAA-I pouvait freiner certains effets stimulateurs de l'IL-15 chez le neutrophile comme le retard d'apoptose ainsi que la synthèse protéique *de novo* (Pelletier *et al*, 2001).

La VAA-I (1 ng/kg de masse corporelle, 2 fois/semaine, 6 fois inférieure à la LD-50) administrée sous-cutanée, provoque l'augmentation en nombre de lymphocytes T auxiliaires et de cellules NK, du récepteur à l'IL-2 sur les lymphocytes et du récepteur au HLA-DQ chez les lymphocytes B (Elsässer-Beile *et al*, 1998).

### **5.5 Les activités pro- et anti-tumorales de la VAA-I**

Le potentiel clinique des lectines de plantes en thérapie complémentaire aux traitements classiques (chimiothérapie, radiothérapie) a soulevé bien des controverses. Les propriétés immunomodulatrices, comme la production de cytokines pro-inflammatoires, se sont avérées être plus ou moins favorables dans certains cas de cancer. En fait, à certaines reprises la lectine pouvait même stimuler les tumeurs dans les lignées cellulaires, sur les histocultures de tumeurs humaines ainsi que dans deux modèles animaux comportant des tumeurs (Gabijs, 2001). Son utilisation massive en Europe, principalement en Allemagne, est le fruit d'un concept purement dogmatique et spirituel, suivant les idées des docteurs Rudolf Steiner et Ita Wegman (Legnani,

2008). Ces fondateurs de la première clinique anthroposophique furent les premiers à utiliser la plante de gui pour traiter le cancer en 1918 (Kienle *et al*, 2003). D'un point de vue pharmaceutique, plusieurs facteurs (composition variable de la lectine, méthodologie faible, discontinuité du traitement ou interruption prématurée, suivi incomplet) rendent difficile la reproductibilité dans les essais cliniques cités plus bas. De plus, la lectine ne peut faire la distinction entre une cellule cancéreuse et une cellule normale, ce qui rappelle sa fonction initiale de protéger la plante de gui de tous les prédateurs éventuels, malades ou pas (Rüdiger, 1998).

### *Études rapportant une utilisation avantageuse*

Malgré ces observations et les risques éventuels, l'Iscador est présentement grandement utilisé pour traiter le cancer à une dose d'environ 1 mg de VAA-I par kg de masse corporelle, administrée deux fois par semaine, et présente certains résultats satisfaisants dans des études en phase I (Mikeska *et al*, 2004 ; Büssing, 1996 ; Klebingat, 1998 ; Kleijnen et Knipschild, 1994 ; Grossarth-Maticek et Ziegler, 2008). En examinant les résultats et la constance de plusieurs études, la VAA-I put améliorer la qualité de vie de certains patients cancéreux ainsi que limiter certains effets secondaires reliés aux thérapies plus conventionnelles (chimio-, radio- et hormonothérapie). Ces observations furent toutefois critiquées (Kienle et Kiene, 1997).

Durant les traitements avec la VAA-I, une légère réaction inflammatoire survient habituellement près du site de l'injection. Suite à une biopsie de la peau autour du site d'injection, les chercheurs remarquèrent toutefois que l'épiderme était normal. Par contre, le derme et les régions sous-cutanées sous cette région démontrèrent une infiltration de lymphocytes et de monocytes (Gorter *et al*, 1998).

De plus, une augmentation des lymphocytes T périphériques, dont l'expression des marqueurs CD25<sup>+</sup> et HLA-DQ<sup>+</sup> est rehaussée, est remarquée chez les patientes atteintes du cancer du sein (Beuth *et al*, 1992). L'efficacité de la VAA-I envers les cellules cancéreuses est grandement influencée par la spécificité de la chaîne B et son interaction avec un récepteur de surface putatif (Ye *et al*, 2006).

Des études réalisées *in vitro* démontrent une certaine variabilité en ce qui concerne l'efficacité de la VAA-I envers les différentes lignées cellulaires cancéreuses, tout dépendant du type de tumeur, du type cellulaire, de l'individu et de l'âge des patients (Knöpfel-Sidler *et al*, 2005). Une étude pilote effectuée par l'équipe de Hajto sur douze patients comportant des tumeurs malignes (stage III et IV, cancer des os, poumons, seins, peau, ganglions), a démontré que l'injection de VAA-I (1ng/kg de masse corporelle) a permis de complètement rétablir un patient (disparition complète de la tumeur), d'obtenir des réponses partielles (réduction de 50% ou plus de la tumeur) pour trois d'entre eux et trois autres ont eu des rémissions mineures (réduction de moins de 50% de la tumeur) (Hajto *et al*, 2005).

Dans une autre étude, des chercheurs ont observé une amélioration dans la capacité à réparer l'ADN de leurs lymphocytes chez des patientes atteintes de cancer du sein auxquels de l'Isador (1,6 ng/kg de masse corporelle) avait été administré (Kovacs, Hajto et Hostanska, 1991).

#### *Efficacité clinique controversée*

Bien que les préparations de lectines soient parmi les thérapies non conventionnelles les plus largement prescrites dans le centre de l'Europe, son efficacité fut le sujet de nombreux débats controversés. Des études *in vitro* et *in vivo* effectuées sur des modèles d'animaux ont démontré les risques associés à une telle utilisation dans des cas de tumeurs. En suivant la croissance de la tumeur (huit sarcomes et quatre mélanomes), cinq d'entre eux ont démontré une stimulation/prolifération significative. Dans des histocultures établies à partir d'une trentaine de cas (tumeurs humaines prélevées), la plus faible concentration (1ng/mL) comportait une certaine toxicité. De plus, cinq tumeurs progressaient suite à l'augmentation significative de thymidine radioactive (Gabijs *et al*, 2001).

Dans une autre étude, les tumeurs induites chimiquement dans la vessie des rats n'ont été nullement influencées après un traitement expérimental avec la VAA-I de quinze mois. Les tumeurs ont même plutôt progressées (Kunze *et al*, 1998). Thimoshenko et ses collaborateurs ont quant à eux étudiés les tumeurs sous-cutanées et les lésions métastatiques des poumons et ils ont eux aussi remarqué que leur croissance et leur fréquence avaient augmentées significativement relativement aux souris témoins suite

à l'administration de la VAA-I sur une période de vingt-et-un jours (Timoshenko, Gabius et Lala, 2001).

En résumé, même s'il s'avère intéressant d'utiliser la VAA-I comme thérapie non conventionnelle ou encore comme effecteur potentiel dans la production endogène de cytokines, les évidences obtenues dans les études pré-cliniques nous procurent de sérieuses réserves quand à la justification éthique et à la légitimité de son utilisation. Compromettre l'état de santé d'un patient pendant un traitement n'est jamais justifiable. Des études de plus haute qualité et très encadrées sont requises pour pouvoir confirmer l'efficacité et la sécurité de la VAA-I comme médicament anti-tumoral.

Bien que l'efficacité de la VAA-I soit controversée lorsqu'elle est utilisée à une faible dose, il est important de se rappeler qu'une des propriétés proéminentes de cette lectine est sa capacité à retarder la croissance de certaines tumeurs *in vivo* ainsi qu'une variété de lignées cancéreuses humaines, de fibroblastes et de lymphocytes *in vitro* à plus forte concentration (Pryme *et al*, 2006). C'est donc dans cette optique que l'enjeu d'effectuer des études sur les propriétés pro-apoptotiques de la lectine devient intéressant. Que se soit pour freiner les tumeurs ou encore diminuer l'inflammation, la VAA-I s'avère un choix intelligent.

## **SECTION 2 : ARTICLES**

**1.1 ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF *VISCUM ALBUM* AGGLUTININ-I (VAA-I):  
INDUCTION OF APOPTOSIS IN ACTIVATED NEUTROPHILS AND INHIBITION OF  
LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED NEUTROPHILIC INFLAMMATION *IN VIVO***

**Auteurs**

Valérie Lavastre, Hélène Cavalli, Claude Ratthé et Denis Girard

**Publié dans**

*Clinical Experimental Immunology* (2004), volume 137, pages 272-278

**Contribution personnelle**

J'ai réalisé les études sur les neutrophiles humains au repos et activés par le LPS (immunobuvardages de type Western et cytométrie en flux) (figures 1, 2, 3, 4 et 5A). J'ai planifié et réalisé les expériences effectuées sur les souris (figures 5 et 6). J'ai participé à l'analyse des résultats ainsi qu'aux analyses statistiques. J'ai participé à l'élaboration du manuscrit. J'évalue ma contribution personnelle pour cet article à environ 80%.

**Contribution des co-auteurs**

**Hélène Cavalli :** Elle a participé à la réalisation des études *in vivo* (préparation des souris, injection des agonistes, sacrifice, préparation des lames et analyse).

**Claude Ratthé :** Elle a mesuré les concentrations en cytokines dans les fractions intracellulaires et extracellulaires du surnageant des neutrophiles humains par la technique d'ELISA (tableau 1) ainsi que réalisé les études statistiques s'y rattachant.

**Denis Girard :** Il a dirigé les expériences reliées à cette étude. Il a participé à la planification des expériences, aux analyses statistiques ainsi qu'à la réalisation du manuscrit.

## 1.2 Résumé en français de l'article

La VAA-1 est une lectine de plante qui possède des propriétés anti-tumorales. Cette lectine est aussi connue pour ses effets immunostimulateurs lorsqu'elle est employée à faible dose (1 à 100 ng/mL). Nous avons démontré récemment que la VAA-1, utilisée à une plus forte concentration, est un puissant inducteur d'apoptose *in vitro* chez le neutrophile humain. Jusqu'à présent, le rôle de la VAA-1 sur des neutrophiles activés n'a pas été investigué et ses propriétés pro-inflammatoires dans un modèle *in vivo* n'ont encore jamais fait l'objet d'aucune recherche. Dans cette étude, nous démontrons que la VAA-1 (1000 ng/mL) induit l'apoptose chez des neutrophiles humains activés par le LPS *in vitro* ainsi que chez des neutrophiles murins isolés à partir d'un exsudat obtenu suite à une stimulation par le LPS. En utilisant le modèle de la poche d'air murine, nous avons démontré que l'injection de VAA-1 (100 ou 1000 ng/mL) n'induit aucune réaction inflammatoire. Toutefois, des doses de 1 et de 10 ng/mL de VAA-1 provoquent une inflammation, témoignée par une augmentation significative de leucocytes totaux (principalement des neutrophiles). De plus, la VAA-1 freine le recrutement de neutrophiles dans la poche murine induite par le LPS lorsque ce dernier fut administré en simultané avec la VAA-1. Des neutrophiles démontrant une morphologie caractéristique de l'apoptose ont été ainsi observés. Contrairement au LPS qui provoque la synthèse de plusieurs cytokines, la VAA-1 n'a pas induit la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1(3), IL-8, IL-10 ou IL-12 (p70) chez le neutrophile humain. Cette étude a démontré que la VAA-1 induit l'apoptose chez des neutrophiles humains activés et ce, à une concentration qui n'induit pas de réponse pro-inflammatoire. De plus, la VAA-1 est en mesure d'inhiber la réponse inflammatoire induite par le LPS dans le modèle de la poche d'air murine. Ces recherches ouvrent les portes pour des perspectives sur l'utilisation future de la VAA-1 dans les thérapies basées principalement sur son activité anti-inflammatoire contrairement à son emploi déjà existant reposant sur ses effets immunostimulateurs.

## 1.3 Article tel que publié

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

Clinical and experimental immunology 2004 Aug;137(2):272-8. Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-1 (VAA-1): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02545.x  
Lavastre V, Cavalli H, Ratthe C, Girard D.

**2.1 *VISCUM ALBUM* AGGLUTININ-I (VAA-I) INDUCES APOPTOSIS AND DEGRADATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN HUMAN LEUKEMIA PLB-985 AND X-CGD CELLS VIA CASPASES: LAMIN B<sub>1</sub> IS A NOVEL TARGET OF VAA-I**

**Auteurs**

Valérie Lavastre, Sonia Chiasson, Hélène Cavalli et Denis Girard

**Publié dans**

*Leukemia Research* (2004), volume 29, pages 1443-1453

**Contribution personnelle**

J'ai réalisé les études sur les PLB concernant l'évaluation de leur état apoptotique (cytologie, dégradation d'ADN sur gel d'agarose, immunobuvardages de type Western) pour produire les figures 1, 2, 4, 5 et 6. J'ai effectué les expériences concernant l'expression des caspases au niveau des protéines (figure 3B et 3C) et l'utilisation des différents inhibiteurs (figures 2B, 7 et 8). J'ai participé à l'analyse des résultats. J'ai aidé à la correction du manuscrit. J'évalue ma contribution personnelle pour cet article à environ 70%.

**Contribution des co-auteurs**

**Sonia Chiasson :** Elle a planifié et réalisé les expériences de réactions de polymérisation en chaîne par transcriptase inverse (RT-PCR ou *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) pour les caspases (figure 3A). Elle a réalisé les analyses et les statistiques s'y rattachant.

**Hélène Cavalli :** Elle a confirmé certains résultats d'immunobuvardages de type Western ainsi qu'analysé les résultats.

**Denis Girard :** Il a dirigé les expériences reliées à cette étude. Il a participé à la planification des expériences, aux analyses statistiques ainsi qu'à la réalisation du manuscrit.

## 2.2 Résumé en français de l'article

La VAA-1 est un puissant inducteur d'apoptose chez de nombreux types cellulaires et possède également des propriétés anti-tumorales. L'utilisation des lignées promyélocytaïres PLB-985 et PLB-985 déficientes en la sous-unité gp91<sup>phox</sup>, nous a permis de démontrer que la VAA-1 peut également induire l'apoptose chez ces types de cellules comme démontré par cytologie, par l'apparition de l'échelle d'ADN caractéristique de l'apoptose ainsi que par le clivage d'une protéine du cytosquelette, la gelsoline. Chaque lignée cellulaire exprime les caspases-3 et -8 qui sont activées suite à l'ajout de la VAA-1. De plus, la lamine-B<sub>1</sub> est identifiée comme une nouvelle cible de la VAA-1. Sa dégradation est renversée par l'ajout de l'inhibiteur général, zVAD, ainsi que par l'inhibiteur de la caspase-6 mais non par l'inhibiteur de la caspase-8.

## 2.3 Article tel que publié

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

Leukemia Research, 2005 Dec;29(12):1443-53. Epub 2005 Oct 19.

Viscum album agglutinin-1 (VAA-1) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-1.  
DOI: 10.1016/j.leukres.2005.05.014

Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D.

**3.1 *VISCUM ALBUM* AGGLUTININ-I INDUCES DEGRADATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN LEUKEMIA PLB-985 CELLS DIFFERENTIATED TOWARD NEUTROPHILS: CLEAVAGE OF NON-MUSCLE MYOSIN HEAVY CHAIN-IIA BY CASPASES**

**Auteurs**

Valérie Lavastre, François Binet, Éliane Moisan, Sonia Chiasson et Denis Girard

**Publié dans**

*British Journal of Haematology* (2007), volume 138, pages 545-54

**Contribution personnelle**

J'ai planifié et réalisé les expériences de microscopie (figures 1A et B) ainsi que les immunobuvardages de type Western (figures 2, 3 et 4). J'ai contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques s'y rattachant. J'évalue ma contribution personnelle pour cet article à environ 40%.

**Contribution des co-auteurs**

**François Binet** : Il a planifié et réalisé les expériences de microscopie à fluorescence (figures 1C et 4B). Il a contribué à l'analyse des résultats ainsi qu'aux analyses statistiques s'y rattachant.

**Éliane Moisan** : Elle a participé à la planification et à la réalisation des expériences de cytométrie en flux (figure 6). Elle a contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques s'y rattachant. Elle a également effectué la mise au point des conditions nécessaires à la détection intracellulaire de la NMHC-IIA dans les immunobuvardages de type Western.

**Sonia Chiasson** : Elle a effectué les expériences de RT-PCR afin de déterminer l'expression des différentes caspases chez les PLB-985 et les neutrophiles (figure 5B). Elle a contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques s'y rattachant.

**Denis Girard** : Il a dirigé les expériences reliées à cette étude. Il a participé à la planification des expériences, aux analyses statistiques ainsi qu'à la réalisation du manuscrit.

### **3.2 Résumé en français de l'article**

Le rôle de l'agent anti-cancéreux VAA-I chez les promyélocytes PLB-985 différenciés en un phénotype de neutrophile par le diméthylsulfoxyde (DMSO) (PLB-985D) n'a jamais été étudié. Cette étude enquête sur la possibilité que la VAA-I puisse provoquer une rupture dans le réseau des filaments du cytosquelette chez les cellules PLB-985D et chez les cellules PLB-985 non différenciées. La VAA-I induit l'apoptose des cellules PLB-985D, tel que démontré par cytologie et en examinant la dégradation de la gelsoline, évènement se produisant par l'activation de la caspase-3. La VAA-I induit une certaine perturbation des protéines du cytosquelette basée sur la rupture du réseau de filament d'actine et le clivage de la paxilline, de la vimentine et de la lamine B<sub>1</sub>. De plus, pour la première fois, nous avons démontré que la chaîne lourde IIA de la myosine non musculaire (NMHC-IIA) est également clivée par l'ajout de la VAA-I. La dégradation de la NMHC-IIA est renversée par l'inhibiteur de caspases z-VAD-fmk chez les neutrophiles et les cellules PLB-985D. Cependant, contrairement à la lamine B<sub>1</sub>, aucune fragment de NMHC-IIA n'est détecté à la surface des neutrophiles apoptotiques. En conclusion, les cellules PLB-985D répondent de façon similaire aux neutrophiles concernant le démantèlement des protéines du cytosquelette testées dans cette étude. Ainsi, les cellules PLB-985D peuvent offrir un substitut approprié pour les neutrophiles dans des expériences de criblage, prévenant des isolations de neutrophiles répétitives.

### **3.3 Article tel que publié**

# *Viscum album* agglutinin-I induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases

Valérie Lavastre, François Binet, Éliane Moisan, Sonia Chiasson and Denis Girard

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

Received 2 April 2007; accepted for publication 18 May 2007

Correspondence: Denis Girard, PhD, INRS-Institut Armand-Frappier, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), QC, Canada, H9R 1G6.

E-mail: denis.girard@iaf.inrs.ca

## Summary

The role of the anti-cancer agent *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward a neutrophil-like phenotype by dimethylsulphoxide (PLB-985D) has never been studied. This study investigated whether or not VAA-I can induce cytoskeletal breakdown in PLB-985D cells, as previously observed in undifferentiated PLB-985 cells. VAA-I was found to induce apoptosis in PLB-985D cells, as assessed by cytology and by degradation of gelsolin, an event known to occur via caspase-3 activation. VAA-I induced cytoskeletal breakdown based on the disruption of the F-actin network and cleavage of paxillin, vimentin and lamin B<sub>1</sub>. In addition, we demonstrated, for the first time, that non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) was cleaved by VAA-I treatment. Degradation of NMHC-IIA was reversed by the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk in PLB-985D cells and neutrophils. However, unlike lamin B<sub>1</sub>, no NMHC-IIA was detected on the cell surface of apoptotic neutrophils. In conclusion, PLB-985D cells responded in a similar manner to neutrophils regarding the degradation of the tested cytoskeletal. Therefore, PLB-985D cells may provide a suitable substitute for neutrophils in screening experiments, preventing extensive neutrophil cell isolation.

