

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉVALUATION DES MÉCANISMES DE L' APOPTOSE INDUITE PAR
L' ACTION DE L' ACROLÉINE SUR LES CELLULES CANCÉREUSES
PULMONAIRES A549

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE
(CONCENTRATION BIOCHIMIE)

PAR

JULIE ROY

septembre 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais prendre un moment pour remercier ma directrice de recherche, la Dre Diana Averill-Bates, pour sa confiance en mes capacités en me confiant un projet, qui représentait pour moi un nouveau défi, en reliant les notions d'agent polluant de notre environnement quotidien, la cytotoxicité et la biochimie via les mécanismes d'induction de la mort cellulaire. Au cours de ma maîtrise, je me suis fixée certains objectifs : d'acquérir de l'autonomie dans la conduite des expériences scientifiques, en plus de développer la capacité de mettre au point des protocoles et des techniques de laboratoire. Grâce aux soutiens et aux encouragements de ma directrice, j'ai pu réaliser les travaux présentés dans ce mémoire, tout en atteignant mes objectifs. Je tiens également à remercier tous les membres de son laboratoire pour leur aide et soutien si précieux. Plus particulièrement, Ahmed Bettaieb, Yulia Zilber et Catherine Lauzon pour leur appui, les bonnes conversations scientifiques et le plaisir de travailler auprès d'eux. J'aimerais souligner le soutien technique et la patience d'Ahmed de m'avoir montré en plus l'utilisation de certains appareils.

Depuis toujours, j'ai eu un intérêt pour la science. Ma passion pour la biochimie doit venir de mes parents, qui tous deux ont déjà travaillé dans un laboratoire. J'aimerais leur dire merci de m'avoir aidée et encouragée à entreprendre des études en science. De plus, je remercie mon conjoint Éric Hébert ainsi que toute ma famille pour leurs conseils, leurs encouragements et leur compréhension pendant la période de rédactions. Je dédie donc ce mémoire à ces gens qui ont sans cesse eu confiance en moi, en mes capacités d'accomplir tout ce que je désire vraiment. Je ne dois pas oublier les chercheurs chez *Bioniche Therapeutics Inc.* qui m'ont donné le goût à la recherche fondamentale et je les remercie du fond du cœur pour une expérience de travail inoubliable.

Le financement nécessaire à l'élaboration des travaux présentés dans ce mémoire a été fourni par le Conseil de Recherche en Sciences Naturels et en Génie (CRSNG) et les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC). De plus, je tiens à remercier les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) et la Bourse Francine-Beaudoin-Denizeau pour leur soutien financier qui m'a permis d'accomplir ces travaux de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------|
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | viii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xi |
| LISTES DES FIGURES..... | xii |
| RÉSUMÉ..... | xiv |
| | |
| CHAPITRE I. | |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| | |
| 1.1 Maladies respiratoires graves..... | 1 |
| 1.1.1 Introduction et statistiques canadiennes..... | 1 |
| 1.1.2 Asthme..... | 2 |
| 1.1.3 Maladie pulmonaire obstructive chronique..... | 6 |
| 1.1.4 Fibrose kystique..... | 7 |
| 1.1.5 Cancer du poumon..... | 8 |
| | |
| 1.2 Facteurs de risque pour les maladies respiratoires graves..... | 10 |
| 1.2.1 Qualité de l'air extérieur..... | 10 |
| 1.2.2 Qualité de l'air intérieur..... | 11 |
| 1.2.3 Tabagisme..... | 12 |
| | |
| 1.3 Acroléine..... | 13 |
| 1.3.1 Généralité (utilisation et production)..... | 13 |
| 1.3.2 Structure et propriétés chimiques..... | 14 |
| 1.3.3 Sources potentielles d'exposition..... | 15 |
| 1.3.4 Métabolisme de l'acroléine..... | 18 |
| 1.3.5 Propriétés biochimiques : interactions au niveau cellulaire..... | 19 |
| 1.3.5.1 Réaction d'addition de Michael..... | 19 |
| 1.3.5.2 Modifications des acides nucléiques..... | 20 |
| 1.3.5.3 Modifications des acides aminés..... | 21 |
| 1.3.5.4 Interactions avec les thiols et les facteurs de transcription..... | 22 |
| 1.3.6 Pathologies associées..... | 25 |

| | |
|---|----|
| 1.4 Nécrose..... | 26 |
| 1.4.1 Introduction et propriétés morphologiques..... | 26 |
| 1.4.2 Voies biochimiques | 29 |
| 1.4.3 Lien entre nécrose et acroléine..... | 31 |
| 1.5 Apoptose..... | 32 |
| 1.5.1 Introduction et propriétés morphologiques..... | 32 |
| 1.5.2 Voies apoptotiques..... | 33 |
| 1.5.2.1 Voies des récepteurs de mort et du « cross-talk »..... | 33 |
| 1.5.2.2 Voie mitochondriale..... | 37 |
| 1.5.2.3 Voie du réticulum endoplasmique..... | 40 |
| 1.5.3 Famille Bcl-2..... | 46 |
| 1.5.4 Caspases..... | 50 |
| 1.6 Présentation du projet..... | 53 |
| 1.6.1 Introduction..... | 53 |
| 1.6.2 Choix du modèle..... | 53 |
| 1.6.3 Objectifs spécifiques..... | 54 |
| 1.6.4 Approches expérimentales..... | 55 |
| CHAPITRE II. | |
| RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX..... | 60 |
| 2.1 Préface..... | 60 |
| 2.2 Article 1: <i>A549 Adenocarcinoma Cells Undergo Apoptosis by Activation of the Death Receptor Pathway upon Exposure to Acrolein</i> | 61 |
| 2.3 Résumé..... | 62 |
| 2.4 Abstract..... | 63 |
| 2.5 Introduction..... | 64 |
| 2.6 Material and Methods..... | 66 |
| 2.6.1 Cell culture..... | 66 |
| 2.6.2 Flow cytometric analysis of FasR and FasL extracellular expression..... | 67 |
| 2.6.3 Total FasL expression..... | 67 |
| 2.6.4 Preparation of whole cell lysates..... | 67 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.6.5 | Preparation of subcellular fractions..... | 68 |
| 2.6.6 | Immunodetection..... | 68 |
| 2.6.7 | Determination of caspase activity by fluorescence spectroscopy..... | 69 |
| 2.6.8 | Determination of cell death by Annexin V-FITC staining..... | 70 |
| 2.6.9 | Morphological analysis of apoptosis..... | 71 |
| 2.6.10 | ROS generation..... | 71 |
| 2.6.11 | Statistics..... | 72 |
| 2.7 | Results..... | 72 |
| 2.7.1 | Initiation of the death receptor pathway by acrolein..... | 72 |
| 2.7.2 | Acrolein causes translocation of adaptor proteins FADD and RIP to the plasma membrane | 73 |
| 2.7.3 | Acrolein induces activation of initiator caspases..... | 73 |
| 2.7.4 | Induction of the cross-talk pathway by acrolein and implication of p53 | 74 |
| 2.7.5 | Acrolein induces activation of effector caspase-7..... | 74 |
| 2.7.6 | Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein..... | 75 |
| 2.7.7 | Role of ROS in activation of the receptor pathway by acrolein..... | 75 |
| 2.8 | Discussion..... | 76 |
| 2.8.1 | Initiation of the death receptor pathway by acrolein..... | 76 |
| 2.8.2 | Acrolein induces translocation of adaptor proteins FADD and RIP to the plasma membrane | 76 |
| 2.8.3 | Acrolein induces activation of initiator caspases..... | 77 |
| 2.8.4 | Induction of cross-talk pathway by acrolein and implication of p53..... | 78 |
| 2.8.5 | Acrolein induces activation of effector caspase-7..... | 79 |
| 2.8.6 | Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein..... | 80 |
| 2.8.7 | Effects of acrolein-induced ROS on FasL total expression and caspase-8 activation | 80 |
| 2.9 | Conclusions..... | 81 |
| 2.10 | Acknowledgments..... | 82 |
| 2.11 | Figure Legends..... | 92 |
| 2.12 | References..... | 95 |

CHAPITRE III.

| | |
|---|-----|
| RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX..... | 101 |
| 3.1 Préface..... | 101 |
| 3.2 Article 2: <i>Acrolein Induced Apoptosis via Activation of the Mitochondrial Pathway in A549 Adenocarcinoma Cells</i> | 102 |
| 3.3 Résumé..... | 103 |
| 3.4 Abstract..... | 104 |
| 3.5 Introduction..... | 105 |
| 3.6 Material and Methods..... | 107 |
| 3.6.1 Cell culture..... | 107 |
| 3.6.2 Measurement of mitochondrial membrane potential by flow cytometry..... | 108 |
| 3.6.3 Measurement of ROS production..... | 108 |
| 3.6.4 Preparation of whole cell lysates..... | 109 |
| 3.6.5 Preparation of subcellular fractions..... | 109 |
| 3.6.6 Immunodetection..... | 110 |
| 3.6.7 Intracellular expression of Bax, Bcl-2 and survivin by flow cytometry..... | 111 |
| 3.6.8 Determination of caspase activity by fluorescence spectroscopy..... | 112 |
| 3.6.9 Cell cycle analysis..... | 112 |
| 3.6.10 Statistics..... | 113 |
| 3.7 Results..... | 113 |
| 3.7.1 Acrolein increases mitochondrial membrane potential and ROS production..... | 113 |
| 3.7.2 Acrolein increases Bax levels at mitochondria..... | 114 |
| 3.7.3 Cytochrome c release from mitochondria in the presence of acrolein..... | 114 |
| 3.7.4 Acrolein induces activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3 and -6..... | 114 |
| 3.7.5 Acrolein induces AIF release from mitochondria and translocation to the nucleus..... | 115 |
| 3.7.6 Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein..... | 115 |
| 3.7.7 Activation of AKT by acrolein..... | 116 |
| 3.7.8 Acrolein induces phosphorylation of Bad..... | 116 |
| 3.7.9 Acrolein increases cIAP1/2 expression in A549 cells..... | 116 |
| 3.7.10 Effects of acrolein-induced ROS on mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation..... | 117 |
| 3.8 Discussion..... | 117 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| 3.8.1 | Acrolein increases ROS production and mitochondrial membrane potential..... | 117 |
| 3.8.2 | Acrolein increases Bax concentration at mitochondria..... | 118 |
| 3.8.3 | Release of cytochrome c from mitochondria in the presence of acrolein..... | 119 |
| 3.8.4 | Acrolein induces activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3 and -6..... | 119 |
| 3.8.5 | Acrolein induces AIF release from mitochondria and translocation to the nucleus | 120 |
| 3.8.6 | Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein..... | 121 |
| 3.8.7 | Acrolein induces activation of AKT and phosphorylation of Bad..... | 121 |
| 3.8.8 | Increased cIAP1/2 expression in the presence of acrolein..... | 122 |
| 3.8.9 | Effects of acrolein-induced ROS on mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation..... | 123 |
| 3.9 | Conclusions..... | 123 |
| 3.10 | Acknowledgments..... | 124 |
| 3.11 | Figure Legends..... | 135 |
| 3.12 | References..... | 138 |
| | | |
| CHAPITRE IV. | | |
| | CONCLUSIONS..... | 143 |
| | | |
| 4.1 | Introduction..... | 143 |
| 4.2 | Voie apoptotique des récepteurs de mort induite par l'acroléine..... | 145 |
| 4.3 | Voie apoptotique mitochondriale induite par l'acroléine..... | 148 |
| 4.4 | Conclusions et perspectives..... | 153 |
| | | |
| ANNEXE I. | | |
| | RÉSULTATS PUBLIÉS..... | 155 |
| | | |
| 1. | Préface..... | 155 |
| 2. | Article publié: <i>Mechanism of Cell Death Induced by Spermine and Amine Oxidase in Mouse Melanoma Cells</i> | 156 |
| | | |
| | RÉFÉRENCES..... | 166 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AFC | “7-amino-4-trifluorométhylcoumarin” |
| AIF | Facteur inducteur d’apoptose |
| AKT | Protéine kinase B |
| AMC | “7-amino-4-méthylcoumarin” |
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| ANT | Translocateur de nucléotide d’adénine |
| AP-1 | Protéine activatrice-1 |
| Apaf-1 | Facteur activateur de protéase apoptotique-1 |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ASK-1 | “Apoptosis signal-regulating kinase-1” |
| Asp | Acide aspartique |
| ATCC | “American Type Culture Collection” |
| ATF6 | “Activating transcription factor 6” |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| Bad | Antagoniste de mort cellulaire de Bcl-2 |
| Bak | Antagoniste/tueur homologue à Bcl-2 |
| Bap31 | Récepteur de cellules B associé à la protéine 31 |
| Bax | Protéine X associée à Bcl-2 |
| Bcl-2 | Lymphome de cellules B de type 2 |
| Bcl-XL | Lymphome de cellules B extra long |
| BH | Domaine d’homologie à Bcl-2 |
| Bid | Agoniste de mort interagissant par domaine BH3 |
| BiP | Protéine de liaison luminale |
| BIR | Domaines IAP répétés du baculovirus |
| BNIP3 | Bcl-2/adénovirus E1B 19kDa protéine interactive 3 |
| BSA | Albumine de sérum bovin |
| BSAO | Amine oxydase de sérum bovin |
| bZIP | “Basic-leucine zipper” |
| CAD | DNase activé par caspase |
| CARD | Domaine recruteur de caspases |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonique acide |
| CO | Monoxyde de carbone |
| cPLA ₂ | Phospholipase A ₂ calcium-dépendante |
| dATP | Désoxyadénosine triphosphate |
| Daxx | Protéine associée au domaine de mort |
| DD | Domaine de mort |
| DED | Domaine effecteur de mort |
| Smac/DIABLO | Protéine liante de l’IAP avec un dérivé de la mitochondrie activateur de caspase |
| DISC | Complexe inducteur de signal de mort |
| DMEM | Milieu Eagle’s modifié par Dulbecco |
| DNase | Déoxyribonucléase |
| DR | Récepteur de mort |
| eIF-2 α | “Eukaryotic translation initiation factor” |

| | |
|-------------------------------|--|
| EDEM | “ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein” |
| EDTA | Éthylène diamine tétraacétique acide |
| EGTA | Éthylène glycol tétraacétique acide |
| ERAD | Dégradation associée au réticulum endoplasmique |
| ERK | Kinase régulatrice de signal extracellulaire |
| FACS | Cytomètre de flux |
| FADD | Protéine associée au domaine de mort de Fas |
| FasR | Récepteur associé au fibroblaste |
| FasL | “Fas Ligand” |
| FBS | Sérum foetal bovin |
| FCCP | “Mesoxalonitrile 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone” |
| FDP | “Formyldehydropiperidino” |
| FITC | Fluorescéine isothiocyanate |
| FK | Fibrose kystique |
| FLIP | Protéine inhibitrice de la caspase-8 |
| GADD153/CHOP | Arrêt de croissance et dommage à l’ADN/C/EBP protéine homologue |
| GAPDH | Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase |
| Gas2 | Protéine spécifique à l’arrêt de croissance 2 |
| GRP | Protéine régulée par le glucose |
| GSH | Glutathion réduit |
| GSSG | Glutathion disulfide |
| GST | Glutathion S-transférase |
| H ₂ O ₂ | Peroxyde d’hydrogène |
| H ₂ DCFDA | 2’,7’-Dichlorodihydrofluorescéine diacétate |
| hILP2 | “Human IAP-like protein 2” |
| HtrA2/Omi | Protéine A2 haute température requise / endoprotéase régulée par le stress |
| IAP | Protéine inhibitrice de l’apoptose |
| ICAD | Inhibiteur de la DNase activé par caspase |
| I κ B | “Inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells” |
| IL-13 | Interleukine-13 |
| INF- γ | Interféron gamma |
| IRE1 | Inositol requis 1 |
| JC1 | “5,5’,6,6’-Tetrachloro-1,1’,3,3’-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide” |
| MAPK | Protéines kinases activées par mitogènes |
| MCA | “7-methoxy coumarin-4 acetyl” |
| α -MEM | Milieu essentiel minimum alpha |
| ML-IAP | “Melanoma IAP” |
| MOPS | 3-(N-morpholino)-propane sulfonique acide |
| MPOC (COPD) | Maladie pulmonaire obstructive chronique |
| NADH | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADPH | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite) |
| NAIP | Protéine neuronale inhibitrice de l’apoptose |
| NF- κ B | Facteur nucléaire- κ B |
| NO | Oxyde nitrique |
| NO ₂ | Dioxyde d’azote |
| NOS | Oxyde nitrique synthétase |
| O ₂ ^{•-} | Superoxyde |
| HO [•] | Radical hydroxyle |

| | |
|------------------|--|
| α -OH-PdG | 3 <i>H</i> -6-hydroxy-3-(β -D-2'-désoxyribofuranosyl)-5,6,7,8-tetrahydropyrido[3,2- <i>a</i>]purin-9-one |
| γ -OH-PdG | 3 <i>H</i> -8-hydroxy-3-(β -D-2'-désoxyribofuranosyl)-5,6,7,8-tetrahydropyrido[3,2- <i>a</i>]purin-9-one |
| OMM | Membrane mitochondriale externe |
| P450 | Cytochrome P450 |
| PARP | PolyADP-ribose polymérase |
| PBS | Tampon phosphate salin |
| PdG | 1, <i>N</i> ² -(1,3-propano)-2'-désoxyguanosine |
| PE | Phycoérythrine |
| PERK | “PKR-like ER kinase” |
| PI | Iodure de propidium |
| PI3K | Phosphatidyl inositol-3 kinase |
| PIDD | Protéine à domaine de mort |
| PKR | Protéine kinase R |
| ppb | Particules par billion |
| ppm | Particules par million |
| PS | Phosphatidylsérine |
| PTP | Pore mitochondriale de perméabilité transitoire |
| PVDF | Polyvinylidène difluoride |
| RAIDD | Protéine associée au domaine de mort de RIP |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| Rho 123 | Rhodamine 123 |
| RING | Domaine protéique « doigt à zinc » |
| RIP | Récepteur de protéine |
| ROS | Espèces réactives de l'oxygène |
| S1P | Site-1 protéase |
| SDS | Sodium dodécyl sulphate |
| SDS-PAGE | Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante |
| SDR | Syndrome de détresse respiratoire |
| SEM | Erreur standard de la moyenne |
| sFasL | Fas Ligand soluble |
| SO ₂ | Dioxyde de soufre |
| tBid | Agoniste de mort interagissant par domaine BH3 tronqué |
| TLR | “Toll-like receptor” |
| TNF- α | Facteur de nécrose tumorale alpha |
| TNF-R1 | Récepteur du facteur de nécrose tumorale 1 |
| TRADD | Protéine associée au TNFR1 avec un domaine de mort |
| TRAF2 | Facteur 2 associé au TNFR |
| TRAIL | Ligand inductible d'apoptose associé au TNF |
| UPR | Réponse aux protéines dépliées |
| VDAC | Canal anionique voltage dépendant |
| XBP1 | “X-Box protein-1” |
| XIAP | Protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X |
| $\Delta\psi_m$ | Différence de potentiel mitochondrial |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|-------------|--|----|
| Tableau 1.1 | Nombre de Canadiens touchés par une maladie respiratoire..... | 2 |
| Tableau 1.2 | Classification des types et des sous-types du cancer du poumon..... | 9 |
| Tableau 1.3 | Sources et estimations d'émission d'acroléine dans l'atmosphère au Canada..... | 16 |
| Tableau 1.4 | Différences entre la mort cellulaire par apoptose et par nécrose..... | 28 |
| Tableau 1.5 | Classification des caspases selon leur fonction..... | 51 |
| Tableau 1.6 | Liste des substrats fluorescents pour mesurer l'activité enzymatique de chacune des caspases..... | 56 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|-------------|--|----|
| Figure 1.1 | La représentation des voies respiratoires d'un individu asthmatique et d'un individu sain..... | 3 |
| Figure 1.2 | La structure chimique de l'acroléine..... | 14 |
| Figure 1.3 | Voies métaboliques de la production endogène d'acroléine..... | 18 |
| Figure 1.4 | Voies métaboliques proposés pour l'acroléine chez le rat..... | 19 |
| Figure 1.5 | La réaction d'addition de Michael entre un énolate et l'acroléine..... | 19 |
| Figure 1.6 | Structures des exocycles formés par l'addition de Michael entre la désoxyguanosine de l'ADN et l'acroléine..... | 20 |
| Figure 1.7 | Structures chimiques de l'acroléine-lysine et de l'acroléine-histidine..... | 21 |
| Figure 1.8 | Mécanisme de la glutathiolation de protéines modifiées par l'acroléine..... | 21 |
| Figure 1.9 | Voie de production et de régulation des formes réduites et oxydées du glutathion..... | 24 |
| Figure 1.10 | Voies biochimiques de la nécrose..... | 29 |
| Figure 1.11 | Multiples mécanismes de mort déclenchés par les récepteurs de mort..... | 36 |
| Figure 1.12 | Illustration schématique du rôle central de la mitochondrie dans la régulation de l'apoptose..... | 39 |
| Figure 1.13 | Le mécanisme de la réponse du RE au stress..... | 42 |
| Figure 1.14 | Voie apoptotique du RE..... | 45 |
| Figure 1.15 | Représentation schématique de la structure des protéines de la famille Bcl-2 et des protéines à un seul domaine BH3..... | 47 |
| Figure 2.1 | FasL expression is increased by acrolein..... | 83 |
| Figure 2.2 | Acrolein causes translocation of adaptor protein FADD to the plasma membrane..... | 84 |
| Figure 2.3 | Translocation of adaptor protein RIP to the plasma membrane in the presence of acrolein..... | 85 |
| Figure 2.4 | Acrolein induces activation of initiator caspases-2 and -8..... | 86 |
| Figure 2.5 | Cleavage of Bid to tBid by acrolein..... | 87 |
| Figure 2.6 | Acrolein induces activation of p53..... | 88 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| Figure 2.7 | Acrolein induces activation of effector caspase-7..... | 89 |
| Figure 2.8 | Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein..... | 90 |
| Figure 2.9 | Production of ROS by acrolein causes upregulation of FasL and caspase-8 activation..... | 91 |
| Figure 3.1 | Acrolein induces mitochondrial membrane hyperpolarisation and increases ROS production..... | 125 |
| Figure 3.2 | Acrolein increases Bax expression at mitochondria but does not affect the cellular Bax / Bcl-2 ratio..... | 126 |
| Figure 3.3 | Release of cytochrome c from mitochondria in the presence of acrolein..... | 127 |
| Figure 3.4 | Acrolein induces activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3 and -6..... | 128 |
| Figure 3.5 | Acrolein induces release of AIF from mitochondria and translocation to the nucleus | 129 |
| Figure 3.6 | Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein..... | 130 |
| Figure 3.7 | Activation of AKT in the presence of acrolein..... | 131 |
| Figure 3.8 | Acrolein induces phosphorylation of Bad..... | 132 |
| Figure 3.9 | Acrolein increases cIAP1/2 expression in A549 cells..... | 133 |
| Figure 3.10 | Overproduction of ROS by acrolein increases mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation..... | 134 |

RÉSUMÉ

Les maladies pulmonaires graves touchent plus de 3 millions de Canadiens, indépendamment de leur âge ou de leur sexe. Parmi ces maladies, nous retrouvons l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), le cancer du poumon et la fibrose kystique. Ces dernières peuvent être déclenchées par la présence chronique d'un stress oxydatif et par conséquent, elles font partie des pathologies associées à une exposition à l'acroléine. On retrouve l'acroléine dans notre alimentation et dans les produits de combustion organique. L'acroléine, un aldéhyde *alpha,beta*-insaturé très réactif, est également une des substances toxiques qui résulte de la peroxydation des lipides endogènes, lors d'un stress oxydatif.

Notre laboratoire a évalué les mécanismes toxiques de l'acroléine induits *in vitro*, en utilisant la lignée cellulaire A549. Le choix de ce modèle cellulaire pour l'étude provient du fait qu'elles sont des cellules humaines, d'origine pulmonaire, soit le premier organe ciblé par une exposition à l'acroléine. Cette étude vise donc à comprendre les mécanismes impliqués dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose: 1) la voie des récepteurs de mort, 2) la voie du « cross-talk » et 3) la voie mitochondriale induites par l'acroléine.

L'exposition des cellules A549 à des doses d'acroléine de 0 à 50 μM a activé la voie des récepteurs de mort. L'acroléine a causé une augmentation d'expression du ligand FasL (FasL) et a induit la translocation de la protéine associée au domaine de mort de Fas (FADD) et du récepteur de protéine (RIP) à la membrane cytoplasmique, en plus de l'activation des caspases initiatrices 2 et 8. Par ailleurs, cette exposition a causé une augmentation du domaine interagissant par BH3 tronqué (tBid) à la mitochondrie. Il semble que l'acroléine peut déclencher la voie du « cross-talk » par l'activation des caspases-2 et -8, qui clivent la protéine Bid en tBid.

Pour ce qui est de la voie mitochondriale, l'acroléine a causé une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale et une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Notre étude a aussi démontré que l'acroléine a induit l'activation de p53, la translocation de la protéine X associée à Bcl-2 (Bax) à la mitochondrie, le relâchement du cytochrome c dans le cytosol, l'activation de la caspase initiatrice 9 et la translocation du facteur inducteur d'apoptose (AIF) au noyau. De plus, l'inhibition des ROS générées par l'acroléine grâce à l'antioxydant PEG-catalase, a empêché l'augmentation de l'expression totale du FasL, l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale ainsi que l'activation des caspases-3 et -8. Par conséquent, les ROS sont préalablement requises pour que l'acroléine induise l'apoptose par la voie des récepteurs de mort et par la voie mitochondriale, chez les cellules A549. En conclusion, l'acroléine peut induire les trois voies apoptotiques étudiées chez ces cellules. L'acroléine provoque l'exécution de l'apoptose via l'activation des caspases effectrices -3, -6 et -7, l'externalisation de la phosphatidylsérine, la condensation de la chromatine et le clivage de la polyADP-ribose polymérase (PARP).

Par contre, l'acroléine induit aussi certains mécanismes de survie cellulaire comme l'augmentation de la phosphorylation d'AKT, de Bad et de l'expression des cIAP1/2. Même si les protéines antiapoptotiques sont activées, l'acroléine peut encore induire la mort cellulaire par apoptose chez les cellules A549.

Ces recherches sont pertinentes dans plusieurs contextes de toxicité à l'acroléine tels que l'action pharmacologique et/ou les effets secondaires de la cyclophosphamide, un agent anticancéreux où l'acroléine est l'un de ses métabolites, la régulation de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale par les polyamines, la maladie d'Alzheimer, ainsi que la toxicité causée par les expositions environnementales à de faibles doses d'acroléine. Cependant, il est important de poursuivre les recherches pour améliorer nos connaissances sur les mécanismes de toxicité de cet aldéhyde, considérant l'étendue de l'exposition des humains à l'acroléine.

MOTS CLÉS : Acroléine, apoptose, caspase, mitochondrie, récepteurs de mort.

CHAPITRE I. INTRODUCTION

1.1 Maladies respiratoires graves

1.1.1 Introduction et statistiques canadiennes

Les gens ne s'attardent normalement pas sur la respiration, l'une des principales fonctions vitales de notre corps. C'est une action involontaire qui se produit environ 12 fois par minute (Santé Canada 2001). Chez un individu sain, l'épithélium à l'intérieur des voies respiratoires procure une barrière à l'environnement externe et est capable d'initier une variété de réponses, par exemple lorsqu'elle est endommagée, elle initie rapidement les processus de réparation. Lorsqu'il y a présence d'une blessure, il est essentiel que les cellules de cet épithélium soient capables de se déplacer, de proliférer et de se redifférencier pour maintenir une fonction respiratoire normale et ce, pour toute la vie (Wang *et al.*, 2001). Par conséquent, s'il y a des changements dans ces processus de réparation et de renouvellement de l'épithélium des voies respiratoires, ils peuvent engendrer de graves maladies pulmonaires en limitant la circulation de l'air lors de la respiration.