**Keywords:** leukaemia cells, neutrophils, cytoskeleton, caspases, myosin.

Although the cytoskeleton is known to undergo dramatic changes during apoptosis, the list of cytoskeletal proteins known to be degraded in haematopoietic cells is far from being complete. This is particularly true for granulocytes, which are known to exert several functions requiring cytoskeleton rearrangements, including respiratory burst, chemotaxis, adhesion, phagocytosis and apoptosis (Bengtsson *et al*, 1993, 2006; Kothakota *et al*, 1997; Anderson *et al*, 2000; Robinson & Badwey, 2002; Grzanka *et al*, 2003; Veselska *et al*, 2003). Among the cytoskeletal proteins, actin has been (and is still) the most studied in neutrophils (Bengtsson *et al*, 1993, 2006), probably due to the fact that several laboratories investigate F-actin polymerisation in activated neutrophils using flow cytometry, which is a very simple and rapid method. In the past few years, studies performed in apoptotic cells have identified several cytoskeletal proteins as caspase substrates

(Brancolini *et al*, 1995; Sanghavi *et al*, 1998; Nicholson, 1999; Byun *et al*, 2001; Chen *et al*, 2003; Cho & Johnson, 2004). Because of our general interest in granulocytes, we conducted experiments in order to identify which cytoskeletal proteins are cleaved by caspases during apoptosis. We have previously demonstrated that the microfilament-associated proteins (MFAPs) gelsolin and paxillin, but not vinculin, are cleaved by the plant lectin *Viscum album* Agglutinin-I (VAA-I) in apoptotic mature human neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002) as well as in promyelocytic PLB-985 cells, mature eosinophils and eosinophilic AML14.3D10 cells (Lavastre *et al*, 2005a,b). The two intermediate filament (IF) proteins vimentin and lamin B, known to be expressed in neutrophils, were also found to be cleaved by VAA-I-induced caspases in neutrophils, PLB-985 cells, eosinophils and AML14.3D10 cells (Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b). In addition

to vinculin, VAA-I did not promote cleavage of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin in granulocytes (Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b), suggesting that existence of a selective mechanism for cytoskeletal protein degradation.

Factors that modulate apoptosis and the execution phase of apoptosis may vary from cell to cell, and because several common caspase substrates are not expressed in neutrophils (Bhatia *et al*, 1995; Sanghavi *et al*, 1998; Santos-Beneit & Mollinedo, 2000; Moulding *et al*, 2001) it is important to identify caspase substrates specific to these cells. In addition, because elimination of apoptotic neutrophils by professional phagocytes, such as macrophages, is important for the resolution of inflammation, searching for new pro-apoptotic agents and/or new targets to these agents represent an interesting avenue of research for developing or ameliorate therapeutic strategies in inflammatory disorders. Because we have recently demonstrated that the MFAP gelsolin is fragmented by caspases in VAA-I-induced human neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002), we hypothesised that several other cytoskeletal proteins may be targets to caspases. The present study found that non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) was cleaved by VAA-I in apoptotic granulocytes, including dimethylsulphoxide (DMSO)-differentiated PLB-985 (PLB-985D) and peripheral human neutrophil cells.

## Methods

### Chemicals and agonists

The monoclonal antibodies to human cytoskeletal proteins (anti-gelsolin, clone GS-2C4; anti-vinculin, clone Vin-11-5; anti-vimentin, clone Vim 13.2; anti- $\alpha$ -tubulin, clone B-5-1-2; anti-myosin IIA (non-muscle) and the plant lectin VAA-I, a potent inducer of apoptosis (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). The pan caspase inhibitor, z-VAD-fmk (caspase-1,-3,-4 and -7) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA) and dissolved in endotoxin-tested DMSO (Sigma, St Louis, MO, USA) as previously published. The polyclonal anti-lamin B<sub>1</sub> antibody (clone C-20) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

### Cell cultures and differentiation

Human myelomonoblastic cell line PLB-985 cells (a gift from Dr Y. Pommier, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, in RPMI-1640 complete medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics; 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Cells were cultivated at a cell density between  $2 \times 10^5$ /ml and  $1 \times 10^6$ /ml and the medium was changed thrice a week. For differentiation of PLB-985/HL-60 cells toward the neutrophil-like phenotype, 1.25% (v/v) DMSO (Lavastre *et al*, 2002, 2005a) was added to the culture for 6 d and the efficiency of the differentiation was

evaluated by the Nitroblue tetrazolium (NBT; Sigma) dye reduction (blue-black formazan deposits). Experiments were conducted with an efficiency of cell differentiation >75%. Cell viability was systematically verified with trypan blue exclusion before performing the different experiments and was routinely >98%.

### Granulocyte isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Baie D'urfee, QC, Canada), as previously described (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b). 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%.

### Immunofluorescence

Cells were incubated as specified and for the indicated times. Then, cells were spun on prewashed microscope slides for 2 min at 300 g and fixed/permeabilised with a solution of 2% paraformaldehyde – 0.005% digitonin for 5 min at 37°C. After several washes in phosphate-buffered saline (PBS)-1.25% bovine serum albumin (BSA), slides were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin (1:50), the anti-NMHC-IIA antibody (1:50) or the respective isotypic control for 30 min at 37°C. For NMHC-IIA detection, slides were washed again and incubated with a goat anti-rabbit FITC-conjugated antibody (1:50), for 30 min at 37°C. Slides were visualised at 400 $\times$  with a Leica microscope (Deerfield, IL, USA) equipped with a fluorescent lamp.

### Assessment of apoptosis

Cells ( $1 \times 10^6$ /ml) were untreated or treated with 1000 ng/ml VAA-I for 22 h and apoptosis was assessed by staining DNA with Hoechst reagent. Briefly, an aliquot of  $2 \times 10^5$  cells was harvested and washed twice with 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 the above fluorescent microscope. Images were digitalised using ImagePro Plus software (version 4.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Cells harboring characteristic-segmented nuclei were scored as apoptotic.

### Western blot and degradation of cytoskeletal proteins

PLB-985 and X-CGD 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  $\mu\text{mol/l}$  z-VAD-fmk (Lavastre *et al.*, 2002, 2005a) 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 subjected to 10% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred from the gel to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes. Non-specific sites were blocked with 1% BSA 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-vinculin (1:500); anti-vimentin (1:1000); anti- $\alpha$  tubulin (1:500); anti-lamin B<sub>1</sub> (1:500) or anti-NMHC-IIA (1:500)] for 1 h at room temperature followed by washes, 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 (Lavastre *et al.*, 2002, 2005a). Membranes were washed three times with TBS-Tween, and bands were revealed with the enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection system (Amersham, Pharmacia Biotech Inc). Protein loading was systematically verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments. In some experiments, activation of caspase-3 and caspase-8 was assessed by monitoring the cleavage of the procaspase-3 or procaspase-8 forms by immunoblotting under the conditions indicated in the corresponding figure legend.

#### 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'Urfe', QC, Canada) and reverse-transcribed into cDNA with 200 units of Moloney-murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 25  $\mu\text{l}$ . 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  $\mu\text{l}$ ) contained 1  $\mu\text{l}$  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 CASP mRNA (Lavastre *et al.*, 2005b) are listed below:

- CASP1: Forward 5'-CGACAAGGTCCTGAAGGAGA-3'  
Reverse 5'-CATCTGGCTGCTCAAATGAA-3'  
CASP2: Forward 5'-CAGTTACCTGCACACCGAGTCACGG-3'  
Reverse 5'-AGCCGCATATCATGTCTGAGCGCG-3'  
CASP3: Forward 5'-TTTGTGGTGTGCTTCTGAGCC-3'  
Reverse 5'-ATTCTGTTGCCACCTTTCGG-3'  
CASP4: Forward 5'-TCGGGTCATGGCAGACTCTATGC-3'  
Reverse 5'-ATGCACAGTTCCGCAGATTCCC-3'

- CASP7: Forward 5'-CGATCCATCAAGACCACCCG-3'  
Reverse 5'-GGAATAGGCGAAGAGGAAAGTCAGC-3'  
CASP8: Forward 5'-GGGACAGGAATGGAACACACTTGG-3'  
Reverse 5'-TCAGGATGGTGAGAATATCATCGCC-3'  
CASP9: Forward 5'-AACAGGCAAGCAGCAAAAGTT-3'  
Reverse 5'-TCCATCTGTGCCGTAGACAG-3'  
CASP10: Forward 5'-TGCTGAGTGAGGAAGACCCT-3'  
Reverse 5'-CCTCTGTGGTTCCGATTCAT-3'

As an internal controls, 18S cDNA was amplified by PCR using the primers: 5'-TCCGATAACGAACGAGACTC-3' (forward) and 5'-AGGGACTTAATCAACG-CAA-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 (CASP1); 69°C, 26 cycles (CASP2); 65°C, 28 cycles (CASP3); 69°C, 35 cycles (CASP4); 67°C, 35 cycles (CASP7); 69°C, 30 cycles (CASP8); 69°C, 38 cycles (CASP9); 68°C, 38 cycles (CASP10); 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: CASP1 (1076 bp), CASP2 (325 bp), CASP3 (400 bp), CASP4 (502 bp), CASP7 (537 bp), CASP8 (558 and 694 bp), CASP9 (492 bp), CASP10 (514, 551 and 643 bp) and 18S (315 bp).

#### Cell surface expression of cytoskeletal proteins by flow cytometry

Neutrophils ( $10 \times 10^6$  cells/ml RPMI-HEPES P/S) were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 22 h in order to undergo spontaneous apoptosis. Cells were harvested in cold PBS and blocked with PBS containing 20% autologous serum for 30 min on ice. Cells were washed in PBS and incubated for 30 min on ice with 2  $\mu\text{g/ml}$  of mouse monoclonal anti-cytoskeletal antibodies (anti-lamin B<sub>1</sub> or anti-NMHC-IIA). Appropriate isotypic control antibodies were used to compare with the proteins of interest. Cells were washed in PBS and incubated for 30 min on ice with FITC-conjugated goat anti-mouse; FITC-conjugated rabbit anti-goat or FITC-conjugated goat anti-rabbit antibodies. Cell surface expression was analysed using a FACScan. Apoptosis was evaluated by flow cytometry after staining with FITC-annexin-V (Moisan & Girard, 2006).

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows Version 3.00 (copyright © 1992-2003 SPSS Inc., Chicago, IL, USA) with a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was established at  $P < 0.05$ .

## Results

### VAA-I induces apoptosis in PLB-985D

VAA-I is a potent inducer of apoptosis in a variety of cells (Bussing *et al*, 1996; Hostanska *et al*, 1996; Hajto *et al*, 2003, 2006; Harmsma *et al*, 2004), including granulocytes (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b). In these latter cells, although VAA-I was found to induce apoptosis in human promyelocytic PLB-985 and leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells, as well as in mature neutrophils and eosinophils, its ability to induce apoptosis in DMSO-differentiated PLB-985 (PLB-985D) cells toward a neutrophil-like phenotype, has never been investigated. As illustrated in Fig 1, the efficiency of PLB-985 cell differentiation toward neutrophil-like cells (PLB-985D) was evaluated by cytology and by the NBT dye reduction assay (blue-black formazan deposits) (Fig 1A). All experiments were conducted with a differentiation efficiency  $\geq 75\%$ . VAA-I was found to induce apoptosis in PLB-985D cells, as assessed by Hoechst staining (Fig 1B and inset). Interestingly, the number of apoptotic cells is similar to that previously observed in undifferentiated PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005b). As illustrated in Fig 1C, breakdown of

the cytoskeleton in apoptotic PLB-985D cells was confirmed by immunofluorescence where the normal F-actin network appearance (left panel) switched to the disintegration of the filament into small aggregates (left panel) after VAA-I treatment.

### VAA-I induces the degradation of cytoskeletal components in PLB-985D cells

Knowing that VAA-I induced apoptosis as well as cytoskeleton breakdown in PLB-985D cells, we verified the possibility that it would induce the degradation of the MFAP gelsolin, an event known to occur via caspase-3 activation (Kothakota *et al*, 1997; Lavastre *et al*, 2002). As illustrated in Fig 2A, gelsolin was degraded by VAA-I after 22 h of treatment. Similarly to undifferentiated PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005a) and mature neutrophils (Lavastre *et al*, 2002), the degradation of gelsolin did not occur rapidly, since very little, if any, degradation was observed after 4 h of treatment with VAA-I. Next, we investigated the possibility that VAA-I induced the degradation of paxillin, but not of vinculin (two other MFAPs), in PLB-985D cells. As illustrated in Fig 2B, VAA-I induced the degradation of the two paxillin bands (68 and

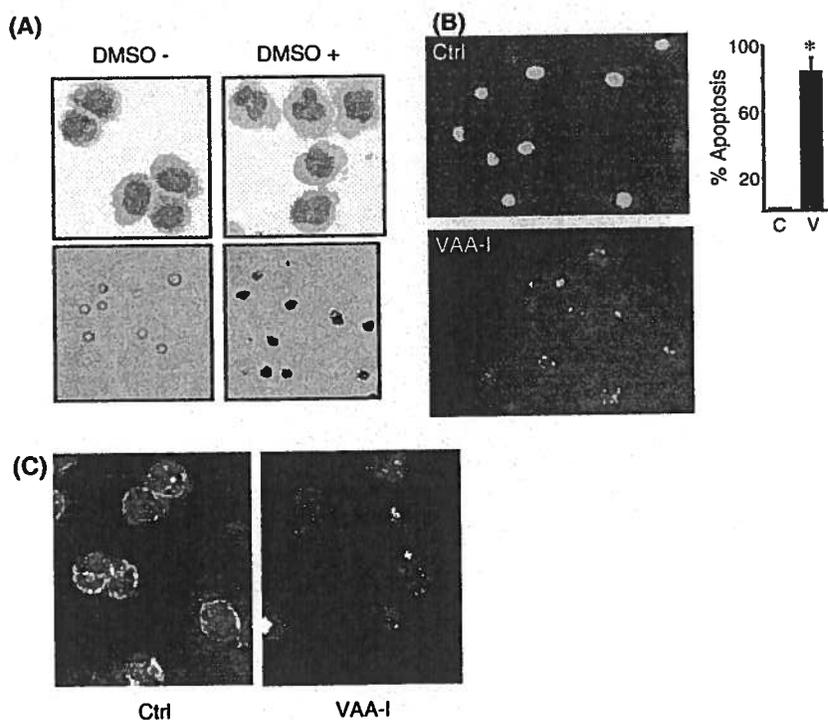


Fig 1. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and cytoskeletal breakdown in apoptotic PLB-985D cells. (A) PLB-985 cells were fully differentiated toward neutrophil-like cells with DMSO (PLB-985D) and the efficiency of differentiation was verified by cytology (upper panels, note the appearance of polylobed nucleus in the top right panel) and by the NBT dye reduction assay (formation of blue-black formazan deposits, bottom right). (B) Apoptosis was evaluated by immunofluorescence microscopy after staining DNA with Hoechst in PLB-985D cells treated with buffer (Ctrl or C) or 1000 ng/ml VAA-I (V) for 22 h. The number of apoptotic cells was counted and expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). (C) PLB-985D cells were treated as above and the F-actin network was observed by immunofluorescence after staining with FITC-phalloidin. Note the appearance of actin aggregates in the right panel when cells were treated with VAA-I. All illustrated results are representative of at least three different experiments.

40 kDa) known to be recognised by the antibody (Lavastre *et al*, 2002). This was reversed by treatment with the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk. Interestingly, vinculin was not degraded by VAA-I in PLB-985D cells (Fig 2C). This suggests that, at least for the tested MFAPs, PLB-985D cells responded similarly to VAA-I when compared with human neutrophils. As it was recently identified that the IF lamin B<sub>1</sub> is a novel target to VAA-I (Lavastre *et al*, 2005a), we verified the possibility that VAA-I cleaved both lamin B<sub>1</sub> and vimentin in PLB-985D cells, the two only members of IF proteins known to be expressed in neutrophils (Bruel *et al*, 2001). As illustrated

in Fig 3A and B, VAA-I induced the degradation of both lamin B<sub>1</sub> and vimentin. Interestingly, lamin B<sub>1</sub> was cleaved into a fragment of 46 kDa (p46), which was previously observed in undifferentiated PLB-985 and in mature neutrophil cells (Lavastre *et al*, 2005a). Although VAA-I is known to cleave several cytoskeletal proteins, it did not cleave the MFAP vinculin (Lavastre *et al*, 2002; present study) nor  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin in PLB-985, AML-14.3D10, neutrophil and eosinophil cells (Lavastre *et al*, 2005a,b). As illustrated in Fig 3C,  $\alpha$ -tubulin was not cleaved by VAA-I after 4 or 22 h of treatment when compared with untreated cells.

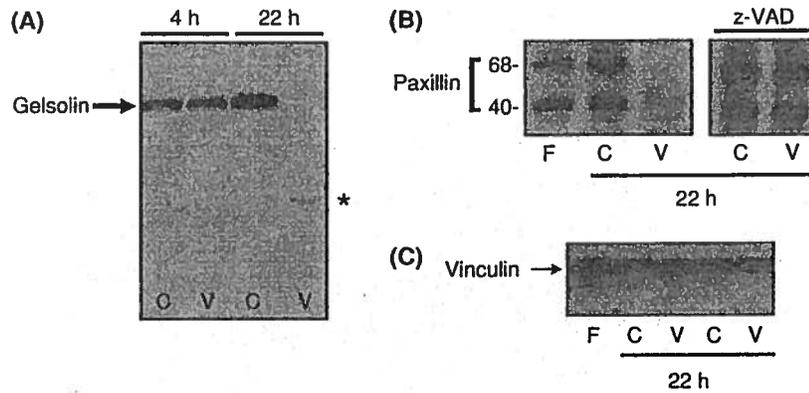


Fig 2. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces the degradation of the microfilament-associated proteins gelsolin and paxillin, but not vinculin in apoptotic PLB-985D cells. PLB-985D cells were treated with buffer (C) or 1000 ng/ml VAA-I (V) for 22 h and potential degradation of the cytoskeletal MFAP gelsolin (A), paxillin (B) and vinculin (C) was monitored by immunoblotting as described in *Methods*. Note the degradation of gelsolin after treatment with VAA-I and the appearance of a faint fragment (\*). The degradation of paxillin was reversed by treatment with the pan caspase inhibitor (z-VAD). As expected, vinculin was not cleaved by VAA-I (Lavastre *et al*, 2002). F, fresh cells. Results are representative of at least three different experiments.

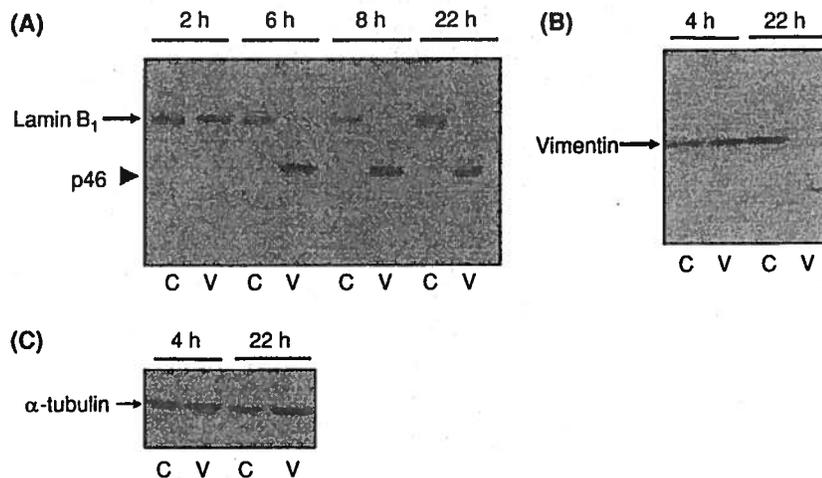


Fig 3. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces the degradation of the intermediate filament proteins lamin B<sub>1</sub> and vimentin but not the major microtubule protein,  $\alpha$ -tubulin, in apoptotic PLB-985D cells. PLB-985D cells were treated as indicated in Fig 2, and potential cleavage of the two IF proteins lamin B<sub>1</sub> (A) and vimentin (B) and one of the major constituent of microtubules,  $\alpha$ -tubulin (C) was assessed by immunoblotting as described in *Methods*. Panel A, note the disappearance of the native lamin B<sub>1</sub> and the apparition of the characteristic p46 fragment when apoptosis was induced by VAA-I (V) when compared with control cells (C). Panel B, vimentin was cleaved by VAA-I but not  $\alpha$ -tubulin (Panel C). Results are representative of at least three different experiments.

*Identification of myosin heavy chain-IIA as a novel cytoskeletal protein cleaved via a caspase-dependent mechanism in VAA-I-induced human granulocyte apoptosis*

Recently, two studies reported that NMHC degradation occurred during apoptosis in bovine aortic endothelial and human Jurkat T cells (Suarez-Huerta *et al*, 2000; Kato *et al*, 2005). Because we are interested in the identification of potential novel cytoskeletal proteins that could be cleaved by VAA-I during granulocyte apoptosis, and as MFAPs represent the most susceptible candidates for cleavage, we investigated the potential degradation of NMHC-IIA, the sole myosin isoform expressed in human neutrophils and platelets (Patel *et al*, 2005). As illustrated in Fig 4A, NMHC-IIA was cleaved in VAA-I-induced PLB-985D cells. The native *c.* 200 kDa myosin band disappeared after VAA-I treatment and was cleaved into a major fragment of *c.* 60 kDa (F60) recognised by the anti-NMHC-IIA antibody. NMHC-IIA was also cleaved into another fragment of *c.* 95 kDa (F95) that was recognised by the antibody. Interestingly, the proteolysis of myosin was reversed when cells were treated with the pan caspase z-VAD-fmk. This indicated that cleavage of NMHC-IIA occurred by a caspase-dependent mechanism. The degradation of NMHC-IIA was confirmed by immunofluorescence, in which VAA-I treatment of cells led to aggregation of myosin and a weaker

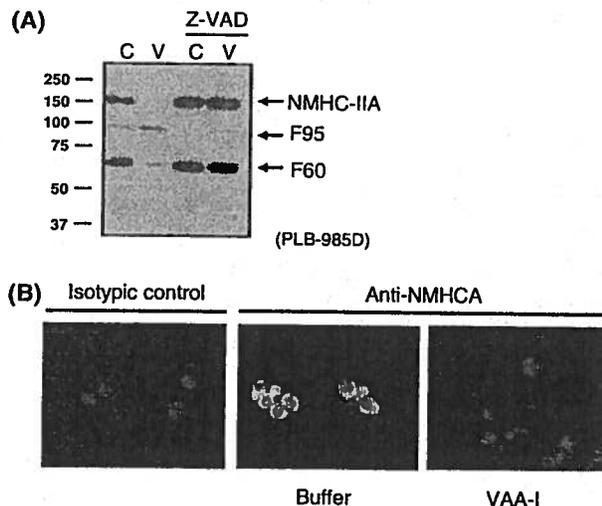


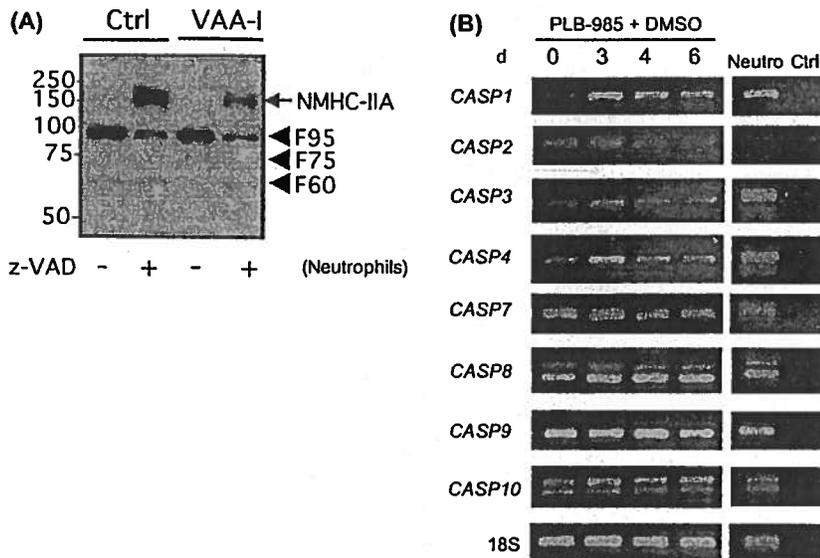
Fig 4. Identification of non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) as a new cytoskeletal target of *Viscum album agglutinin-I* (VAA-I) cleaved by caspases in apoptotic PLB-985D cells. PLB-985D cells were treated as indicated in Fig 2 and potential cleavage of the MFAP NMHC-IIA was assessed by immunoblotting (A) and confirmed by immunofluorescence (B). Note the disappearance of the native form of NMHC-IIA (*c.* 200 kDa) and the F60 fragment detected by the antibody in apoptotic cells (V) when compared with control cells (C). Cleavage of NMHC-IIA was prevented when a pan caspases inhibitor was added (Z-VAD). (B) Distribution of NMHC-IIA by immunofluorescence in control non-apoptotic (middle panel) and in apoptotic VAA-I-induced PLB-985D cells. Results are representative of at least three different experiments.

signal intensity when compared with control cells (Fig 4B). As it was the first time that myosin was found to be cleaved in granulocytes, we investigated whether or not such NMHC-IIA cleavage occurring in 'neutrophil-like' PLB-985D cells could also occur in primary mature human neutrophils. As illustrated in Fig 5A, myosin was cleaved in apoptotic neutrophils. Of note, because neutrophils are known to undergo spontaneous apoptosis, NMHC-IIA was cleaved not only in VAA-I-induced cells, but also in spontaneous or 22-h-aged neutrophils, as evidenced by the appearance of the F95 fragment. The detection of the native form of NMHC-II during spontaneous neutrophil apoptosis can vary from donor to donor, but was always almost undetectable in VAA-I-induced neutrophils. Figure 5A shows that the native form was weakly detectable. Interestingly, in contrast to PLB-985D, F95 was the major fragment recognised by the antibody while that of the F60 was faintly detected. Another fragment (F75) was also barely detectable. Addition of z-VAD-fmk reversed the cleavage of NMHC-IIA in spontaneous- and in VAA-I-induced neutrophil apoptosis. Because the different fragments of NMHC-IIA could be detected and as we had recently demonstrated that VAA-I activated caspase-3 and caspase-8 in PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005a), we then investigated caspase expression during DMSO-induced differentiation toward neutrophils as well as in mature neutrophils. As illustrated in Fig 5B, fully differentiated PLB-985D cells expressed *CASP1*, *CASP2*, *CASP3*, *CASP4*, *CASP7*, *CASP8* and *CASP10*. Only *CASP1* expression was reproducibly ( $n = 3$ ) increased following DMSO treatment, whereas *CASP2* expression decreased. This latter observation concurs with the maturation state of PLB-985D toward neutrophils, as neutrophils do not express caspase-2 (Santos-Beneit & Mollinedo, 2000).

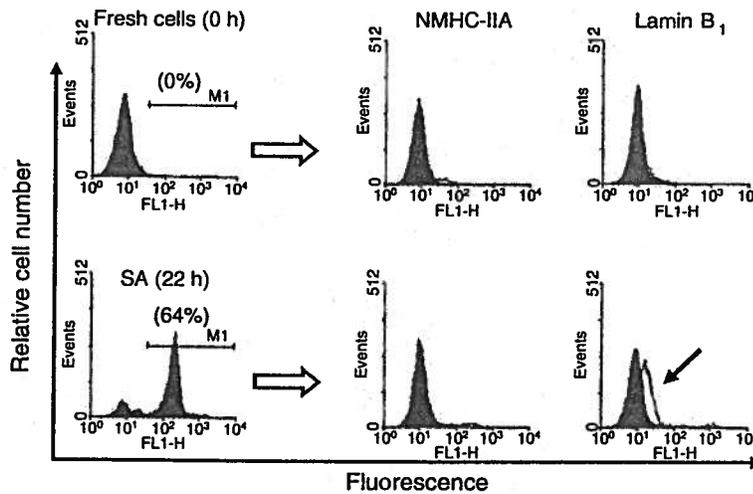
It was recently documented that some cytoskeletal proteins were expressed on the cell surface of apoptotic human neutrophils (Moisan & Girard, 2006); we therefore investigated whether or not NMHC-IIA would be at the cell surface in this situation. Unlike the IF protein lamin B<sub>1</sub>, NMHC-IIA was not detected on the neutrophil cell surface during spontaneous apoptosis (SA) in neutrophils (Fig 6). In addition, no cell surface expression of myosin was detected when apoptosis was induced by VAA-I (*data not shown*).

## Discussion

This study demonstrated that VAA-I induced apoptosis in neutrophil-like PLB-985D cells by a caspase-dependent mechanism. These results were in agreement with the observation that VAA-I induced apoptosis in PLB-985, neutrophils, AML-14.3D10 and eosinophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002, 2005a,b). The ability of VAA-I to induce cell apoptosis via caspases is not limited to granulocytes, as this was previously shown in human leukaemic T and B cell lines (Bantel *et al*, 1999). Of note, although several leukaemia cell lines have been used to study the pro-apoptotic activity of VAA-I, it is important to mention that our studies



**Fig 5.** *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces cleavage of NMHC-IIA in mature human neutrophils: role of caspases. (A) Freshly isolated human neutrophils were isolated as described in *Methods* and were incubated for 22 h with buffer (Ctrl) or 1000 ng/ml VAA-I in the presence or absence of the pan caspase inhibitor z-VAD-fmk (z-VAD). Results are representative of three different experiments. (B) Expression of *CASP1*, *CASP2*, *CASP3*, *CASP4*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9* and *CASP10* mRNA was investigated in PLB-985 cells during their differentiation toward neutrophil-like phenotype by RT-PCR as described in *Methods*. Note that unlike neutrophils (neutro), PLB-985D cells express *CASP2*. Results are representative of three different experiments. ctrl, negative technical control.



**Fig 6.** Non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) is not expressed on the cell surface of apoptotic human neutrophils. Freshly isolated human neutrophils were aged *in vitro* for 22 h to undergo spontaneous apoptosis and cell surface expression of NMHC-IIA and lamin B<sub>1</sub> was investigated by flow cytometry as described in *Methods*. The number in parentheses indicates the % of apoptotic cells evaluated by flow cytometry after staining with FITC-annexin-V. Note the detection of lamin B<sub>1</sub> (arrow) and not of NMHC-IIA during spontaneous apoptosis (SA) when compared with fresh cells. Results are representative of four different experiments.

demonstrate that this plant lectin induced apoptosis in mature non-dividing cells, such as neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002, 2005a) and eosinophils (Lavastre *et al*, 2005b). Thus, in these latter mature cells, we could not induce cell cycle arrest followed by apoptosis, suggesting that different mechanisms might occur between leukaemia cells and circulating neutrophils and eosinophils. Nevertheless, the present

study demonstrated that, in neutrophil-like PLB-985D cells, VAA-I induced cleavage of the tested cytoskeletal proteins, namely paxillin, gelsolin, vimentin and lamin B<sub>1</sub>, as was previously demonstrated in promyelocytic PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005b) and neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2002). In addition, we further found that VAA-I did not induce cleavage of vinculin and  $\alpha$ -tubulin in PLB-

985D cells, indicating that these cells represent an excellent model for studying apoptosis and cytoskeletal protein degradation occurring in VAA-I-induced neutrophils. Moreover, using PLB-985D cells, NMHC-IIA was identified as a novel target of VAA-I and then confirmed in neutrophils. Thus, PLB-985D cells could be used in screening experiments for identification of potential new caspase substrates, preventing extensive neutrophil cell isolation.

Myosins are MFAPs belonging to a superfamily of actin-based motor proteins comprising several classes. The two main groups of myosins are the conventional (class II) and the unconventional myosins. The conventional myosins found in non-muscle cells are referred to as NMHC, and because they arise from at least two genes, two proteins are named NMHC-IIA and NMHC-IIB (Sellers, 2000). The expression of these two isoforms varies from cell to cell. This study specifically investigated NMHC-IIA, because this isoform is the only one expressed in human neutrophils (Patel *et al*, 2005). Recently, a fragment named p95 was identified as the carboxyl-terminal fragment of NMHC-IIA in apoptotic human Jurkat T cells (Kato *et al*, 2005). In these cells, apoptosis was induced by anti-Fas antibody + staurosporine, a natural product that inhibits several protein kinases and which was isolated almost 30 years ago from the bacterium *Streptomyces staurosporeus* (Omura *et al*, 1977). Cleavage of NMHC-IIA into a fragment of *c.* 97 kDa was also observed in apoptotic bovine aortic endothelial cells, where apoptosis was induced by treatment with the cytokine tumour necrosis factor- $\alpha$  + the protein synthesis inhibitor cycloheximide (Suarez-Huerta *et al*, 2000). The present study used VAA-I, a 63 kDa galactoside-specific plant lectin belonging to the family of type II ribosome-inactivating proteins, including ricin, to induce apoptosis and NMHC-IIA degradation in PLB-985D and neutrophils. VAA-I is an inhibitor of protein synthesis, due to a RNA-glycosidase activity inhibiting *N*-glycosylation of a single adenine within a universally conserved GAGA sequence on the 28S rRNA (Endo *et al*, 1988). Interestingly, in our study, cleavage of NMHC-IIA was also observed during spontaneous (22-h-aged) neutrophil apoptosis, a condition that occurs when any exogenous agents are added into the culture. Taken together, the above observations indicate that degradation of NMHC-IIA occurs in response to different proapoptotic signals and in different cell types.

In the present study, cleavage of NMHC-IIA occurred via caspases, because treatment of cells with the pan caspases inhibitor z-VAD-fmk reversed the process. This was observed in VAA-I-induced PLB-985D and VAA-I-induced neutrophil cells as well as during spontaneous neutrophil apoptosis. These results are in agreement with those of Kato *et al* (2005) where the inhibition of caspases resulted in the disappearance of a p95 fragment, which they identified. However, we did not observe the fragment of *c.* 110 kDa, which was detected by Kato *et al* (2005) using their antibodies raised against different NMHC-IIA residues. We identified the native form of NMHC-IIA (*c.* 200 kDa) and fragments denoted F95 and F60 in

PLB-985D cells and native NMHC-IIA, F95, F75 and F60 in neutrophils, suggesting involvement of different caspases in the two cell types. However, except for *CASP2*, the expression of all caspases was similar in both cell types. Although this study did not investigate the potential activity of all caspases, it was previously documented that VAA-I can activate caspase-3 and caspase-8 in PLB-985 cells (Lavastre *et al*, 2005a). As VAA-I can also activate these caspases in mature neutrophils (Savoie *et al*, 2000; Lavastre *et al*, 2005b), the differences observed regarding the cleavage of NMHC-IIA cannot be related to inactivation of these two major caspases. Although it is clear that caspases are involved in the ability of VAA-I to induce PLB-985D cell apoptosis and cleavage of cytoskeletal proteins, including NMHC-IIA, the possibility that other proteases could be involved were not eliminated. In this respect, when z-VAD was added in VAA-I-induced neutrophils, the intensity of the detected NMHC-IIA did not return to the basal level observed when z-VAD was added to prevent spontaneous apoptosis, thus supporting the role of proteases other than caspases.

The gene *MYH9* encodes for NMHC-IIA, and mutations in this gene cause *MYH9* disorders that are autosomal-dominant macrothrombocytopenias with leucocyte inclusions (Seri *et al*, 2000; Pecci *et al*, 2002; Kunishima *et al*, 2005). These rare disorders include May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome and Fechtner syndrome, and are all characterised by a triad of giant platelets, thrombocytopenia and characteristic Döhle body-like cytoplasmic inclusions in granulocytes (Seri *et al*, 2000; Pecci *et al*, 2002; Kunishima *et al*, 2005). Immunofluorescent analysis of neutrophil NMHC-IIA was reported to be useful as a screening test for the clear haematopathological classification of *MYH9* disorders (Kunishima *et al*, 2003). Knowing that NMHC-IIA is cleaved by caspases in apoptotic granulocytes, especially in neutrophils (this report), it would be interesting to investigate the potential altered cleavage of this cytoskeletal protein in neutrophils isolated from patients suffering of *MYH9* disorders in future studies.

In addition to the *MYH9* disorders, myosin is also associated with autoimmune diseases, including rheumatic heart disease, systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis (Girard & Senecal, 1995; Shrivastav *et al*, 2002; Warraich *et al*, 2006), as it has been characterised as an autoantigen. Apoptotic cells have been reported to be an important source of autoantigens (Levine & Koh, 1999). In this respect, two studies have demonstrated that injection of apoptotic cells into normal mice resulted in the production of various autoantibodies (Casciola-Rosen *et al*, 1994; Hall *et al*, 2004), including antibodies directed against the cytoskeletal protein vimentin. Using flow cytometry, we recently found that that the two IF proteins vimentin and lamin B<sub>1</sub>, but not the MFAPs paxillin, gelsolin and vinculin, or the microtubule proteins  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, were expressed on the cell surface of human apoptotic neutrophils (Moisan & Girard, 2006). Knowing this, in addition to their high cell turnover and the fact that these cells are known to undergo spontaneous apoptosis that can

be accelerated by several agents, neutrophils represent a good source of cytoskeletal autoantigens. However, the present study demonstrated that NMHC-IIA was not expressed on the cell surface of apoptotic neutrophils. This indicates that, unlike vimentin and lamin B<sub>1</sub>, the presence of anti-myosin autoantibodies in several disorders does not originate from NMHC-IIA expression on apoptotic neutrophils.