Au Canada, plus de trois millions de personnes souffrent de graves maladies respiratoires, telles que l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) (Kirkham et Rahman, 2006), le cancer du poumon, la grippe, la pneumonie, la bronchiolite, la tuberculose, la fibrose kystique (FK) et le syndrome de détresse respiratoire. Le *tableau 1.1* présente les cinq maladies respiratoires graves les plus fréquentes, qui touchent environ trois millions de Canadiens. Ces dernières affligent normalement les gens de tout âge, indépendamment de leur sexe. Les maladies respiratoires graves représentent la troisième cause d'hospitalisation et de décès au Canada, après les maladies cardiovasculaires et le cancer. En 1993, ces dernières ont eu de graves répercussions économiques sur le système canadien de soins de santé, en totalisant pour près de 12,18 milliards de dépenses par année. Ce montant englobait les coûts directs de 3,79 milliards de dollars (en médicaments, en soins

médicaux et hospitaliers et en recherche) ainsi que les coûts indirects de 8,39 milliards, associés à l'incapacité et à la mortalité. Il est intéressant de noter que ce montant de dépenses directes en soins de santé attribuées aux maladies respiratoires s'est classé au troisième rang parmi les principaux problèmes de santé, soit après les maladies cardiovasculaires et les troubles mentaux (Santé Canada 2001).

Tableau 1.1

Nombre de Canadiens touchés par une maladie respiratoire

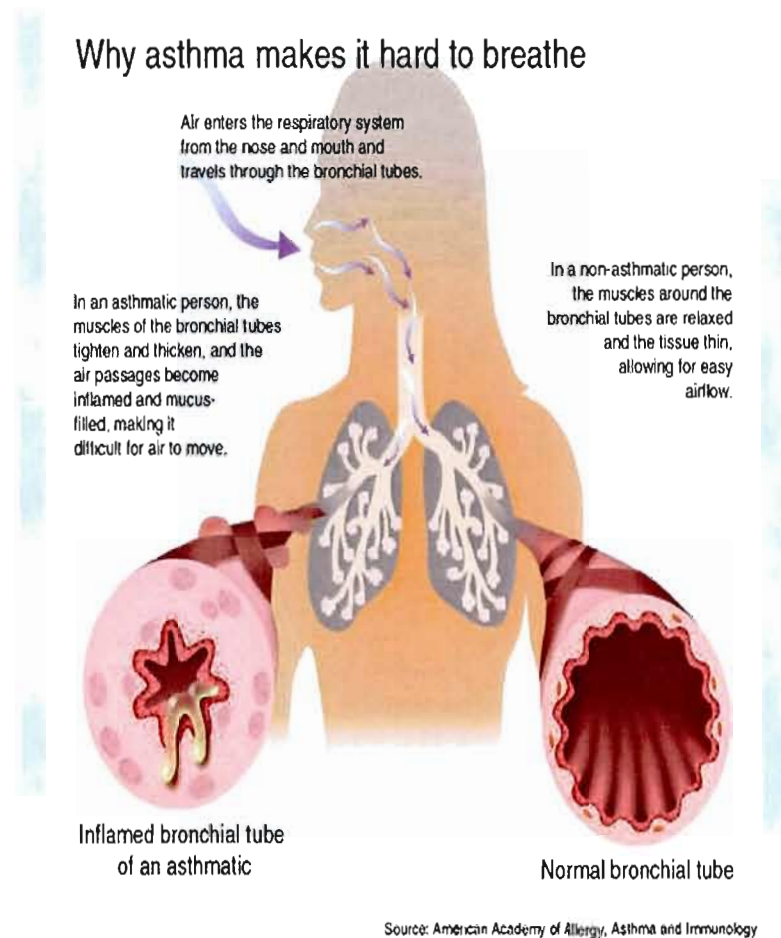
| Maladie | Nbre de Canadiens selon les estimations |
|---|---|
| Pathologies associées à l'ACROLÉINE | |
| Asthme – diagnostiqué par un médecin (prévalence ENSP, 1998-1999) | 2 474 400 |
| MPOC – diagnostiquée par un médecin (prévalence ENSP, 1998-1999) | 498 400 |
| Cancer du poumon (nouveaux cas - 1996) | 18 441 |
| Fibrose kystique (prévalence du registre - 1997) | 3 142 |
| Tuberculose (nouveaux cas ou cas de réactivation - 1998) | 1 798 |

Légende : les quatre pathologies encadrées en rouge sont associées à une exposition à l'acroléine, un aldéhyde α,β -insaturé produit entre autre lors de la combustion incomplète de matière organique (Santé Canada 2001).

1.1.2 Asthme

L'asthme est une maladie pulmonaire chronique qui se caractérise par une difficulté à respirer causée par la présence d'une inflammation systémique, d'un stress oxydatif et d'une inflammation chronique de la paroi des voies aériennes (Kirkham et Rahman, 2006). En 2003, 287 Canadiens sont décédés de l'asthme (Association pulmonaire du Canada, 2007). Les symptômes et les crises d'asthme sont généralement déclenchés par l'exposition à des allergènes, les infections respiratoires virales, l'exercice ou l'exposition à des vapeurs ou à des gaz irritants. Ces facteurs causent une inflammation localisée dans les poumons et un rétrécissement anormal des voies respiratoires, qui entraînent ainsi les symptômes d'asthme (Santé Canada 2001). Plus les voies aériennes hypersensibles d'un individu asthmatique sont enflées, plus les muscles qui entourent ces dernières fibrillent et se contractent brusquement

(Association pulmonaire du Canada, 2007). La *figure 1.1* présente les voies respiratoires d'une personne asthmatique versus celles d'une personne saine.



Certains éléments rendent une personne plus susceptible à l'asthme. Pour les enfants, cette susceptibilité à l'asthme semble être déterminée durant le développement du fœtus et au cours des trois à cinq premières années de la vie (Santé Canada 2001). Les facteurs de risque potentiellement liés au développement de cette maladie comprennent les antécédents familiaux d'allergies comprenant les affections allergiques (asthme, rhume des foins ou eczéma), l'exposition importante au cours de la première année de la vie des enfants susceptibles à des allergènes inhalés (animal de compagnie, acariens, coquerelles,

moisissures), l'exposition à la fumée de tabac (y compris l'exposition *in utero*), les infections respiratoires fréquentes au cours des premières années de vie, le faible poids à la naissance et le syndrome de détresse respiratoire (Santé Canada 2001; Association pulmonaire du Canada, 2007).

Chez les adultes, l'asthme peut être déclenché par une exposition professionnelle à des sensibilisants de faible masse moléculaire (exemple : présence d'animaux, d'isocyanates, de poussières), ou par une exposition simultanée à des agents infectieux, à des allergènes et à la pollution (Santé Canada 2001; Kirkham et Rahman, 2006; Association pulmonaire du Canada, 2007). En ce qui concerne la pollution atmosphérique, y compris la fumée de tabac, elle ne peut être considérée comme étant la cause primaire de l'asthme, mais plutôt comme un facteur aggravant de la maladie.

Les éléments susceptibles de déclencher l'asthme, chez les enfants et les adultes, peuvent générer un stress oxydatif en favorisant l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans leurs voies aériennes. Les ROS sont des molécules instables ayant généralement un électron non apparié porté par l'atome d'oxygène comme le superoxyde ($O_2\cdot^-$) et le radical hydroxyle ($HO\cdot$), mais le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) fait aussi partie de ces espèces. Il y a principalement deux sources de production de ROS dans les poumons: par des réactions métaboliques endogènes ou par des polluants exogènes. La production endogène est réalisée par l'activation de certaines enzymes comme la NADPH oxydase des cellules inflammatoires et épithéliales présentes dans les poumons en réponse au pathogène ou à l'irritant (Rochelle *et al.*, 1998; van der Vliet, 2007). Cette production cellulaire des ROS provient de différentes réactions : la respiration mitochondriale (via la chaîne de transport des électrons), du système xanthine / xanthine oxydase, mais majoritairement de la NADPH oxydase. Ces réactions ont pour effet de relâcher le superoxyde des macrophages et des éosinophiles activés. La production exogène des ROS provient des gaz et des particules de l'air pollué. Il faut noter que ces derniers peuvent engendrer la production de ROS *in situ*. Ces molécules instables ont toutes la capacité d'initier les réactions d'oxydation des protéines, de l'ADN et des lipides qui peuvent causer directement des dommages aux tissus, comme la peroxydation des phospholipides de la

membrane plasmique (voir section 1.3.6), ou induire une variété de réponses cellulaires, en augmentant la signalisation pro-inflammatoire ou en changeant la fonction de certaines enzymes (Gutteridge, 1995). Toutes ces modifications causées par la présence des ROS peuvent donc significativement interférer avec la fonction de la cellule pulmonaire (Poli *et al.*, 2004).

Considérant que les poumons sont dans un environnement riche en oxygène et remplis de vaisseaux sanguins, ils sont donc très vulnérables aux dommages occasionnés par le stress oxydatif (Kirkham et Rahman, 2006). Ce dernier est reconnu comme étant une partie intégrale du processus d'inflammation dans plusieurs maladies pulmonaires associées à une inflammation chronique des voies respiratoires, comme l'asthme et la MPOC. Les ROS peuvent donc initier et amplifier une réponse inflammatoire dans les poumons menant aux symptômes de l'asthme (Kirkham et Rahman, 2006). En effet, l'inflammation systémique et pulmonaire chronique cause l'influx et l'activation de cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et mastocytes), qui génèrent des médiateurs inflammatoires tels que l'interféron gamma (INF- γ) (Gern et Busse, 1999), l'interleukine-13 (IL-13) (Ford *et al.*, 2001), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (Halayko et Amrani, 2003), et ces événements causent des dommages importants aux cellules épithéliales des voies respiratoires. Pendant ces processus, il y a libération de l'acide arachidonique (reconnu comme médiateur dans les processus d'hypersécrétion de mucus), contraction des muscles lisses des voies respiratoires, augmentation de la réactivité et de la sécrétion de mucus des voies aériennes, augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et augmentation de la synthèse des molécules chimioattractantes (Owen *et al.*, 1991; Sadeghi-Hashjin *et al.*, 1996). Alors, la présence et l'intensité du stress oxydatif, qui provient de la production massive de ROS et qui conduit à l'inflammation chronique locale et systémique, ont d'importantes conséquences sur la pathologie, la sévérité et même le traitement de l'asthme (Kirkham et Rahman, 2006).

1.1.3 Maladie pulmonaire obstructive chronique

La MPOC est une affection qui progresse lentement et qui est normalement irréversible (s'éteint souvent par le décès). Elle est caractérisée par des difficultés respiratoires causées par l'essoufflement, la toux, la perte d'élasticité et de la forme des voies aériennes et des alvéoles, la perte de l'intégrité de la paroi des alvéoles, l'épaississement et l'inflammation des parois des voies respiratoires ainsi que la surproduction de mucus (Santé Canada 2001; Kirkham et Rahman, 2006; Association pulmonaire du Canada, 2007). Ses symptômes ne se manifestent habituellement pas avant l'âge de 55 ans mais les changements au niveau du poumon débutent avant. La MPOC englobe quelques maladies pulmonaires. Les plus courantes sont la bronchite chronique et l'emphysème. Plusieurs personnes atteintes de la MPOC ont ces deux maladies en même temps. La bronchite chronique est une inflammation chronique de la muqueuse des bronches. L'emphysème, de son côté, est caractérisé par une dilatation anormale et permanente des alvéoles pulmonaires pouvant entraîner la rupture de leurs parois et l'infiltration gazeuse du tissu cellulaire (Santé Canada 2001; Association pulmonaire du Canada, 2007).

La cause principale du développement de la MPOC est, dans 80 à 90% des cas, la cigarette. Cependant, il existe d'autres facteurs pouvant augmenter les risques de souffrir de cette maladie. La seconde cause en importance est l'exposition professionnelle aux poussières et à certaines fumées (par exemple : cadmium, poussière d'or, de charbon, de céréale). Les polluants de l'air peuvent accroître le risque de déclencher la MPOC. Des antécédents d'infections pulmonaires répétées durant l'enfance et l'exposition à la fumée de tabac peuvent prédisposer l'individu à la MPOC (Santé Canada 2001; Kirkham et Rahman, 2006; Association pulmonaire du Canada, 2007).

Tout comme pour l'asthme, chez les personnes souffrant de la MPOC, il y a une forte augmentation du stress oxydatif dans leurs poumons qui provient de la surabondance des particules oxydantes inhalées et des ROS générées par les cellules inflammatoires, immunitaires et structurales présentes dans les voies respiratoires (Corradi *et al.*, 2004; Kirkham et Rahman, 2006). Par conséquent, chez le fumeur, la hausse importante du nombre

de particules oxydantes inhalées provient de la fumée de sa cigarette qui contient environ 10^{14} molécules oxydantes et 3000 ppm d'oxyde nitrique (NO) par inhalation (Church et Pryor, 1985). Plusieurs de ces substances contenues dans la fumée de cigarette, incluant les ROS tels que l'oxyde nitrique ($\text{NO}\cdot$), le dioxyde d'azote radicalaire ($\text{NO}_2\cdot$), un mélange de semiquinones, d'hydroquinones et de quinones (Pryor *et al.*, 1983), sont soupçonnés d'être responsables du processus d'inflammation dans la MPOC (Facchinetti *et al.*, 2007). Il faut aussi noter que les autres facteurs de risques pour la MPOC (l'exposition aux poussières, les polluants de l'air, les infections pulmonaires répétées) ont tous la capacité d'induire un stress oxydatif.

Pour conclure, la MPOC est caractérisée par un stress oxydatif, qui stimule les macrophages des alvéoles à produire et à relâcher plus de ROS ainsi que certains médiateurs comme le $\text{TNF-}\alpha$, permettant l'infiltration massive de cellules inflammatoires, comme les neutrophiles, dans les poumons. Tout ceci conduit à l'inflammation chronique des voies respiratoires et aux dommages irréversibles des cellules pulmonaires (Kirkham et Rahman, 2006; Facchinetti *et al.*, 2007).

1.1.4 Fibrose kystique

La fibrose kystique (FK) a été décrite pour la première fois à la fin des années 1930. À ce moment, on ne la reconnaissait qu'après le décès de l'enfant, souvent pour cause de malnutrition ou à la suite d'une pneumonie (Fondation canadienne de la fibrose kystique 2007). Cette maladie respiratoire chronique est la plus répandue des maladies héréditaires mortelles chez les jeunes canadiens de race blanche. Environ un Canadien sur vingt-cinq est porteur du gène défectueux responsable de la FK et un nouveau-né sur 3600 en est atteint (Santé Canada 2001; Fondation canadienne de la fibrose kystique 2007). Les symptômes apparaissent généralement au cours des premières années de vie. Elle affecte plusieurs organes mais principalement les poumons et l'appareil digestif. Dans les poumons, la FK amène une surproduction et une accumulation de mucus épais qui rend donc l'élimination des pathogènes aériens plus difficile. Ceci est à l'origine des cycles d'infection pulmonaire grave et d'inflammation qui endommagent les tissus des poumons (Santé Canada 2001; Fondation

canadienne de la fibrose kystique 2007). Dans l'appareil digestif, cette maladie freine grandement la digestion et l'absorption d'éléments nutritifs en quantité suffisante. Le mucus épais obstrue les conduits du pancréas et empêche ses enzymes d'atteindre les intestins pour faciliter la digestion des aliments (Santé Canada 2001; Fondation canadienne de la fibrose kystique 2007).

La sécrétion excessive de mucus est un processus commun à plusieurs pathologies pulmonaires comme l'asthme, la MPOC et la FK (Lundgren et Shelhamer, 1990). Ces désordres pulmonaires peuvent être causés ou aggravés par la présence de pathogènes ou d'irritants dans les voies aériennes, tels que les aldéhydes de la fumée de cigarette. Les personnes souffrant de ces maladies présentent certaines anomalies dans leurs glandes submucosales et à la surface de l'épithélium pulmonaire dues à l'inflammation, à l'augmentation du nombre de cellules mucosales et à l'excès de mucus présent dans les voies respiratoires. Cette inflammation pulmonaire cause l'influx et l'activation de cellules inflammatoires, qui génèrent des médiateurs inflammatoires. Certaines classes de ces médiateurs comme des cytokines (TNF- α) (Cohan *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1995), des protéases (Klinger *et al.*, 1984; Sommerhoff *et al.*, 1990), des ROS (Adler *et al.*, 1990) et des métabolites de l'acide arachidonique (Marom *et al.*, 1983; Enns *et al.*, 1997) sont impliquées dans le processus d'hypersécrétion de mucus (Borchers *et al.*, 1999).

1.1.5 Cancer du poumon

Le cancer du poumon est responsable du développement de cellules anormales, qui se multiplient et prennent le contrôle des tissus sains de cet organe (Association pulmonaire du Canada, 2007). Au Canada, le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer étant à l'origine d'environ 30% des décès attribuables au cancer chez les hommes et de 20% des décès dus au cancer chez les femmes (Santé Canada 2001). Le cancer du poumon est classifié en deux types, selon sa formation et sa progression différente. Le *tableau 1.2* présente la classification des types et des sous-types de ce cancer.

Le premier type, le cancer du poumon « non à petites cellules », est la forme de cancer du poumon la plus répandue (de 85 à 90% des cas) mais qui évolue plus lentement que l'autre type. Il en existe trois sous-types car lorsqu'on observe les cellules cancéreuses sous un microscope, elles diffèrent par leur taille, leur forme et l'expression de certains marqueurs chimiques (American Cancer Society, 2007; Association pulmonaire du Canada, 2007).

Le deuxième type, le cancer du poumon à petites cellules, une forme plus rare, compte pour environ 15% de tous les cancers pulmonaires. Ce type prend souvent naissance dans les bronches. Même si ces cellules cancéreuses sont très petites, elles peuvent se multiplier rapidement et former de grandes tumeurs qui peuvent envahir d'autres parties du corps. Ce type de cancer est très rare chez une personne qui n'a jamais fumé (American Cancer Society, 2007; Association pulmonaire du Canada, 2007).

Tableau 1.2

Classification des types et des sous-types du cancer du poumon.

| Cancer du poumon non à petites cellules | Cancer du poumon à petites cellules |
|---|--|
| <i>Adénocarcinome</i> (environ 40%) | <i>Carcinome à petites cellules</i> (cellules en grains d'avoine) |
| <i>Carcinome épidermoïde</i> (25-30%) | <i>Carcinome mixte à petites et à grandes cellules</i> (cellules intermédiaires) |
| <i>Carcinome à grandes cellules indifférenciées</i> (10-15%) | <i>Carcinome mixte à petites cellules</i> |
| Localisation : dans n'importe quelle partie des poumons | Localisation : alvéoles, bronches, bronchioles, tissus de soutien des poumons |

Légende : les pourcentages indiqués dans le tableau sont l'incidence de ce sous-type par rapport à tous les cancers du poumon. (American Cancer Society, 2007; Association pulmonaire du Canada, 2007)

Il existe plusieurs causes qui augmentent les risques de cancer du poumon, telles que la présence de certaines lésions pulmonaires qui touchent surtout le tissu cicatriciel des poumons, l'exposition à des substances mutagènes ou cancérigènes (comme l'amiante, l'arsenic, le chrome, la silice, le nickel, l'uranium, le radon et certains produits pétroliers) en milieu de travail ou dans l'environnement, mais la première cause est le tabagisme. Au Canada, le tabac est responsable d'au moins 70 à 80% de tous les cas de cancer du poumon chez les femmes et de 90% des cas chez les hommes (Santé Canada 2001; Association

pulmonaire du Canada, 2007). Le risque augmente de façon marquée avec le nombre de cigarettes fumées par jour et encore plus avec le nombre d'années d'usage du tabac (Santé Canada 2001). La fumée de tabac contient plus de 4000 produits chimiques reconnus comme étant dangereux, dont plusieurs sont cancérigènes (Gomes *et al.*, 2002; Association pulmonaire du Canada, 2007). Par exemple, l'acroléine est un des aldéhydes les plus abondants, réactifs et mutagènes de la fumée de cigarette. Cette molécule a la capacité de causer directement des dommages à l'ADN en plus d'inhiber les mécanismes de réparation de l'ADN. Ces deux effets peuvent conduire à plus de mutations dans les cellules pulmonaires et par conséquent, à déclencher un cancer du poumon (Feng *et al.*, 2006). Donc, la meilleure solution pour diminuer au maximum le risque de ce cancer est de ne pas fumer et d'éviter l'exposition à la fumée secondaire, sans oublier qu'il n'est jamais trop tard pour arrêter de fumer (Association pulmonaire du Canada, 2007).

1.2 Facteurs de risque pour les maladies respiratoires graves

1.2.1 Qualité de l'air extérieur

Le lien entre qualité de l'air et la santé est difficile à distinguer, dû à la complexité des rapports entre les nombreux facteurs : les expositions personnelles, la génétique, les maladies latentes, les habitudes de vie et alimentaires, l'emplacement géographique et le climat. Malgré tout, des recherches sur les effets des niveaux actuels de la pollution de l'air extérieur et les troubles respiratoires ont révélé l'existence d'un lien avec les décès prématurés et le nombre accru d'hospitalisations (Santé Canada 2001). Santé Canada estime que, dans 11 grandes villes canadiennes, la pollution atmosphérique est responsable de 5000 décès prématurés. De plus, environ 80% des hospitalisations liées à la pollution de l'air extérieur ont été attribuées à un mélange gazeux (SO₂, NO₂, CO, l'ozone troposphérique) et 20% seraient attribuables aux particules. Les effets de ces polluants sur la santé sont plus sévères chez les gens souffrant de maladies respiratoires graves (Santé Canada 2001).

Par conséquent, ces polluants gazeux ou ces particules qui affectent la qualité de l'air au Canada proviennent de l'utilisation de combustibles fossiles, des fonderies, des centrales thermiques et des industries. L'ozone troposphérique se forme par des réactions chimiques entre la lumière solaire, le NO₂ et des composés organiques volatils. Malgré que sa concentration semble diminuer avec les années, plusieurs régions du Canada, dont le corridor Windsor-Québec, dépassent la norme actuelle de 82 ppb en matière de qualité de l'air. Les concentrations de particules dans l'air sont dues à une combinaison de sources naturelles et anthropiques. Elles sont composées de diverses substances chimiques comme les sulfates, les nitrates, des composés organiques (dont l'acroléine). Tous ces polluants forment le smog et les pluies acides (Santé Canada 2001).

Cette pollution atmosphérique provenant d'un mélange gazeux et de particules génère la source de production environnementale d'espèces réactives de l'oxygène (O₂•⁻, H₂O₂, HO•), auxquelles les poumons sont exposés lors de la respiration. De plus, en pénétrant dans les poumons, les gaz oxydants comme l'ozone, le SO₂, le NO₂, le CO ainsi que les particules de l'air, ayant un diamètre inférieur à 10 micromètres, peuvent aussi mener à une production *in situ* de ROS. Par conséquent, l'augmentation du taux de ces oxydants peut amplifier la réponse inflammatoire dans les maladies respiratoires graves (Kirkham et Rahman, 2006).

1.2.2 Qualité de l'air intérieur

La qualité de l'air intérieur est influencée par les concentrations de polluants intérieurs, les appareils de combustion, les sources personnelles (tabagisme, animaux domestiques), les produits de consommation et les matériaux de construction. Par ces multiples expositions simultanées, la pollution de l'air intérieur peut aggraver et même causer des maladies respiratoires graves. Pour ce qui est de l'asthme, il existe un rapport de cause à effet entre l'exposition aux allergènes produits par les acariens détriticoles et cette pathologie. De plus, plusieurs polluants de l'air intérieur sont liés à l'exacerbation de l'asthme dont l'exposition à la fumée de tabac, à de fortes concentrations de NO₂, aux allergènes (d'animaux, d'acariens et de coquerelles), aux champignons et aux rhinovirus (Santé Canada 2001).

La pollution de ce milieu provient de différentes sources comme l'air extérieur, la fumée de tabac ambiante, les matières biologiques, les produits de combustion et les matières radioactives. Naturellement, tous les polluants de l'air extérieur peuvent se retrouver à l'intérieur et dans le cas des particules fines, le CO et le NO₂, ils se retrouvent tous à des concentrations supérieures à l'intérieur qu'à l'extérieur. Pour ce qui est des contaminants biologiques (bactéries, virus et allergènes), ils sont souvent responsables d'affections allergiques, d'asthme et de symptômes respiratoires. Les produits de combustion au gaz, au bois ou à l'huile, généralement constitués de CO, NO₂, SO₂ et de particules respirables (comme l'acroléine), peuvent augmenter le risque de maladie respiratoire jusqu'à 30%. Pour les matières radioactives, l'exposition au radon est considérée comme la deuxième cause de cancer des poumons, après la cigarette. Par conséquent, la qualité de l'air intérieur est un facteur de risque important pour les maladies respiratoires graves car selon l'étude intitulée « Canadian Human Activities Pattern Survey », les Canadiens passent environ 90% du temps à l'intérieur (Santé Canada 2001).

1.2.3 Tabagisme

Le tabagisme et la fumée secondaire sont les principaux facteurs de risque évitable des maladies respiratoires graves. Selon Santé Canada, en 2001, un Canadien sur quatre fume des cigarettes à tous les jours. Chez l'adulte, l'exposition directe ou indirecte à la fumée de tabac aggrave les risques d'asthme, de la MPOC et de cancer du poumon. Chez les enfants, cette exposition augmente les risques d'asthme, de bronchite, de bronchiolite, de syndrome de mort subite du nourrisson et de syndrome de détresse respiratoire du bébé (Santé Canada 2001).

Les maladies respiratoires telles que les bronchites, l'asthme et la FK, peuvent être causées ou aggravées par des particules oxydantes de la fumée de cigarette (Shephard, 1992; Troisi *et al.*, 1995). Ces molécules peuvent pénétrer facilement dans les cellules et inhiber leur migration, leur prolifération et leur redifférenciation, empêchant ainsi la réparation des tissus pulmonaires, ce qui peut potentiellement compromettre les fonctions respiratoires (Wang *et al.*, 2001).

D'un autre côté, les cellules des voies respiratoires *in vitro* peuvent reprendre efficacement leur processus de réparation si elles ne sont plus exposées aux molécules oxydantes de la fumée de cigarette. Ceci permet d'expliquer qu'en général, les personnes qui cessent de fumer peuvent grandement diminuer leurs risques de développer des maladies respiratoires et plus ce renoncement dure longtemps, plus la réduction des risques est importante (Santé Canada 2001; Wang *et al.*, 2001).

1.3 Acroléine

1.3.1 Généralités (utilisation et production)

Le nom *acroléine* provient des mots latin *acer* et *olere* signifiant respectivement aigre, âcre et sentir, qui caractérise très bien l'odeur mordante et suffocante de cette molécule. Son suffixe vient du mot *glycérine* puisque sa synthèse est obtenue par déshydratation de la glycérine (Robert, 1991). Pour l'humain, l'acroléine est hautement toxique pour les voies respiratoires, les yeux et la peau pouvant causer la nausée, la diarrhée, l'irritation sévère au lieu d'exposition, la détresse du système respiratoire, l'œdème pulmonaire, la dermatite, la nécrose tissulaire, l'inconscience et parfois même la mort (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; World Health Organization, 2002). La plupart des gens ne peuvent pas tolérer une exposition à l'acroléine de 2,2 ppm ou plus, pour plus de deux minutes, tandis qu'une exposition aux concentrations au-dessus de 8,73 ppm peut être fatale (Einhorn, 1975; Kirk, 1991; World Health Organization, 2002).

L'acroléine est principalement utilisée comme herbicide aquatique dans les canaux d'irrigation et comme microbiocide dans l'eau produite pour l'exploration d'huiles. L'acroléine est rapidement métabolisée par les organismes et elle ne se bioaccumule pas. Par conséquent, il est peu probable que cette dernière soit transportée sur de longues distances à cause de sa grande réactivité et sa courte demi-vie estimée dans l'eau et dans l'air (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; World Health Organization, 2002). Selon les rapports de « International Programme on Chemical Safety » en 2005, la demi-vie globale de l'acroléine

basée sur sa réactivité est estimée de 30 à 100 heures dans l'eau et de moins de 10 heures dans l'air (Mackay *et al.*, 1995).