In summary, PLB-985D cells were found to represent a good model for extrapolating data regarding the cleavage of cytoskeletal proteins and the role of caspases during neutrophil apoptosis, although some minor differences were observed between the two cell types, especially with respect to the detection of distinct fragments of a given cytoskeletal protein, such as NMHC-IIA. Nevertheless, the results of this study clearly establish for the first time that the cytoskeletal protein NMHC-IIA is a novel target of VAA-I, inducing granulocyte apoptosis and caspase activation. The fact that NMHC-IIA is not expressed on the cell surface of apoptotic neutrophils further supports our previous conclusion that, among different members of the three classes of cytoskeletal filaments, only those of the IFs are detected on the cell surface of apoptotic neutrophils.

### Acknowledgements

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

### References

Anderson, S.I., Hotchin, N.A. & Nash, G.B. (2000) Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *Journal of Cell Sciences*, **113** (Pt 15), 2737–2745.

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.

Bengtsson, T., Jaconi, M.E., Gustafson, M., Magnusson, K.E., Theler, J.M., Lew, D.P. & Stendahl, O. (1993) Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. *European Journal of Cell Biology*, **62**, 49–58.

Bengtsson, T., Orselius, K. & Wettero, J. (2006) Role of the actin cytoskeleton during respiratory burst in chemoattractant-stimulated neutrophils. *Cell Biology International*, **30**, 154–163.

Bhatia, M., Kirkland, J.B. & Meckling-Gill, K.A. (1995) Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. *Biochemical Journal*, **308** (Pt 1), 131–137.

Brancolini, C., Benedetti, M. & Schneider, C. (1995) Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO Journal*, **14**, 5179–5190.

Bruel, A., Paschke, S., Jainta, S., Zhang, Y., Vassy, J., Rigaut, J.P. & Beil, M. (2001) Remodeling of vimentin cytoskeleton correlates with enhanced motility of promyelocytic leukemia cells during differentiation induced by retinoic acid. *Anticancer Research*, **21**, 3973–3980.

Bussing, A., Suzart, K., Bergmann, J., Pfuller, U., Schietzel, M. & Schweizer, K. (1996) Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Letters*, **99**, 59–72.

Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K.J. & Cryns, V.L. (2001) Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **8**, 443–450.

Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G. & Rosen, A. (1994) Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *Journal of Experimental Medicine*, **179**, 1317–1330.

Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Capetanaki, Y. & Cryns, V.L. (2003) Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 6848–6853.

Cho, J.H. & Johnson, G.V. (2004) Glycogen synthase kinase 3 beta induces caspase-cleaved tau aggregation in situ. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 54716–54723.

Endo, Y., Tsurugi, K. & Franz, H. (1988) The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Letters*, **231**, 378–380.

Girard, D. & Senecal, J.L. (1995) Anti-microfilament IgG antibodies in normal adults and in patients with autoimmune diseases: immunofluorescence and immunoblotting analysis of 201 subjects reveals polyreactivity with microfilament-associated proteins. *Clinical Immunology and Immunopathology*, **74**, 193–201.

Grzanka, A., Grzanka, D. & Orlikowska, M. (2003) Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochemical Pharmacology*, **66**, 1611–1617.

Hajto, T., Berki, T., Boldizsar, F. & Nemeth, P. (2003) Galactoside-specific plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I induces enhanced proliferation and apoptosis of murine thymocytes in vivo. *Immunology Letters*, **86**, 23–27.

Hajto, T., Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F. & Nemeth, P. (2006) Investigation of the effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador on the proliferation and apoptosis of murine thymocytes. *Arzneimittelforschung*, **56**, 441–446.

Hall, J.C., Casciola-Rosen, L. & Rosen, A. (2004) Altered structure of autoantigens during apoptosis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, **30**, 455–471, vii.

Harmsma, M., Gromme, M., Ummelen, M., Dignef, W., Tusenius, K.J. & Ramaekers, F.C. (2004) Differential effects of *Viscum album* extract IscadorQu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells. *International Journal of Oncology*, **25**, 1521–1529.

Hostanska, K., Hajto, T., Weber, K., Fischer, J., Lentzen, H., Sutterlin, B. & Saller, R. (1996) A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Nature Immunology*, **15**, 295–311.

- Kato, M., Fukuda, H., Nonaka, T. & Imajoh-Ohmi, S. (2005) Cleavage of nonmuscle myosin heavy chain-A during apoptosis in human Jurkat T cells. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, **137**, 157–166.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J. & Williams, L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**, 294–298.
- Kunishima, S., Matsushita, T., Kojima, T., Sako, M., Kimura, F., Jo, E.K., Inoue, C., Kamiya, T. & Saito, H. (2003) Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations. *Laboratory Investigation*, **83**, 115–122.
- Kunishima, S., Matsushita, T., Shiratsuchi, M., Ikuta, T., Nishimura, J., Hamaguchi, M., Naoe, T. & Saito, H. (2005) Detection of unique neutrophil non-muscle myosin heavy chain-A localization by immunofluorescence analysis in MYH9 disorder presented with macrothrombocytopenia without leukocyte inclusions and deafness. *European Journal of Haematology*, **74**, 1–5.
- 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.
- Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H. & Girard, D. (2005a) *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. *British Journal of Haematology*, **130**, 527–535.
- Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H. & Girard, D. (2005b) *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leukemia Research*, **29**, 1443–1453.
- Levine, J.S. & Koh, J.S. (1999) The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen, and accelerant. *Seminars in Nephrology*, **19**, 34–47.
- Moisan, E. & Girard, D. (2006) Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **79**, 489–498.
- Moulding, D.A., Akgul, C., Derouet, M., White, M.R. & Edwards, S.W. (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **70**, 783–792.
- Nicholson, D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, **6**, 1028–1042.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y. & Masuma, R. (1977) A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, **30**, 275–282.
- Patel, S.R., Hartwig, J.H. & Italiano, Jr, J.E. (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 3348–3354.
- Pecci, A., Noris, P., Invernizzi, R., Savoia, A., Seri, M., Ghiggeri, G.M., Sartore, S., Gangarossa, S., Bizzaro, N. & Balduini, C.L. (2002) Immunocytochemistry for the heavy chain of the non-muscle myosin IIA as a diagnostic tool for MYH9-related disorders. *British Journal of Haematology*, **117**, 164–167.
- Robinson, J.M. & Badwey, J.A. (2002) Rapid association of cytoskeletal remodeling proteins with the developing phagosomes of human neutrophils. *Histochemistry and Cell Biology*, **118**, 117–125.
- Sanghavi, D.M., Thelen, M., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L. & Rosen, A. (1998) Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *FEBS Letters*, **422**, 179–184.
- 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.
- Sellers, J.R. (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1496**, 3–22.
- Seri, M., Cusano, R., Gangarossa, S., Caridi, G., Bordo, D., Lo Nigro, C., Ghiggeri, G.M., Ravazzolo, R., Savino, M., Del Vecchio, M., d'Apolito, M., Iolascon, A., Zelante, L.L., Savoia, A., Balduini, C.L., Noris, P., Magrini, U., Belletti, S., Heath, K.E., Babcock, M., Glucksman, M.J., Aliprandis, E., Bizzaro, N., Desnick, R.J. & Martignetti, J.A. (2000) Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nature Genetics*, **26**, 103–105.
- Shrivastav, M., Mittal, B., Aggarwal, A. & Misra, R. (2002) Autoantibodies against cytoskeletal proteins in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, **21**, 505–510.
- Suarez-Huerta, N., Lecocq, R., Mosselmans, R., Galand, P., Dumont, J.E. & Robaye, B. (2000) Myosin heavy chain degradation during apoptosis in endothelial cells. *Cell Proliferation*, **33**, 101–114.
- Veselska, R., Zitterbart, K., Jelinkova, S., Neradil, J. & Svoboda, A. (2003) Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Oncology Reports*, **10**, 1049–1058.
- Warraich, R.S., Griffiths, E., Falconar, A., Pabbathi, V., Bell, C., Angelini, G., Suleiman, M.S. & Yacoub, M.H. (2006) Human cardiac myosin autoantibodies impair myocyte contractility: a cause-and-effect relationship. *FASEB Journal*, **20**, 651–660.

**4.1 *VISCUM ALBUM* AGGLUTININ-I INDUCES APOPTOSIS AND DEGRADATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS VIA CASPASES IN HUMAN LEUKEMIA EOSINOPHIL AML 14.3 D10 CELLS: DIFFERENCES WITH PURIFIED HUMAN EOSINOPHILS**

**Auteurs**

Valérie Lavastre, Sonia Chiasson, Hélène Cavalli et Denis Girard

**Publié dans**

*British Journal of Hematology* (2005), volume 103, pages 527-535

**Contribution personnelle**

J'ai planifié et réalisé les expériences concernant l'évaluation de l'apoptose tel que la microscopie (figure 1A) et la microscopie à fluorescence (figures 1B et 6D), la cytométrie en flux (figure 7A), la dégradation d'ADN sur gel d'agarose (figures 1B et 5B) ainsi que les immunobuvardages de type Western (figures 3, 4, 5A, 5C, 7B) chez les différents types cellulaires. J'ai contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques s'y rattachant. J'évalue ma contribution personnelle pour cet article à environ 60%.

**Contribution des co-auteurs :**

**Sonia Chiasson :** Elle a planifié et effectué les expériences de RT-PCR afin de déterminer l'expression des différentes caspases chez les éosinophiles humains, les cellules 3D10 et les neutrophiles (figure 2). Elle a contribué à l'analyse des résultats et aux analyses statistiques s'y rattachant

**Hélène Cavalli :** Elle a confirmé certains résultats d'immunobuvardages de type Western sur les PLB-985 (figure 6C) ainsi que ceux de cytométrie en flux (figure 7A).

**Denis Girard :** Il a dirigé les expériences reliées à cette étude. Il a participé à la planification des expériences, aux analyses statistiques ainsi qu'à la réalisation du manuscrit.

#### **4.2 Résumé de l'article**

Bien qu'il existe plusieurs agents qui induisent l'apoptose des neutrophiles, peu d'entre eux sont reconnus pour induire également l'apoptose chez les éosinophiles. Comme les éosinophiles sont de puissantes cellules effectrices contribuant à l'inflammation suivant une allergie ou encore l'asthme, nous avons enquêté sur la possibilité que la VAA-I puisse induire l'apoptose chez les éosinophiles. Ainsi, nous avons démontré que la VAA-I induit l'apoptose chez les cellules AML 14.3D10 (3D10) arborant certaines caractéristiques des éosinophiles. Les cellules 3D10 expriment aussi les caspases-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9 et -10. La dégradation de la gelsoline par la VAA-I chez les cellules 3D10 est bloquée par l'inhibiteur de caspase N-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-fluorométhyl cétone (z-VAD). De plus, la paxilline, la vimentine et la lamine B<sub>1</sub> sont clivées par les caspases activées par la VAA-I chez les cellules 3D10. Dans ces mêmes cellules, les caspases-3 et -8 sont activées par la VAA-I, cependant contrairement à la zVAD, le traitement avec l'inhibiteur de caspase-8 bloque partiellement leur apoptose. Le traitement des éosinophiles humains avec la VAA-I provoque leur apoptose, la dégradation de la gelsoline et de la lamine B<sub>1</sub> cependant, contrairement aux cellules 3D10, le clivage de la lamine B<sub>1</sub> et l'apoptose n'est pas renversée par la z-VAD. Nous concluons donc que la VAA-I est un puissant inducteur d'apoptose chez les éosinophiles et que d'autres protéases, autres que celles inhibées par la zVAD chez les cellules 3D10, sont impliquées dans le processus d'induction d'apoptose chez les éosinophiles humains ainsi que dans le clivage de la lamine B<sub>1</sub>. Par conséquent, la VAA-I représente un candidat potentiel pour l'élimination des éosinophiles dans les maladies où ces cellules jouent un rôle important.

#### **4.3 Article 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'-CAGTTACCTGCACCCGAGTCAC-  
GG-3'  
Reverse 5'-AGCCGCATATCATGTCTGAGCGCG-3'  
Caspase-3 Forward 5'-TTTGTGTTGTGTGCTTCTGAGCC-3'  
Reverse 5'-ATTCTGTTGCCACCTTTCCGG-3'  
Caspase-4 Forward 5'-TCGGGTCATGGCAGACTCTATGC-3'  
Reverse 5'-ATGCACAGTTCGCGAGATTCCC-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'-TGCTGAGTGAGGAAGACCCT-3'  
Reverse 5'-CCTCTGTGGTTCCGATTTCAT-3'

As internal controls, β-actin cDNA and 18S cDNA were amplified by PCR using primers: 5'-GCGGGA-AATC-GTGCCTGACATT-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.

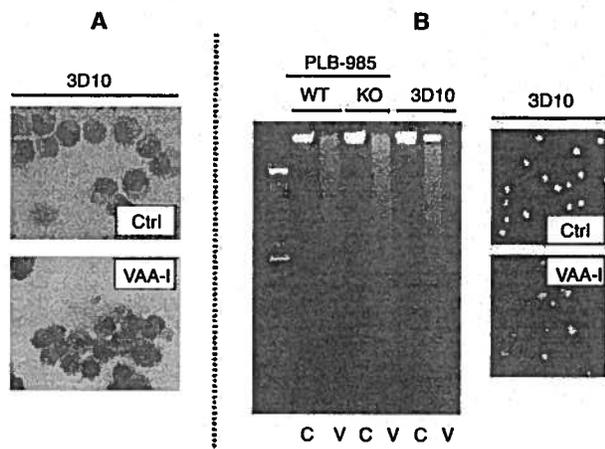
*Activation of caspase-3 and -8*

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.

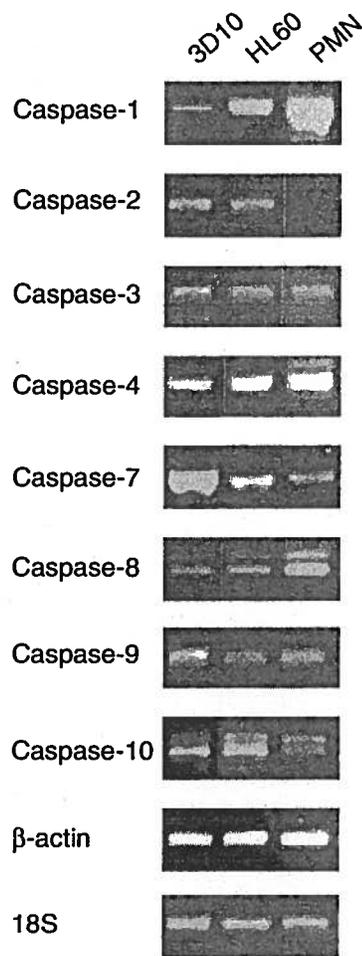
**Results**

*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.

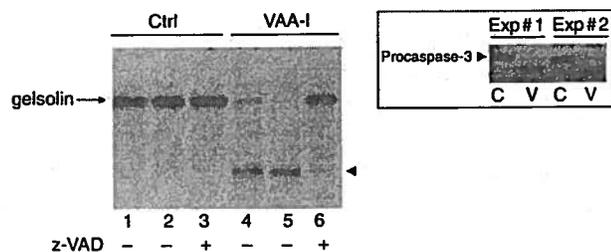


Fig 3. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces cleavage of gelsolin by a caspase-dependent mechanism in AML14.3D10 cells. Cells were incubated with or without VAA-I in the presence (+) or absence (-) of 50  $\mu$ mol/l *N*-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl ketone and expression of gelsolin 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.

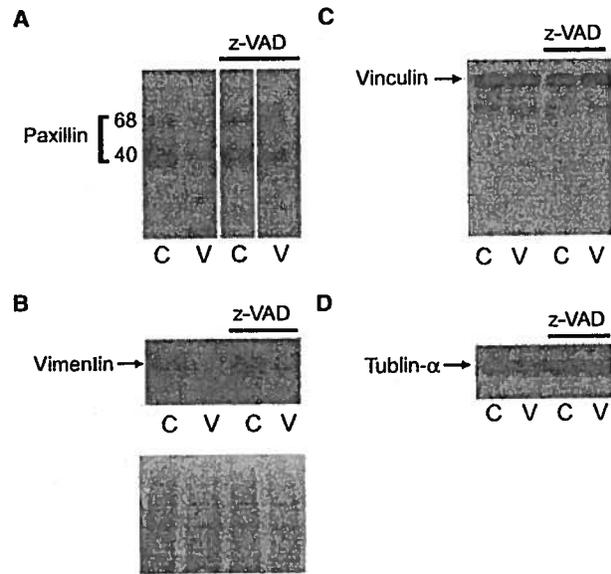


Fig 4. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces the degradation of paxillin and vimentin via caspases in AML14.3D10 cells. Cells were treated as described in the legend to Fig 3. in the presence of 0.1% dimethyl sulphoxide (C) or VAA-I (V) and potential degradation of paxillin (A), vimentin (B), vinculin (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,

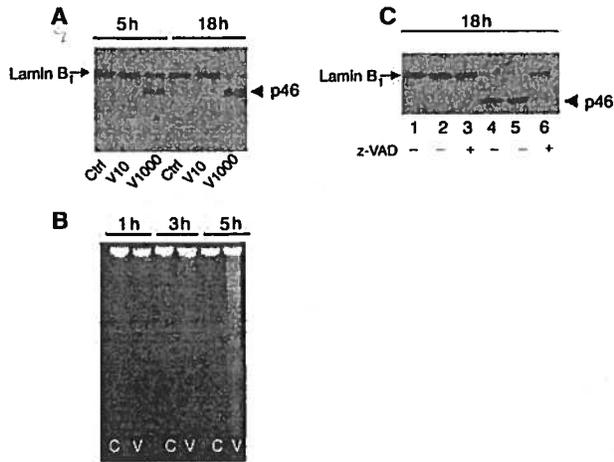


Fig 5. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces the degradation of lamin B<sub>1</sub> in eosinophil AML14.3D10 (3D10) cells via caspases. (A) 3D10 cells were treated with 0 (Ctrl), 10 (V10) or 1000 (V1000) ng/ml VAA-I, lamin B<sub>1</sub> was monitored and DNA fragmentation was assessed (B) as described 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).