En plus d'être utilisée comme biocide, l'acroléine est produite et utilisée exclusivement par l'industrie chimique comme intermédiaire dans la production d'additifs de la nourriture pour les animaux, d'agent pour teindre le cuir et d'ingrédient actif pour récupérer le sulfure d'hydrogène des liquides obtenus des opérations pétrolières. L'acroléine peut aussi solubiliser les dépôts de sulfure ferreux qui obstruent les puits, les citernes et les barils (World Health Organization, 2002). Elle est utilisée entre autres comme intermédiaire dans la production d'acide acrylique, de polymères d'acrylate, de la DL-méthionine (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; Kehrer et Biswal, 2000) et de l'immunosuppresseur FR901483 (Maeng et Funk, 2001). Ainsi, les travailleurs dans diverses industries sont exposés à l'acroléine.

1.3.2 Structure et propriétés chimiques

L'acroléine (CAS 107-02-8) est aussi connue sous les noms : 2-Propenal, prop-2-enal, acraldéhyde, acryaldéhyde, aldéhyde acrylique ou allylique, aqualin et magnacide. Sa formule chimique est C_3H_4O et son poids moléculaire est de 56,06 g/mol (World Health Organization, 2002). Sa structure est représentée à la *figure 1.2*. À la température de la

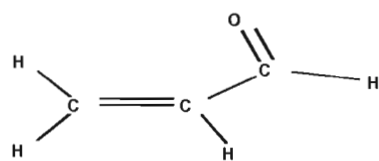


Figure 1.2 La structure chimique de l'acroléine présentant un système conjugué.

pièce, l'acroléine se retrouve sous forme d'un liquide clair, très volatil avec une odeur âcre et irritante (World Health Organization, 2002). Quelques autres propriétés physiques et chimiques de l'acroléine sont un point d'ébullition de 52,1 à 53,5 °C à 101,3 kPa, une solubilité dans l'eau de 206 à 270 g/litre à 20 °C, une pression de vapeur de 29,3 à 36,5 kPa à 20 °C et dans l'air à 25 °C et 101,3 kPa, 1 ppm d'acroléine représente une concentration de 2,29 mg/m³ (World Health Organization, 2002).

Ce produit est mutagène et génotoxique (International Agency for Research on Cancer, 1995). L'acroléine est un aldéhyde α,β -insaturé hautement réactif et sa toxicité

provient du système conjugué dans cette molécule (représenté à la *figure 1.2*), la rendant extrêmement électrophile (Beauchamp *et al.*, 1985; Witz, 1989; Kehrer et Biswal, 2000).

1.3.3 Sources potentielles d'exposition

L'acroléine est un polluant omniprésent dans l'environnement et l'humain s'expose de façon considérable à cet agent toxique dans plusieurs situations (Kehrer et Biswal, 2000). C'est une particule relâchée naturellement dans l'atmosphère comme produit des processus de fermentation et de mûrissement (World Health Organization, 2002). De plus, l'acroléine est générée lors de feux de forêt ou de maison comme produit de la combustion incomplète de la matière organique (Lipari, 1984; World Health Organization, 2002) et elle est formée par l'oxydation photochimique des hydrocarbures de l'atmosphère (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; World Health Organization, 2002). La principale source anthropogénique d'émission d'acroléine, dans l'environnement au Canada, est suspectée de provenir des activités de combustion, par exemple l'incinération des ordures, les fournaies, les foyers, les centrales électriques, la combustion de végétaux ou de plastiques de polyéthylène et la cuisson de la nourriture. Par contre, l'émission de l'acroléine provient majoritairement de la combustion d'essence et du diésel des véhicules motorisés (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; World Health Organization, 2002). Le *tableau 1.3* représente les sources et les quantités estimées d'émission d'acroléine dans l'atmosphère au Canada. Dans les villes canadiennes entre 1989 et 1996, la moyenne des concentrations d'acroléine dans l'atmosphère était généralement inférieure à $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Malheureusement, de 1990 à 1999, les concentrations d'acroléine ont augmenté dans l'atmosphère de $0,4$ à $1,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans les villes et les banlieues du Canada (World Health Organization, 2002).

Tableau 1.3

Sources et estimations d'émission d'acroléine dans l'atmosphère au Canada.
(World Health Organization, 2002)

| Sources | Estimated releases (kg/year) |
|--|---|
| Natural sources: fermentation, forest fires | Unknown |
| Road motor vehicles | 209 000–2 730 000 ^a |
| Off-road motor vehicles, ^b including aircraft | Unknown, could be greater than road vehicle release |
| Oriented-strand board (OSB) industry | 3 208–25 664 ^c |
| Pulp and paper (kraft) mills | 3 747–18 735 ^d |
| Waste incineration | 2 435 ^e |
| Coal-based electric power generation plants | 467–17 504 ^f |
| Other combustion sources ^g | Unknown |
| Atmospheric production from other pollutants | Unknown |
| By-product of vinyl acetate production | Negligible ^h |

a Estimated based on emissions test data from Howes (1989a,b), BUA (1994), L.A. Graham (personal communication, 1996), and IPCS (1996), multiplied by the estimated 1995 mileage for on-road motor vehicles in Canada (Environment Canada, 1993). This estimate also considers that about 90% of light-duty gas vehicles in Canada have catalytic converters, which reduce emissions (L. King, personal communication, 1998).

b These include aircraft, railway and mine vehicles, other off-road motor vehicles, and gas-powered lawnmowers and snowblowers, most of which are expected to have greater emission rates than on-road vehicles because of a lack of pollution control features (L.A. Graham, personal communication, 1998).

c The lower estimate corresponds to the total emissions of acrolein in 1995 reported by two OSB companies responding to the CEPA Section 16 Industrial Survey (Environment Canada, 1997) and one OSB company reporting to the Accelerated Reduction/Elimination of Toxics (ARET) program (ARET Secretariat, 1998). The larger value is the total emission estimated for all 24 such plants in Canada (D. Halliburton, personal communication, 1998), assuming an average emission rate of 1070 kg/year per mill.

d The lower estimate corresponds to the total emissions of acrolein in 1995 reported in response to the CEPA Section 16 Industrial Survey by nine Canadian pulp and paper (kraft) mills (Environment Canada, 1997). The larger value is the total emission estimated for all 45 such kraft mills in Canada (D. Halliburton, personal communication, 1998), assuming an average emission rate of 416 kg/year per mill.

e Based on the estimated emission rate of acrolein from one municipal incinerator in Ontario (Novamann International, 1997), the nameplate capacity of Canadian hazardous waste incinerators, and the amount of municipal, hazardous, and biomedical waste incinerated in Canada in 1996.

f Based on US emission rates (Lipari et al., 1984; Sverdrup et al., 1994), high heating value of fuel, and Canadian coal consumption in 1995 (D. Rose, personal communication, 1998).

g Includes prescribed burning, wood-burning furnaces and fireplaces, natural gas furnaces, other electric power generation plants, and other industries (e.g., smelters).

h The unintentional production of 2700 kg of acrolein was reported in 1995 by one vinyl acetate producer in the CEPA Section 16 Industrial Survey. Related releases of acrolein are estimated to be negligible, because it is reported that impurities such as acrolein are separated and processed for recovery or disposal (Environment Canada, 1997).

Il est intéressant de noter qu'au Canada dans l'air ambiant de nos foyers et lieux de travail, l'acroléine se retrouve à des concentrations approximativement 2 à 20 fois plus élevées que celles dans l'atmosphère (World Health Organization, 2002). Pour expliquer cette différence, l'acroléine peut provenir de diverses sources dont la combustion de matières organiques, la fumée de cigarette ainsi que la nourriture (Kehrer et Biswal, 2000). Pour ce qui est de la fumée de cigarette, elle est responsable de la formation de 10 à 500 µg ou 50 à 90 ppm d'acroléine par cigarette (Borchers *et al.*, 1999; Kehrer et Biswal, 2000). Dans la nourriture, l'acroléine est produite pendant la cuisson par la vaporisation de corps gras, dont on a rapporté de sévères cas de toxicité chez l'humain (Beauchamp *et al.*, 1985; World Health Organization, 2002). Elle peut aussi être formée lors du mûrissement des fruits (Hayase, 1984; World Health Organization, 2002). De plus, l'acroléine a été détectée dans certains fromages, le caviar, le veau (Feron *et al.*, 1991), le poulet cru ou cuit (Hrdlicka et Kuca, 1965), la noix de cacao, les liqueurs de chocolat (Boyd *et al.*, 1965) et les mélasses (Hrdlicka et Janicek, 1968). Lors de la fermentation de l'alcool ou de l'entreposage et de la maturation des produits alcoolisés, l'acroléine peut être formée comme sous-produit indésirable (Feron *et al.*, 1991; World Health Organization, 2002). Cette molécule toxique peut aussi provenir de la dégradation thermique des cellophanes et des thermoplastiques de polystyrène utilisés pour emballer les aliments (Zitting et Heinonen, 1980; World Health Organization, 2002).

En plus de ces sources d'expositions exogènes, l'acroléine est produite en petite quantité *in situ*, lors du catabolisme intermédiaire normal de divers acides aminés et des polyamines (Alarcon, 1976; World Health Organization, 2002). De plus, elle est formée pendant le métabolisme de l'alcool allylique ou de la cyclophosphamide, un agent chimiothérapeutique (Cox, 1979; Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; Ramu *et al.*, 1996). L'acroléine est aussi produite lors de la peroxydation des lipides membranaires générée par un stress oxydatif, qui est impliqué dans plusieurs désordres pulmonaires (Nath *et al.*, 1997; World Health Organization, 2002). Par irradiation aux ultra-violets, la trioléine, un lipide de la peau, peut être dégradée en acroléine (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). Elle peut aussi être formée à partir de l'oxydation de la thréonine par la myéloperoxydase du neutrophile aux sites d'inflammation (Anderson *et al.*, 1997). En plus, l'acroléine est générée via le

métabolisme de l'allylamine, une toxine cardiovasculaire (He *et al.*, 1998). La figure 1.3 présente quelques voies métaboliques de la production endogène d'acroléine.

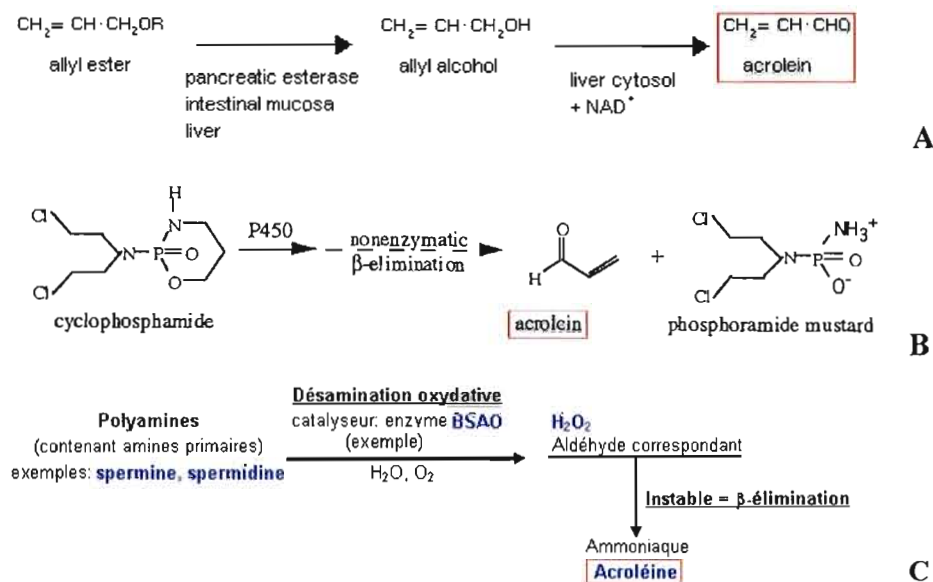


Figure 1.3 Voies métaboliques de la production endogène d'acroléine (identifiée en encadré rouge). **A)** Métabolisme de l'alcool allylique en acroléine (Kaye, 1973). **B)** Métabolisme de la cyclophosphamide (Ramu *et al.*, 1996). **C)** Catabolisme des polyamines (Tabor *et al.*, 1964; Alarcon, 1970; Tabor et Tabor, 1984). NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide, P450 : cytochrome P450, BSAO : amine oxydase de sérum de bovin.

1.3.4 Métabolisme de l'acroléine

Il a été rapporté dans la littérature chez le rat que l'acroléine est métabolisée en glycidaldéhyde et en glycéraldéhyde par différentes enzymes, telles que l'époxydase et le cytochrome P450 des microsomes du foie et des poumons. De plus, l'acide acrylique est formé à partir de l'acroléine par l'aldéhyde déshydrogénase, l'enzyme contenue dans le cytosol et les microsomes du foie (Patel *et al.*, 1980). Toutefois, en se basant sur les métabolites les plus fréquemment identifiés dans l'urine des animaux exposés à cette molécule toxique, la voie prédominante pour le métabolisme de l'acroléine semble impliquer sa conjugaison avec le glutathion suivi de sa modification en composés *N*-acétylcystéine (Patel *et al.*, 1980; World Health Organization, 1991). Ces voies métaboliques pour l'acroléine sont démontrées à la figure 1.4.

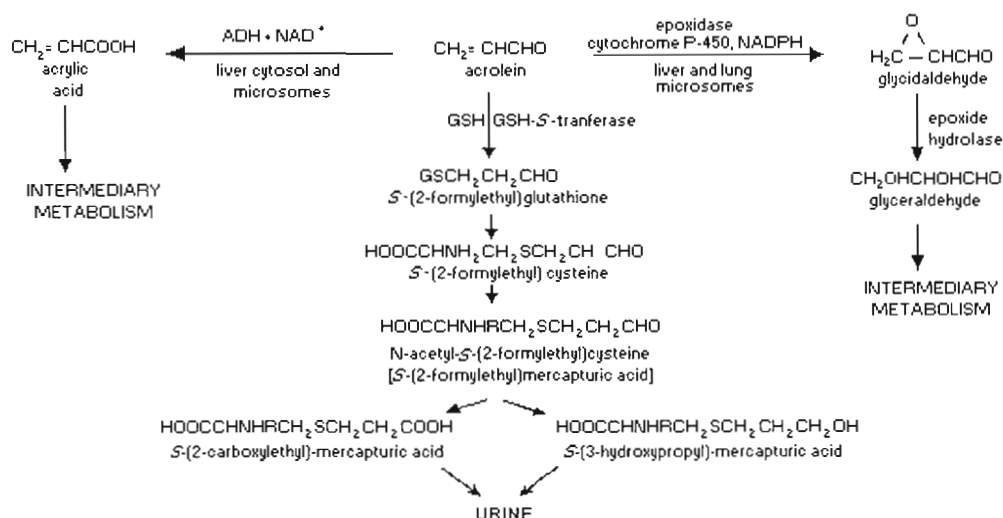


Figure 1.4 Voies métaboliques proposées pour l'acroléine chez le rat (Patel *et al.*, 1980; World Health Organization, 1991). GSH : glutathion, GS : glutamylcystéinylglycine, ADH : aldéhyde déhydrogénase, R = COCH₃.

1.3.5 Propriétés biochimiques : interactions au niveau cellulaire

1.3.5.1 Réaction d'addition de Michael

La réactivité primordiale de l'acroléine provient de sa liaison carbone-carbone α,β -insaturée. Cet aldéhyde va réagir par addition de Michael en présence de nucléophile pour former un adduit alkylé (Butterfield *et al.*, 2002). À la *figure 1.5*, la réaction démontre cette

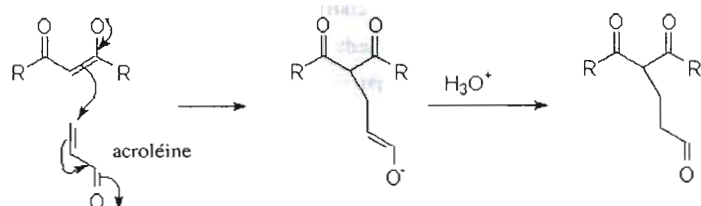


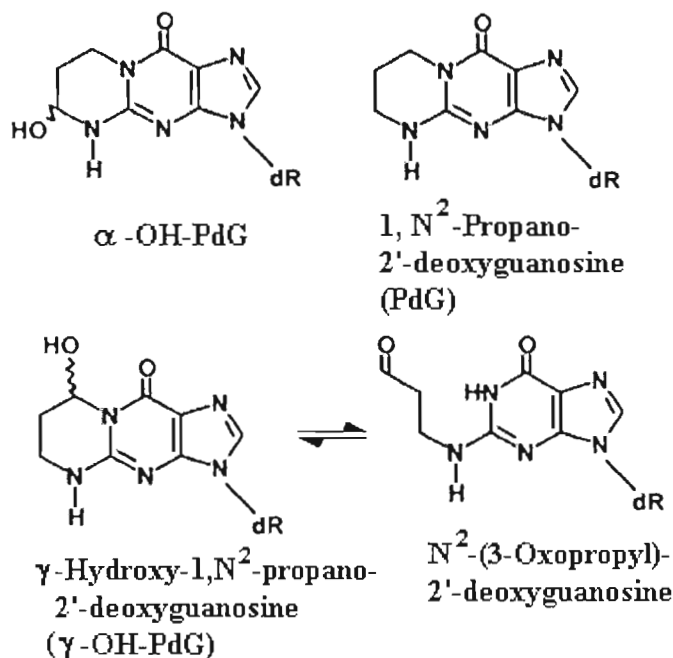
Figure 1.5 La réaction d'addition de Michael entre un énolate et l'acroléine (Maeda et Kraus, 1997).

addition conjuguée d'un énolate nucléophile à un composé carbonyle α,β -insaturé, l'acroléine (Maeda et Kraus, 1997). De plus, la toxicité de l'acroléine est

basée sur le fait qu'elle peut se lier aux acides aminés, aux thiols comme le glutathion (Ohno et Ormstad, 1985), à la chromatine nucléaire (Marano et Demestere, 1976) et qu'elle peut former de multiples adduits avec l'ADN (Marinelli *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990b; Nath *et al.*, 1996), tout ceci par la réaction d'addition de Michael (Butterfield *et al.*, 2002).

1.3.5.2 Modifications des acides nucléiques

L'acroléine a la capacité de réagir, par addition de Michael, avec les sites nucléophiles de l'ADN, ce qui modifie les bases d'ADN en formant des adduits exocycliques (Nath et Chung, 1994; Nath *et al.*, 1996; Kehrer et Biswal, 2000). Elle peut s'additionner à une guanine, adénine, cytosine et thymidine, mais la majorité des adduits cycliques sont formés de l'acroléine-désoxyguanosine (Adibhatla *et al.*, 2006). Cet adduit, détecté dans l'ADN des tissus animaux et humains, peut se retrouver sous la forme de stéréoisomères : les isomères R et S γ -OH-PdG et α -OH-PdG (Chung *et al.*, 1984; Nath et Chung, 1994; Chung *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002). La conformation γ -OH-PdG est prédominante (voir *figure 1.6*), mais la



PdG est la plus stable (Chung *et al.*, 1984; Khullar *et al.*, 1999; Kanuri *et al.*, 2002). L'addition de l'acroléine à la guanine entraîne des erreurs lors de la réplication de l'ADN dans les cellules humaines en substituant cette guanine en thymine ou en adénine (Burcham et Marnett, 1994; Moriya *et al.*, 1994; Kawanishi *et al.*, 1998; de los Santos *et al.*, 2001).

Figure 1.6 Structures des exocycles formés par l'addition de Michael entre la désoxyguanosine de l'ADN et l'acroléine (Kanuri *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002).

Par conséquent, la présence d'exocycles, dont l'acroléine désoxyguanosine, empêche l'appariement normal des bases de type Watson-Crick, ce qui peut inhiber la synthèse de l'ADN (de los Santos *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002). Ces adduits cycliques peuvent former des mutations spontanées dans les cellules de mammifères et être fortement impliqués dans les processus de vieillissement et de cancer (Yang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2006). En plus de

causer des dommages à l'ADN, l'acroléine inhibe plusieurs processus tels que l'enzyme polyADP-ribose polymérase (PARP) impliquée dans la réparation de l'ADN (Dypbukt *et al.*, 1993; Grafstrom *et al.*, 1994) et la protéine anti-tumorale p53, un facteur de transcription, gardienne du génome (Feng *et al.*, 2006). L'impact des modifications des acides nucléiques par l'acroléine permet donc d'éclaircir son activité mutagénique et sa génotoxicité chez diverses espèces, comme la drosophile (Sierra *et al.*, 1991), et chez l'humain (Curren *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 2006).

1.3.5.3 Modifications des acides aminés

Parmi les multiples biomolécules avec lesquelles l'acroléine peut réagir, notons qu'elle peut s'additionner aux groupements sulfhydryl de la cystéine, imidazole de l'histidine et amine de la lysine des protéines (Esterbauer *et al.*, 1991).

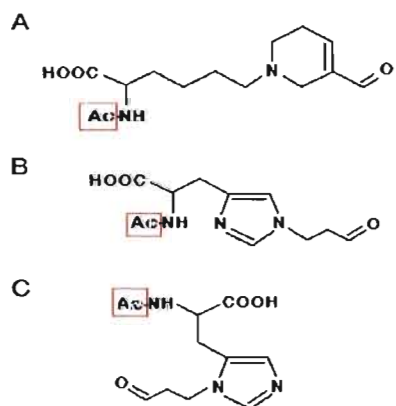


Figure 1.7 Structures chimiques de l'acroléine-lysine et de l'acroléine-histidine.

A) N^{α} -acétyl-FDP-lysine

B) N^{α} -acétyl- N^{ϵ} -formyléthylhistidine

C) N^{α} -acétyl- N^{ϵ} -formyléthylhistidine (Uchida *et al.*, 1998a)

De plus, il a été démontré que cet aldéhyde est rapidement incorporé dans les protéines et génère ainsi des dérivés carbonyles (Uchida, 1999).

Toujours par addition de Michael, l'acroléine peut réagir avec l'un ou l'autre ou les deux atomes d'azote de l'anneau imidazole de l'histidine pour former deux adduits dont la structure est montrée à la figure 1.7 (Gan et Ansari, 1987; Pocker et Janjic, 1988). En plus, un mécanisme est proposé pour la réaction de l'acroléine avec la lysine. L'acroléine devrait être sensible à une addition nucléophile au groupement amine primaire de la

lysine, à la double liaison (C-3), pour former un dérivé avec une amine secondaire et le

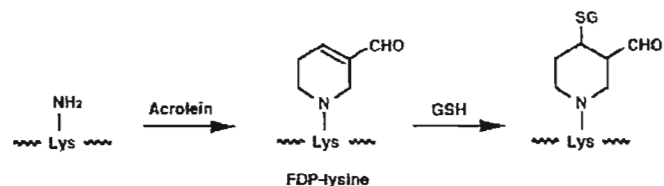


Figure 1.8 Mécanisme de la glutathiolation de protéines modifiées par l'acroléine (Furuhata *et al.*, 2002).

groupe aldéhyde. Cet intermédiaire instable réagit de préférence avec une autre molécule d'acroléine via l'addition de Michael et génère un

dérivé imine. Après la condensation de l'aldol suivie d'une déshydratation, la réaction est complète et génère le dérivé N^ε-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine ou FDP-lysine comme produit majoritaire (Esterbauer *et al.*, 1991; Uchida *et al.*, 1998a). Par contre, puisque ce dérivé FDP-lysine contient encore un aldéhyde α - β -insaturé, il n'est pas le produit final, mais plutôt un intermédiaire qui lie, de manière covalente, les groupements thiols des composés tels que la N-acétylcystéine et le glutathion. Le mécanisme proposé de la thiolation des protéines est démontré à la *figure 1.8* entre l'adduit acroléine-lysine (FDP-lysine) et le glutathion conduisant à la formation d'un nouveau conjugué protéique (Furuhata *et al.*, 2002).

1.3.5.4 Interactions avec les thiols et les facteurs de transcription

L'acroléine lie et épuise rapidement les nucléophiles cellulaires particulièrement ceux contenant un groupement thiol tels que le glutathion (Kehrer et Biswal, 2000). En participant à la réaction d'oxydoréduction via l'oxydation réversible de sa fonction thiol active, le glutathion (GSH) maintient l'équilibre entre les forces oxydantes et réduites de la cellule (Dickinson et Forman, 2002), la protégeant ainsi contre les molécules oxydantes et les électrophiles (Kehrer et Biswal, 2000). En plus, le glutathion est impliqué dans la régulation des signaux de transduction d'oxydoréduction de plusieurs fonctions biologiques dont la prolifération cellulaire, l'inflammation et l'apoptose (Sen, 2000; Biswal *et al.*, 2002; Filomeni *et al.*, 2002). La *figure 1.9* montre le mécanisme de production et de régulation des formes réduites et oxydées du glutathion.

Par contre, la thiolation de certaines protéines liées à l'acroléine altère l'équilibre d'oxydoréduction de la cellule lors d'un stress oxydatif, par lequel ce dernier génère en plus une surproduction d'acroléine et de protéines adduites. Ces dernières à leur tour aggravent le stress oxydatif déjà présent via l'épuisement du glutathion de cette cellule (Furuhata *et al.*, 2002). En inhibant la glutathion réductase, l'acroléine empêche de régénérer la forme réduite du glutathion (GSH) lorsque ce dernier est oxydé en disulfide de glutathion (GSSG) (Nunoshiba et Yamamoto, 1999). L'épuisement des thiols par l'acroléine perturbe plusieurs voies de signalisation cellulaire impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Filomeni *et*

al., 2002), la prolifération et la différenciation cellulaire. En plus, cet épuisement inhibe certains facteurs de transcription sensibles à l'état d'oxydoréduction (Arrigo, 1999; Allen et Tresini, 2000) de la cellule tels que le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) et la protéine activatrice-1 (AP-1) (Horton *et al.*, 1999; Biswal *et al.*, 2002). La régulation par l'état d'oxydoréduction des facteurs de transcription se produit par leur activation dans le cytosol où ils sont alors relocalisés au noyau, ou encore en affectant leur liaison au promoteur à l'intérieur du noyau même. Ce processus requiert de la cystéine au domaine de liaison de l'ADN. En liant cet acide aminé nucléophile, l'acroléine peut affecter directement la transcription de ces facteurs ou indirectement, en diminuant le glutathion (Kehrer et Biswal, 2000). L'acroléine peut aussi exercer ses effets antiprolifératifs en se liant à l'ARN polymérase, causant ainsi une restriction sur la transcription (Moulé *et al.*, 1971; Horton *et al.*, 1997).

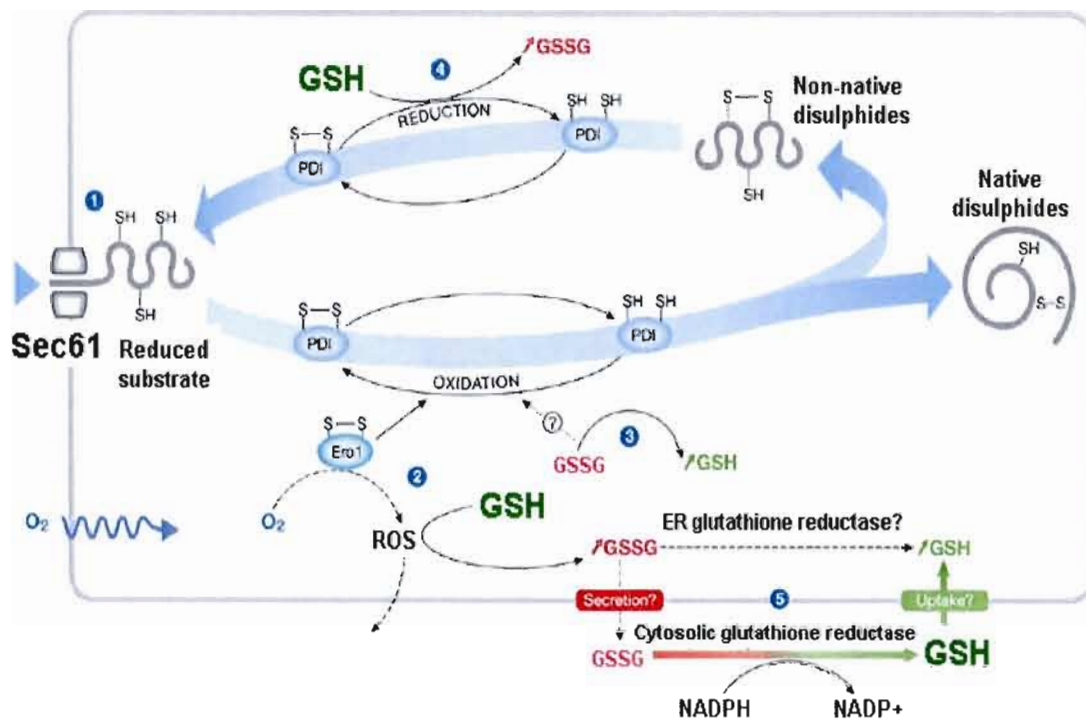


Figure 1.9 Voie de production et de régulation des formes réduites et oxydées du glutathion.

Protein disulphide isomerase (PDI) is used as an example of how the levels of reduced glutathione (GSH) or oxidized glutathione (GSSG) are maintained in the endoplasmic reticulum (ER). (1) Free cysteines are introduced into the ER in the form of newly translocated proteins. (2) Disulphide bonds are formed by PDI, which is reduced. PDI is oxidized by Ero1, which is oxidized by O_2 , a process that generates reactive oxygen species (ROS). Detoxification of ROS can lead to an increase in GSSG. PDI might also be oxidized by GSSG leading to an increase in GSH. (4) PDI is reduced by GSH, which leads to an increase in GSSG. (5) Influx and efflux of GSH or GSSG from the ER may control their ratio. Cytosolic GSSG is reduced by glutathione reductase. Similar activity might occur in the ER lumen (Chakravarthi et al., 2006).

1.3.6 Pathologies associées

L'acroléine est associée à plusieurs maladies respiratoires graves telles que l'asthme (Samet et Cheng, 1994), la MPOC (Hogg, 2001), qui inclue souvent la bronchite chronique et l'emphysème (Saetta, 1999), la FK (Samet et Cheng, 1994; Witschi *et al.*, 1997) et le cancer du poumon (Feng *et al.*, 2006). Les ROS générées par l'acroléine, comme l'anion superoxyde et le radical hydroxyl, sont responsables du déclenchement d'une inflammation chronique (Facchinetti *et al.*, 2007) et d'une hypersécrétion de mucus dans les voies respiratoires (Borchers *et al.*, 1999). De plus, lorsqu'inhalée, l'acroléine est une substance toxique, hautement sélective pour les voies respiratoires (Astry et Jakab, 1983; Aranyi *et al.*, 1986), induisant des lésions à tous les niveaux des voies aériennes (Beauchamp *et al.*, 1985). L'exposition à cet aldéhyde est aussi reconnue pour affecter les processus inflammatoires-immunitaires (Li, L. *et al.*, 1997a; Finkelstein *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2001) qui contribuent aux déficiences documentées dans la défense du poumon contre les infections chez les fumeurs (Jakab, 1977; Green, 1985).

L'acroléine a aussi la capacité d'initier la peroxydation lipidique (Patel, 1987; Adams et Klaidman, 1993), qui altère les lipides des membranes cellulaires. Cet aldéhyde a été identifié comme un des sous-produits cytotoxiques formés par cette peroxydation lipidique, mais tous les métabolites de cette réaction dont la malondialdéhyde et le 4-hydroxynonéal (HNE) ont la capacité de se lier de manière covalente aux protéines cellulaires, modifiant ainsi leurs fonctions (Calingasan *et al.*, 1999; Adibhatla *et al.*, 2006). En effet, les adduits acroléine-protéines ont été trouvés chez des patients souffrant de maladies chroniques qui sont soupçonnées d'être reliées en partie au stress oxydatif et à l'élévation de la peroxydation lipidique, telles que la néphropathie diabétique (Suzuki et Miyata, 1999), le Parkinson (Coyle et Puttfarcken, 1993), la maladie d'Alzheimer (Calingasan *et al.*, 1999; Arlt *et al.*, 2002) et l'athérosclérose (Uchida *et al.*, 1998b).

En conclusion, l'acroléine cause généralement une inhibition de la prolifération cellulaire (Agostinelli *et al.*, 1994; Agostinelli *et al.*, 1996; Biswal *et al.*, 2002) qui induit la mort par nécrose (Rudra et Krokan, 1999), par oncose (Kern et Kehrer, 2002) ou par

apoptose (Li *et al.*, 1997a; Nardini *et al.*, 2002; Tanel et Averill-Bates, 2005; Tanel et Averill-Bates, 2007a).

1.4 Nécrose

1.4.1 Introduction et propriétés morphologiques

Le nom *nécrose* provient du mot grec *νεκρός* signifiant la mort (Robert, 1991). C'est la forme principale de mort cellulaire lors d'accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou lors de déficits métaboliques (Malhi *et al.*, 2006). Le *tableau 1.4* décrit les caractéristiques métaboliques et morphologiques de la nécrose. Elle se distingue par des amas de cellules, qui agissent ensemble dans un tissu, où des dommages irréversibles se produisent à leur membrane plasmique, leur cytoplasme et parfois aussi leurs organelles telles que la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi qui se gonflent (Kroemer *et al.*, 2005) et commencent à se désintégrer rapidement (Grooten *et al.*, 1993; Fiers *et al.*, 1999; Potten et Wilson, 2004; Malhi *et al.*, 2006).

Dans la cellule nécrotique, c'est la déplétion de l'ATP qui est responsable du gonflement des organelles et des altérations au cytosquelette comme la formation de petites protrusions dans la membrane plasmique (Lemasters *et al.*, 1983; Gores *et al.*, 1990; Malhi *et al.*, 2006). De plus, l'ADN dans ce type de mort cellulaire se condense de manière irrégulière et se dégrade aléatoirement (Potten et Wilson, 2004; Festjens *et al.*, 2006), par la DNase I présente dans le milieu extracellulaire (Napirei *et al.*, 2004) ou par la DNase II des lysosomes (Tsukada *et al.*, 2001), formant ainsi différentes longueurs de fragments d'ADN (Higuchi, 2003). Après plusieurs minutes ou heures, un état métastable se développe, caractérisé par une dépolarisation mitochondriale, une désintégration lysosomale, une fuite bidirectionnelle d'anions et des échanges ioniques rapides (Herman *et al.*, 1988; Zahrebelski *et al.*, 1995; Malhi *et al.*, 2006). À ce moment, l'activité métabolique, la synthèse de protéines et leur phosphorylation cessent dans la cellule nécrotique (Potten et Wilson, 2004).

L'état métastable accélère la formation de protrusions et le gonflement de la cellule via les forces osmotiques (Malhi *et al.*, 2006) et culmine par la rupture des protrusions de la membrane plasmique (Herman *et al.*, 1988). Cette rupture est responsable de la perte des gradients électriques et ioniques à travers la membrane plasmique ainsi que de la dispersion des enzymes cytosoliques et des intermédiaires métaboliques dans le milieu extracellulaire (Malhi *et al.*, 2006). Le contenu de la cellule nécrotique relâché dans l'espace extracellulaire endommage les cellules avoisinantes et cause une forte réaction inflammatoire au tissu correspondant (Proskuryakov *et al.*, 2003; Potten et Wilson, 2004; Festjens *et al.*, 2006).

Tableau 1.4

Différences entre la mort cellulaire par apoptose et par nécrose

| Apoptosis | Necrosis |
|--|---|
| General | |
| Affects isolated cells | Affects clusters in cells |
| No inflammatory response | Inflammatory cells invade tissue |
| Metabolic | |
| Early increase in protein & RNA synthesis | Switching off protein synthesis and phosphorylation |
| Cell membrane remains intact | Cell membrane becomes leaky |
| Affected by protein & RNA synthesis inhibitors | |
| Endonuclease activation (calcium- & magnesium-dependent) | |
| ATP-dependent | ATP-depleted |
| Morphological | |
| Loss of cell to cell contact, early | Loss of cell contact, late |
| Shrinkage of cell | Swelling of cell (sodium ions and water taken up by cell) |
| Membranes remain intact (no enzyme leakage) | Membrane defects (internal & external) (enzymes leak out) |
| Organelle structure maintained, late | Organelle structure lost, early |
| Condensation of cytoplasm | Cytoplasm becomes clear |
| | Mitochondria swell and acquire dense bodies. |
| Condensation and margination of chromatin | Lysosomes disrupted (release of enzymes) |
| Sharp edges to chromatin masses | Irregular edges to chromatin masses. |
| Nuclear fragmentation | No fragmentation |
| Cytoplasmic budding and fragmentation | |
| Phagocytic removal | |

Légende : Les différences générales, métaboliques et morphologiques entre la mort cellulaire par apoptose et par nécrose sont décrites dans ce tableau (Potten et Wilson, 2004; Kroemer *et al.*, 2005; Festjens *et al.*, 2006).

1.4.2 Voies biochimiques

Les mécanismes moléculaires de la nécrose restent à clarifier, mais ils semblent être reliés au manque d'ATP dans la cellule (Eguchi *et al.*, 1997; Leist *et al.*, 1997; Kern et Kehrer, 2002). Les niveaux d'ATP cellulaire sont contrôlés par trois paramètres : la matière fournie (l'entrée de glucose), la synthèse d'ATP (principalement dans la mitochondrie) et sa consommation (Ueda et Fujita, 2004).

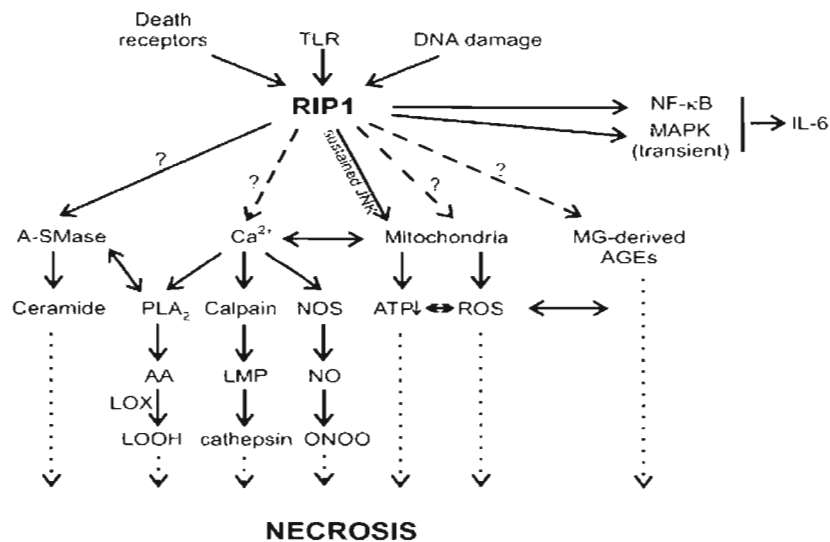


Figure 1.10 Voies biochimiques de la nécrose.

Necrotic cell death is the result of interplay between several signaling cascades. RIP1 appears to be a central initiator of necrosis. RIP1 has been implicated in the generation of ceramide upon TNF α -induced necrosis, and its kinase activity was shown to be crucial for Fas-, TNF-R1- and TRAIL-R-induced necrosis. Necrotically dying cells can actively release inflammatory cytokines due to the activation of NF- κ B and MAPKs, a process in which RIP1 is also implicated. ROS and Ca²⁺ are main players during the propagation and execution phases of necrotic cell death. ROS can be produced in the cytosol when the glycolytic rate is high, but mitochondria are the main producers of ROS. An increase in cytosolic Ca²⁺ concentrations can increase oxidative stress by activating NOS, or by affecting mitochondrial respiration. On the other hand, Ca²⁺ contributes to the activation of proteases, cPLA2 or lipoxygenases (LOX), which in turn disrupt organelle and cell integrity by damaging protein structures or lipid bilayers (Festjens *et al.*, 2006).

Pour ce qui est de la diminution de la synthèse d'ATP, elle semble être reliée à une surproduction de ROS et aux dommages subséquents aux membranes des mitochondries (Ueda et Fujita, 2004). Les ROS et le calcium sont les principales molécules impliquées dans les phases de propagation et d'exécution de la nécrose. Les ROS peuvent être produites dans

le cytosol si le taux de glycolyse est élevé, mais elles sont généralement formées par la mitochondrie. Les concentrations élevées en calcium cytosolique peuvent augmenter le stress oxydatif en activant l'oxyde nitrique synthétase (NOS) ou en affectant la respiration mitochondriale (Festjens *et al.*, 2006). Il a été démontré que la protéine BNIP3 (ou Nip3), une protéine cytotoxique de la famille Bcl-2 (lymphome de cellules B de type 2), ouvre les pores mitochondriaux de perméabilité transitoire (PTP) et s'en suit un influx d'eau et de calcium à la mitochondrie (Vande Velde *et al.*, 2000). Cette élévation de calcium mitochondrial stimule de manière excessive le cycle de Krebs, ce qui augmente l'influx d'électrons dans la chaîne respiratoire, causant ainsi une surproduction de ROS (Festjens *et al.*, 2006). Cette surcharge de calcium est aussi reliée à l'activation de la phospholipase A_2 calcium-dépendante (cPLA $_2$) et à la destruction de la membrane mitochondriale, rendant ainsi impossible la synthèse d'ATP (Malis et Bonventre, 1988; Ueda et Fujita, 2004).

L'activation excessive de PARP par des processus tels que l'ischémie-reperfusion, l'inflammation, les dommages induits par les ROS et l'excitotoxicité du glutamate, est liée à l'augmentation de la consommation d'ATP (Festjens *et al.*, 2006). Cette baisse du taux d'ATP affecte l'activité de la Na $^+$ -K $^+$ ATPase, qui consomme aussi 70% de l'ATP cellulaire. L'accumulation de sodium dans la cellule due à la diminution de l'activité de la Na $^+$ -K $^+$ ATPase cause un influx de calcium par l'échangeur Na $^+$ -Ca $^{2+}$. Cette baisse d'ATP affecte aussi l'activité de la Ca $^{2+}$ -Mg $^{2+}$ ATPase, ce qui diminue l'efflux de calcium. Donc, les problèmes osmotiques engendrés par les dommages à la balance ionique sont impliqués dans la destruction de la membrane plasmique (Ueda et Fujita, 2004). De plus, l'activation de protéases, la cPLA $_2$ ou les lipoxygénases (LOX), bouleversent à leur tour l'intégrité de la cellule par des dommages aux protéines ou aux bicouches lipidiques (Festjens *et al.*, 2006). Par exemple, ce surplus de calcium cytosolique mène à l'activation des calpains, protéases intracellulaires, qui médient la lyse des lysosomes (LMP) par le relâchement de cathepsines (Yamashima *et al.*, 1998; Festjens *et al.*, 2006).

Donc, la nécrose n'est pas due à une seule cascade de signalisation bien définie, mais elle est plutôt le résultat de l'interaction entre plusieurs mécanismes intracellulaires. La *figure 1.10* illustre cette affirmation. Le récepteur de protéine 1 sérine/thréonine kinase

(RIP1), qui possède un domaine de mort (DD), semble être l'initiateur central des voies biochimiques de la nécrose (Festjens *et al.*, 2006). Il a été impliqué dans la génération de céramides durant la nécrose induite par le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (Thon *et al.*, 2005) et son activité kinase est essentielle pour la nécrose induite par les récepteurs de mort tels que le récepteur associé au fibroblaste (FasR), le récepteur du facteur de nécrose tumorale 1 (TNF-R1) et le récepteur ligand inductible d'apoptose associé au TNF (TRAILR) (Holler *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2003). De plus, RIP1 est impliqué dans la mort cellulaire par nécrose induite par la stimulation des « toll-like receptor » (TLR) et par les dommages à l'ADN (Shen *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Finalement, en plus d'induire une réponse inflammatoire lors de la lyse et le déversement de leur contenu, les cellules nécrotiques peuvent aussi relâcher activement des cytokines inflammatoires (interleukine-6, IL-6) dû à l'activation de NF- κ B et des protéines kinases activées par mitogènes (MAPKs) (Vanden Berghe *et al.*, 2006), un processus qui implique aussi RIP1 (Kelliher *et al.*, 1998; Devin *et al.*, 2003; Lamkanfi *et al.*, 2005).

1.4.3 Lien entre nécrose et acroléine

C'est la grande réactivité de l'acroléine qui est à la base de sa cytotoxicité chez toutes les cellules exposées à de fortes concentrations, car elle cause une destruction massive de la structure et de la fonction cellulaire (Kehrer et Biswal, 2000; Kern et Kehrer, 2002). En effet, l'acroléine cause une inhibition de croissance (Marano et Puiseux-Dao, 1982), une augmentation de la perméabilité membranaire et une diminution du taux de glutathion (Grafstrom *et al.*, 1988; Patel et Block, 1993), de protéines sulfhydryles (Patel et Block, 1993) et des enzymes contenant des groupements thiols, en plus de la formation d'adduits avec l'ADN (Horton *et al.*, 1997). Par conséquent, de fortes doses d'acroléine, supérieures à 50 μ M, conduisent les cellules vers une mort par nécrose (Tanel et Averill-Bates, 2005).

1.5 Apoptose

1.5.1 Introduction et propriétés morphologiques

Le nom *apoptose* fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne et dérive des deux mots grecs, *apo* pour éloignement et *ptose* pour chute (Kerr *et al.*, 1972). Ce suicide cellulaire est un processus important et complémentaire à la mitose lors du développement embryonnaire, en plus du maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte et de la régulation du système immunitaire (Jacobson *et al.*, 1997; Schwarz *et al.*, 2007). Le *tableau 1.4* décrit les caractéristiques métaboliques et morphologiques de l'apoptose et démontre les différences entre cette mort cellulaire et la nécrose. Chez la cellule apoptotique, son activité métabolique est maintenue pour initialement modifier la synthèse de l'ARN et de certaines protéines et pour finalement moduler leur activation (Jeffrey *et al.*, 2002; Potten et Wilson, 2004; Malhi *et al.*, 2006). Par exemple, l'activation des récepteurs de mort recrute des protéines adaptatrices telles que RIP, qui stimule la « inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells » (IκB) kinase et la dégradation protéosomale d'IκB, permettant ainsi l'activation et la translocation nucléaire de NFκB (Barnhart et Peter, 2003; Malhi *et al.*, 2006). De son côté, NFκB induit l'augmentation de l'expression des gènes de survie comme le lymphome de cellules B extra long (Bcl-XL) et la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) (Yin et Ding, 2003b; Malhi *et al.*, 2006). De plus, l'apoptose est caractérisée par une série de changements morphologiques et biochimiques distincts chez la cellule tels que la perte de contact avec ses cellules avoisinantes, la fragmentation de l'ADN en 180-200 paires de bases par l'activation d'endonucléases, la condensation de la chromatine et du cytoplasme, l'exposition de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane plasmique, le rétrécissement du volume de la cellule, le maintien des structures des organelles et le bourgeonnement de la membrane cytoplasmique (Wyllie *et al.*, 1980; Potten et Wilson, 2004; Kroemer *et al.*, 2005). Éventuellement, la cellule apoptotique sera fractionnée en corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules avoisinantes et les macrophages (Malhi *et al.*, 2006).

La santé des organismes multicellulaires dépende de l'élimination des cellules endommagées ou indésirables tout au long de leur vie. Ceci est assuré par l'apoptose, qui est un processus actif nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP, où les cellules sont individuellement enrayerées de manière ordonnée et contrôlée, minimisant ainsi les réponses inflammatoires et la perte d'organelles dans l'espace extracellulaire (Malhi *et al.*, 2006). Par des signaux extracellulaires et intracellulaires, une grande variété de stimuli tels que les ligands des récepteurs de mort, les dommages à l'ADN et le retrait de facteurs de croissance peuvent initier les cascades de signalisation de l'apoptose (Antonsson, 2003; Festjens *et al.*, 2006; Malhi *et al.*, 2006). Trois voies de signalisation apoptotique ont été identifiées : une extrinsèque, les récepteurs de mort et deux voies intrinsèques, une impliquant la mitochondrie et l'autre le réticulum endoplasmique.

1.5.2 Voies apoptotiques

1.5.2.1 Voies des récepteurs de mort et du « cross-talk »

Les récepteurs de mort sont des récepteurs de cytokines à la surface des cellules appartenant à la superfamille du facteur de nécrose tumorale / facteur de croissance nerveux. Chez les mammifères, la majorité des membres de cette famille sont impliqués dans le développement, le maintien et le fonctionnement des cellules immunitaires et des organes lymphoïdiques secondaires, mais ils participent aussi dans d'autres processus comme l'homéostasie des os (Locksley *et al.*, 2001). Lorsque ces récepteurs de mort lient un ligand trimérique ayant une structure similaire ou certains anticorps spécifiques (ex. TNF α), ceci déclenche la voie de signalisation de l'apoptose (Nagata, 1997; Ashkenazi et Dixit, 1998; Locksley *et al.*, 2001; Mollinedo et Gajate, 2006).

Les ligands de cette famille TNF sont des protéines transmembranaires de type-II avec un domaine homotrimérique extracellulaire, homologue à la partie C-terminale du TNF, qui est fréquemment tronqué en une cytokine soluble (Bodmer *et al.*, 2002; Curtin et Cotter, 2003). Les récepteurs de mort sont normalement des protéines transmembranaires de type-I, caractérisés par la présence d'un à quatre domaines extracellulaires N-terminaux conservés

contenant deux à cinq motifs répétitifs riches en cystéine, une seule région transmembranaire et un domaine de mort intracellulaire, C-terminal aussi conservé d'environ 60 à 80 acides aminés, qui lient les protéines adaptatrices et initient l'apoptose (Idriss et Naismith, 2000; Guicciardi et Gores, 2003; Mollinedo et Gajate, 2006). Considérant qu'il existe plusieurs récepteurs de mort, seuls les mécanismes de signalisation des récepteurs transmembranaires de type-I TNF-R1 (Gray *et al.*, 1990) et Fas (Itoh *et al.*, 1991) seront décrits.

De façon générale, la transduction du signal par les récepteurs de mort est initiée, suite à la liaison du domaine extracellulaire avec son ligand et par l'agglomération du récepteur à la membrane plasmique, ce qui déclenche immédiatement la juxtaposition des domaines de mort intracellulaires (DD) (Curtin et Cotter, 2003; Malhi *et al.*, 2006; Mollinedo et Gajate, 2006). La *figure 1.11* montre de multiples mécanismes de mort déclenchés par la voie des récepteurs de mort. Pour la voie de signalisation du récepteur de mort Fas, cet évènement mène au recrutement de différentes protéines adaptatrices telles que la protéine associée au domaine de mort de Fas (FADD), le récepteur de protéine (RIP) et/ou la protéine associée au domaine de mort (Daxx) à la membrane plasmique, où elles peuvent s'associer au récepteur de mort par des interactions homophiliques entre les DD du récepteur et leur propre DD analogue. Par la suite, Daxx active la voie de signalisation Ask1-JNK kinase, qui conduira les cellules à mourir par apoptose de manière caspase-indépendente (Charette *et al.*, 2001; Song et Lee, 2003; Khelifi *et al.*, 2005).

En ce qui concerne la protéine adaptatrice RIP, elle peut initier deux voies de signalisation distinctes. RIP peut recruter la protéine associée au domaine de mort de RIP (RAIDD) ainsi que la procaspase-2 initiatrice aux agglomérations du récepteur Fas, ce qui activera cette caspase et conduira la cellule vers une mort par apoptose (Fan *et al.*, 2005; Lavrik *et al.*, 2006; Stevens et Maier, 2008). Par contre, RIP peut aussi initier la voie nécrotique, caspase-indépendente, médiée par la formation de ROS, telle que décrite à la section 1.4.2 (Holler *et al.*, 2000; Festjens *et al.*, 2006).

Pour ce qui est de la protéine adaptatrice FADD, contenant aussi un domaine effecteur de mort (DED), elle recrute des caspases (caspase-8 et/ou caspase-10) par association avec un

DED correspondant, situé dans le pro-domaine de la caspase initiatrice inactive (Guicciardi et Gores, 2003; Fan *et al.*, 2005). Le complexe qui résulte de toutes ces interactions est appelé le complexe inducteur de signal de mort (DISC) (Mollinedo et Gajate, 2006). La proximité de plusieurs molécules de caspases recrutées au récepteur de mort permet l'auto-activation de celles-ci, probablement par une faible activité protéolytique que possèdent les procaspases (Guicciardi et Gores, 2003; Fuentes-Prior et Salvesen, 2004). L'activation des caspases initiatrices entraîne une cascade d'activation de caspases effectrices (caspase-3, caspase-6 et caspase-7), qui sont directement ou indirectement responsables du clivage et de la dégradation de plusieurs protéines cellulaires essentielles à la survie de la cellule (polyADP-ribose polymérase (PARP), inhibiteur de la DNase activé par caspase (ICAD), lamin A, actine, fodrin, ...), et à l'exécution de cette mort (Guicciardi et Gores, 2003; Fan *et al.*, 2005; Timmer et Salvesen, 2007).

Une voie alternative pour les récepteurs de mort Fas et TNF-R1 est l'initiation de la dysfonction de la mitochondrie, communément appelée la voie du « cross-talk ». Les caspases-2, -8 et -10 initiatrices, activées par la voie des récepteurs, ont la capacité de cliver Bid (agoniste de mort interagissant par domaine BH3), une protéine cytosolique proapoptotique membre de la famille de Bcl-2, en tBid (Bid tronqué) (Fan *et al.*, 2005; Lavrik *et al.*, 2006; Stevens et Maier, 2008). Une fois tronqué, le tBid est transloqué à la mitochondrie et induit l'activation des caspases effectrices par le largage de facteurs proapoptotiques de la mitochondrie (Malhi *et al.*, 2006; Youle et Strasser, 2008).

La voie de signalisation du récepteur de mort TNF-R1 diffère de celle du récepteur Fas par les différentes caractéristiques suivantes. L'association de FADD et de RIP à l'agglomération du récepteur TNF-R1 requière une autre protéine adaptatrice, la protéine associée au TNF-R1 avec un domaine de mort (TRADD) (Strasser *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2005). De plus, le récepteur TNF-R1 peut initier une voie apoptotique caspase-indépendente médiée par la cathepsin B, qui amplifie le signal de mort via la voie apoptotique mitochondriale (Guicciardi *et al.*, 2000; Holler *et al.*, 2000; Sandes *et al.*, 2007).

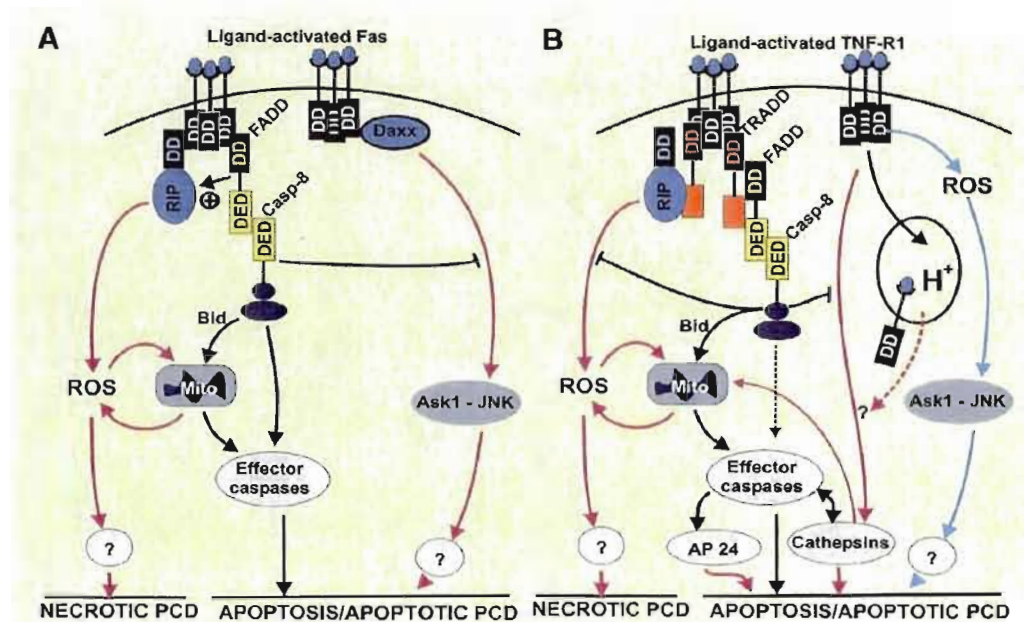


Figure 1.11 Multiples mécanismes de mort déclenchés par les récepteurs de mort.