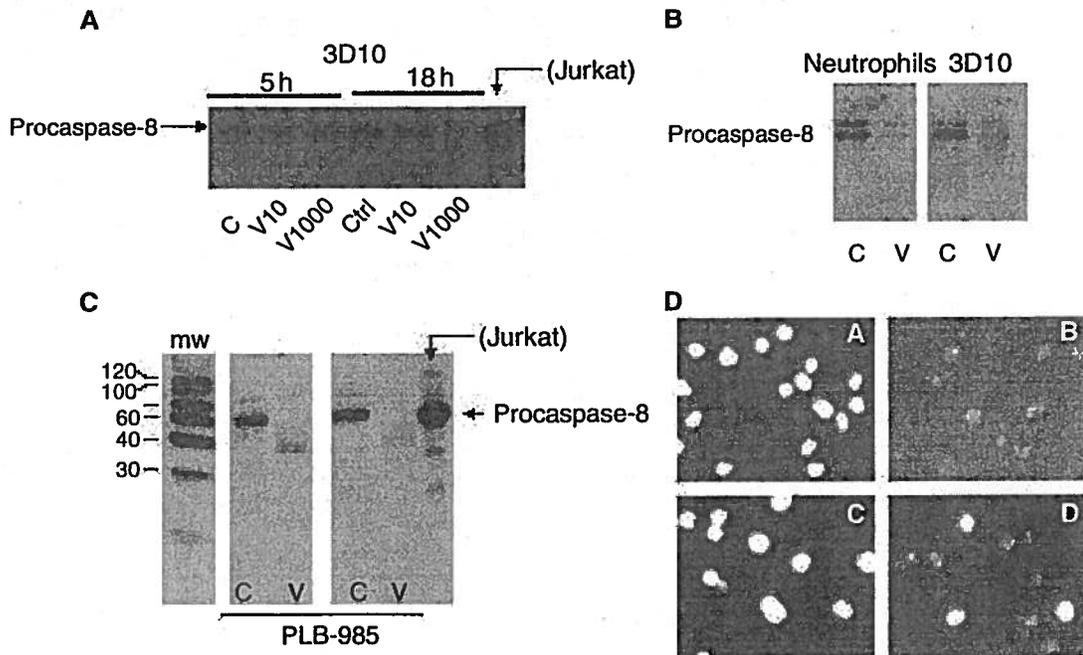


Fig 6. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces caspase-8 activation in AML14.3D10 (3D10) cells. 3D10 cells, neutrophils, or PLB-985 cells were incubated with buffer (C) or 1000 ng/ml VAA-I (V) if not specified and expression of procaspase-8 (A–C) was assessed as described in *Materials and methods*. 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.

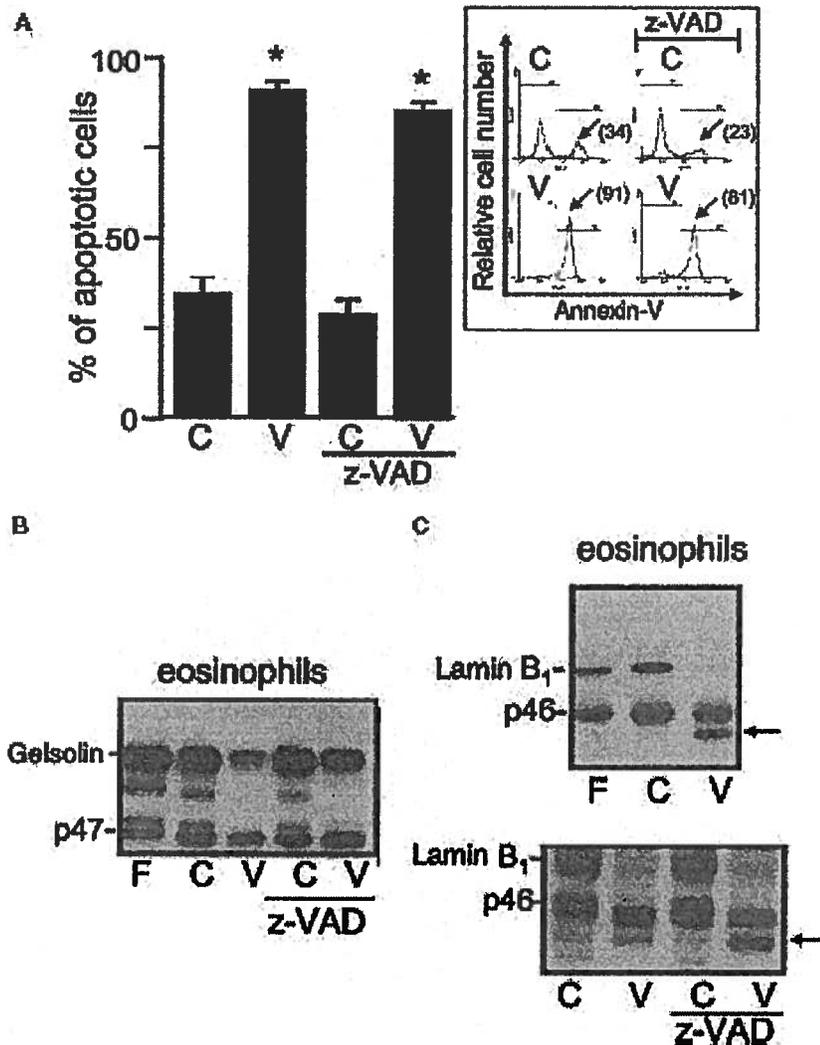


Fig 7. *Viscum album* agglutinin (VAA)-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human peripheral blood eosinophils. Eosinophils were isolated as described in *Materials and methods* and were treated for 24 h with VAA-I (V) or buffer (C) in the presence (+) or absence (-) of *N*-benzyloxycarbonyl-V-A-D-O-methylfluoromethyl 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. & Pommier, 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., Koths, 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.

## CONCLUSION

A l'égard des recherches et des essais cliniques effectuées sur la VAA-I, deux effets essentiels doivent être considérés dans cette thèse: les effets immunostimulateurs et les effets cytostatiques/apoptotiques. L'inhibition d'une réponse pro-inflammatoire par la VAA-I amène des perspectives cliniques intéressantes pour le futur. Les effets apoptotiques de la VAA-I sont d'un grand intérêt aussi et présentent de nouvelles stratégies pour moduler la balance entre la croissance cellulaire et la mort cellulaire programmée thérapeutique.

### *MODULATION DE L'APOPTOSE PAR LA VAA-I CHEZ LES NEUTROPHILES ACTIVES DANS UN CONTEXTE INFLAMMATOIRE*

La VAA-I est un inducteur d'apoptose très efficace chez plusieurs types cellulaires au repos. Jusqu'à maintenant, peu d'études se sont concentrées sur son effet à l'intérieur des cellules pré-activées ou en combinaison avec d'autres agents stimulants.

Récemment, notre équipe a étudié l'effet de la VAA-I sur des neutrophiles auxquels de l'IL-15 ou du GM-CSF y avait été ajouté simultanément à la VAA-I (1000 ng/mL) (Pelletier *et al*, 2001). La VAA-I avait conséquemment modulé la réponse des neutrophiles habituellement induite par ces cytokines. La VAA-I inhibait les effets stimulateurs engendrés par l'IL-15 comme la synthèse protéique *de novo*. De plus, la VAA-I, reconnue pour stimuler la phagocytose des globules rouges de moutons opsonisés de façon dose dépendante chez les neutrophiles, augmentait légèrement cet effet provoqué par l'IL-15. Finalement, les neutrophiles adoptaient des caractéristiques apoptotiques tel qu'une morphologie typique de l'apoptose ainsi que l'apparition de fragments de gelsoline en immunobuvardage.

Ces propriétés (inhibition de synthèse protéique, augmentation de phagocytose, induction d'apoptose) peuvent s'avérer intéressantes à exploiter lors de l'utilisation de la VAA-I à des fins thérapeutiques. En effet, l'IL-15, souvent présente en grande quantité dans le liquide synovial de patients arthritiques (McInnes et Liew, 1998 ; Thirkow *et al*, 1997), stimule la phagocytose des neutrophiles. Par contre, leur

présence accrue peut entraîner d'autres effets secondaires non désirables, comme une inflammation qui perdure et une possibilité d'endommager les tissus s'il y a mort par nécrose. L'inhibition de la synthèse protéique *de novo* par l'utilisation de la VAA-I qui n'affecte pas négativement leur capacité à phagocyter comporte un net avantage à utiliser l'IL-15 et la VAA-I en combinaison.

Également, l'utilisation de l'IL-15 dans le cas de cancer, comparativement au traitement avec l'IL-2, comporte l'avantage d'augmenter la phagocytose. Il a même été démontré que cette cytokine, utilisée en combinaison avec l'IL-12, pouvait augmenter les effets anti-tumoraux de cette dernière dans un modèle de souris (mélanome B16F10) (Lasek *et al*, 1999). De plus, des chercheurs ont démontré que l'IL-15 serait une meilleure candidate compte tenu du fait qu'elle stimule la réponse anti-tumorale suivant une transplantation de moelle osseuse avec une plus faible toxicité que l'IL-2 (Munger *et al*, 1995). Donc, l'utilisation en combinaison de l'IL-15 et de la VAA-I s'avère efficace dans le cadre d'une résolution saine et efficace de l'inflammation.

Le premier article présenté (Lavastre *et al*, 2004) dans cette étude nous démontre clairement que la VAA-I adopte des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* (figures 1 et 2), *ex vivo* (figure 3 et 4) et *in vivo* (figure 6). Ainsi, la VAA-I a la capacité de diminuer le recrutement cellulaire suite à une inflammation et de provoquer l'apoptose de certains neutrophiles murins activés (LPS) lorsqu'elle était administrée à une forte concentration. L'apoptose des neutrophiles humains activés a également été observée en présence de la VAA-I. Cette observation est comparable à son induction chez les cellules non stimulées. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait révélé de telles conclusions chez les neutrophiles humains.

Lors d'une inflammation, les cellules sont activées par plusieurs agents tels que les cytokines pro-inflammatoires et les microorganismes. Cette production retarde l'apoptose des cellules et ainsi fait perdurer l'inflammation. Suite à la récolte de surnageants de neutrophiles stimulés avec la VAA-I (1 et 10 ng/mL), nous avons analysé les liquides intracellulaires et extracellulaires (*in vitro*) et avons remarqué qu'elle n'engendrait pas la production de cytokines pro-inflammatoires (préférentiellement l'IL-1, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$ ) (tableau 1 de Lavastre *et al*, 2004).

Ceci, curieusement et contrairement à ce qui a été initialement rapporté chez d'autres types cellulaires tels les kératinocytes et les cellules mononucléées (Gorter *et al*, 2003 ; Ribereau-Gayon *et al*, 1996). Bien que cette étude est préliminaire, nos résultats suggèrent toutefois une avenue prometteuse. Sachant que l'élimination des neutrophiles présents dans un site inflammatoire peut conduire éventuellement vers une résolution de l'inflammation, une stratégie thérapeutique pourrait se traduire par l'administration locale d'un inducteur d'apoptose efficace qui n'induit pas la production de cytokines pro-inflammatoires. Suite aux résultats obtenus dans cette thèse, on devine très bien que la VAA-I se révèle un excellent candidat. Le développement d'une immunotoxine avec la VAA-I ciblant spécifiquement les neutrophiles dans un contexte inflammatoire pourrait attirer un vif intérêt médical ou biologique. L'immunotoxine pourrait être créée par la fusion entre la chaîne-A (cytotoxique) de la lectine et un anticorps spécifique aux neutrophiles. Cela augmenterait ainsi l'efficacité de l'immunotoxine envers ces granulocytes.

Les immunotoxines sont des molécules hybrides créées biochimiquement à partir d'une toxine (entière ou dépourvue de son domaine de liaison naturelle) et d'un anticorps monoclonal ou d'un facteur de croissance qui lie spécifiquement une cellule cible. La plupart des immunotoxines exercent leurs fonctions en inhibant enzymatiquement la synthèse protéique. L'efficacité surprenante des immunotoxines repose sur l'internalisation de la molécule et la translocation de la toxine dans le cytosol (Kreitman, 2006). D'ailleurs, des études ont déjà démontré l'efficacité de tels composés. Ces derniers, considérés comme une radioimmunothérapie, induisent des réponses chez des patients qui sont habituellement résistants aux traitements d'anticorps monoclonaux. Une immunotoxine fut créée à partir de la fusion d'une partie tronquée de l'étoxine de *Pseudomonas* (PE) et d'un fragment reconnaissant l'antigène de Lewis qui est exprimé chez plusieurs cellules épithéliales associées à des cancers du colon et du sein. La PE est une toxine qui catalyse l'ADP-ribosylation et qui inactive le facteur d'élongation-2. Tout comme la VAA-I, elle arrête toute synthèse protéique. L'immunotoxine induit l'apoptose des cellules cancéreuses via un mécanisme impliquant les caspases (principalement la famille des caspases effectrices) et produit également le clivage de plusieurs protéines, dont la PARP (Keppler-Hafkemeyer, Brinkmann et Pastan, 1998).

Des recherches cliniques antérieures ont d'ailleurs présenté des résultats très prometteurs concernant l'activité antitumorale de cette immunotoxine chez des patients atteints de ces deux types de cancer (Pai *et al*, 1996). Les chercheurs ont testé l'immunotoxine sur 38 patients atteints de tumeurs solides (et exprimant l'antigène de Lewis) et dont les thérapies conventionnelles n'avaient pas révélé les effets escomptés. De ces patientes atteintes du cancer du sein, cinq ont obtenu des effets bénéfiques face à leur cancer, 18 autres ont observé une certaine stabilité et malheureusement 15 autres ont vu leur cancer progresser. Une rémission complète du cancer fut observée chez une des patientes. Les patients atteints du cancer du colon ont observé une réduction de la tumeur à plus de 75%.

Une autre toxine, appartenant à la même classe de RIP que la VAA-I, la ricine, a également fait l'objet d'une immunotoxine (Farah *et al*, 1998 ; Engert, Sausville et Vitetta, 1997 ; Frankel, Kreitman et Sausville, 2000 ; Tonevitsky *et al*, 1996). Les auteurs ont développé une immunotoxine suite à des tentatives infructueuses de traitement contre l'arthrite rhumatoïde avec l'anti-TNF- $\alpha$ . Même si cette cytokine pro-inflammatoire produite par les macrophages est une cytokine clé au cœur de l'arthrite, ils se sont rendus compte que le blocage d'une seule fonction du macrophage chez ces patients n'était pas suffisant pour contrôler la maladie. Ils se sont donc tournés vers l'utilisation d'une immunotoxine. Ils ont réussi à cibler les macrophages grâce à l'anti-CD64. Le nombre de CD-64 présents à la surface des macrophages est grandement augmenté dans un contexte inflammatoire. Un anticorps ciblant le CD64 élimine spécifiquement les macrophages activés. Les auteurs ont lié chimiquement un anti-CD64 à la chaîne A de la ricine (la chaîne cytotoxique) suite à une séparation et une purification de la lectine complète. Ils ont effectué les analyses dans le liquide synovial de patients arthritiques et ils ont remarqué *in vitro* une diminution du nombre total de cellules CD64 positives. Par la suite, afin de vérifier l'efficacité de leur immunotoxine *in vivo*, ils ont utilisé un modèle de rats transgéniques pour le CD64 humain qui mimait la pathologie. Ils ont aussi remarqué une baisse notable de macrophages (Van Vuuren *et al*, 2006).

Malheureusement, les études prometteuses de l'immunotoxine ont été tôt fait d'être assombries par l'apparition de plusieurs effets secondaires : une toxicité élevée, un syndrome de faiblesse vasculaire (défini comme une hypoalbuminémie), un gain de

poids et dans les cas les plus sévères un œdème pulmonaire ainsi qu'une hypotension (Amlot *et al*, 1993 ; Stone *et al*, 1996). Fort heureusement, des chercheurs qui se sont penchés sur ce problème ont conclu que la mutation de trois acides aminés présents à l'intérieur d'une certaine portion commune au RIP pouvait grandement diminuer ces effets non désirables, notamment la faiblesse vasculaire (Smallshaw *et al*, 2003). La VAA-I, étant moins toxique que la ricine, semble encore présenter un excellent potentiel.

La dualité fonctionnelle (immunostimulatrice et immunocytotoxique) de la VAA-I demeure un net avantage par rapport aux inhibiteurs classiques de synthèse protéique (actinomycine D, antibiotiques (cycloheximide), toxines). Tel que mentionné plus haut, contrairement à ces inhibiteurs, la VAA-I peut influencer la phagocytose ainsi que la production en cytokines de diverses cellules, fonctions étonnantes pour un inhibiteur de synthèse protéique. Les inhibiteurs classiques bloquent principalement des étapes spécifiques comprises dans la conversion de l'ADN en protéines : interruption de la chaîne d'élongation peptidique, blocage du site A dans le ribosome, erreurs de lecture dans le code génétique et prévention de l'attachement des chaînes d'oligosaccharides aux glycoprotéines. Ainsi, ils sont principalement efficaces pour délimiter le rôle du contrôle transcriptionnel/translationnel dans la régulation de l'expression de gènes cibles à l'intérieur de certaines maladies, pour étudier la synchronisation du cycle cellulaire ou pour éliminer spécifiquement les infections bactériennes (streptomycine, tétracycline, etc.) (Hash, 1972).

#### ***PROFIL INTRACELLULAIRE D'INDUCTION D'APOPTOSE PAR LA VAA-I CHEZ LES LIGNEES PROMYELOCYTAIRES ET LES GRANULOCYTES***

La résolution de l'inflammation s'effectue principalement par l'élimination du stimulus inflammatoire, la diminution des médiateurs pro-inflammatoires et la réduction en nombre des leucocytes impliqués dans la réponse inflammatoire. Cette élimination de cellules se fait via l'induction de l'apoptose (Serhan et Savill, 2005).

La VAA-I induit l'apoptose chez bon nombre de cellules différenciées ainsi que chez des lignées cellulaires. Les trois derniers articles présentés dans cette thèse (Lavastre *et al*, 2005b ; Lavastre *et al*, 2007 et Lavastre *et al*, 2005a) reposent sur des

expériences qui évaluent le potentiel apoptotique de la VAA-I chez les lignées promyélocytaires leucémiques (PLB-985 et X-CGD), la lignée cellulaire 3D10 (phénotype éosinophilique), les éosinophiles et les neutrophiles. Dans tous les cas, cette induction d'apoptose repose sur un mécanisme hautement régulé qui implique les caspases et qui est indépendant de la production en radicaux libres. La dépendance des caspases est facilement observable par l'inhibition marquée de l'état apoptotique des cellules par l'inhibiteur général des caspases, la zVAD. Le démantèlement du cytosquelette se déroule généralement de façon très similaire entre les cellules étudiées. Ainsi, plusieurs protéines sont clivées comme la gelsoline, la lamine B<sub>1</sub>, la NMHC-IIA, la vimentine et la paxilline tandis que la vinculine et la tubuline ne le sont jamais. L'utilisation des deux lignées cellulaires (PLB-985 et X-CGD) suggère que la production de radicaux libres n'est pas essentielle à leur dégradation puisqu'elles étaient dégradées de façon similaire dans ces deux types de cellules. De plus, le fait que la VAA-I puisse induire l'apoptose chez des cellules différenciées et matures (PLB-D (Lavastre *et al*, 2007), éosinophiles (Lavastre *et al*, 2005a) et neutrophiles (Savoie *et al*, 2000)) nous démontre que l'induction d'apoptose ne peut être reliée à un arrêt du cycle cellulaire, suggérant que des mécanismes différents peuvent être impliqués dans les lignées cellulaires et les cellules circulantes.