Death-receptor signaling is initiated by ligand-induced receptor trimerization. (A) Receptor death domains (DD) of Fas then recruit FADD, RIP, and/or Daxx to the receptor complex. Caspase-8 is activated after recruitment to FADD via death effector domain (DED) interaction, and triggers effector caspases either directly or through a Bid-mediated mitochondrial pathway (black arrows) (Strasser *et al.*, 2000). RIP initiates a caspase-independent (red arrows) necrotic pathway mediated by the formation of ROS (Holler *et al.*, 2000). Daxx activates the Ask1-JNK kinase pathway leading to caspase-independent apoptosis (Yang *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998; Charette *et al.*, 2000; Charette *et al.*, 2001). (B) Tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) signaling differs from that of Fas on the following steps. 1) Binding of FADD and RIP to the receptor complex requires the adaptor protein TRADD (Strasser *et al.*, 2000). 2) Binding of Daxx to TNF-R1 has been demonstrated and the Ask1-JNK pathway is also activated by ROS (blue line, caspase involvement unclear) (Yang *et al.*, 1997; Shinoda *et al.*, 2003). 3) The RIP-mediated necrotic pathway is inhibited by caspase-8 (Holler *et al.*, 2000). 4) TNF-R1 can initiate a caspase-independent direct cathepsin B-mediated pathway (Holler *et al.*, 2000). 5) Cathepsin B can enhance the mitochondrial death pathway (Guicciardi, M.E. *et al.*, 2000). 6) The final execution of the death—that is, phosphatidylserine exposure, chromatin condensation, and loss of viability—is brought about by effector caspases, the serine protease AP24, or cathepsin B in a cell-type-specific manner (Wright *et al.*, 1997; Guicciardi, M.E. *et al.*, 2000; Strasser *et al.*, 2000; Foghsgaard *et al.*, 2001; Jäättelä *et al.*, 2003).

1.5.2.2 Voie mitochondriale

La voie de signalisation intracellulaire mitochondriale de l'apoptose peut être activée par une variété d'insultes cytotoxiques, telles que les infections virales, le dommage à l'ADN ainsi que la privation de facteurs de croissance, mais elle est strictement régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (Youle et Strasser, 2008). L'activation des membres proapoptotiques de cette famille, tels que la protéine X associée à Bcl-2 (Bax) ou tBid, induisent la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et causent le relâchement de ses protéines solubles dans le cytosol cellulaire. Ces protéines vont promouvoir l'activation des caspases et la mort cellulaire (Schwarz *et al.*, 2007; Youle et Strasser, 2008).

Le mécanisme précis par lequel ces protéines apoptogéniques, incluant le cytochrome c, l'endonucléase G (endoG), le facteur inducteur d'apoptose (AIF), la protéine liante de l'IAP avec un dérivé de la mitochondrie activateur de caspase (Smac/DIABLO) et la protéine A2 haute température requise / endoprotéase régulée par le stress (HtrA2/Omi) sont larguées de la mitochondrie au cytosol de la cellule, est encore controversé. Cependant, différents modèles ont été proposés, dont plusieurs impliquent la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie où le pore mitochondrial de perméabilité transitoire (PTP), formé d'une protéine « translocateur de nucléotide d'adénine » (ANT), d'un canal anionique voltage dépendant (VDAC), du récepteur de la benzodiazépine et de la cyclophiline D, semble avoir un rôle important (Belzacq *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Bras *et al.*, 2005). C'est l'ouverture du PTP qui est responsable de la dilatation de la mitochondrie et de la rupture de sa membrane externe, menant au largage non spécifique des protéines de son espace intermembranaire (Marzo *et al.*, 1998b; Bernardi *et al.*, 2006; Kinnally et Antonsson, 2007). Une variation de ce modèle a été proposée via la démonstration d'une interaction entre la protéine proapoptotique Bax avec ANT (Marzo *et al.*, 1998a; Schwarz *et al.*, 2007) et VDAC (Shimizu *et al.*, 2000; Banerjee et Ghosh, 2004; Schwarz *et al.*, 2007). Des investigations subséquentes sur les structures de Bax (Antonsson *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997), de Bcl-2 (Schendel *et al.*, 1997) et de Bid tronqué (Schendel *et al.*, 1999) ont révélé une habileté similaire à former des canaux dans la paroi de la membrane externe de la mitochondrie et à

réguler leur ouverture (Muchmore *et al.*, 1996; Minn *et al.*, 1997; Youle et Strasser, 2008). La *figure 1.12* illustre le rôle central de la mitochondrie dans la régulation de l'apoptose.

Une fois ouvert, le PTP permet le largage du cytochrome c dans le cytosol de la cellule où il se lie au facteur activateur de protéase apoptotique-1 (Apaf-1) (Liu *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997b; Youle et Strasser, 2008). Apaf-1 est une protéine cytosolique contenant un domaine recruteur de caspase (Tinel *et al.*) et un site de liaison nucléotidique. La formation du complexe Apaf-1 avec le cytochrome c augmente l'affinité pour le dATP, ce qui entraîne un changement de conformation dans la protéine Apaf-1 menant à son oligomérisation et à l'exposition de son domaine CARD (Adrain et Martin, 2001; Acehan *et al.*, 2002; Antonsson, 2003; Jin et El-Deiry, 2005). Par la suite, la procaspase-9 peut se lier à chacun des sept monomères d'Apaf-1 par des interactions CARD-CARD (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004). Ce complexe de haut poids moléculaire est un apoptosome et sa formation promouvoit l'activation de la caspase-9, due à l'augmentation de la concentration locale de la caspase-9 zymogène (Li *et al.*, 1997b; Zou *et al.*, 1999; Youle et Strasser, 2008). De plus, Apaf-1 semble avoir un rôle de régulateur allostérique de la caspase-9, car la caspase-9 protéolytique libre possède peu d'activité enzymatique (Murphy et Martin, 2003). Il semble que seul un monomère de chaque dimère de la caspase-9 soit catalytiquement actif (Renatus *et al.*, 2001; Acehan *et al.*, 2002). Une fois activée dans l'apoptosome, la caspase-9 propage la cascade de caspases par l'activation de la caspase-3 et de la caspase-7 (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004; Timmer et Salvesen, 2007). La caspase-3, à son tour, active la caspase-6 et ces deux dernières promouvoient l'activation des caspases-8 et -10 (Slee *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2005). La caspase-3 participe aussi à une rétroaction d'amplification qui promouvoit davantage l'activation de la caspase-9 (Srinivasula *et al.*, 1998; Slee *et al.*, 1999; Timmer et Salvesen, 2007). Donc, il est évident que lorsque la caspase-9 est activée dans l'apoptosome, il y a une amplification rapide du signal de mort apoptotique par l'activation d'une panoplie de caspases différentes (Murphy et Martin, 2003).

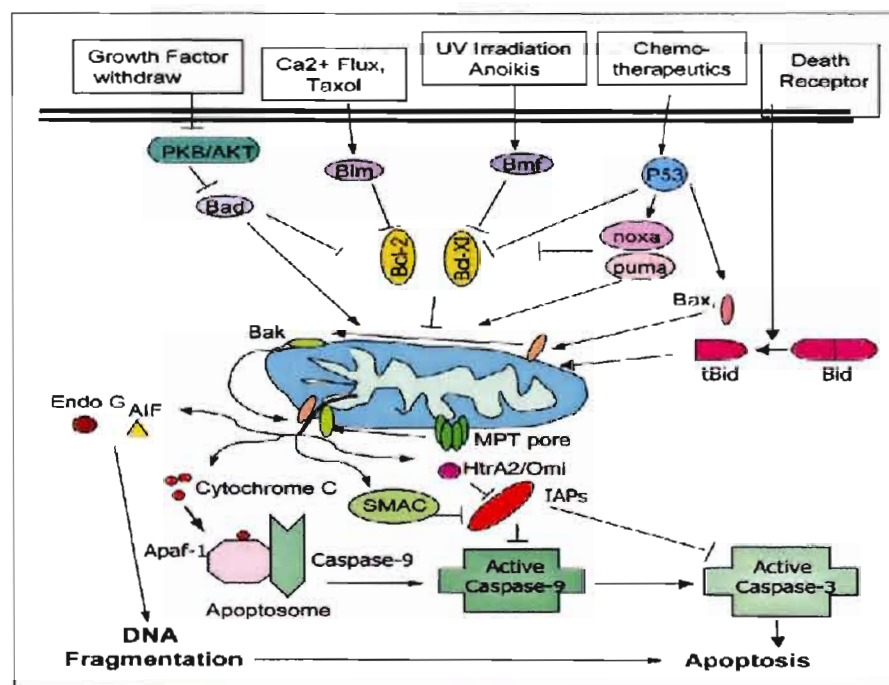


Figure 1.12 Illustration schématique du rôle central de la mitochondrie dans la régulation de l'apoptose (Jin et El-Deiry, 2005).

The BH3-only proteins, such as Bax and tBid, trigger apoptosis in response to developmental cues, insufficient trophic support, and intracellular damage. As for the loss of Bim, it renders cells refractory to cytokine deprivation, calcium flux, Taxol, and the T-cell receptor signals that kill selfreactive lymphocytes, but not to γ -irradiation (Harada et Grant, 2003). Conversely, the p53-induced Noxa and Puma may mediate the response to genotoxic damage. Additionally recent studies support a transcriptionally independent pathway involving localization of p53 to the mitochondria, followed by binding and inhibition of Bcl-x1 and/or bcl-2 or activating Bax directly (Chipuk et Green, 2003). As for Bad, it is regulated by its phosphorylation and sequestration by 14-3-3 proteins. Deprivation from growth factors or cytokines results in the inactivation of AKT (Datta *et al.*, 1997), which induces the dephosphorylation and activation of Bad. As for Bid, it remains inactive until cleaved to expose its BH3 domain. Cleavage of Bid in death receptor-mediated apoptosis results in its translocation to mitochondrial membranes (Luo *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998b). As for Bmf, it may have role in the suspension-induced apoptosis (anoikis) (Bouillet *et al.*, 1999).

Death signals activate some BH3-only members of the Bcl-2 protein family and other proteins, which in turn induce oligomerization of the pro-apoptotic, BH123 proteins like Bax and Bak to insert into the outer mitochondrial membrane (OMM) or to form a "megachannel" also known as the mitochondrial permeability transition pore (MPT pore) (Hampton et Orrenius, 1997). Bax and Bak appear to permeabilize the OMM, allowing efflux of apoptogenic proteins (Newmeyer et Ferguson-Miller, 2003). AIF and endoG are released from the mitochondria into the cytosol where they translocate to the nucleus and generate DNA fragmentation. Subsequent binding of released cytochrome c to Apaf-1 results in the formation of an apoptosome complex in the presence of ATP/dATP. The apoptosome can recruit procaspase-9 and thereby activate it through oligomerization which then leads to the activation of executioner caspase-3, -6 and -7 and ultimately to apoptosis (Zou *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b). As for inhibitors of apoptosis protein (IAPs), they act as a brake for apoptosis by inhibiting activated caspases. Smac/DIABLO and HtrA2/Omi bind IAPs in a manner similar to caspases, therefore functioning as competitive inhibitors (Du *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Hegde *et al.*, 2003).

Plusieurs protéines résident normalement dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et sont relâchées dans le cytosol lors de l'apoptose, où elles ont toutes un rôle soit dans l'initiation ou dans la propagation de la cascade signalétique de l'apoptose. Ces protéines peuvent être catégorisées en deux groupes. Le premier groupe unissant le cytochrome c, Smac/DIABLO et HtrA2/Omi active ou promouvoit l'activation des caspases (Youle et Strasser, 2008). Le second groupe, comprenant l'endoG et AIF, transloque au noyau et induit la dégradation de l'ADN indépendamment des activités des caspases (Jin et El-Deiry, 2005). Donc, les protéines relâchées de la mitochondrie peuvent initier au moins deux voies différentes de signalisation apoptotique, une caspase-dépendante et l'autre caspase-indépendante (Antonsson, 2003).

1.5.2.3 Voie du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est depuis peu considéré comme un régulateur crucial de la mort cellulaire, avec la découverte d'une caspase ancrée à sa membrane et de son activation par des agents qui ciblent spécifiquement le RE (Nakagawa *et al.*, 2000; Faitova *et al.*, 2006). Plusieurs conditions, comme la perte d'un environnement oxydant dans la lumière du RE ou de l'homéostasie du calcium, l'hypoxie/ischémie, la privation de nutriments et l'accumulation de protéines dans le RE, peuvent empêcher son bon fonctionnement et causer une accumulation de protéines dépliées (Faitova *et al.*, 2006). Ces protéines ont tendance à s'agréger par des interactions hydrophobiques et peuvent conduire à l'activation d'une réponse aux protéines dépliées (UPR) (Gething et Sambrook, 1992; Price et Calderwood, 1992; Faitova *et al.*, 2006).

La réponse UPR est une voie de signalisation qui sert à limiter l'accumulation de protéines dépliées au RE. Elle réduit la synthèse générale de protéines, mais active sélectivement l'expression de protéines ayant la capacité de faciliter les activités de chaperonne (Mori, 2000; Faitova *et al.*, 2006). Les premiers effets de l'activation de la réponse UPR sont désignés à protéger le RE, mais ils servent aussi à limiter les dommages aux autres organelles et à protéger l'organisme en éliminant les cellules exposées à un stress prolongé (Faitova *et al.*, 2006). Dans des conditions sévères de stress au RE où les cellules

ne peuvent s'adapter, la réponse UPR déclenche alors l'apoptose (Breckenridge *et al.*, 2003; Faitova *et al.*, 2006; Sundar Rajan *et al.*, 2007). La réponse UPR comporte au moins quatre systèmes distincts à ce jour (Liu et Kaufman, 2003; Sundar Rajan *et al.*, 2007). La *figure 1.13* démontre les voies de signalisation de la réponse du RE au stress.

Le premier système de la réponse UPR consiste en l'atténuation de la translation pour réduire la charge de la biosynthèse et donc prévenir l'accumulation additionnel de protéines dépliées (Sundar Rajan *et al.*, 2007). Trois récepteurs transmembranaires du RE, l'inositol requis 1 (IRE1), l'« activating transcription factor 6 » (ATF6) et le « PKR-like ER kinase » (PERK), répondent à l'accumulation de protéines dépliées dans le lumen. Elles sont normalement gardées dans un état inactif par une association avec la chaperonne, protéine de liaison luminale (BiP), dans le lumen. Dans les conditions de stress au RE, BiP se dissocie (lui permettant maintenant de lier les protéines dépliées) et IRE1 ainsi que PERK s'homooligomérisent et stimulent leur trans-autophosphorylation dans leurs domaines sérine/thréonine kinase (Breckenridge *et al.*, 2003; Faitova *et al.*, 2006). Dans le cas de PERK, son activation mène à la phosphorylation de l'« eukaryotic translation initiation factor » (eIF-2 α), qui a pour effet d'inhiber la synthèse générale de protéines (Sundar Rajan *et al.*, 2007) et d'arrêter le cycle cellulaire à la phase G1 (Shi *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 1999; Faitova *et al.*, 2006). PERK est aussi requis pour l'activation de NF- κ B, qui régule positivement les protéines antiapoptotiques comme Bcl-2 durant le stress au RE, contribuant ainsi à la balance entre les signaux de survie et de mort (Jiang et Wek, 2005; Faitova *et al.*, 2006).

Lors d'un stress au RE, la protéine BiP se dissocie aussi du domaine luminal de ATF6, permettant ainsi la translocation d'ATF6 à l'appareil de Golgi (Chen *et al.*, 2002), où elle sera clivée par deux protéases, S1P et S2P (site-1, -2 proteases) (Sundar Rajan *et al.*, 2007). Cette protéolyse expose le domaine cytosolique d'ATF6 qui migre alors au noyau cellulaire, où il transactive les promoteurs en aval (Faitova *et al.*, 2006). ATF6 induit la transcription de la « X-Box protein-1 » (XBP1) (Yoshida *et al.*, 2001; Sundar Rajan *et al.*, 2007).

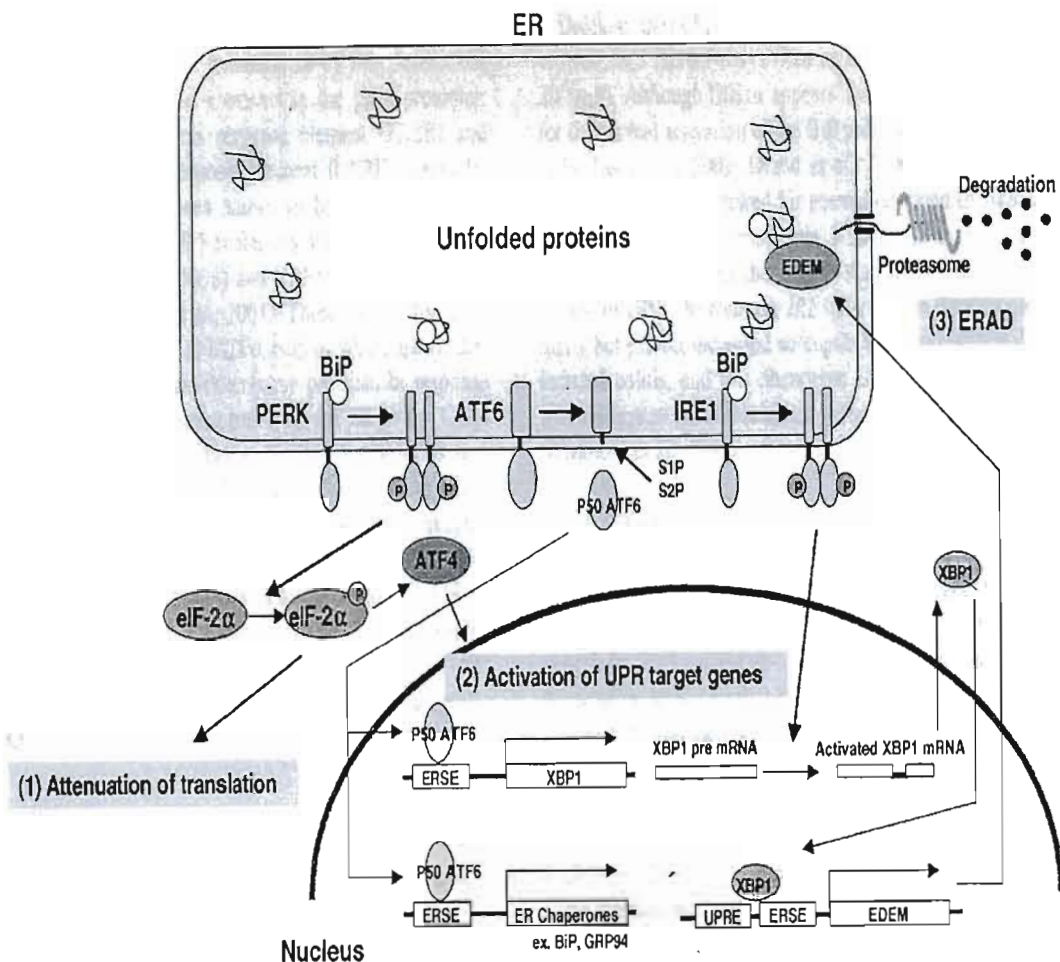


Figure 1.13 Le mécanisme de la réponse du RE au stress. The adaptive phase of the unfolded protein response. The coordinated action of three systems is required for the elimination of protein aggregates accumulating in ER stress. 1) The PERK/PKR, system upon protein aggregation, attenuates protein synthesis by phosphorylating the eIF2 α translational initiation factor. 2) Grp78, which inhibits translocation of ATF6 to the Golgi apparatus, dissociates from ATF6 and associates with aggregating proteins. The free ATF6 translocates to the Golgi, where it is activated by proteolysis. The active ATF6 enters the nucleus, where it initiates the expression of ER-localized chaperones and XBP1 transcription factor. The transcribed XBP1 mRNA is processed in the cytosol by the endonuclease activity of IRE1. The resulting mRNA is translated into a XBP1 protein with an active transactivation domain, which translocates to the nucleus and induces its own expression as well as that of other chaperones. 3) The ERAD (ER Associated Protein Degradation) mediates ubiquitination and elimination of denatured proteins from the ER (Szegezdi et al., 2003; Kadowaki et al., 2004; Faitova et al., 2006).

Pour IRE1, sa trans-autophosphorylation active son domaine cytosolique endonucléasique, qui peut alors cliver l'ARNm (acide ribonucléique messager) de XBP1 (Calfon *et al.*, 2002; Faitova *et al.*, 2006). Ceci cause une augmentation de l'expression des gènes de la dégradation associée au RE (ERAD) dont la « ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein » (EDE1), qui est impliquée dans la dégradation de protéines mal repliées (Yoshida *et al.*, 2003; Sundar Rajan *et al.*, 2007). De plus, le clivage de l'ARNm de XBP1 permet la synthèse du facteur de transcription à haute activité « basic-leucine zipper » (bZIP) qui stimule la transcription de gènes de protéines chaperonnes (exemple : BiP, GRP94) du RE (Lee *et al.*, 2003; Faitova *et al.*, 2006).

Le second système implique l'augmentation d'expression de gènes codants les protéines chaperonnes du RE telles que BiP/GRP78 et GRP94 (protéine de liaison luminale / protéine régulée par le glucose). Ce mécanisme permet d'augmenter l'activité du repliement de protéines et prévient leurs agrégations dans le RE (Sundar Rajan *et al.*, 2007).

Le troisième système est la dégradation de protéines mal repliées par l'ERAD. Les protéines mal repliées qui ne peuvent être repliées correctement dans le RE sont alors rétro-transloquées dans le cytosol et dégradées par le protéasome (Sundar Rajan *et al.*, 2007).

Le quatrième système est le mécanisme de signalisation apoptotique du RE déclenché lorsque le stress est trop sévère. L'apoptose dans le RE comporte au moins deux principales voies d'activation : l'une dépend de certains facteurs de transcription et l'autre est caspase-dépendante (Szegezdi *et al.*, 2003; Sundar Rajan *et al.*, 2007). La figure 1.14 illustre les mécanismes de signalisation apoptotique du RE.

Pour ce qui est de la première voie, IRE1, ATF6 et PERK sont soupçonnés d'avoir une fonction proapoptotique, possiblement par l'augmentation de la régulation du facteur de transcription, l'arrêt de croissance et dommage à l'ADN/C/EBP protéine homologue (GADD153/CHOP), qui peut, à son tour, amplifier le signal proapoptotique (Zinszner *et al.*, 1998; Sundar Rajan *et al.*, 2007). Ce mécanisme altère la balance entre Bcl-2 et Bax, en faveur de l'apoptose (Wang *et al.*, 1998; Ghribi *et al.*, 2001; Faitova *et al.*, 2006). Une autre

alternative est que IRE1 peut activer les éléments proximaux de la voie c-jun N-terminal kinase et induire l'apoptose en recrutant la protéine adaptatrice facteur 2 associée au TNFR (TRAF2) et la kinase « apoptosis signal-regulating kinase-1 » (ASK-1) (Urano *et al.*, 2000; Yoneda *et al.*, 2001; Sundar Rajan *et al.*, 2007).

Le RE peut aussi initier la mort cellulaire par l'activation des caspases. Cette voie, où la caspase-12 semble être en charge de la signalisation, est indépendante de celle de la mitochondrie et des récepteurs de mort. Des investigations sur le mécanisme d'activation de la caspase-12 ont révélé plusieurs modèles (Szegezdi *et al.*, 2003; Faitova *et al.*, 2006). La procaspase-12 pourrait interagir avec Ire1 α via la protéine adaptatrice TRAF2. Lors d'un stress au RE, la procaspase-12 serait libérée de TRAF2, formerait un homodimère et procéderait à une autoactivation (Yoneda *et al.*, 2001; Faitova *et al.*, 2006). Un autre mécanisme proposé serait que le largage de calcium du RE lors d'un stress activerait la calpain, qui, à son tour, serait transloquée du cytosol au RE et cliverait la procaspase-12 en caspase active (Rao *et al.*, 2001; Sundar Rajan *et al.*, 2007) et la protéine Bid, toutes deux pouvant contribuer à l'activation de la caspase-9 (Morishima *et al.*, 2002; Szegezdi *et al.*, 2003; Faitova *et al.*, 2006). En plus de ces mécanismes d'activation de la caspase-12, la caspase-7 peut aussi cliver la procaspase-12 au milieu de son prodomaine, ce qui entraîne son autoactivation (Rao *et al.*, 2001; Szegezdi *et al.*, 2003). Alors, l'activation de la caspase-12 est un processus complexe qui peut dépendre des types cellulaires et de la nature du stimulus apoptotique (Szegezdi *et al.*, 2003). Cependant, une fois activée, la voie de signalisation de la caspase-12 reste la même. Cette caspase initie une cascade de caspases, en clivant directement la procaspase-9, qui, à son tour, active la caspase-3 effectrice (Morishima *et al.*, 2002) et culmine à la mort cellulaire par apoptose (Sundar Rajan *et al.*, 2007).

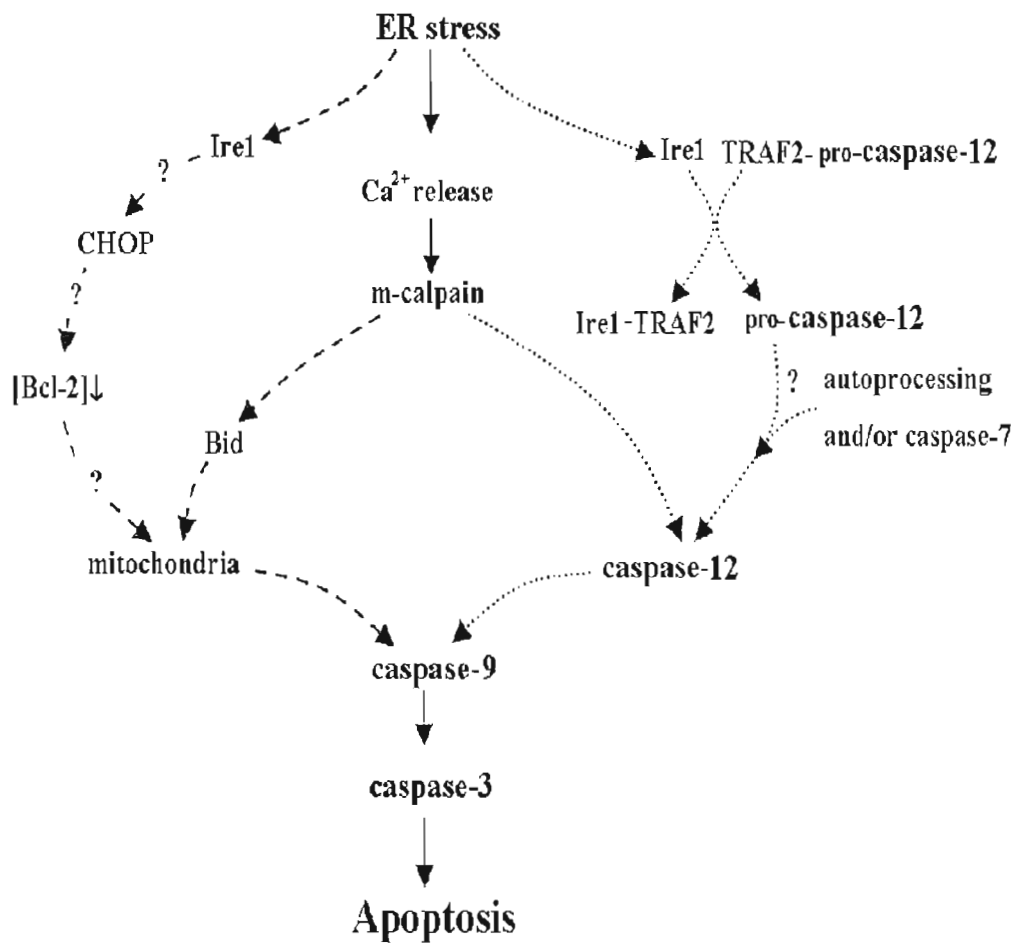


Figure 1.14 Voie apoptotique du RE.

The postadaptive phase of UPR. Upon prolonged ER stress the proapoptotic CHOP/GADD153 transcription factor is induced and activated. CHOP/GADD153 and/or other processes may be responsible for the down-regulation of Bcl-2, which results in mitochondrial cytochrome c release. A parallel pathway involving caspase-12 activation converges with the transcription-dependent pathway, both leading to caspase-9 and then caspase-3 activation, and finally cell death. Furthermore, disruption of calcium homeostasis can contribute to the activation of both pathways (Szegezdi et al., 2003; Sundar Rajan et al., 2007).

1.5.3 Famille Bcl-2

De multiples signaux apoptotiques peuvent modifier la conformation, l'activité et la localisation de plusieurs protéines de la famille Bcl-2, formant ainsi un réseau de signalisation intracellulaire qui maintient la balance délicate entre la vie et la mort (Adams et Cory, 2001; Yin *et al.*, 2003a; Lalier *et al.*, 2007). La famille Bcl-2, composée de groupes de protéines proapoptotiques et antiapoptotiques, est illustrée à la *figure 1.15*.

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être localisées à la mitochondrie de façon constitutive ou par induction (Gross *et al.*, 1999; Puthalakath et Strasser, 2002; Youle et Strasser, 2008). De plus, certaines de ces protéines ont aussi été retrouvées dans d'autres lieux subcellulaires tels que le noyau et le RE. Ainsi, elles peuvent donc réguler la contribution de ces organelles au processus apoptotique (Akao *et al.*, 1994; Lithgow *et al.*, 1994; Youle et Strasser, 2008). Par contre, les protéines de la famille Bcl-2 semblent contrôler l'apoptose principalement par leurs effets sur la mitochondrie (Yin *et al.*, 2003a; Youle et Strasser, 2008).

Un point commun des protéines de la famille Bcl-2 est qu'elles partagent toutes des séquences homologues dans quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1, 2, 3 et 4), mais ce ne sont pas tous les membres de cette famille qui possèdent tous les domaines (Hunter *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Lalier *et al.*, 2007). Des études ont révélé que ces domaines sont importants pour la fonction de ces différentes protéines et pour les interactions protéiques entre les membres de cette famille ou avec d'autres protéines. Les domaines BH1 et BH2 sont nécessaires pour la fonction de répression de la mort dans les molécules antiapoptotiques, tandis que le domaine BH3 est requis pour que les molécules proapoptotiques puissent accomplir leur rôle en provoquant la mort cellulaire (Gross *et al.*, 1999; Puthalakath et Strasser, 2002; Wang *et al.*, 2007). Pour ce qui est du domaine BH4, qui est principalement présent dans les protéines antiapoptotiques, il est aussi important pour les fonctions d'inhibition de la mort cellulaire (Denis *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

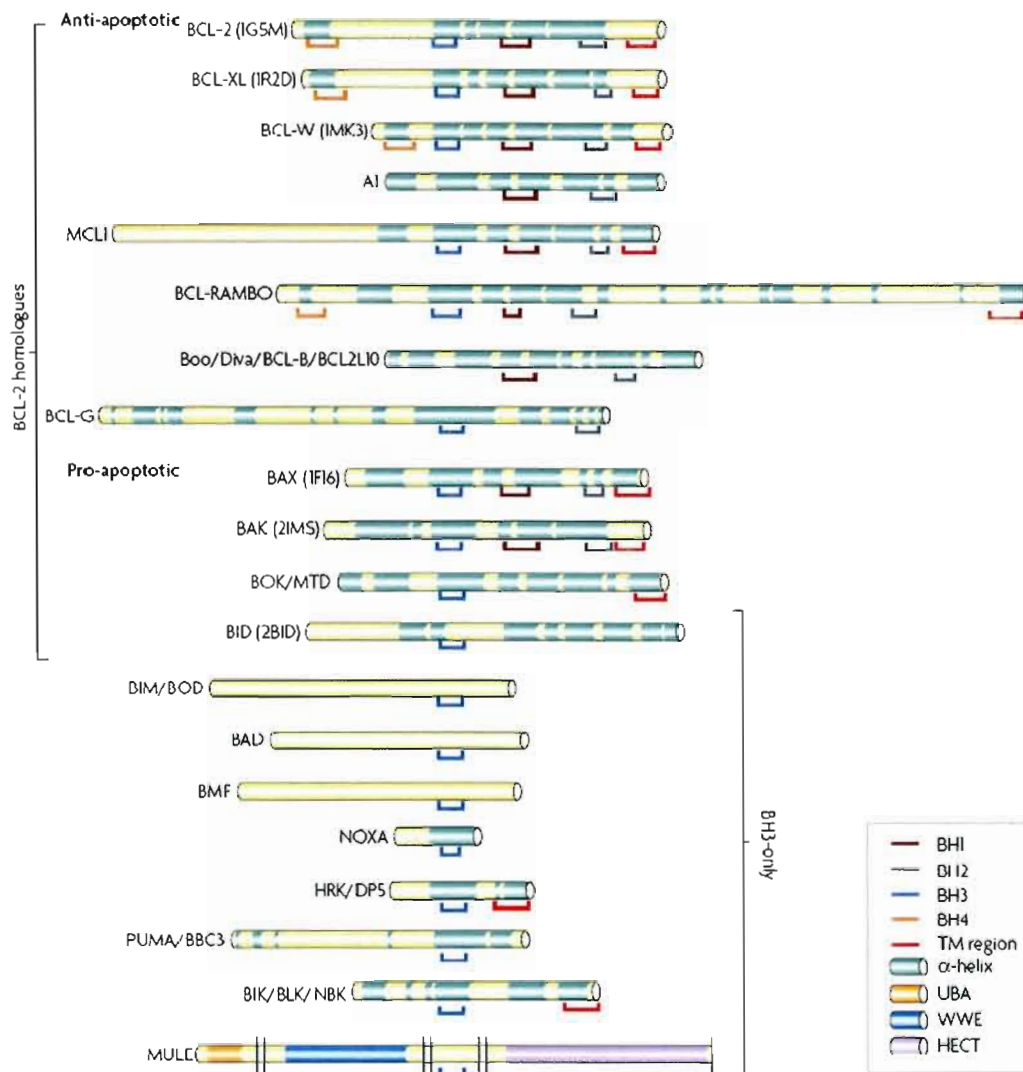


Figure 1.15 Représentation schématique de la structure des protéines de la famille Bcl-2 et des protéines à un seul domaine BH3.

Green bars depict α -helical segments from the determined structures (when labelled by Protein Data Bank (PDB) identified in parentheses) or from secondary structure prediction (as predicted using PSIPRED). Red lines label regions of predicted transmembrane (TM) domains (as predicted using TMHMM). Sequence homologies of the BH1 (brown lines), BH2 (grey lines), BH3 (blue lines) and BH4 (orange lines) regions are shown. The BH1, BH2 and BH3 domains fold to line a hydrophobic pocket that can bind BH3-only peptides. The BH3 domain, particularly among the BH3-only proteins, mediates interaction between the BH3-only proteins and core Bcl-2 family proteins and thereby promotes apoptosis. The upper five proteins (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, A1 and MCL1) are generally anti-apoptotic. The three proteins in the shaded area are less well studied and cannot be categorized at this time. The lower 12 proteins are considered to be pro-apoptotic. MULE contains a ubiquitin-associated domain (UBA), the Trp-Trp-Glu interaction module (WWE) and a HECT ubiquitin ligase domain. Bid has a unique role as both a Bcl-2 homologue and a BH3-only protein and links the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. BIM (also known as BOD), Bad and BMF are unstructured proteins (Youle et Strasser, 2008).

Le type d'interaction protéique le plus commun est l'interaction entre les membres antiapoptotiques et proapoptotiques de cette famille, tel que Bcl-2 versus Bax (Oltvai *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004; Youle et Strasser, 2008) ou Bid (Wang *et al.*, 1996; Youle et Strasser, 2008). Cette interaction peut mener à des actions antagonistes pour les deux types de protéines et par conséquent, pourrait déclencher un processus rhéostat de contrôle de la mort cellulaire, basé sur la balance délicate des facteurs pro-vie ou pro-mort (Oltvai et Korsmeyer, 1994; Jin et El-Deiry, 2005).

Un autre type d'interaction peut se produire entre deux membres proapoptotiques, habituellement avec une protéine à un seul domaine BH3 et une protéine à multiples domaines, comme par exemple Bid avec Bax (Wang *et al.*, 1996; Youle et Strasser, 2008) ou l'antagoniste/tueur homologue à Bcl-2 (Bak) (Wei *et al.*, 2000; Willis *et al.*, 2007; Youle et Strasser, 2008). De telles interactions pourraient être importantes dans l'activation des molécules exécutrices à multiples domaines, Bax ou Bak, par les protéines à un seul domaine BH3 qui peuvent déceler les signaux de mort périphériques (Cheng *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001; Willis *et al.*, 2007). Ce processus ressemble d'une certaine façon à la cascade de caspases, où la molécule initiatrice Bid activerait la molécule exécutrice Bax ou Bak.

Le dernier type d'interaction est la multimérisation de la même protéine de la famille Bcl-2. Ce phénomène a été décrit dans les deux types de protéines, les proapoptotiques (Gross *et al.*, 1998; Eskes *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000; Youle et Strasser, 2008) et les antiapoptotiques (Hanada *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004). Cette habileté de Bax ou de Bak à s'oligomériser est considérée comme un facteur important pour que ces protéines soient capables de former des canaux dans la paroi de la mitochondrie pour larguer les molécules proapoptotiques, comme le cytochrome c (Eskes *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000; Youle et Strasser, 2008). Tandis que, l'homodimère ou l'homo-oligomérisation de protéines antiapoptotiques permet d'amplifier leur bioactivité (Wang *et al.*, 2008a), par exemple une étude *in vitro* a démontré que les dimères de Bcl-2 peuvent encore interagir avec Bax et neutraliser ainsi l'activité proapoptotique de Bax (Zhang *et al.*, 2004).

En plus de la capacité d'ouvrir le PTP, les protéines de la famille Bcl-2 semblent avoir un autre rôle soit la régulation du transport de métabolites essentiels, comme l'ADP et l'ATP, à travers la mitochondrie et donc le contrôle indirect des fonctions de cette organelle (Vander Heiden *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2007). Il est donc primordial que les protéines de cette famille soient très bien régulées puisqu'elles ont un rôle important et décisif sur la vie ou la mort de la cellule.

Cette régulation des protéines de la famille Bcl-2 se fait via des modifications post-translationnelles, souvent par clivage protéolytique ou par phosphorylation (Yin *et al.*, 2003a; Youle et Strasser, 2008). Par exemple, lorsque la protéine Bid est activée par un clivage protéolytique médié par la caspase-8 active, sa forme tronquée (tBid) induira des dommages à la mitochondrie (Luo *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998b; Youle et Strasser, 2008). Un autre exemple est l'activation de la protéine antagoniste de mort cellulaire de Bcl-2 (Bad), par la perte de son groupement phosphate en réponse à une privation de facteurs de croissance, qui favorise la mort cellulaire par apoptose en antagonisant l'activité de Bcl-2 et de Bcl-xL (Zha *et al.*, 1996; Youle et Strasser, 2008).

Une autre façon de réguler l'activité des protéines de la famille Bcl-2 est par leur interaction avec d'autres types de protéines. Par exemple, la régulation de l'activité de la protéine Bad peut se faire via sa phosphorylation par les kinases Raf ou la protéine kinase B (AKT). Une fois phosphorylée, la protéine 14-3-3 ϵ viendra se lier à Bad et induira sa séquestration dans les membranes riches en cholestérol, empêchant ainsi sa fonction proapoptotique à la mitochondrie (Zha *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 1997; Rapp *et al.*, 2007). Un autre exemple d'interaction protéique implique le récepteur de cellules B associé à la protéine 31 (Bap31) au site du RE. Bap31, activé par la caspase-8 active, régule l'apoptose médiée par le RE en induisant la fragmentation des membranes cellulaires et le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie. Par contre, la liaison de Bap31 à Bcl-2 ou à Bcl-xL empêche son activation et sa fonction proapoptotique (Ng *et al.*, 1997; Stojanovic *et al.*, 2005; Faitova *et al.*, 2006).

1.5.4 Caspases

Les caspases (pour *cysteinyl-aspartate-cleaving proteases*) sont un groupe d'enzymes protéolytiques qui utilisent la cystéine comme groupement nucléophile pour le clivage de leurs substrats et brisent les liaisons peptidiques du côté carboxylique des résidus de l'acide aspartique (Cohen, 1997; Villa *et al.*, 1997; Nicholson, 1999; Timmer et Salvesen, 2007). Une fois activées, les actions coopératives des caspases produisent des changements à la cellule qui sont reconnus comme étant le phénotype de l'apoptose (Martin et Green, 1995; Nicholson et Thornberry, 1997; Salvesen et Dixit, 1997; Fan *et al.*, 2005).

Les caspases chez les mammifères peuvent être divisées en deux grandes familles : celles dont le rôle principal est la régulation des cytokines (caspases-1, -4, -5, -11, -13, -14 et -15) et celles qui ont un rôle central dans l'apoptose (voir *tableau 1.5*). La famille des caspases impliquées dans l'apoptose peut être subdivisée en caspases initiatrices et en caspases effectrices selon la longueur de leur prodomaine. La base de cette classification est que les caspases possédant de long prodomaine sont plus susceptibles d'agir comme caspases initiatrices, car elles peuvent être recrutées par des protéines activatrices de caspases (comme FADD ou Apaf-1) grâce au domaine recruteur de caspases (CARD, des caspases-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12) ou DED des caspases-8 et -10. Les caspases à plus petits prodomaines (caspases-3, -6, -7) ne peuvent faire d'interactions protéine-protéine et elles sont donc moins aptes à être activées hâtivement dans le mécanisme de mort par apoptose (Murphy et Martin, 2003; Fan *et al.*, 2005; Lamkanfi *et al.*, 2007).

Les caspases sont synthétisées sous forme de proenzymes inactives qui requièrent un clivage aux résidus aspartiques internes pour obtenir leur pleine activité catalytique. Leur structure est organisée en trois régions, un prodomaine, une sous-unité p20 et une p10 (Eckhart *et al.*, 2005). Toutes les caspases contiennent un pentapeptide entourant le site actif de la cystéine, formé d'une structure générale des acides aminés suivants : QACxG, où x est soit R, Q ou G (Murphy et Martin, 2003; Fan *et al.*, 2005). Lors de l'activation des caspases, il se produit deux clivages au niveau des liaisons Asp-X, un entre le prodomaine et la grande sous-unité et l'autre entre les deux sous-unités. Les caspases actives sont généralement

tétramériques, composées de deux grandes et de deux petites sous-unités, et possèdent donc deux sites actifs. La présence de ces résidus aspartiques internes aux sites de clivage permet à certaines caspases de s'autoactiver ou d'être activées par d'autres caspases, ce qui fait partie du processus d'amplification du signal de la cascade de caspases. Ces mécanismes d'activation de caspases semblent impliquer la formation de complexes contenant plusieurs procaspases, via l'intervention de protéines adaptatrices (Salvesen et Dixit, 1999; Shi, 2004; Lamkanfi *et al.*, 2007).

Tableau 1.5

Classification des caspases selon leur fonction

| Caspases (autres nomenclatures) | Fonctions |
|--|-----------------------------------|
| Caspase-1 (ICE) | Proinflammatoire |
| Caspase-2 (ICH-1) | Proapoptotique |
| Caspase-3 (CPP32, Yama) | Proapoptotique |
| Caspase-4 (ICErel II, TX, ICH-2) | Proinflammatoire |
| Caspase-5 (ICErel III, TY) | Proinflammatoire |
| Caspase-6 (Mch2) | Proapoptotique |
| Caspase-7 (Mch3, ICE-LAP3, CMH-1) | Proapoptotique |
| Caspase-8 (FLICE, MACH, Mch5) | Proapoptotique |
| Caspase-9 (ICE-LAP6, Mch6, APAF-3) | Proapoptotique |
| Caspase-10 (Mch4) | Proapoptotique |
| Caspase-11 | Proinflammatoire |
| Caspase-12 | Proapoptotique/ Proinflammatoire |
| Caspase-13 | Proinflammatoire |
| Caspase-14 (MICE) | Proinflammatoire |
| Caspase-15 | Proapoptotique / Proinflammatoire |

Légende: Les caspases-2, -8,-9, -10 et -12 sont des caspases initiatrices de la caspase protéolytique proapoptotique, qui mène à l'activation des protéases exécutrices de l'apoptose, les caspases-3, -6, et -7. Ces dernières clivent de nombreuses protéines requises pour la survie de la cellule. La fonction première des caspases-1, -4 et -5 en plus de leurs homologues non-humaines caspases-11 et -13 est de transformer les proformes de l'interleukine-1 β et interleukine-18 en deux cytokines proinflammatoires (Martinon et Tschoop, 2004). La caspase-14 est activée lors de la différenciation des kératinocytes épithéliaux, mais elle n'est pas impliquée dans les processus apoptotiques (Lippens *et al.*, 2000). La caspase-15 est une protéase proinflammatoire et proapoptotique, pouvant induire le clivage de Bid et de la procaspase-3 (Eckhart *et al.*, 2005).

L'activation des caspases cible différentes protéines cellulaires pour modifier et réguler leurs activités. Les caspases reconnaissent normalement les motifs DEVD, YVAD et DEAD (P4-P3-P2-P1) térapeptidiques de leurs substrats, en clivant le lien entre le résidu P1 et le côté C-terminal de l'acide aminé adjacent dans la chaîne peptidique (Nicholson et Thornberry, 1997; Villa *et al.*, 1997; Murphy et Martin, 2003). Plusieurs protéines du cytosquelette et/ou du noyau sont des substrats bien connus des caspases, comme la gelsoline (Kothakota *et al.*, 1997), la fodrine (Martin *et al.*, 1995b), les lamines A (Takahashi *et al.*, 1996) et B (Neamati *et al.*, 1995), la Gas2 (Brancolini *et al.*, 1995), la kératine 18 (Caulin *et al.*, 1997), la β -caténine (Brancolini *et al.*, 1997) et ICAD (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998), responsable de la dégradation de l'ADN une fois clivées. Le clivage de ces substrats contribue à la réorganisation du corps cellulaire et même dans certains cas, à la formation des corps apoptiques (Murphy et Martin, 2003; Fan *et al.*, 2005).

Pour maintenir une balance entre la vie et la mort de la cellule, une famille de protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) permet de réguler la cascade d'activation des caspases, le cycle cellulaire et la transduction du signal des récepteurs de mort. Les membres de cette famille sont capables d'abolir l'activité des caspases en les éliminant de la cellule par la voie de dégradation du protéasome via une ubiquitination et/ou en inhibant directement leur activité enzymatique (Riedl et Shi, 2004; Vaux et Silke, 2005; Eckelman *et al.*, 2006). À présent chez l'humain, les membres de la famille des IAP sont cIAP1 (protéine cellulaire inhibitrice de l'apoptose), cIAP2, hILP2 (human IAP-like protein 2), ML-IAP (melanoma IAP), XIAP (protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X), NAIP (protéine neuronale inhibitrice de l'apoptose), Survivin et Apollon. Tous les membres de cette famille contiennent un à trois domaines N-terminaux IAP répétés du baculovirus (BIR) et cinq d'entre eux contiennent à leur extrémité C-terminale un domaine RING (protéique « doigt à zinc »). Les domaines BIR sont responsables de l'abolition de l'activité enzymatique des caspases car ils bloquent leur poche catalytique. Pour ce qui est du domaine RING, il possède une activité ligase E3 de l'ubiquitine et il dirige alors la dégradation des caspases cibles par le protéasome (Fan *et al.*, 2005; Eckelman *et al.*, 2006; Mufti *et al.*, 2007).

1.6 Présentation du projet

1.6.1 Introduction

L'acroléine est un polluant omniprésent dans l'environnement et l'humain s'expose de façon considérable à cet agent toxique dans plusieurs situations. On retrouve l'acroléine dans notre alimentation, par exemple dans la vapeur d'huile de cuisson, et dans les produits de combustion organique. C'est un composé majeur de la fumée de cigarette, un produit généré lors de feux de forêt ou d'habitation et un constituant des gaz d'échappement des véhicules motorisés. De plus, ce produit toxique est utilisé en industrie comme matière première pour la fabrication de polymères d'acrylique, dans la production d'acide acrylique et comme herbicide. L'acroléine, un aldéhyde α,β -insaturé très réactif, est un des produits toxiques de la peroxydation des lipides endogènes lors d'un stress oxydatif. Le stress oxydatif a été impliqué dans plusieurs maladies pulmonaires et neurodégénératives. En plus, les patients traités avec la cyclophosphamide, un agent chimiothérapeutique pour le traitement de différents cancers, sont exposés à l'acroléine comme métabolite de ce produit. L'acroléine générée *in situ* est probablement responsable en grande partie de la toxicité de la cyclophosphamide et des dommages qu'elle cause aux tissus sains, comme dans le cas de la vessie. Plusieurs recherches ont été réalisées sur les effets biochimiques aigus de l'acroléine. Par contre, mon projet de recherche vise à investiguer divers mécanismes d'apoptose activés par de faibles doses d'acroléine chez la lignée cellulaire pulmonaire A549.

1.6.2 Choix du modèle

Pour approfondir les voies de signalisation de mort initiées par une exposition à l'acroléine, la lignée cellulaire A549 a été choisie. Il s'agit d'un adénocarcinome humain du type de cancer du poumon le plus répandu, « non à petites cellules ». Cette lignée a été isolée en 1972 et a été obtenue des cultures de l'«American Type Culture Collection» (ATCC). Le choix des cellules A549 comme modèle pour l'étude provient du fait qu'elles sont des cellules humaines, bien caractérisées, stables, immortelles, à prolifération rapide et d'origine pulmonaire.

L'exposition des cellules A549 à de faibles concentrations d'acroléine a été réalisée dans le milieu α -MEM avec 10% de FBS et non pas dans le milieu de culture DMEM car il est connu que l'acroléine réagit avec les composés du DMEM (Grafstrom, R.C., 1990; Horton, N.D. *et al.*, 1999). Cette exposition durait 30 minutes, 1, 2, 4 ou 24 heures à 37°C. Les concentrations d'acroléine variaient de 0 à 50 μ M pour représenter les concentrations retrouvées *in vivo*, puisque les niveaux estimés d'acroléine dans le sérum d'un humain sain peuvent atteindre 50 μ M (Sato *et al.*, 1999) et 80 μ M dans les fluides des voies respiratoires d'un fumeur (Eiserich *et al.*, 1995).

1.6.3 Objectifs spécifiques

Il est connu qu'à des concentrations non létales, l'acroléine diminue la prolifération des cellules pulmonaires cancéreuses humaines (Ramu *et al.*, 1996; Horton *et al.*, 1997; Rudra et Krokan, 1999) et induit l'apoptose chez certaines lignées cellulaires, telles que les macrophages alvéolaires (Li *et al.*, 1997a), ainsi que les cellules épithéliales des bronches (Nardini *et al.*, 2002). Récemment, chez les cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) en prolifération, il a été démontré que l'acroléine active la voie mitochondriale (Tanel et Averill-Bates, 2005) et la voie du récepteur de mort Fas (Tanel et Averill-Bates, 2007a) de l'apoptose. De plus, toujours chez les cellules CHO, il a été établi que l'acroléine médie l'induction de l'apoptose par p38 et par la kinase régulatrice de signal extracellulaire (ERK) de la voie de signalisation des MAPKs (Tanel et Averill-Bates, 2006). Par contre, chez les cellules CHO, cette induction de la mort cellulaire peut être inhibée par l'antioxydant N-acétylcystéine (Tanel et Averill-Bates, 2007b).

Considérant qu'il n'est pas nécessairement possible de faire des extrapolations entre les espèces, nous n'avons pas poursuivi les recherches dans un modèle animal. Étant donné la pertinence de l'exposition à l'acroléine pour la santé humaine, nous nous sommes attardés sur l'induction de l'apoptose et de ses mécanismes de signalisation chez les cellules pulmonaires humaines, soit le premier organe ciblé par une exposition à l'acroléine.

Par contre, ces études précédentes permettent d'élaborer certaines hypothèses. Il est donc probable que l'acroléine à faibles doses induit l'apoptose, par la voie du récepteur de mort Fas en plus de la voie mitochondriale chez les cellules A549 en prolifération.

L'objectif principal de cette recherche est d'évaluer les mécanismes de toxicité induits par l'acroléine *in vitro*, sur la lignée cellulaire tumorale A549. En premier lieu, on déterminera si l'acroléine induit la mort cellulaire soit par apoptose ou par nécrose. En second lieu, on investiguera si ces mécanismes de toxicité impliquent la voie du récepteur de mort Fas de l'apoptose et initie la dysfonction de la mitochondrie par la voie du « cross-talk ». En troisième lieu, l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose par l'acroléine sera évaluée.

1.6.4 Approches expérimentales

En premier lieu, les événements de la phase exécutive d'apoptose ont été déterminés par l'activation des caspases-3, -6 et -7 effectrices par fluorimétrie, et par le clivage d'un des substrats de ces caspases, le polyADP-ribose polymérase (PARP) par la méthode du Western blot, en utilisant l'anticorps spécifique correspondant (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). L'activité enzymatique de chaque caspase sera mesurée selon le protocole de Hampton et Orrenius avec quelques modifications (Hampton et Orrenius, 1997; Tanel et Averill-Bates, 2005) en utilisant un substrat fluorescent pour chacune d'elles (les substrats employés sont mentionnés au *tableau 1.6*). En ajoutant en excès ce substrat à un lysat de cellules, il est possible de suivre la réaction cinétique d'une caspase active par fluorimétrie. Lorsque la caspase active rencontrera son substrat, elle le clivera pour libérer ainsi une petite molécule (AMC (7-amino-4-méthylcoumarin), AFC (7-amino-4-trifluorométhylcoumarin) ou MCA (7-méthoxy coumarin-4 acetyl)) pouvant être détectée par le fluorimètre. L'activité enzymatique de la caspase est proportionnel à la fluorescence émise par ces petites molécules.

Tableau 1.6

Liste des substrats fluorescents pour mesurer l'activité enzymatique de chacune des caspases

| Caspases | Substrats |
|-----------------|-----------------------------------|
| Caspase-2 | Z-VDVAD-AFC |
| Caspase-3 | Ac-DEVD-AMC |
| Caspase-6 | Ac-VEID-AMC |
| Caspase-7 | MCA-VDQVDGWK(DNP)-NH ₂ |
| Caspase-8 | Z-IETD-AFC |
| Caspase-9 | Ac-LEHD-AFC |

Légende : L'activité enzymatique de chaque caspase est mesurée selon le protocole de Hampton et Orrenius avec quelques modifications (Hampton et Orrenius, 1997; Tanel et Averill-Bates, 2005).

De plus, cette phase exécutive de l'apoptose sera suivie au microscope à fluorescence pour la condensation de la chromatine dans le noyau cellulaire grâce à la molécule de Hoescht No. 33258 (Lee et Shacter, 1997; Tanel et Averill-Bates, 2005) et en cytométrie de flux pour l'exposition de la phosphatidylsérine à la membrane cytoplasmique externe de la cellule par marquage à l'annexin V-FITC (van Engeland *et al.*, 1998; Averill-Bates *et al.*, 2005). L'iodure de propidium (PI), imperméable à la membrane plasmique (coloration rouge en microscopie à fluorescence), a été utilisé dans ces deux méthodes comme indicateur pour la nécrose.