Bien que la lamine B<sub>1</sub> soit dégradée chez certaines lignées leucémiques apoptotiques, ces trois articles sont les premiers à révéler une telle dégradation chez les PLB, les 3D10, les éosinophiles et les neutrophiles suite à l'action de la VAA-I. De plus, cette dégradation a lieu très tôt dans le processus apoptotique comparativement aux autres protéines dégradées. Cette dégradation coïncide astucieusement avec la fragmentation de l'ADN. La fragmentation de l'enveloppe nucléaire facilite l'action des endonucléases et permet également le détachement de la chromatine à des endroits spécifiques (Atencia, Asumendi et Garcia-Sanz, 2000). La lamine B<sub>1</sub> s'avère un marqueur précoce d'apoptose chez ces cellules.

La tubuline ainsi que la vinculine sont résistantes à cette dégradation. Ces deux dernières protéines échappent donc à l'action de toutes protéases qui peuvent être activées lors de l'apoptose. En fait, il est possible que lorsque la cellule est en apoptose, le site de clivage soit inaccessible ou encore masqué par un mécanisme qui nous soit encore inconnu.

La fragmentation de la NMHC-IIA quant à elle, a été observée chez des cellules endothéliales apoptotiques bovines dont l'apoptose avait été induite par le TNF- $\alpha$  ainsi que la cycloheximide (Suarez-Huerta *et al*, 2000). Dans notre étude, le clivage de la NMHC-IIA par la VAA-I fut observé pour la première fois et apparemment sous le contrôle des caspases. De plus, nous supposons que d'autres protéases seraient impliquées dans sa dégradation puisque l'ajout de l'inhibiteur de caspases zVAD ne permettait pas de maintenir cette protéine à son niveau basal.

Des maladies autosomales dominantes (maladie de May-Hegglin, syndrome de *Sebastian* et syndrome d'Epstein) associées à des mutations du gène MYH9 encodant pour la NMHC-IIA désorganisent les microtubules. Les patients atteints de ces maladies présentent une macrothrombopénie ainsi que des inclusions bleutées ressemblant aux corps plaquettaires dans les neutrophiles, les éosinophiles, les lymphocytes et les monocytes (Kunishima *et al*, 2003). Des analyses d'immunofluorescence sur la NMHC-IIA des neutrophiles ont d'ailleurs démontré l'utilité de cette protéine dans des études de criblage pour identifier les désordres associés au gène MYH9. Sachant que cette protéine est dégradée dans les neutrophiles apoptotiques, il serait intéressant d'investiguer sur le rôle potentiel de cette protéine chez les neutrophiles de ces patients.

Les caspases sont des médiateurs cruciaux dans l'apoptose qui clivent différents substrats. Dans ces trois études, il est clairement établi que l'induction d'apoptose par la VAA-I est tout à fait dépendante des caspases. Cependant, des chercheurs ont démontré que d'autres protéases (autre que les caspases) peuvent être impliquées dans ce processus (Borner et Monney, 1999 ; McCarthy *et al*, 1997). Cela pourrait expliquer les réponses différentes face aux divers inhibiteurs étudiés. Ainsi, puisque le neutrophile ne possède pas la caspase-2, la dégradation des protéines étudiées est donc indépendante de cette caspase. Par contre, l'utilisation de l'inhibiteur de caspase-2 chez les autres types cellulaires pourrait possiblement confirmer cette affirmation.

Des études ont démontré que le substrat principal de la caspase-6 était la lamine (Okinaga *et al*, 2007 ; Lee *et al*, 2006 ; Broers *et al*, 2002). L'ajout de l'inhibiteur spécifique de la caspase-6 (z-VEID) chez les PLB-985 nous confirme cette

affirmation (Lavastre *et al*, 2005b). En effet, cet inhibiteur et l'inhibiteur général de caspases, z-VAD, permettent de protéger cette dégradation. Fait intéressant, l'inhibiteur de cystéines protéases (notamment la cathepsine B), zFA, n'inhibe que très partiellement cette dégradation. Une enquête plus approfondie sur cet inhibiteur pourrait possiblement nous renseigner sur le rôle des cystéines protéases à l'intérieur des cellules étudiées. D'un autre côté, l'inhibiteur de caspase-8 ne freinait ni la dégradation de la lamine B1, ni celle de la vimentine. Cela suggère ici l'indépendance de la fragmentation de ces protéines et l'activation de cette caspase.

Sachant que la VAA-I induit l'apoptose chez les neutrophiles ainsi que sur les lignées leucémiques apparentées, nous avons enquêté sur la possibilité qu'elle l'induisse similairement chez les éosinophiles ainsi que chez les 3D10 (Lavastre *et al*, 2005a). En effet, la totalité des cellules étaient apoptotiques suite au traitement avec la VAA-I et ce via l'observation de l'échelle d'ADN, le marquage des cellules apoptotiques par le colorant d'ADN Hoescht ou encore par l'annexine-V. Les effets pro-apoptotiques de la VAA-I sur le démantèlement du cytosquelette ne sont pas uniquement restreints aux neutrophiles puisque le même profil est apparent chez les éosinophiles et les 3D10.

Fait intéressant, la zVAD n'a pu renverser l'apoptose des éosinophiles induite par la VAA-I (Figure 7, Lavastre *et al*, 2005a). En effet, suite au marquage avec l'annexine-V, pratiquement toutes les cellules étaient virtuellement en apoptose et ce malgré l'incubation des cellules avec l'inhibiteur précédemment à la VAA-I. De plus, le démantèlement de la gelsoline et de la lamine B<sub>1</sub> n'était pas protégé. Ces observations nous indiquent que l'apoptose par la VAA-I chez les éosinophiles serait sous l'influence d'autres protéases. Par contre ces observations ne purent être observées chez les 3D10. De ce fait, les éosinophiles et les 3D10 diffèrent dans le profil enzymatique actif, du moins lors de leur apoptose par la VAA-I.

En conclusion, cette thèse démontre hors de tout doute que la VAA-I est un puissant inducteur d'apoptose chez les granulocytes au repos et activés. De plus, à l'exception des éosinophiles, cette induction est principalement sous le contrôle des caspases.

Des concentrations élevées de VAA-I peuvent suggérer de nouvelles perspectives afin de moduler la balance entre l'activation cellulaire et la mort cellulaire thérapeutique. L'inhibition des réponses pro-inflammatoires par la VAA-I peut procurer de bonnes perspectives cliniques dans le futur. D'autres expériences seraient essentielles afin de documenter les effets bénéfiques de la lectine pendant le traitement des maladies où la mort cellulaire programmée est défectueuse. Ainsi, des expériences sur la capacité de la VAA-I à inhiber la synthèse de cytokines pro-inflammatoires chez les cellules des patients cancéreux ou arthritiques et d'autres sur l'utilisation d'une immunotoxine créée à partir de la VAA-I seraient nécessaire afin de mesurer notamment le pouvoir de déplétion face aux neutrophiles.

## CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Cette étude démontre pour la première fois que la VAA-I (1000 ng/mL) induit l'apoptose des neutrophiles humains activés et des neutrophiles murins issus d'un foyer inflammatoire (modèle de la poche d'air). Qui plus est, la concentration induisant l'apoptose chez ces cellules n'entraîne pas d'effets pro-inflammatoires *in vivo* et contribue à la résolution de l'inflammation aiguë induite par le LPS. Ces résultats prometteurs suggèrent que des études plus sérieuses et encadrées doivent être réalisées sur la VAA-I dans un tel contexte afin de contrer certaines lacunes observées dans les études cliniques réalisées à ce jour.

De plus, cette induction d'apoptose n'est pas seulement exclusive aux neutrophiles mais est clairement démontrée chez plusieurs types cellulaires. Cette thèse nous présente le puissant pouvoir apoptotique de la VAA-I chez les lignées leucémiques PLB-985, les X-CGD, les 3D10 ainsi que chez les éosinophiles. Pendant l'apoptose, un démantèlement des protéines du cytosquelette est observé. Plusieurs protéines, mais pas toutes, sont dégradées par les caspases. Ainsi, la lamine B<sub>1</sub> et la NMHC-IIA sont deux protéines nouvellement identifiées comme substrats des caspases activées par la VAA-I. De plus, les PLB-985 différenciées s'avèrent être un bon modèle pour étudier le comportement du neutrophile face à l'apoptose, plus spécifiquement concernant le profil des protéines influencées par ce mécanisme. Contrairement aux 3D10 qui possèdent certaines différences avec leurs cellules associées, soit les éosinophiles. En effet, les éosinophiles démontrent un comportement différent face aux inhibiteurs de caspases par rapport à la lignée cellulaire. Tout porte à croire que d'autres protéases, autres que celles inhibées par la zVAD, seraient impliquées dans l'apoptose induite par la VAA-I chez les éosinophiles. Ces résultats démontrent et confirment le profil apoptotique généralisé de la VAA-I envers une multitude de cellules.

En résumé, les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* qui sont présentés dans cette thèse nous permettent d'établir des débouchés afin de développer des thérapies avec la VAA-I ou encore d'améliorer des stratégies thérapeutiques déjà existantes.

## RÉFÉRENCES

- ABBAS, A. K., A. H. Lichtman et J. S. Pober. 1997. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Pennsylvania, 494 p.
- ABRAMSON J. S. Et Wheeler J. G. 1993. The Natural Immune System: The Neutrophil. New York: IRL Press, 306 p.
- AGAPOV, I. I., A. G. Tonevitsky, M. M. Moysenovich, N. V. Maluchenko, R. Weyhenmeyer et M. P. Kirpichnikov. 1999. "Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm". FEBS Letters, vol. 452, p. 211-4.
- AKGUL, C., D. A. Moulding et S. W. Edwards. 2001. "Molecular control of neutrophil apoptosis". FEBS Letters, vol. 487, p. 318-22.
- AMANN, R., R. Schuligoi, I. Lanz et J. Donnerer. 1995. "Histamine-induced edema in the rat paw--effect of capsaicin denervation and a CGRP receptor antagonist". European Journal of Pharmacology, vol. 279, p. 227-31.
- AMLOT, P. L., M. J. Stone, D. Cunningham, J. Fay, J. Newman, R. Collins, R. May, M. McCarthy, J. Richardson, V. Ghete et a. l. et. 1993. "A phase I study of an anti-CD22-deglycosylated ricin A chain immunotoxin in the treatment of B-cell lymphomas resistant to conventional therapy". Blood, vol. 82, p. 2624-33.
- ANDERSON D. C., T. K. Kishimoto, C. W. Smith, C. R. Scriver, A. L. Beaudet, A. L. Sly et D. Valle. 1997. "Leukocyte adhesion deficiency and other disorders of leukocyte adherence and motility". The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, vol. III, McGraw-Hill, Inc. New-York, p. 3955-94.
- ARNAOUT, M. A., M. Michishita, S. Gupta et C. Griselli. 1993. "Genetic Abnormalities in Leukocyte Adhesion Molecule Deficiency". New concepts in immunodeficiency diseases, Chichester, West Sussex: John Wiley, USA, p.191-202.
- ASHKENAZI, A. et V. M. Dixit. 1998. "Death receptors: signaling and modulation". Science, vol. 281, p. 1305-8.
- ASSARI, T. 2006. "Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD". Medical Immunology, vol. 5, p. 4.
- ATENCIA, R., A. Asumendi et M. Garcia-Sanz. 2000. "Role of cytoskeleton in apoptosis". Vitamins and Hormones, vol. 58, p. 267-97.
- AUGUSTIN, M., P. R. Bock, J. Hanisch, M. Karasmann et B. Schneider. 2005. "Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to high-risk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland". Arzneimittel-Forschung, vol. 55, p. 38-49.

- BANTEL, H., I. H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff et S. Wesselborg. 1999. "Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis". Cancer Research, vol. 59, p. 2083-90.
- BARBIERI, L., M. G. Battelli et F. Stirpe. 1993. "Ribosome-inactivating proteins from plants". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1154, p. 237-82.
- BARRY, M. et R. C. Bleackley. 2002. "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death". Nature Reviews Immunology, vol. 2, p. 401-9.
- BEDNER, E., X. Li, W. Gorczyca, M. R. Melamed et Z. Darzynkiewicz. 1999. "Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry". Cytometry, vol. 35, p. 181-95.
- BESSHO, R., K. Matsubara, M. Kubota, K. Kuwakado, H. Hirota, Y. Wakazono, Y. W. Lin, A. Okuda, M. Kawai, R. Nishikomori et a. l. et. 1994. "Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes". Biochemical Pharmacology, vol. 48, p. 1883-9.
- BEUTH, J., H. L. Ko, H. J. Gabius, H. Burchter, K. Oette et G. Pulverer. 1992. "Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients". Clinical Investigator, vol. 70, p. 658-61.
- BHALLA, K. N. 2003. "Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis". Oncogene, vol. 22, p. 9075-86.
- BINET, F., S. Chiasson et D. Girard. 2007. "Arsenic trioxide induces de novo protein synthesis of annexin-1 in neutrophils: association with a heat shock-like response and not apoptosis". British Journal of Haematology, vol.
- BOATRIGT, K. M. et G. S. Salvesen. 2003. "Mechanisms of caspase activation". Current Opinion in Cell Biology, vol. 15, p. 725-31.
- BOILARD, E., S. G. Bourgoin, C. Bernatchez et M. E. Surette. 2003. "Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A2". Blood, vol. 102, p. 2901-9.
- BORNER, C. et L. Monney. 1999. "Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine?". Cell Death and Differentiation, vol. 6, p. 497-507.
- BORREGAARD, N. 1997. "Development of neutrophil granule diversity". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 832, p. 62-8.
- BLAYLOCK, M. G., B. H. Cuthbertson, H. F. Galley, N. R. Ferguson et N. R. Webster. 1998. "The effect of nitric oxide and peroxynitrite on apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes". Free Radical Biology and Medicine, vol. 25, p. 748-52.

- BROERS, J. L., N. M. Bronnenberg, H. J. Kuijpers, B. Schutte, C. J. Hutchison et F. C. Ramaekers. 2002. "Partial cleavage of A-type lamins concurs with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis". European Journal of Cell Biology, vol. 81, p. 677-91.
- BROWN, S. B., K. Bailey et J. Savill. 1997. "Actin is cleaved during constitutive apoptosis". Biochemical Journal, vol. 323 ( Pt 1), p. 233-7.
- BRUNNER, T., C. Wasem, R. Torgler, I. Cima, S. Jakob et N. Corazza. 2003. "Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology". Seminars in Immunology, vol. 15, p. 167-76.
- BUDIARDJO, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo et X. Wang. 1999. "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis". Annual Review of Cell and Developmental Biology, vol. 15, p. 269-90.
- BURG, N. D. et M. H. Pillinger. 2001. "The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity". Clinical Immunology, vol. 99, p. 7-17.
- BUSSING, A. 1996. "Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: A review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L.". Apoptosis, vol. 1, p.25-32.
- BUSSING, A., G. Schaller et U. Pfüller. 1998. "Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L". Anticancer Research, vol. 18, p. 4291-6.
- BUSSING, A., W. Troger, C. Stumpf et M. Schietzel. 2008. "Local reactions to treatments with *Viscum album* L. extracts and their association with T-lymphocyte subsets and quality of life". Anticancer Research, vol. 28, p. 1893-7.
- CASSATELLA, M. A. 1995. "The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils". Immunology Today, vol. 16, p. 21-6.
- CASSATELLA, M. A. et P. P. McDonald. 2000. "Interleukin-15 and its impact on neutrophil function". Current Opinion in Hematology, vol. 7, p. 174-7.
- COHEN, G. M. 1997. "Caspases: the executioners of apoptosis". Biochemical Journal, vol. 326 ( Pt 1), p. 1-16.
- COLVILLE-NASH, P. et T. Lawrence. 2003. "Air-pouch models of inflammation and modifications for the study of granuloma-mediated cartilage degradation". Methods in Molecular Biology, vol. 225, p. 181-9.
- COUSIN, J. M., C. Haslett et A. G. Rossi. 1997. "Regulation of granulocyte apoptosis by PKC inhibition and elevation of". Biochemical Society Transactions, vol. 25, p. 243S.
- COX, G. 1995. "Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes". Journal of Immunology, vol. 154, p. 4719-25.

COX, D. P. et D. R. Weathers. 2008. "Leukocyte adhesion deficiency type 1: an important consideration in the clinical differential diagnosis of prepubertal periodontitis. A case report and review of the literature". Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, vol. 105, p. 86-90.

DAIGLE, I. et H. U. Simon. 2001. "Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis". International Archives of Allergy and Immunology, vol. 126, p. 147-56.

DAMME, Els J. M. Van, W. Peumans, A. Barre et P. Rougé. 1998. "Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles". Critical Reviews in Plant Sciences, vol. 17, p. 575-692.

DEJANA, E. 2006. "The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis". Nature Cell Biology, vol. 8, p. 105-7.

DEWSON, G., G. M. Cohen et A. J. Wardlaw. 2001. "Interleukin-5 inhibits translocation of Bax to the mitochondria, cytochrome c release, and activation of caspases in human eosinophils". Blood, vol. 98, p. 2239-47.

DIBBERT, B., M. Weber, W. H. Nikolaizik, P. Vogt, M. H. Schoni, K. Blaser et H. U. Simon. 1999. "Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, p. 13330-5.

DODD, R. B. et K. Drickamer. 2001. "Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity". Glycobiology, vol. 11, p. 71R-9R.

DONEPUDI, M. et M. G. Grütter. 2002. "Structure and zymogen activation of caspases". Biophysical Chemistry, vol. 101-102, p. 145-53.

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

EDWARDS, J. C., A. D. Sedgwick et D. A. Willoughby. 1981. "The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system". Journal of Pathology, vol. 134, p. 147-56.

ELMORE, S. 2007. "Apoptosis: a review of programmed cell death". Toxicologic Pathology, vol. 35, p. 495-516.

ELSASSER-BEILE, U., S. Lusebrink, T. Grussenmeyer, U. Wetterauer et W. Schultze-Seemann. 1998. "Comparison of the effects of various clinically applied mistletoe preparations on peripheral blood leukocytes". Arzneimittel-Forschung, vol. 48, p. 1185-9.