Le Hoescht No. 33258 est un colorant fluorescent perméable aux membranes cellulaires et est reconnu pour s'intercaler entre les bases d'ADN, donnant ainsi une coloration bleutée au noyau cellulaire en microscopie à fluorescence. Le comarquage au Hoescht et au PI nous permet de classifier les cellules selon différents critères. Les cellules vivantes ne peuvent être marquées au PI car leur membrane plasmique est intacte, mais le Hoescht les pénètre et marque légèrement leur noyau avec une chromatine structurée, à coloration bleu pale. Les cellules apoptotiques ont une membrane plasmique intacte et ne peuvent pas être marquées au PI, mais le Hoescht les pénètre et marque fortement leur noyau car la chromatine est maintenant condensée ou fragmentée, ce qui donne une coloration bleu intense. Les cellules nécrotiques ont une membrane plasmique perforée, alors le PI peut

maintenant les pénétrer et s'intercaler entre les bases d'ADN, donnant ainsi une coloration rouge avec un noyau élargi ayant une structure lisse et normale.

Pour ce qui est de l'annexin V-FITC, elle a une grande affinité pour la phosphatidylsérine (PS) des bicouches lipidiques, mais elle ne peut pas franchir la membrane plasmique (van Engeland *et al.*, 1998). Lors de l'apoptose, la PS, qui était normalement à la surface interne de la membrane plasmique, est transloquée la surface externe, où l'annexin V peut maintenant la lier. Grâce au comarquage annexin V-FITC et PI, il est possible de distinguer quatre populations de cellules par cytométrie de flux sur deux détecteurs différents. Les cellules vivantes ne sont pas fluorescentes car leur membrane plasmique est intacte et ne subissent aucun marquage. Les cellules apoptotiques à membrane plasmique intacte expriment la PS à la surface extracellulaire et sont donc marquées par l'annexin V. Les cellules apoptotiques à membrane plasmique perforée expriment la PS à la surface extracellulaire et sont donc comarquées par l'annexin V et le PI. Les cellules nécrotiques ont une membrane plasmique perforée mais n'expriment pas la PS à la surface extracellulaire, donc elles ne sont marquées que par le PI.

Nous allons aussi étudier l'effet de l'acroléine sur le cycle cellulaire des cellules A549 en cytométrie de flux pour évaluer si ce polluant peut accumuler les cellules dans une phase du cycle cellulaire et/ou induire la fragmentation de l'ADN (Krishan, 1975).

En second lieu, le rôle de la voie du récepteur de mort Fas sera démontrée par la translocation des protéines adaptatrices FADD et RIP du cytosol à la membrane cytoplasmique par fractionnement cellulaire suivi de la méthode du Western blot (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). De plus, l'activation des caspases-2 et -8 a été évaluée par fluorimétrie (Hampton et Orrenius, 1997; Tanel et Averill-Bates, 2005). Nous allons aussi vérifier si une exposition à l'acroléine peut induire des variations d'expression du récepteur Fas (Cifone *et al.*, 1994) et de son ligand FasL (Kayagaki *et al.*, 1995) pour promouvoir la voie apoptotique par cytométrie de flux (Filion *et al.*, 2004). À l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents tels que (FITC)-étiqueté anti-FasR et (PE)-étiqueté anti-FasL, il est possible de suivre leur modulation d'expression à la surface extracellulaire des cellules exposées à l'acroléine par

rapport aux cellules non traitées grâce à la cytométrie de flux. Cet appareil mesure l'intensité de fluorescence présente chez 10 000 cellules et plus cette intensité est élevée, plus il y a d'anticorps fixés sur ces cellules et donc plus il y a de récepteurs Fas ou de ligands FasL à leur surface extracellulaire.

Afin de déterminer si la voie de « cross-talk » entre les voies des récepteurs de mort et de la mitochondrie est aussi activée, le clivage de la protéine pro-apoptotique Bid en tBid et sa translocation à la membrane mitochondriale seront évalués par fractionnement cellulaire suivi de la méthode du Western blot (Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

En troisième lieu, la voie mitochondriale sera démontrée par différents facteurs. Le changement du potentiel de sa membrane et l'augmentation de la production de ROS, suite à une exposition à l'acroléine, seront démontrés en cytométrie de flux par le colorant Rho123 (Rhodamine 123) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005) et la sonde H₂DCFDA (Denning et al., 2002), respectivement. La Rho123 est un colorant cationique lipophile. L'incorporation du colorant dépend principalement du potentiel de membrane (en raison de sa charge). Le potentiel interne de la mitochondrie étant 2 à 3 fois plus élevé que celui de la membrane plasmique, l'accumulation du colorant est majoritairement mitochondriale. La Rho123 se fixe aussi dans une moindre mesure en fonction de sa solubilité dans la membrane interne de la mitochondrie et dans la matrice. Cette fixation potentielle dépendante s'accompagne d'un « quenching » de fluorescence et d'un léger déplacement des spectres d'excitation et d'émission, ce phénomène est mis à profit pour effectuer des mesures quantitatives du potentiel de membrane mitochondrial (Shapiro, 1994). Par conséquent, plus l'intensité de fluorescence est faible, moins il y a de Rho123 à la mitochondrie, et plus le potentiel de membrane mitochondrial est faible. De son côté, le H₂DCFDA est une sonde spécifique aux ROS et perméable aux membranes cellulaires. Elle devient fluorescente seulement au moment où ses groupements acétates sont clivés par les estérases intracellulaires lors d'un stress oxydatif. Donc, plus l'intensité de fluorescence en cytométrie est élevée, plus il y a de H₂DCFDA clivés et plus il y a de ROS.

La libération des facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie au cytosol a été réalisée par fractionnement cellulaire et par Western blot, où il a été possible de suivre l'impact d'une exposition à l'acroléine sur la translocation de différentes protéines telles que le cytochrome c et l'AIF (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Il a aussi été possible d'étudier le ratio de Bax versus Bcl-2 par cytométrie de flux (Del Poeta *et al.*, 2003; Fillion *et al.*, 2004) et en plus, l'activation de la caspase-9 par fluorimétrie (Hampton et Orrenius, 1997; Tanel et Averill-Bates, 2005). Il a été suggéré que le ratio Bax/Bcl-2 était plus important que la modulation de l'expression de ces deux protéines individuelles pour déterminer si la mort par apoptose sera initiée (Stoetzer *et al.*, 1996). Par contre, les techniques conventionnelles telles que l'immunocytochimie et le Western blot, ne peuvent pas donner un résultat quantitatif et elles sont donc inadéquates pour calculer le ratio Bax/Bcl-2 (Ong *et al.*, 2000). La cytométrie de flux est particulièrement bien adaptée pour la mesure précise, semiquantitative de l'expression de Bax et de Bcl-2, ainsi que pour l'estimation de l'hétérogénéité cellulaire (Campos *et al.*, 1993; Ong *et al.*, 2000). En fait, il est possible de fixer et de perméabiliser les cellules pour détecter intracellulairement l'expression totale de Bax et de Bcl-2 en utilisant des anticorps monoclonaux fluorescents spécifiques à ces deux protéines par cytométrie, permettant ainsi de calculer le ratio (Del Poeta *et al.*, 2003).

En conclusion, puisqu'il y a peu d'études sur la voie de signalisation biochimique que ce polluant déclenche, il est important de poursuivre les recherches pour augmenter nos connaissances sur l'acroléine, considérant l'étendue de l'exposition des humains à cet agent toxique et de ses impacts sur la santé humaine. Ces études sur la toxicité de l'acroléine sont pertinentes dans plusieurs contextes affectant la santé humaine, comme l'action pharmacologique et/ou les effets secondaires de la cyclophosphamide, un agent anticancéreux où l'acroléine est l'un de ses métabolites, la régulation de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale par les polyamines, les maladies pulmonaires graves et neurodégénératrices (maladie d'Alzheimer), ainsi que la toxicité provenant d'expositions environnementales aux faibles doses d'acroléine.

CHAPITRE II. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

2.1 Préface

Ce chapitre inclut un article scientifique décrivant les résultats expérimentaux de ce projet, qui a été réalisé au cours des deux années dans le laboratoire de la Dre Diana A. Averill-Bates. Le manuscrit intitulé "*A549 Adenocarcinoma Cells Undergo Apoptosis by Activation of the Death Receptor Pathway upon Exposure to Acrolein*" sera soumis sous peu à la revue *Chemico-Biological Interactions*. Ce manuscrit a été rédigé par moi-même et a été révisé par la Dre Diana A. Averill-Bates. De plus, j'ai effectué toutes les expériences pour cet article, à l'exception des résultats présentés à la Figure 9 portant sur la PEG-catalase, qui ont été réalisés par Ahmed Bettaieb. Cette étude *in vitro*, sur la lignée cellulaire tumorale A549, porte sur l'évaluation des mécanismes de toxicité induits par l'acroléine et sur la voie apoptotique du récepteur de mort Fas qu'elle déclenche.

2.2 Article

A549 ADENOCARCINOMA CELLS UNDERGO APOPTOSIS BY ACTIVATION OF THE DEATH RECEPTOR PATHWAY UPON EXPOSURE TO ACROLEIN

Julie Roy, Ahmed Bettaieb and Diana A. Averill-Bates^{1,2}

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

¹To whom correspondence should be addressed

²Formerly Dr Diana A. Bates

Acknowledgments: Financial support was obtained from CIHR (Canadian Institutes of Health Research) (DAB). JR gratefully acknowledges financial support from the Bourse Francine Beaudoin-Denizeau, Fondation UQAM, FRSQ (Fonds de la recherche en santé du Québec), and CIHR. The authors thank Yulia Zilber and André Tanel for technical assistance.

Abbreviations: Bax: Bcl-associated X protein; Bcl-2: B-cells lymphoma 2; Bid: BH3-interacting domain death agonist; BSA: bovine serum albumin; CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; DISC: Death-inducing signaling complex; DMEM: Dulbecco's modification of Eagle's medium; DTT: dithiothreitol; EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid; ERK: extracellular signal-regulated kinase; FACS: Fluorescence activated cell sorter; FADD: Fas associating death domain; FasR: Fibroblast-associated receptor; FasL: Fas ligand; FBS: fetal bovine serum; FITC: Fluorescein isothiocyanate; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; α MEM: minimum essential medium alpha; MOPS: 3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid; PARP: Poly(ADP-ribose) polymerase; PBS: phosphate-buffered saline; PE: phycoerythrin; PI: propidium iodide; PIDD: p53 induced protein with a death domain; PS: phosphatidylserine; PVDF: polyvinylidene difluoride; RAIDD: RIP-associated ICH-1/Ced-3 homologous protein with a death domain; RIP: receptor-interacting protein; ROS: reactive oxygen species; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; tBid: truncated Bid; TNFR: tumor necrosis factor receptor; TRAIL: TNF-related apoptosis- inducing ligand.

Running title: Acrolein and Apoptosis

2.3 Résumé

L'acroléine est un polluant omniprésent dans l'environnement et l'humain s'expose de façon considérable à cet agent toxique dans plusieurs situations. On retrouve l'acroléine dans notre alimentation, par exemple dans la vapeur d'huile de cuisson, et dans les produits de combustion organique. L'acroléine, un aldéhyde *alpha,beta*-insaturé très réactif, est un des sous-produits toxiques de la peroxydation des lipides endogènes lors d'un stress oxydatif. La peroxydation des lipides a été impliquée dans plusieurs désordres, dont certaines maladies pulmonaires, cardiaques et neurodégénératives. Notre laboratoire a concentré ses efforts sur l'évaluation des mécanismes de toxicité induits par l'acroléine *in vitro*, sur la lignée cellulaire A549, un adénocarcinome pulmonaire humain. Plus précisément, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose par l'acroléine via la voie du récepteur de mort Fas. L'exposition des cellules A549 à l'acroléine (0 à 50 μM) a causé une augmentation de l'expression du ligand FasL et la translocation des protéines adaptatrices FADD et RIP à la membrane plasmique. À ces concentrations subléthales, l'acroléine a induit l'activation des caspases initiatrices, caspases-2 et -8. De plus, la voie du « cross-talk » entre les récepteurs de mort et la mitochondrie est initiée par le clivage de Bid. L'acroléine a aussi causé l'augmentation de l'activation de p53 par phosphorylation et déclenché la phase d'exécution de l'apoptose chez les A549 par l'activation de la caspase-7 effectrice, l'externalisation de la phosphatidylsérine et la condensation de la chromatine nucléaire. La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène induite par l'acroléine est responsable de l'augmentation du ligand FasL et de l'activation de la caspase-8. Cette étude démontre que l'acroléine induit la voie extrinsèque de l'apoptose. Ces études améliorent nos connaissances sur les mécanismes de toxicité de cet aldéhyde, qui a des répercussions importantes sur la santé humaine.

MOTS CLÉS : Acroléine, apoptose, récepteurs de mort, caspase, Bid.

2.4 Abstract

Acrolein is an omnipresent environmental pollutant to which humans are exposed in many situations. It is present in food, vapors of overheated cooking oil, and is a product of organic combustion. Acrolein, a highly reactive *alpha,beta*-unsaturated aldehyde, is a toxic by-product of endogenous lipid peroxidation resulting from oxidative stress. Lipid peroxidation has been implicated in many pulmonary, cardiac and neurodegenerative diseases. The aim of this study is to evaluate the toxic mechanisms induced by acrolein *in vitro*, in human lung adenocarcinoma A549 cells. More precisely, we investigated the mechanisms implicated in the induction of apoptosis by acrolein via the death receptor pathway. Exposure of A549 cells to acrolein (0 to 50 μ M) caused upregulation of Fas ligand (FasL) and translocation of adaptor proteins FADD and RIP to the plasma membrane. Acrolein induced activation of the initiator caspases-2 and -8. Moreover, the cross-talk between the death receptor and the mitochondria was initiated by the cleavage of Bid. Acrolein also caused activation of p53, and triggered the execution phase of apoptosis by activation of effector caspase-7, externalization of phosphatidylserine and condensation of nuclear chromatin. Increased production of reactive oxygen species induced by acrolein appeared to be responsible for upregulation of FasL and caspase-8 activation. This study demonstrates that acrolein induces the extrinsic pathway of apoptosis in A549 cells. These findings increase our knowledge on the toxic mechanisms of this aldehyde, which has important repercussions for human health.

KEYWORDS: Acrolein, Apoptosis, Death Receptor, Caspase, Bid.

2.5 Introduction

Acrolein, an α,β -unsaturated aldehyde, is an omnipresent environmental pollutant and humans are exposed to this compound in many situations (Kehrer et Biswal, 2000). It is released naturally to the atmosphere as a product of fermentation, ripening processes, and generated during forest and house fires as a product of the incomplete combustion of organic material (Beauchamp *et al.*, 1985). A major source of acrolein generation is cigarette smoke and second-hand smoke. In addition to exogenous sources of exposure, acrolein is also produced *in situ*, during the normal intermediary catabolism of various amino acids and polyamines (Alarcon, 1976) and when allylic alcohol or cyclophosphamide are metabolized (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). Furthermore, acrolein is a product and initiator of lipid peroxidation associated with oxidative stress (Kehrer et Biswal, 2000). Acrolein, by depleting antioxidant defenses such as glutathione (Yang *et al.*, 2004) and increasing generation of reactive oxygen species (ROS), causes an increase in oxidative stress (Luo et Shi, 2004).

Acrolein is mutagenic and genotoxic to bacterial and human cells (Kehrer et Biswal, 2000). This has been attributed to its highly reactive and extremely electrophilic properties (Beauchamp *et al.*, 1985), which permits it to bind cellular nucleophiles (Kehrer et Biswal, 2000). Acrolein can mediate cigarette smoke induced macrophage activation, which could be responsible for the induction of chronic inflammation (Facchinetti *et al.*, 2007) and mucus hypersecretion in the respiratory track (Borchers *et al.*, 1999). Hence, acrolein is a highly selective airway toxicant (Aranyi *et al.*, 1986), which is capable of inducing respiratory tract lesions (Beauchamp *et al.*, 1985). As a consequence, acrolein exposure has been associated with many lung diseases such as asthma (Samet et Cheng, 1994), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Hogg, 2001), chronic bronchitis, emphysema (Saetta, 1999), cystic fibrosis (Witschi *et al.*, 1997) and lung carcinogenesis (Feng *et al.*, 2006).

Exposure to doses of acrolein higher than 50 μM causes cells to die by necrosis (Tanel et Averill-Bates, 2005). Necrosis is a form of cell death resulting from traumatic accidents, certain pathologies or metabolic deficiencies (Malhi *et al.*, 2006). It is characterized by

irreversible plasma membrane damage and organelle breakdown, which leads to leakage of cellular contents into the extracellular environment, and often results in inflammatory reactions (Festjens *et al.*, 2006). Exposure to doses of acrolein exceeding 50 μM causes massive disruption to structure and function of cells (Kehrer et Biswal, 2000; Kern et Kehrer, 2002). In fact, acrolein inhibits cell growth (Marano et Puiseux-Dao, 1982), increases cell membrane permeability, alters levels of glutathione, protein sulfhydryls (Patel et Block, 1993) and thiol-containing enzymes, as well as forming adducts with DNA (Kehrer et Biswal, 2000).

It was reported that at doses inferior to 50 μM , acrolein decreases the proliferation of human lung carcinoma cell lines (Rudra et Krokan, 1999) and induces apoptosis in several cell types, such as alveolar macrophages (Li *et al.*, 1997a), bronchial epithelial cells (Nardini *et al.*, 2002) and Chinese hamster ovary (CHO) cells (Tanel et Averill-Bates, 2005; Tanel et Averill-Bates, 2007a). However, induction of apoptosis by acrolein is cell-type dependent. Acrolein inhibits apoptosis in neutrophils (Finkelstein *et al.*, 2001) and in proB lymphocytes, it induces oncosis/necrosis (Kern et Kehrer, 2002).

Apoptosis is essential for normal embryonic development, tissue homeostasis and immune regulation (Schwarz *et al.*, 2007). It is characterized by a series of distinct morphological and biochemical alterations such as phosphatidylserine externalization, DNA fragmentation, chromatin condensation and cellular fragmentation into apoptotic bodies (Malhi *et al.*, 2006). Apoptotic signal transduction of death receptor Fas can be initiated by the engagement of its ligand (FasL) to its extracellular domain, which triggers oligomerization of the Fas receptor upon juxtaposition of its intracellular domains (Guicciardi et Gores, 2003; Malhi *et al.*, 2006). This event results in the translocation of adaptor proteins such as Fas associating death domain (FADD) and/or receptor-interacting protein (RIP) to the cytoplasmic membrane, which leads to recruitment and subsequent activation of initiator caspases-8 and -10 (Guicciardi et Gores, 2003). These newly functional initiator caspases trigger a cascade of caspase activation by processing and activating the effector caspases-3, -6, and -7 (Youle et Strasser, 2008), which are directly or indirectly responsible for the cleavage and degradation of several crucial cellular proteins (inhibitor of caspase activated

DNase (ICAD), lamin A, actin, fodrin...) and for the execution of cell death (Guicciardi et Gores, 2003). Alternatively, caspases-8 and -10, once activated by the death receptors, can interconnect with the mitochondrial pathway of apoptosis through cleavage of other substrates such as Bid, a Bcl-2 related protein (Fan *et al.*, 2005). Once cleaved, truncated Bid (tBid) inserts itself in the mitochondrial membrane and triggers the release of proapoptotic mitochondrial factors, such as cytochrome c, which leads to activation of initiator caspase-9 and then effector caspase activation (Youle et Strasser, 2008).

One of major routes of exposure to acrolein is the lung via inhalation. Therefore, with the aim of advancing our knowledge on the death pathways initiated by acrolein, the A549 adenocarcinoma cell line was chosen for this study for its human pulmonary origin. Given the widespread exposure of humans to low doses of acrolein, this research is important for improving the understanding of its toxic mechanisms, amongst those implicating the death receptor signaling pathway of apoptosis.

2.6 Material and Methods

2.6.1 Cell culture

A549 cells (ATCC #CCL-185) were grown in monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Canada), 2 mM L-glutamine, 3.7 g/l sodium bicarbonate, 1.0 mM sodium pyruvate and 1% penicillin (50 U/ml)-streptomycin (50 µg/ml) (Flow Laboratories, Mississauga, ON, Canada), in tissue culture flasks (Starstedt, St-Laurent, QC, Canada). The cells were grown to near confluence in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in a water-jacketed incubator at 37°C and were then incubated for 24 h with fresh culture medium. Confluent cells were harvested using 0.25% (w/v) trypsin-0.02% (w/v) EDTA solution, washed by centrifugation (1000 g, 3 min) and resuspended in minimum essential medium alpha (αMEM) plus 10% FBS for experimental studies (Grafstrom, 1990; Horton *et al.*, 1999).

2.6.2 Flow cytometric analysis of FasR and FasL extracellular expression

Briefly, 1×10^6 cells were resuspended in α MEM plus 10% FBS and incubated with acrolein (0 to 27 μ M) in a final volume of 1.0 ml at 37°C. After 1 h of exposure, the cells were washed three times by centrifugation (1000 g, 3 min) to stop the incubation and resuspended in 100 μ l of PBS-1% FBS. Cells were then incubated either with 20 μ g/ml of (FITC)-labeled anti-FasR (Cifone *et al.*, 1994) or 20 μ g/ml of (PE)-labeled anti-FasL (Kayagaki *et al.*, 1995) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 30 min at room temperature in the dark (Filion *et al.*, 2004). After washing them three times, 10 000 cells were analysed by flow cytometry using a FACScan (Averill-Bates *et al.*, 2005) equipped with an argon laser (488 nm) and analysed using Lysis II software (Becton Dickinson, Oxford, UK). Anti-FasR-FITC fluorescence was detected on the FL-1 detector and anti-FasL-PE fluorescence on the FL-2 detector. The extracellular expression of FasR and FasL was compared with untreated cells.

2.6.3 Total FasL expression

Cells were pretreated with or without 300 μ M polyethylene glycol catalase (PEG-catalase) (Sigma-Aldrich Canada, ON, Canada) for 3 h and then exposed to acrolein for 1 h or 2 h. Then, cells were fixed with 1% formaldehyde for 20 min and permeabilized with saponin buffer (20 mM Hepes/ 138 mM KCl/ 4 mM MgCl₂/ 0.2 mg/ml saponin/ 1% bovine serum albumin/ 1 mM ATP/ 3 mM phalloidin) for 1 min. Cells were washed twice in saponin-free buffer and labeled for 1 h at 4°C with 20 μ g/ml of (PE)-labeled anti-FasL monoclonal antibody (Caltag laboratories, Burlingame, CA, USA). After washing cells three times, total expression of FasL in 10 000 cells was analysed by FACScan (Vitriol *et al.*, 2007).

2.6.4 Preparation of whole cell lysates

Following treatment with acrolein, cells were washed in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM 3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid (MOPS), pH 7.4) by

centrifugation (1000 g, 3 min). Briefly, the supernatant was discarded, pelleted cells were resuspended in lysis buffer H (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 80 mM β -glycerophosphate, 10 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM NaF, 2% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 1% cocktail of protease inhibitors) and incubated on ice for 1 h, vortexing cells every 15 min. Then, by a 10 min centrifugation at 2500 g, the proteins of whole cell lysates were isolated in the supernatant (Bettaieb et Averill-Bates, 2005) for the immunodetection of FasR, p53 and anti-p53 Ser¹⁵P.

2.6.5 Preparation of subcellular fractions

The subcellular fractions were prepared as described (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Following treatment with acrolein, cells were washed in buffer A and resuspended in buffer B (buffer A plus 5% Percoll, 0.01% digitonin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT and 1% cocktail of protease inhibitors: 10 μM aprotinin, 10 μM pepstatin A, 10 μM leupeptin, 25 μM calpain inhibitor I). After a 30 min incubation on ice, lysates were homogenised using a hand potter (Kontes glass CO, Duall 22, Fisher, QC, Canada). Unbroken cells and nuclei were pelleted by centrifugation at 2500 g for 10 min. The supernatant was centrifuged further at 15000 g for 15 min to isolate the mitochondrial fraction. The pellet was subsequently washed with 500 μL of buffer A and centrifuged at 15000 g for 15 min. The final pellet containing the purified mitochondrial fraction was then resuspended in lysis buffer H for the detection of tBid.

The supernatant was centrifuged at 100 000 g for 1 h. The resultant supernatant was designated as the cytosolic fraction, which was used for the detection of FADD, RIP and Bid. The pellet was resuspended in lysis buffer H and designated as the microsomal fraction, which was used for the detection of translocation of FADD and RIP to the plasma membrane.

2.6.6 Immunodetection

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the cellular proteins was carried out according to Laemmli (Laemmli, 1970). Proteins (40 μg) were quantified

according to Bradford (Bradford, 1976) and then solubilised in Laemmli sample buffer. The samples were boiled for 5 min at 100°C and loaded onto a SDS-polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 125 V. Cellular proteins were transferred electrophoretically to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a MilliBlot Graphite Electroblotter I apparatus (Milli-pore, Bedford, MA, USA) (Tanel et Averill-Bates, 2005). The transfer buffer contained 96 mM glycine, 10 mM Tris, and 10% methanol. The transfer was carried out for 1.5 h at constant amperage of 80 mA/gel. Hydrophobic or nonspecific sites were blocked overnight at 4°C with 5% powdered skim milk in Tris-buffered saline (50 mM Tris and 150 mM NaCl) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T). Membranes were washed four times for 15 min in TBS-T. The blots were probed with the primary antibodies: anti-FasR, anti-FADD, anti-RIP, anti-Bid, anti-p53, anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and anti-tBid, anti-p53 Ser¹⁵P (Stressgen, San Diego, CA, USA) in TBS-T, 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature. Membranes were washed four times for 15 min and incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000) in TBS-T containing 5% milk powder. Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse, anti-rabbit, and anti-goat IgG (Biosource, Camarillo, CA, USA). PVDF membranes were washed four times for 15 min and were detected using the ECL plus chemiluminescence kit (PerkinElmer, Boston, MA, USA). Purity of mitochondrial, cytosolic and microsomal fractions were verified using antibodies to cyclooxygenase IV (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), glutathione S-transferase (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) and calnexin (BD Biosciences Canada, Mississauga, ON, Canada), respectively (data not shown). For verification of equivalence in protein loading, blots were probed with the anti-GAPDH antibody and by coloration of the membrane using Coomassie blue (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Protein expression was analysed using a scanning laser densitometer, relative to GAPDH (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

2.6.7 Determination of caspase activity by fluorescence spectroscopy

The activity of caspases was measured according to Hampton and Orrenius (Hampton et Orrenius, 1997), with minor modifications. Cells were pretreated with or without 300 µM

PEG-catalase for 3h and then exposed to acrolein for 30 min, 1 h or 2 h. After incubation, cells were washed three times by centrifugation (1000 g, 3 min) in cold PBS and resuspended in 75 μ l of reaction buffer (20 mM piperazine-N-N-bis-(2-ethanesulfonic acid), 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% 3-(3-cholamidopropyl-dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propane sulfonic acid and 10% sucrose, pH 7.2). Cells were lysed at -80°C for 30 min. The kinetic reaction was followed for 30 min, after addition of the appropriate caspase substrate at a final concentration of 50 μM , at 37°C (Bettaieb et Averill-Bates, 2005) using a Spectra Max Gemini spectrofluorimeter (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Caspase-2 activity was measured by cleavage of the fluorogenic peptide substrate Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-AFC (Z-VDVAD-AFC) with λ_{max} excitation wavelength at 400 nm and λ_{max} emission wavelength at 505 nm. For caspase-8, the substrate was Z-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (Z-IETD-AFC) with λ_{max} excitation at 400 nm and λ_{max} emission at 505 nm, and for caspase-7, the substrate was MCA-Val-Asp-Gln-Val-Gly-Trp-Lys-(DNP)-NH₂ (MCA-VDQVDGWK(DNP)-NH₂) with λ_{max} excitation at 325 nm and λ_{max} emission at 395 nm (Calbiochem, La Jolla, CA, USA).