ENDO, Y., K. Tsurugi et H. Franz. 1988. "The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein". FEBS Letters, vol. 231, p. 378-80.

- ENGERT, A., E. A. Sausville et E. Vitetta. 1998. "The emerging role of ricin A-chain immunotoxins in leukemia and lymphoma". Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 234, p. 13-33.
- ESTEVE, M. A., M. Carré et D. Braguer. 2007. "Microtubules in apoptosis induction: are they necessary?". Current Cancer Drug Targets, vol. 7, p. 713-29.
- EVANS, D. P., M. Hossack et D. S. Thomson. 1971. "Inhibition of contact sensitivity in the mouse by topical application of corticosteroids". British Journal of Pharmacology, vol. 43, p. 403-8.
- FARAH, R. A., B. Clinchy, L. Herrera et E. S. Vitetta. 1998. "The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer". Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, vol. 8, p. 321-56.
- FRANKEL, A. E., R. J. Kreitman et E. A. Sausville. 2000. "Targeted toxins". Clinical Cancer Research, vol. 6, p. 326-34.
- FAURSCHOU, N. et Niels Borregaard. 2003. "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation". Microbes and Infection, vl. 5, p.1317-27.
- FRANZ, H. 1986. "Mistletoe lectins and their A and B chains". Oncology, vol. 43 Suppl 1, p. 23-34.
- FRANZ, H., P. Ziska et A. Kindt. 1981. "Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.)". Biochemical Journal, vol. 195, p. 481-4.
- FUCHS, E. et K. Weber. 1994. "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease". Annual Review of Biochemistry, vol. 63, p. 345-82.
- GABIUS, H. J. 2001. "Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1". Biochimie, vol. 83, p. 659-66.
- GABIUS, H. J., F. Darro, M. Remmelink, S. Andre, J. Kopitz, A. Danguy, S. Gabius, I. Salmon et R. Kiss. 2001. "Evidence for stimulation of tumor proliferation in cell lines and histotypic cultures by clinically relevant low doses of the galactoside-binding mistletoe lectin, a component of proprietary extracts". Cancer Investigation, vol. 19, p. 114-26.
- GALOU, M., J. Gao, J. Humbert, M. Mericskay, Z. Li, D. Paulin et P. Vicart. 1997. "The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies". Biologie Cellulaire, vol. 89, p. 85-97.
- GARCIA-CALVO, M., E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholson et N. A. Thornberry. 1998. "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 32608-13.
- GOLDSTEIN, S. A., L. Shemano, R. Daweo et J. Betler. 1976. "Cotton pellet granuloma pouch method for evaluation of anti-inflammatory activity". Archives of Pharmacodynamic Therapy, vol. 165, p. 294-301.

- GOLDSTEIN, J. C., N. J. Waterhouse, P. Juin, G. I. Evan et D. R. Green. 2000. "The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant". Nature Cell Biology, vol. 2, p. 156-62.
- GORTER, R. W., P. Joller et M. Stoss. 2003. "Cytokine release of a keratinocyte model after incubation with two different *Viscum album* L extracts". American Journal of Therapeutics, vol. 10, p. 40-7.
- GORTER, R. W., M. van Wely, M. Stoss et U. Wollina. 1998. "Subcutaneous infiltrates induced by injection of mistletoe extracts (Iscador)". American Journal of Therapeutics, vol. 5, p. 181-7.
- GOUGEROT-POCIDALO, M. –A. et L. Halbwachs-Mecarelli. 2005. "L'activation du polynucléaire neutrophile dans la synovite rhumatoïde". Revue du rhumatisme, vol. 72, p. 303-9.
- GRABAREK, J., P. Amstad et Z. Darzynkiewicz. 2002. "Use of fluorescently labeled caspase inhibitors as affinity labels to detect activated caspases". Human Cell, vol. 15, p. 1-12.
- GRAY, A. M. et P. R. Flatt. 1999. "Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe)". Journal of Endocrinology, vol. 160, p. 409-14.
- GRISWOLD, D. E., L. D. Martin, A. M. Badger, J. Breton et M. Chabot-Fletcher. 1998. "Evaluation of the cutaneous anti-inflammatory activity of azaspiranes". Inflammation Research, vol. 47, p. 56-61.
- GROSSARTH-MATICEK, R., H. Kiene, S. M. Baumgartner et R. Ziegler. 2001. "Use of Iscador, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study". Alternative Therapies in Health and Medicine, vol. 7, p. 57-66, 68-72, 74-6 passim.
- GROSSARTH-MATICEK, R. et R. Ziegler. 2008. "Randomized and non-randomized prospective controlled cohort studies in matched pair design for the long-term therapy of corpus uteri cancer patients with a mistletoe preparation (Iscador)". European Journal of Medical Research, vol. 13, p. 107-20.
- GURTU, V., S. R. Kain et G. Zhang. 1997. "Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis". Analytical Biochemistry, vol. 251, p. 98-102.
- HABECK, M. 2003. "Mistletoe compound enters clinical trials". Drug Discov Today, vol. 8, p. 52-3.
- HABECK, M. 2003. "Mistletoe compound enters clinical trials". Drug Discovery Today, vol. 8, p. 52-3.
- HAJTO, T. et K. Hostanska. 1985. "Effect of in vivo hyperthermia on human natural killer cells". Clinical Trials Journal, vol. 22, p.514-20.

- HAJTO, T., K. Hostanska, T. Berki, L. Palinkas, F. Boldizsar et P. Nemeth. 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, K. Frei, C. Rordorf et H. J. Gabius. 1990. "Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract". Cancer Research, vol. 50, p. 3322-6.
- 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. 4803-8.
- HAJTO, T., K. Hostanska, K. Weber, H. Zinke, J. Fischer, U. Mengers, H. Lentzen et R. Saller. 1998. "Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo". Natural Immunity, vol. 16, p. 34-46.
- HALLETT, J. M., A. E. Leitch, N. A. Riley, R. Duffin, C. Haslett et A. G. Rossi. 2008. "Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 29, p. 250-7.
- HALLSWORTH, M. P., M. A. Gienbycz, P. J. Barnes et T. H. Lee. 1996. "Cyclic AMP-elevating agents prolong or inhibit eosinophil survival depending on prior exposure to GM-CSF". British Journal of Pharmacology, vol. 117, p. 79-86.
- HANNAH, S., K. Mecklenburgh, I. Rahman, G. J. Bellingan, A. Greening, C. Haslett et E. R. Chilvers. 1995. "Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro". FEBS Letters, vol. 372, p. 233-7.
- HARTMAN, K. R., M. K. Mallet, J. Nath et D. G. Wright. 1990. "Antibodies to actin in autoimmune neutropenia". Blood, vol. 75, p. 736-43.
- HASH, J. H. 1972. "Antibiotic mechanisms". Annual Review Pharmacology, vol. 12, p. 35-56.
- HAYNES, D. R. 2007. "Inflammatory cells and bone loss in rheumatoid arthritis". Arthritis Research and Therapy, vol. 9, p. 104.
- HENGARTNER, M. O. 2000. "The biochemistry of apoptosis". Nature, vol. 407, p. 770-6.
- HENSON, P. M. 2005. "Dampening inflammation". Nature Immunology, vol. 6, p. 1179-81.

- HIRAOKA, W., N. Vazquez, W. Nieves-Neira, S. J. Chanock et Y. Pommier. 1998. "Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells". Journal of Clinical Investigation, vol. 102, p. 1961-8.
- HOFMANN, W. K., S. de Vos, K. Tsukasaki, W. Wachsman, G. S. Pinkus, J. W. Said et H. P. Koeffler. 2001. "Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray". Blood, vol. 98, p. 787-94.
- HOGG, N., R. Henderson, B. Leitinger, A. McDowall, J. Porter et P. Stanley. 2002. "Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes". Immunological Reviews, vol. 186, p. 164-71.
- HOONTRAKOON, R., H. W. Chu, S. J. Gardai, S. E. Wenzel, P. McDonald, V. A. Fadok, P. M. Henson et D. L. Bratton. 2002. "Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 26, p. 404-12.
- HORNEBER, M.A., G. Bueschel, R. Huber, K. Linde et M. Rostock. 2008. "Mistletoe therapy in oncology (Review) ". Cochrane Database System Review, vol. 2, CD003297.
- HOSTANSKA, K., T. Hajto, G. C. Spagnoli, J. Fischer, H. Lentzen et R. Herrmann. 1995. "A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells". Natural Immunity, vol. 14, p. 295-304.
- HOSTANSKA, K., T. Hajto, K. Weber, J. Fischer, H. Lentzen, B. Sutterlin et R. Saller. 1996-1997. "A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes". Natural Immunity, vol. 15, p. 295-311.
- HOSTANSKA, K., V. Vuong, S. Rocha, M. S. Soengas, C. Glanzmann, R. Saller, S. Bodis et M. Pruschy. 2003. "Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation". British Journal of Cancer, vol. 88, p. 1785-92.
- IWAI, K., T. Miyawaki, T. Takizawa, A. Konno, K. Ohta, A. Yachie, H. Seki et N. Taniguchi. 1994. "Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils". Blood, vol. 84, p. 1201-8.
- JUNPING K, N. Yun, N. Wang, L. Liang et H. Zhi-Hong. 2005. "Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal plants *Polyrhachis lamellidens*". Biological Pharmaceutical Bulletin, vol. 28, p. 176-80.
- KEPPLER-HAFKEMEYER, A., U. Brinkmann et I. Pastan. 1998. "Role of caspases in immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells". Biochemistry, vol. 37, p. 16934-42.

- KERR, J. F., A. H. Wyllie et A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". British Journal of Cancer, vol. 26, p. 239-57.
- KITSIS, E. et G. Weissmann. 1991. "The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis". Clinical Orthopaedics and Related Research, vol. 63-72.
- KIENLE, G. S., F. Berrino, A. Bussing, E. Portalupi, S. Rosenzweig et H. Kiene. 2003. "Mistletoe in cancer - a systematic review on controlled clinical trials". European Journal of Medical Research, vol. 8, p. 109-19.
- KIENLE, G. S. et H. Kiene. 2007. "Complementary cancer therapy: a systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts". European Journal of Medical Research, vol. 12, p. 103-19.
- KLEBINGAT, K. J. 1998. "Unkonventionelle - alternative Therapieverfahren in der palliativen urologischen Onkologie", Urologe, vol. 38, p. 249-51.
- KLEIJNEN, J. et P. Knipschild. 1994. "Mistletoe treatment for cancer. Review of controlled trials in humans", Phytomedicine, vol. 1, p. 255-260.
- KNOPFL-SIDLER, F., A. Viviani, L. Rist et A. Hensel. 2005. "Human cancer cells exhibit in vitro individual receptiveness towards different mistletoe extracts". Pharmazie, vol. 60, p. 448-54.
- KOVACS, E., T. Hajto et K. Hostanska. 1991. "Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscador)". European Journal of Cancer, vol. 27, p. 1672-6.
- KRAMMER, P. H. 1999. "CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die". Advances in Immunology, vol. 71, p. 163-210.
- 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. 418-24.
- KREITMAN, R. J. 2006. "Immunotoxins for targeted cancer therapy". AAPS J, vol. 8, p. E532-51.
- KUIDA, K., J. A. Lippke, G. Ku, M. W. Harding, D. J. Livingston, M. S. Su et R. A. Flavell. 1995. "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme". Science, vol. 267, p. 2000-3.
- KUNISHIMA, S., T. Matsushita, T. Kojima, M. Sako, F. Kimura, E. K. Jo, C. Inoue, T. Kamiya et H. Saito. 2003. "Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations". Laboratory Investigation, vol. 83, p. 115-22.

- KUNZE, E., H. Schulz, M. Adamek et H. –J. Gabius. 2000. "Long-term administration of galactoside-specific mistletoe lectin in an animal model: no protection against N - butyl-N -(4-hydroxybutyl)- nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats and no induction of a relevant local cellular immune response", Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, vol. 126, 125-38.
- KUNZE, E., H. Schulz et H. J. Gabius. 1998. "Inability of galactoside-specific mistletoe lectin to inhibit N-methyl-N-nitrosourea-induced tumor development in the urinary bladder of rats and to mediate a local cellular immune response after long-term administration". Journal of Cancer Research in Clinical Oncology, vol. 124, p. 73-87.
- KVIETYS, P. R. et M. Sandig. 2001. "Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular?". News in Physiological Sciences, vol. 16, p. 15-9.
- LASEK, W., J. Golab, W. Maslinski, T. Switaj, E. Z. Balkowiec, T. Stoklosa, A. Giermasz, M. Malejczyk et M. Jakobisiak. 1999. "Subtherapeutic doses of interleukin-15 augment the antitumor effect of interleukin-12 in a B16F10 melanoma model in mice". European Cytokine Network, vol. 10, p. 345-56.
- LASSUS, P., X. Opitz-Araya et Y. Lazebnik. 2002. "Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization". Science, vol. 297, p. 1352-4
- LAVASTRE, V. et D. Girard. 2002. "Tributyltin induces human neutrophil apoptosis and selective degradation of cytoskeletal proteins by caspases". Journal of Toxicology and Environmental Health A, vol. 65, p. 1013-24.
- LAVASTRE, V., F. Binet, E. Moisan, S. Chiasson et D. Girard. 2007. "Viscum album agglutinin-I induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases". British Journal of Haematology, vol. 138, p. 545-54
- LAVASTRE, V., H. Cavalli, C. Rathe et D. Girard. 2004. "Anti-inflammatory effect of Viscum album agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo". Clinical and Experimental Immunology, vol. 137, p. 272-8
- LAVASTRE, V., M. Pelletier, R. Saller, K. Hostanska et D. Girard. 2002a. "Mechanisms involved in spontaneous and Viscum album agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: Viscum album agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases". Journal of Immunology, vol. 168, p. 1419-27
- LAVASTRE, V., S. Chiasson, H. Cavalli et D. Girard. 2005a. "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". British Journal of Haematology, vol. 130, p. 527-35.

- LAVASTRE, V., S. Chiasson, H. Cavalli et D. Girard. 2005b. "Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I". Leukemia Research, vol. 29, p. 1443-53.
- LAVASTRE, V., C. J. Roberge, M. Pelletier, M. Gauthier et D. Girard. 2002b. "Toxaphene, but not beryllium, induces human neutrophil chemotaxis and apoptosis via reactive oxygen species (ROS): involvement of caspases and ROS in the degradation of cytoskeletal proteins". Clinical Immunology, vol. 104, p. 40-8.
- LAVELLE, E. C., G. Grant, A. Pusztai, U. Pfuller, O. Leavy, E. McNeela, K. H. Mills et D. T. O'Hagan. 2002. "Mistletoe lectins enhance immune responses to intranasally co-administered herpes simplex virus glycoprotein D2". Immunology, vol. 107, p. 268-74.
- LEE, R. T., H. J. Gabius et Y. C. Lee. 1994. "The sugar-combining area of the galactose-specific toxic lectin of mistletoe extends beyond the terminal sugar residue: comparison with a homologous toxic lectin, ricin". Carbohydrate Research, vol. 254, p. 269-76.
- LEE, S. C., J. Chan, M. V. Clement et S. Pervaiz. 2006. "Functional proteomics of resveratrol-induced colon cancer cell apoptosis: caspase-6-mediated cleavage of lamin A is a major signaling loop". Proteomics, vol. 6, p. 2386-94.
- LEGNANI, W. 2008. "Mistletoe in conventional oncological practice: exemplary cases". Integrative Cancer Therapies, vol. 7, p. 162-71.
- LEVERY, S. B. 2005. "Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics". Methods in Enzymology, vol. 405, p. 300-69.
- LIEBERMAN, J. 2003. "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal". Nature Reviews Immunology, vol. 3, p. 361-70.
- LIU, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel et M. Karin. 1996. "Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death". Cell, vol. 87, p. 565-76.
- LOS, M., S. Wesselborg et K. Schulze-Osthoff. 1999. "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice". Immunity, vol. 10, p. 629-39.
- LUSTER, A. D., R. Alon et U. H. von Andrian. 2005. "Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets". Nature Immunology, vol. 6, p. 1182-90.
- LUSTIK, M. 1975. "The antitumor activity of phythemagglutinin from *Viscum album* L. ". Doklady Academic Sciences, vol. 6, p.541-4.
- MALDACKER, J. 2006. "Preclinical investigations with mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador". Arzneimittel-Forschung, vol. 56, p. 497-507.

MARCEAU, N., B. Schutte, S. Gilbert, A. Loranger, M. E. Henfling, J. L. Broers, J. Mathew et F. C. Ramaekers. 2007. "Dual roles of intermediate filaments in apoptosis". Experimental Cell Research, vol. 313, p. 2265-81.

MARTINON, F. et J. Tschopp. 2007. "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation". Cell Death and Differentiation, vol. 14, p. 10-22.

MARTINVALET, D., P. Zhu et J. Lieberman. 2005. "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis". Immunity, vol. 22, p. 355-70.

MCCARTHY, N. J., M. K. Whyte, C. S. Gilbert et G. I. Evan. 1997. "Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak". Journal of Cell Biology, vol. 136, p. 215-27.

MCINNES, I. B. et F. Y. Liew. 1998. "Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis". Immunology Today, vol. 19, p. 75-9.

MEAGHER, L. C., J. M. Cousin, J. R. Seckl et C. Haslett. 1996. "Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes". Journal of Immunology, vol. 156, p. 4422-8.

MIKESKA, R., R. Wacker, R. Arni, T. P. Singh, A. Mikhailov, A. Gabdoulkhakov, W. Voelter et C. Betzel. 2005. "Mistletoe lectin I in complex with galactose and lactose reveals distinct sugar-binding properties". Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, vol. 61, p. 17-25.

MIN, D. Y., Y. A. Lee, J. S. Ryu, M. H. Ahn, Y. B. Chung, S. Sim et M. H. Shin. 2004. "Caspase-3-mediated apoptosis of human eosinophils by the tissue-invading helminth *Paragonimus westermani*". International Archives of Allergy and Immunology, vol. 133, p. 357-64.

MISAGHI, S., M. E. Pacold, D. Blom, H. L. Ploegh et G. A. Korbel. 2004. "Using a small molecule inhibitor of peptide: N-glycanase to probe its role in glycoprotein turnover". Chemistry and Biology, vol. 11, p. 1677-87.

MOISAN, E., E. Kouassi et D. Girard. 2003. "Mechanisms involved in methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced suppression of human neutrophil apoptosis". Human and Experimental Toxicology, vol. 22, p. 629-37.

MOISENOVICH, M. M., I. A. Demina, I. I. Agapov, O. V. Chelnokova, N. V. Kozlovska, J. Bereiter-Hahn, A. G. Tonevitsky et V. I. Shumakov. 2002. "Ricin and viscumin bind to different sites of the cell membrane". Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology, vol. 383, p. 175-8.

MOLLINEDO, F. et C. Gajate. 2003. "Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis". Apoptosis, vol. 8, p. 413-50.

MOR-VAKNIN, N., A. Punturieri, K. Sitwala et D. M. Markovitz. 2003. "Vimentin is secreted by activated macrophages". Nature Cell Biology, vol. 5, p. 59-63.

- MULLER, E. A. et F. A. Anderer. 1990. "A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon-gamma inducer". Cancer Immunology, Immunotherapy, vol. 32, p. 221-7.
- MUNGER, W., S. Q. DeJoy, R. Jeyaseelan Sr, L. W. Torley, K. H. Grabstein, J. Eisenmann, R. Paxton, T. Cox, M. M. Wick et S. S. Kerwar. 1995. "Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2". Cellular Immunology, vol. 165, p. 289-93.
- MURDOCK, L. L. et R. E. Shade. 2002. "Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects". Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 50, p. 6605-11.
- MURRAY, J., J. A. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. Van Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett et E. R. Chilvers. 1997. "Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro". Blood, vol. 90, p. 2772-83.
- MUTHING, J., I. Meisen, P. Bulau, M. Langer, K. Witthohn, H. Lentzen, U. Neumann et J. Peter-Katalinic. 2004. "Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac alpha 2-6Gal beta 1-4GlcNAc residues". Biochemistry, vol. 43, p. 2996-3007.
- NIEMINEN, M., T. Henttinen, M. Merinen, F. Marttila-Ichihara, J. E. Eriksson et S. Jalkanen. 2006. "Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration". Nature Cell Biology, vol. 8, p. 156-62.
- NIWA, H., A. G. Tonevitsky, I. I. Agapov, S. Saward, U. Pfeller et R. A. Palmer. 2003. "Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose". European Journal of Biochemistry, vol. 270, p. 2739-49.
- OGILVIE, B. M., P. W. Askenase et M. E. Rose. 1980. "Basophils and eosinophils in three strains of rats and in athymic (nude) rats following infection with the nematodes *Nippostrongylus brasiliensis* or *Trichinella spiralis*". Immunology, vol. 39, p. 385-9.
- OKINAGA, T., H. Kasai, T. Tsujisawa et T. Nishihara. 2007. "Role of caspases in cleavage of lamin A/C and PARP during apoptosis in macrophages infected with a periodontopathic bacterium". Journal of Medical Microbiology, vol. 56, p. 1399-404.
- OLSNES, S., F. Stirpe, K. Sandvig et A. Pihl. 1982. "Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)". Journal of Biological Chemistry, vol. 257, p. 13263-70.
- OZAKI, S. 2007. "ANCA-associated vasculitis: diagnostic and therapeutic strategy". Allergology International, vol. 56, p. 87-96.
- PAI, L. H., R. Wittes, A. Setser, M. C. Willingham et I. Pastan. 1996. "Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to *Pseudomonas* exotoxin". Nature Medicine, vol. 2, p. 350-3.

- PEDRUZZI, E., M. Fay, C. Elbim, M. Gaudry et M. A. Gougerot-Pocidalò. 2002. "Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". British Journal of Haematology, vol. 117, p. 719-26.
- PELLETIER, M., V. Lavastre, A. Savoie, C. Ratthe, R. Saller, K. Hostanska et D. Girard. 2001. "Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I". Clinical Immunology, vol. 101, p. 229-36.
- PETRI, B. et M. G. Bixel. 2006. "Molecular events during leukocyte diapedesis". FEBS Journal, vol. 273, p. 4399-407.
- PEUMANS, W. J. et E. J. Van Damme. 1995. "Lectins as plant defense proteins". Plant Physiology, vol. 109, p. 347-52.
- PEUMANS, W. J. et E. J. Van Damme. 1998. "Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans". Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 33, p. 209-58.
- PEUMANS, W. J., E. J. Van Damme, A. Barre et P. Rouge. 2001. "Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins". Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 491, p. 27-54.
- POUBELLE, P. E., A. Chakravarti, M. J. Fernandes, K. Doiron et A. A. Marceau. 2007. "Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils". Arthritis Research and Therapy, vol. 9, p. R25.
- PRESCOTT L, J. P. Harley et D. A. Klein. 1995. Microbiologie, Bruxelles; DeBoeck Université, 1014 p.
- PRYDE, J. G., A. Walker, A. G. Rossi, S. Hannah et C. Haslett. 2000. "Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 33574-84.
- PRYME, I. F., S. Bardocz, A. Pusztai et S. W. Ewen. 2006. "Suppression of growth of tumour cell lines in vitro and tumours in vivo by mistletoe lectins". Histology and Histopathology, vol. 21, p. 285-99.
- QIN, Y., S. Auh, L. Blokh, C. Long, I. Gagnon et K. J. Hamann. 2007. "TNF-alpha induces transient resistance to Fas-induced apoptosis in eosinophilic acute myeloid leukemia cells". Cellular and Molecular Immunology, vol. 4, p. 43-52.
- QUIOCHO, F. A. 1989. "Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features". Pure and Applied Chemistry, vol. 61, 1293-1306.

- RENSHAW, S. A., J. S. Parmar, V. Singleton, S. J. Rowe, D. H. Dockrell, S. K. Dower, C. D. Bingle, E. R. Chilvers et M. K. Whyte. 2003. "Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL". Journal of Immunology, vol. 170, p. 1027-33.
- RIBEREAU-GAYON, G., S. Dumont, C. Muller, M. L. Jung, P. Pointron et R. Anton. 1996. "Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes". Cancer Letters, vol. 109, p. 33-8.
- RINI, J. M. 1995. "Lectin structure". Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, vol. 24, p. 551-77.
- ROBERTUS, J. D. et M. P. Ready. 1984. "Ricin B chain and discoidin I share a common primitive protein fold". Journal of Biological Chemistry, vol. 259, p. 13953-6.
- ROGERS, K. R., C. J. Morris et D. R. Blake. 1992. "The cytoskeleton and its importance as a mediator of inflammation". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 51, p. 565-71.
- ROIT I. M., J. Brostoff et D.K. Male. 1994. Immunologie. Bruxelles : DeBoek Université, 406 p.
- ROMAY, C., N. Ledon et R. Gonzalez. 1998. "Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation". Inflammation Research, vol. 47, p. 334-8.
- ROSSI, A. G. et C. Haslett. 1997. "Inflammation, cell injury, and apoptosis". Lung biology in health and disease, vol. 112, p. 9-44.
- ROSSI, A. G., J. M. Cousin, I. Dransfield, M. F. Lawson, E. R. Chilvers et C. Haslett. 1995. "Agents that elevate cAMP inhibit human neutrophil apoptosis". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 217, p. 892-9.
- ROTHENBERG, M. E. et S. P. Hogan. 2006. "The eosinophil". Annual Review of Immunology, vol. 24, p. 147-74.
- RUDIGER, H. 1998. "Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins". Acta Anatomica, vol. 161, p. 130-52.
- RUSSELL, J. H. et T. J. Ley. 2002. "Lymphocyte-mediated cytotoxicity". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 323-70.
- SADOWSKI-DEBBING, K., J. F. Coy, W. Mier, H. Hug et M. Los. 2002. "Caspases--their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies". Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, vol. 50, p. 19-34.

- SANTOS-BENEIT, A. M. et F. Mollinedo. 2000. "Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells". Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, p. 712-24.
- SAVOIE, A., V. Lavastre, M. Pelletier, T. Hajto, K. Hostanska et D. Girard. 2000. "Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis". Journal of Leukocyte Biology, vol. 68, p. 845-53.
- SCHEEL-TOELLNER, D., K. Q. Wang, P. R. Webb, S. H. Wong, R. Craddock, L. K. Assi, M. Salmon et J. M. Lord. 2004. "Early events in spontaneous neutrophil apoptosis". Biochemical Society Transactions, vol. 32, p. 461-4.
- SEELY, A. J., J. L. Pascual et N. V. Christou. 2003. "Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance". Critical Care, vol. 7, p. 291-307.
- SELLERS, J. R. 2000. "Myosins: a diverse superfamily". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1496, p. 3-22.
- SELVARAJ, R. J. et A. J. Sbarra. 1966. "Relationship of glycolytic and oxidative metabolism to particle entry and destruction in phagocytosing cells". Nature, vol. 211, p. 1272-6.
- SELYE, H. 1953. "On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury; an experimental study with the granuloma pouch technique". Journal of the American Medical Association, vol. 152, p. 1207-13.
- SERHAN, C. N. et J. Savill. 2005. "Resolution of inflammation: the beginning programs the end". Nature Immunology, vol. 6, p. 1191-7.
- SIMON, H. U. 2001. "Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences". Immunological Reviews, vol. 179, p. 156-62.
- SMALLSHAW, J. E., V. Ghetie, J. Rizo, J. R. Fulmer, L. L. Trahan, M. A. Ghetie et E. S. Vitetta. 2003. "Genetic engineering of an immunotoxin to eliminate pulmonary vascular leak in mice". Nature Biotechnology, vol. 21, p. 387-91.
- STEIN, G. M., A. Büssing et M. Schietzel. 2002. "Activation of dendritic cells by an aqueous mistletoe extract and mistletoe lectin-3 in vitro". Anticancer Research, vol. 22, p. 267-74.
- STEINBERG, B. E., K. K. Huynh et S. Grinstein. 2007. "Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences". Biochemical Society Transactions, vol. 35, p. 1083-7.
- STENNICKE, H. R. et G. S. Salvesen. 2000. "Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1477, p. 299-306.

- STIRPE, F., L. Barbieri, M. G. Battelli, M. Soria et D. A. Lappi. 1992. "Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects". Bio/Technology, vol. 10, p. 405-12.
- STIRPE, F., R. F. Legg, L. J. Onyon, P. Ziska et H. Franz. 1980. "Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)". Biochemical Journal, vol. 190, p. 843-5.
- STOEVA, S., T. Maier, M. H. Soler et W. Voelter. 1999. "Carbohydrate chains and their binding sites in mistletoe lectin I". Polish Journal of Chemistry, vol. 73, p. 125-133.
- STONE, M. J., E. A. Sausville, J. W. Fay, D. Headlee, R. H. Collins, W. D. Figg, M. Stetler-Stevenson, V. Jain, E. S. Jaffe, D. Solomon, R. M. Lush, A. Senderowicz, V. Ghetie, J. Schindler, J. W. Uhr et E. S. Vitetta. 1996. "A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma". Blood, vol. 88, p. 1188-97.
- SUAREZ-HUERTA, N., R. Lecocq, R. Mosselmans, P. Galand, J. E. Dumont et B. Robaye. 2000. "Myosin heavy chain degradation during apoptosis in endothelial cells". Cell Proliferation, vol. 33, p. 101-14.
- TABIASCO, J., F. Pont, J. J. Fournie et A. Vercellone. 2002. "Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity". European Journal of Biochemistry, vol. 269, p. 2591-600.
- THORNBERRY, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins et a. I. et. 1992. "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes". Nature, vol. 356, p. 768-74.
- THURKOW, E. W., I. M. van der Heijden, F. C. Breedveld, T. J. Smeets, M. R. Daha, P. M. Kluin, A. E. Meinders et P. P. Tak. 1997. "Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with Yersinia-induced arthritis and osteoarthritis". Journal of Pathology, vol. 181, p. 444-50.
- TIMOSHENKO, A. V., S. N. Cherenkevich et H. J. Gabius. 1995. "Viscum album agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function". Biomedicine and Pharmacotherapy, vol. 49, p. 153-8.
- TIMOSHENKO, A. V. et H. J. Gabius. 1993. "Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from *Viscum album*". Biological Chemistry Hoppe-Seyler, vol. 374, p. 237-43.
- TIMOSHENKO, A. V., H. J. Gabius et P. K. Lala. 2001. "Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination: effects on tumor growth, capillary leakage and NO production", European Journal of Cancer, vol. 37, p. 1910-20.

- TONEVITSKY, A. G., I. I. Agapov, A. T. Shamshiev, D. E. Temyakov, P. Pohl et M. P. Kirpichnikov. 1996. "Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain". FEBS Lett, vol. 392, p. 166-8.
- TSUCHIDA, H., Y. Takeda, H. Takei, H. Shinzawa, T. Takahashi et F. Sendo. 1995. "In vivo regulation of rat neutrophil apoptosis occurring spontaneously or induced with TNF-alpha or cycloheximide". Journal of Immunology, vol. 154, p. 2403-12.
- TSUYUKI, S., C. Bertrand, F. Erard, A. Trifilieff, J. Tsuyuki, M. Wesp, G. P. Anderson et A. J. Coyle. 1995. "Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways". Journal of Clinical Investigation, vol. 96, p. 2924-31.
- TURNER, R. 1965. Screening Method in Pharmacology-Anti-inflammatory agent. London: Academic Press New York. 158p.
- UTSUMI, T., Y. Aizono et G. Funatsu. 1987. "Receptor-mediated interaction of ricin with the lipid bilayer of ganglioside GM1-liposomes". FEBS Letters, vol. 216, p. 99-103.
- VANDAL, K., P. Rouleau, A. Boivin, C. Ryckman, M. Talbot et P. A. Tessier. 2003. "Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide". Journal of Immunology, vol. 171, p. 2602-9.
- VAN DAMME, E. J. M, Q. Hao, Y. Chen, A. Barre, F. Vandebussche, S. Desmyter, P. Rouge et W. J. Peumans. 2001. "Ribosome-inactivating proteins: a family plant proteins that do more than inactivating ribosomes ". Critical Reviews in Plant Sciences, vol. 20, 395-465.
- VAN DEN BERG, J. M., S. Weyer, J. J. Weening, D. Roos et T. W. Kuijpers. 2001. "Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 69, p. 467-73.
- VAN ENGELAND, M., H. J. Kuijpers, F. C. Ramaekers, C. P. Reutelingsperger et B. Schutte. 1997. "Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis". Experimental Cell Research, vol. 235, p. 421-30.
- VAN VUUREN, A. J., J. A. van Roon, V. Walraven, I. Stuij, M. C. Harmsen, P. M. McLaughlin, J. G. van de Winkel et T. Thepen. 2006. "CD64-directed immunotoxin inhibits arthritis in a novel CD64 transgenic rat model". Journal of Immunology, vol. 176, p. 5833-8.
- VEHMEYER, K., T. Hajto, K. Hostanska, S. Konemann, H. Loser, R. Saller et B. Wormann. 1998. "Lectin-induced increase in clonogenic growth of haematopoietic progenitor cells". European Journal of Haematology, vol. 60, p. 16-20.
- VITETTA, E. S., M. Stone, P. Amlot, J. Fay, R. May, M. Till, J. Newman, P. Clark, R. Collins, D. Cunningham et a. l. et. 1991. "Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma". Cancer Research, vol. 51, p. 4052-8

- VOGEL, H. 1996. "Anti-inflammatory activity". Drug Discovery and Evaluation, p.725-771.
- WALZEL, H., M. Blach, P. Neels, U. Schulz, K. Wollenhaupt et J. Brock. 2001. "The B-chain of mistletoe lectin I efficiently stimulates calcium signaling in human Jurkat T-cells". Immunology Letters, vol. 78, p. 57-66.
- WARD, C., E. R. Chilvers, M. F. Lawson, J. G. Pryde, S. Fujihara, S. N. Farrow, C. Haslett et A. G. Rossi. 1999a. "NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 4309-18.
- WARD, C., I. Dransfield, E. R. Chilvers, C. Haslett et A. G. Rossi. 1999b. "Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets". Trends in Pharmacological Sciences, vol. 20, p. 503-9.
- WATSON, R. W., A. O'Neill, A. E. Brannigan, R. Coffey, J. C. Marshall, H. R. Brady et J. M. Fitzpatrick. 1999. "Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent". FEBS Letters, vol. 453, p. 67-71.
- WEITZMAN, J. B., C. E. Wells, A. H. Wright, P. A. Clark et S. K. Law. 1991. "The gene organisation of the human beta 2 integrin subunit (CD18)". FEBS Letters, vol. 294, p. 97-103.
- WENZEL-SEIFERT, K., H. Lentzen et R. Seifert. 1997. "In U-937 promonocytes, mistletoe lectin I increases basal". Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, vol. 355, p. 190-7.
- WESCHE, J., A. Rapak et S. Olsnes. 1999. "Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 34443-9.
- WHITE, M. K. et C. Cinti. 2004. "A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy". Methods in Molecular Biology, vol. 285, p. 105-11.
- WHITTLE, B. A. 1964. "The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesic". British Journal of Pharmacology Chemother, vol. 22, p. 24-253.
- WHYTE, M. K., S. J. Hardwick, L. C. Meagher, J. S. Savill et C. Haslett. 1993. "Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro". Journal of Clinical Investigation, vol. 92, p. 446-55.
- WINTER, C. A., E. A. RISLEY et G. W. NUSS. 1962. "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 111, p. 544-7.
- WINYARD, Paul G. Et D. A. Willoughby. 2003. Methods in molecular Biology, vol. 225: Inflammation Protocols . New Jersey: Humana Press Inc. 378 p.
- WIPKE, B. T. et P. M. Allen. 2001. "Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis". Journal of Immunology, vol. 167, p. 1601-8.

- WITKO-SARSAT, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects". Laboratory Investigation, vol. 80, p. 617-53.
- WONG, T. H., A. G. Rossi et E. R. Chilvers. 1997. "Inhibition of neutrophil function and survival by nitric oxide donors". Clinical Science, vol. 92, p. 7P.
- WU, A. M., S. C. Song, P. Y. Hwang, J. H. Wu et U. Pfeller. 1995. "Interaction of mistletoe toxic lectin-I with sialoglycoproteins". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 214, p. 396-402.
- WYLLIE, A. H. 1980. "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation". Nature, vol. 284, p. 555-6.
- YASUI, K., B. Hu, T. Nakazawa, K. Agematsu et A. Komiyama. 1997. "Theophylline accelerates human granulocyte apoptosis not via phosphodiesterase inhibition". Journal of Clinical Investigation, vol. 100, p. 1677-84.
- YE, W., R. P. Nanga, C. B. Kang, J. H. Song, S. K. Song et H. S. Yoon. 2006. "Molecular characterization of the recombinant A-chain of a type II ribosome-inactivating protein (RIP) from *Viscum album coloratum* and structural basis on its ribosome-inactivating activity and the sugar-binding properties of the B-chain". Journal of Biochemistry and Molecular Biology, vol. 39, p. 560-70.
- ZEISS, C. J. 2003. "The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice". Veterinary Pathology, vol. 40, p. 481-95.
- ZIMMERMANN, N., B. L. Daugherty, J. M. Stark et M. E. Rothenberg. 2000. "Molecular analysis of CCR-3 events in eosinophilic cells". Journal of Immunology, vol. 164, p. 1055-64.
- ZISKA, P., H. Franz et A. Kindt. 1978. "The lectin from *Viscum album* L. Purification by biospecific affinity chromatography". Experientia, vol. 34, p.123-4.