2.6.8 Determination of cell death by Annexin V-FITC staining

Externalized phosphatidylserine (PS) on the outer surface of the cytoplasmic membrane becomes labeled by fluorescein (FITC)-labeled Annexin V (BD Biosciences Canada, Mississauga, ON, Canada), which has a high affinity for PS-containing phospholipid bilayers (van Engeland *et al.*, 1998). To analyse apoptotic cell death by flow cytometry, A549 cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated for 4 h with acrolein (0 to 27 μM). Cells were then washed twice with PBS and resuspended in 1 ml of binding buffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.5, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl₂). A volume of 500 μ l of cell suspension was incubated with 5 μ l of Annexin V-FITC and 10 μ l of propidium iodide (PI) for 10 min at room temperature in the dark. Cells (10 000) were then analysed by flow cytometry (Averill-Bates *et al.*, 2005). Annexin V-FITC fluorescence was detected on the FL-1 detector and PI fluorescence on the FL-3 detector. Four populations of cells were analysed: live control cells in the lower-left quadrant (Annexin V⁻/PI⁻); early stage apoptotic cells in the lower-right quadrant (Annexin V⁺/PI⁻); late stage apoptotic cells in the upper-right quadrant (Annexin

V⁺/PI⁺); necrotic cells in the upper-left quadrant (Annexin V⁻/PI⁺). The results are reported as the fraction of total apoptotic cells (early and late stage apoptosis).

2.6.9 Morphological analysis of apoptosis

To visualize nuclear morphology and chromatin condensation by fluorescence microscopy (Lee et Shacter, 1997), A549 cells were exposed to acrolein (0 or 14 μ M) for 4 h at 37°C in α MEM plus 10% FBS. Cells were then washed twice with PBS and Hoechst 33258 (60 μ g/ml) was added for 15 min to stain apoptotic cells. Cells were washed and PI (50 μ g/ml) was added to stain necrotic cells. Images obtained by fluorescence microscopy (Carl Zeiss Canada Ltd, Montreal, QC, Canada) were analysed by Northern Eclipse software and pictures were taken by digital camera (camera 3CCD, Sony DXC-950P, Empix Imaging Inc, Mississauga, ON, Canada). Cells were classified using the following criteria: a) live cells (normal nuclei, pale blue chromatin with organized structure); b) membrane-intact apoptotic cells (bright blue condensed or fragmented chromatin); c) necrotic cells (red, enlarged nuclei with smooth normal structure). The fractions of apoptotic and necrotic cells were determined relative to total cells (obtained using bright field illumination). A minimum of 200 cells was counted per dish (Tanel et Averill-Bates, 2005).

2.6.10 ROS generation

The generation of pro-oxidants was measured as described by Denning and coworkers (Denning *et al.*, 2002), with modifications. Cells were pretreated with or without 300 μ M PEG-catalase for 3 h and then exposed to acrolein for the indicated periods of time. 10 μ M of 2'7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) was added. H₂DCFDA produces a green fluorescence when it becomes oxidized in the presence of hydrogen peroxide. Levels of hydrogen peroxide in 10 000 cells were determined by flow cytometry using the FL-1 detector.

2.6.11 Statistics

Data represent means \pm SEM from at least 3 independent experiments. When not shown, error bars lie within symbols. Comparisons among multiple groups were made by one-way ANOVA, which measures the linear contrast of means. The Bonferroni-Holmes adjustment was used to control for the Family-wise error rate at a desired level ($\alpha=5\%$). Software used was JMP Statistical Discovery 4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). For significant differences, $P < 0.05$. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ as compared with control (0 μM); (θ) $P < 0.05$, ($\theta \theta$) $P < 0.01$ as compared with cells non pretreated with PEG-catalase at the same concentration of acrolein.

2.7 Results

2.7.1 Initiation of the death receptor pathway by acrolein

A549 cells were exposed to concentrations of acrolein varying from 1 to 50 μM to represent *in vivo* values, since the level of acrolein in the serum of a normal human was estimated to reach 50 μM (Satoh *et al.*, 1999) and up to 80 μM in respiratory track lining fluids in smokers (Eiserich *et al.*, 1995). The death receptor pathway of apoptosis can be initiated by ligation of the receptor Fas (FasR) to its ligand, FasL, which results in receptor aggregation (Mollinedo et Gajate, 2006). To determine the potential for toxicity of acrolein through the Fas death receptor pathway in A549 cells, we evaluated the modulation of expression of FasR and FasL by flow cytometry (Fig. 1A-1E). There was a 4 to 29 % increase in FasL expression at the extracellular surface of the plasma membrane following a 1 h exposure to acrolein concentrations ranging from 1 to 27 μM , compared to the untreated control (Fig. 1A, 1C). Under the same conditions, extracellular FasR expression decreased by 24 to 42 %, compared to the untreated cells (Fig. 1A, 1B). Since the extracellular FasR expression decreased following exposure to acrolein, we further investigated if there were changes in the total expression of this receptor. The immunodetection of FasR in A549

whole cell lysates after 1 h of exposure to acrolein (3-14 μM) showed no significant changes in the total expression of FasR (Fig. 1D, 1E).

2.7.2 Acrolein causes translocation of adaptor proteins FADD and RIP to the plasma membrane

Once death receptor signaling is initiated, the death domains of FasR then recruit adaptor proteins FADD and/or RIP to the receptor complex at the cytoplasmic side of the plasma membrane (Jäättelä et Leist, 2003). Acrolein induced the translocation of FADD and RIP to the A549 cell membrane (Fig. 2A, 2C and Fig. 3A, 3C), which resulted in a corresponding reduction in their levels in the cytosol (Fig. 2B, 2C and Fig. 3B, 3C). The recruitment of FADD and RIP to the cytoplasmic membrane was optimal after 1 h of exposure to acrolein. The maximum increase in translocation to the plasma membrane for FADD reached 3.2 and for RIP 1.93 times the levels in untreated controls.

2.7.3 Acrolein induces activation of initiator caspases

The initiator procaspases-8 and -10 are recruited by adaptor proteins and accumulate at the membrane death-inducing signaling complex (DISC), resulting in their spontaneous activation by autoproteolytic cleavage, which initiates apoptotic signaling (Guicciardi et Gores, 2003; Mollinedo et Gajate, 2006; Stevens et Maier, 2008). Exposure to acrolein, for 30 min to 2 h, led to activation of initiator caspase-2 (Fig. 4A) and caspase-8 (Fig. 4B) in A549 cells. Caspase-10 was not activated by acrolein exposure (data not shown). The increases in enzymatic activity of caspase-8 were more pronounced than for caspase-2. The enzymatic activity of caspase-2 was higher than for untreated cells (maximum increase 14 %) after exposure to 0 to 7 μM of acrolein, for 30 min to 2 h. After 30 min exposure to acrolein (0 to 27 μM), the activity of caspase-8 increased from 22 to 55 %, compared to the untreated control. Caspase-8 also remained active after 1 h exposure to acrolein, with a decline in activity after 2 h at higher concentrations (14 to 27 μM).

2.7.4 Induction of the cross-talk pathway by acrolein and implication of p53

Once procaspases-2 and/or -8 are activated, they can induce a cross-talk pathway between the death receptor and the mitochondrial pathways, through their ability to cleave Bid (Lavrik *et al.*, 2006; Youle et Strasser, 2008). Exposure of A549 cells to acrolein for 30 min caused a small increase in mitochondrial tBid, which was more pronounced after 1 h (Fig. 5A, 5C). In addition, acrolein induced a dose-dependent increase in cytosolic expression of full length Bid up to 2.2-fold, relative to the untreated control after 30 min (Fig. 5B). Following 1 h exposure, acrolein caused cleavage of Bid to form tBid, which was detected at mitochondria. This was apparent as the high cytosolic Bid expression after 30 min returned to control levels after 1 h, and there was a corresponding increase in levels of cleaved fragment tBid in the mitochondrial fraction. After 2 h of exposure, the mitochondrial tBid expression returned to control levels, but cytosolic Bid levels decreased with increasing acrolein concentrations (Fig. 5A-5C).

It is well known that p53, once activated through phosphorylation or acetylation, can induce apoptosis mediated by activation of caspase-2 (Maiuri *et al.*, 2007) and genes such as *Bid* (Sax *et al.*, 2002; Bras *et al.*, 2005). To determine the ability of acrolein to modulate the expression of p53 and its phosphorylation, A549 cells were exposed to low concentrations of acrolein ranging from 0 to 14 μM , for 30 min and 1 h. Acrolein (7 μM) induced an increase in the total cellular expression of p53 and phospho p53(ser15) by about 22 % after 30 min (Fig. 6A-6C).

2.7.5 Acrolein induces activation of effector caspase-7

Once activated, the initiator caspases can process directly or indirectly, through Bid and/or the mitochondrial pathway, downstream effector caspases such as caspases-3, -6, and -7, which are responsible for the execution of cell death by apoptosis (Youle et Strasser, 2008). The downstream event investigated from caspases-2 and -8 activation in the apoptotic cascade initiated by acrolein was the effector caspase-7 (Ho *et al.*, 2005). The enzymatic activity of caspase-7 was analysed by exposing A549 cells to acrolein at concentrations

ranging from 0 to 27 μM (Fig. 7). There was increased enzymatic activity of caspase-7 when cells were exposed to acrolein for 30 min to 2 h, compared to untreated controls. The maximum increase in activity was 48 %, which was reached after 2 h, at acrolein concentrations of 3 and 7 μM .

2.7.6 Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein

After investigating the initiation of the death receptor pathway by acrolein, the execution phase of apoptosis was analysed to determine the potential toxic effect of this aldehyde in A549 cells. Two characteristic changes occurring during apoptosis were evaluated by Annexin V-FITC labeling of externalized PS on the plasma membrane (Fig. 8A-8C) and by the fluorescent probe Hoechst 33258 (blue-green coloration), which labels condensed nuclear chromatin (Fig. 8D, 8E). PI was used as a counterstain for necrosis. There was a 3.1 to 3.7-fold increase in Annexin V-positive cells following a 4 h exposure of A549 cells to acrolein (Fig. 8A, 8C), compared to the untreated control (Fig. 8A, 8B). By Annexin V staining, apoptosis increased by about 15.4%, compared to the untreated cells, in the presence of acrolein (Fig. 8A-8C). By Hoechst staining, apoptosis increased to about 20 % in A549 cells exposed 4 h to 14 μM of acrolein, compared to the untreated control (Fig. 8D, 8E). Under these conditions, levels of necrotic cells remained low (~5 %) (Fig. 8A).

2.7.7 Role of ROS in activation of the receptor pathway by acrolein

The subsequent step was to determine how acrolein can activate the death receptor pathway. We therefore investigated the role of acrolein-induced ROS production on the upregulation of FasL and on the increased activation of caspase-8. ROS production was detected by an increase in H_2DCFDA fluorescence (Fig. 9A). There was a 14 to 34 % increase in ROS production in A549 cells exposed to low concentrations of acrolein, for 30 min to 1 h, when compared to the untreated cells. The acrolein-induced increase in production of ROS, upregulation of FasL and activation of caspase-8 were significantly attenuated by pretreatment of cells with 300 μM PEG-catalase, a well-known ROS

scavenger, which detoxifies hydrogen peroxide (Fig. 9A-9C). These findings suggest that ROS generated by acrolein are responsible for activation of the death receptor pathway.

2.8 Discussion

2.8.1 Initiation of death receptor pathway by acrolein

Acrolein-induced apoptosis is clearly cell type dependent (Kern et Kehr, 2002). This study was carried out in proliferating A549 cells, a human pulmonary adenocarcinoma, to establish whether acrolein can induce apoptosis by the death receptor pathway. This was partially confirmed in acrolein-exposed A549 cells by increased expression of FasL, which was also shown in CHO cells (Tanel et Averill-Bates, 2007a), and decreased expression of FasR by acrolein at the extracellular membrane, while total cellular content of FasR remained stable. These results imply that increased FasL expression at the extracellular membrane encumbers FasR by specific binding, thereby preventing its detection by the anti-FasR-FITC. The decrease in FasR at the extracellular membrane could also be explained by internalisation of the FasL-FasR cluster following receptor activation (Henkler *et al.*, 2005). These results suggest that acrolein induces binding of FasL and FasR that triggers the death receptor pathway. Furthermore, activation of the death receptor pathway was confirmed by the translocation of FADD and RIP to the plasma cell membrane and caspase-8 activation.

2.8.2 Acrolein induces translocation of adaptor proteins FADD and RIP to the plasma membrane

It is well established that TNF-induced cell death can take the form of either apoptosis or necrosis (Laster *et al.*, 1988). The ability of Fas to induce necrosis-like programmed cell death, in addition to apoptosis, has also been described (Holler *et al.*, 2000). The complexity of death-receptor-induced cell survival, apoptotic and necrotic signaling networks now exceeds by far that of the simple linear pathway originally suggested by the discovery of the receptor-triggered caspase cascade (Jäättelä et Leist, 2003). Just as with the different protease families, the concentration of adapter proteins such as FADD might be one of the

switches deciding as to whether the apoptotic or necrotic pathway is triggered by death receptors. As for RIP, it is known to initiate a caspase-independent necrotic pathway mediated by the formation of ROS, but this process can be inhibited by caspase-8 activation (Lin *et al.*, 1999; Holler *et al.*, 2000).

This study reports that A549 cells exposed to low concentrations (less than 50 μM) of acrolein led to recruitment of FADD and RIP to the cytoplasmic membrane. These results are consistent with acrolein-induced FADD translocation to the cytoplasmic membrane in CHO cells at low concentrations (inferior to 50 μM) (Tanel et Averill-Bates, 2007a). Under these conditions, acrolein induced PS externalization and nuclear chromatin condensation associated with apoptosis and a low level of necrosis (~5 %) in A549 cells. These findings indicate that the death receptor pathway activated the apoptotic rather than the necrotic signaling network. Therefore, we pursued this investigation with the activation of initiator caspases.

2.8.3 Acrolein induces activation of initiator caspases

Caspase-8 is known to be activated after recruitment to FADD and the death receptor. Caspase-8 appears to be the principal initiator caspase during death receptor mediated apoptosis (Curtin et Cotter, 2003). Our findings in A549 cells, after short exposures (0.5 to 2 h), demonstrated that acrolein (1 to 27 μM) caused substantial caspase-8 activation. These results are in agreement with acrolein-induced caspase-8 activation in CHO cells at low concentrations (10 to 50 μM) (Tanel et Averill-Bates, 2007a). Given the low level of necrosis, our findings suggest that RIP is mediating apoptosis, rather than necrosis, through death receptors. Caspase-8-mediated cleavage of RIP produces a C-terminal fragment that appears to enhance apoptosis through enhanced DISC formation (Holler *et al.*, 2000; Curtin et Cotter, 2003). Thus, caspase-8 is believed to play an obligatory role in apoptosis initiation by death receptors, but does not appear to be involved in necrosis triggered by these receptors.

The molecular mechanisms of activation of caspase-2 are not well defined, and are in fact controversial. Some have reported that DNA damage can activate caspase-2 in a multinuclear complex that involves the p53-induced protein with a death domain (PIDD) and the RIP-associated protein with a death domain (RAIDD) (together known as the piddosome) (Maiuri *et al.*, 2007; Tinel *et al.*, 2007). Others have reported that the DD of RIP can bind to Fas receptor and recruits RAIDD and caspase-2 to Fas receptor aggregates (Curtin et Cotter, 2003; Stevens et Maier, 2008). In several cell lines, this initiator procaspase-2 was found at the Fas DISC and activated on Fas stimulation. At the same time, it was demonstrated that procaspase-2 could not initiate cell death in the absence of procaspase-8. Thus, it was shown that caspase-2 is activated at the DISC but does not prime Fas-induced apoptosis (Lavrik *et al.*, 2006). After cleavage and activation, caspase-2 is able to further regulate the apoptotic cascade by processing its substrates, such as Bid and effector caspases (Curtin et Cotter, 2003; Lavrik *et al.*, 2006). In A549 cells, acrolein (1 to 7 μ M) caused low level activation of caspase-2 after short exposure times (0.5 to 2 h).

Caspase-2 and -8 were both activated by acrolein in A549 cells. Caspase-8 triggers effector caspases either directly or through a Bid-mediated mitochondrial pathway (Strasser *et al.*, 2000). The Bid molecule was also found to be the substrate for caspase-2 *in vitro* (Guo *et al.*, 2002). Thus, it seems likely that after activation, by acrolein in A549 cells, caspase-2 along with caspase-8 can both contribute to Bid cleavage. This subsequently leads to the amplification of the mitochondrial apoptotic cascade (Lavrik *et al.*, 2006).

2.8.4 Induction of cross-talk pathway by acrolein and implication of p53

Our findings show that acrolein can cause mitochondrial dysfunction by death receptor signaling through the cross-talk pathway involving caspases-2 and -8 mediated cleavage of proapoptotic protein Bid. Our results demonstrated a significant upregulation of cytosolic Bid after a 30 min exposure to low concentrations of acrolein, along with a slight increase in mitochondrial tBid expression.

Wild-type tumor suppressor protein p53 can be upregulated and/or activated, through phosphorylation, by many environmental stimuli, including ultraviolet light (UV), infrared radiation (IR), or chemical DNA damaging agents, and hypothetically acrolein (Mendoza-Rodriguez et Cerbon, 2001). p53-induced apoptosis is mediated by activation of genes involved in two major apoptotic pathways: the mitochondrial pathway, with genes such as *Bax* and *Bid*, and the death receptor pathway, with genes such as *Fas* and *FasL* (Mendoza-Rodriguez et Cerbon, 2001; Sax *et al.*, 2002). Since acrolein causes an upregulation of wild-type p53 after a 30 min to 1 h in A549 cells and increases activation of p53 Ser¹⁵P after 30 min, this could explain the upregulation of cytosolic Bid expression after a 30 min exposure to acrolein. The posttranslational modification of p53 at p53 Ser¹⁵P has also been demonstrated in acrolein-treated CHO cells (Tanel et Averill-Bates, 2007c).

However, a 2 h exposure to acrolein caused mitochondrial tBid to return to levels of the untreated control. At the same time, levels of cytosolic Bid decrease significantly in A549 cells. These latter observations could be explained by the recent demonstration that Bid can reside in the endoplasmic reticulum. Normally, Bid functions as a lipid transfer protein that depends upon its interaction with phospholipids to shuttle negatively charged lipids, like phospholipids and lysolipids, between the endoplasmic reticulum-rich membranes and mitochondria. Since the activation of proapoptotic pathways induces an imbalance in lipid metabolism and membrane remodeling, by increased activity of phospholipases (Jaattela *et al.*, 1995; Hacki *et al.*, 2000), this would enhance the capacity of Bid to transport lysolipids to the outer mitochondrial membrane. Here, the detergent-like effect of these lysolipids may overcome the natural capacity to maintain mitochondrial membrane integrity and stimulate the release of cytochrome c. We suggest that upon receipt of apoptotic stimuli, Bid-mediated lipid transport processes are deregulated and serve to destabilize mitochondrial membranes (Esposti *et al.*, 2001).

2.8.5 Acrolein induces activation of effector caspase-7

Once activated, caspase-8 (Slee *et al.*, 1999) can process the downstream effector caspase-7 via caspase-3 activation. Acrolein was shown to mediate apoptosis via the effector

caspase-7 (0.5 to 2 h), since enzymatic activity of this caspase was significantly increased after short exposure in A549 cells. Our results agree with acrolein-induced apoptosis in CHO cells, which was mediated through the activation of effector caspase-7 (Tanel et Averill-Bates, 2005). As all of the caspase enzymes contain a nucleophilic active-site cysteine residue, potentially they could all be inhibited by acrolein, through direct alkylation (Mannick *et al.*, 1999; Finkelstein *et al.*, 2001). Even though pro-caspase-3 undergoes cleavage to generate caspase-3 in CHO cells, enzymatic activity was immediately inhibited (Tanel et Averill-Bates, 2005). The inhibition of caspase-3 by acrolein is in agreement with other studies. The inhibition of caspase-3 activity occurred in neutrophils after 2 to 8 h of treatment with 10 μ M acrolein (Finkelstein *et al.*, 2001). The activities of caspases-3, -8, and -9 were inhibited 12 h following a 30 min exposure to acrolein (5 to 40 μ M) in murine proB lymphocytes (Kern et Kehrer, 2002). Since activated effector caspase-7 is able to cleave caspase substrates, such as poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) (Fan *et al.*, 2005), and induce chromatin condensation (Degterev *et al.*, 2003), we further investigated the ability of acrolein to activate the execution phase of apoptosis.

2.8.6 Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein

In A549 cells, two distinct characteristics of the execution phase of apoptosis were confirmed after 4 h exposure to acrolein, by Annexin V labeling of externalized PS and by chromatin condensation. These results are in agreement with different studies that have reported findings on acrolein-stimulated apoptosis in isolated human alveolar macrophages, detected by morphological changes and DNA fragmentation when exposed to 25 μ M of acrolein (Li *et al.*, 1997a), in the human lung epithelial cell line HBE1, as indicated by the externalization of PS and DNA fragmentation, 24 h after a 30 min exposure to concentrations of 10 to 25 μ M acrolein (Nardini *et al.*, 2002), and on induction of apoptosis by acrolein that was confirmed morphologically by condensation of nuclear chromatin after 4 h exposure in CHO cells (Tanel et Averill-Bates, 2005).

2.8.7 Effects of acrolein-induced ROS on FasL total expression and caspase-8 activation

To further our knowledge on how acrolein can induce death receptor-mediated apoptosis at the upstream level, we determined whether the upregulation of FasL and the activation of caspase-8 was dependent on the production of ROS in A549 cells. It was reported that acrolein induces ROS formation (Luo *et al.*, 2005). More recent work has shown that ROS can induce FasL expression (Wang *et al.*, 2008b) and are implicated in the activation of caspase-8 during apoptosis (Perez-Cruz *et al.*, 2007). Scavenging of ROS by PEG-catalase prevented the upregulation of FasL expression and increased caspase-8 enzymatic activity. These findings indicate that ROS are an upstream factor required for acrolein-induced Fas-mediated apoptosis in A549 cells. This is a new contribution to knowledge in acrolein toxicity, which can increase ROS production by rapidly depleting cells of its antioxidants, such as glutathione, which inhibits the detoxification of H₂O₂. Significant accumulation of H₂O₂ in cells, produced by endogenous mechanisms (mitochondrial electron transport chain), is responsible for the toxic effects of acrolein exposure which significantly impairs mitochondrial functions, such as cellular respiration and ATP production (Luo *et al.*, 2005).

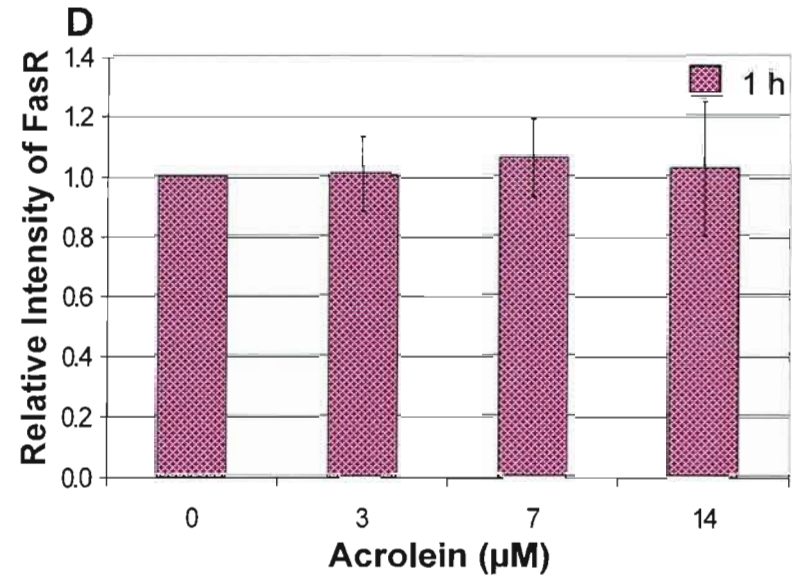
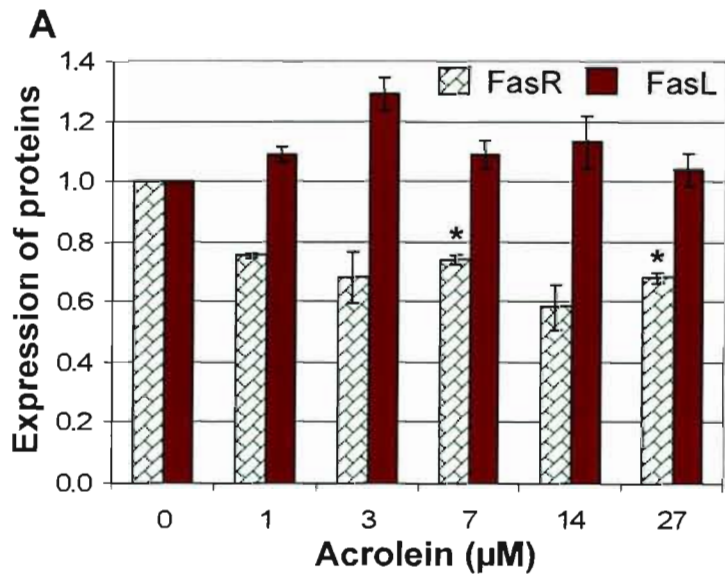
2.9 Conclusions

In conclusion, the present study details the mechanisms by which low concentrations of acrolein can induce apoptosis by the death receptor pathway in proliferating human pulmonary adenocarcinoma cells. The upregulation of FasL by acrolein indicates that the Fas receptor pathway is activated. However, this does not rule out the possibility that acrolein could induce apoptosis by alternative or complementary mechanisms. These findings are relevant to the toxicity of acrolein in many contexts, including the pharmacological action and/or side effects of the anticancer agent cyclophosphamide, which has acrolein as one of its metabolites, the regulation of cellular proliferation and tumor growth by polyamines, Alzheimer's disease, as well as the toxicity of environmental exposures to low doses of acrolein.

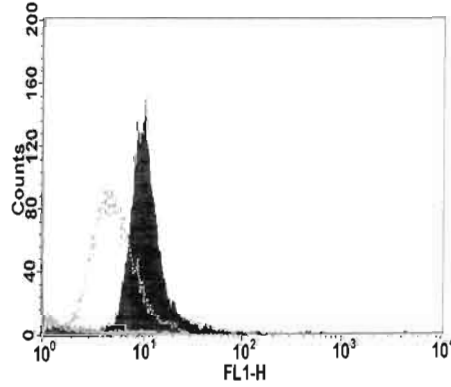
2.10 Acknowledgments

Financial support was obtained from CIHR (Canadian Institutes of Health Research) (DAB). Financial support is gratefully acknowledged from the Bourse Francine Beaudoin-Denizeau (Fondation UQAM), FRSQ (Fonds de la recherche en santé du Québec) and CIHR (JR). The authors thank Yulia Zilber and André Tanel for technical assistance.

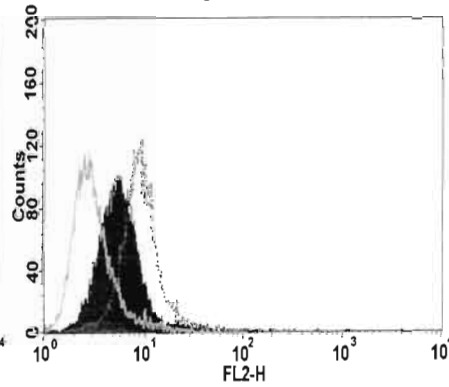
Figure 1



B FasR expression



C FasL expression



E

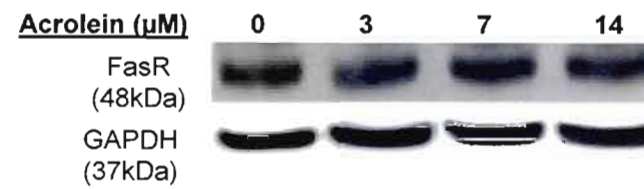
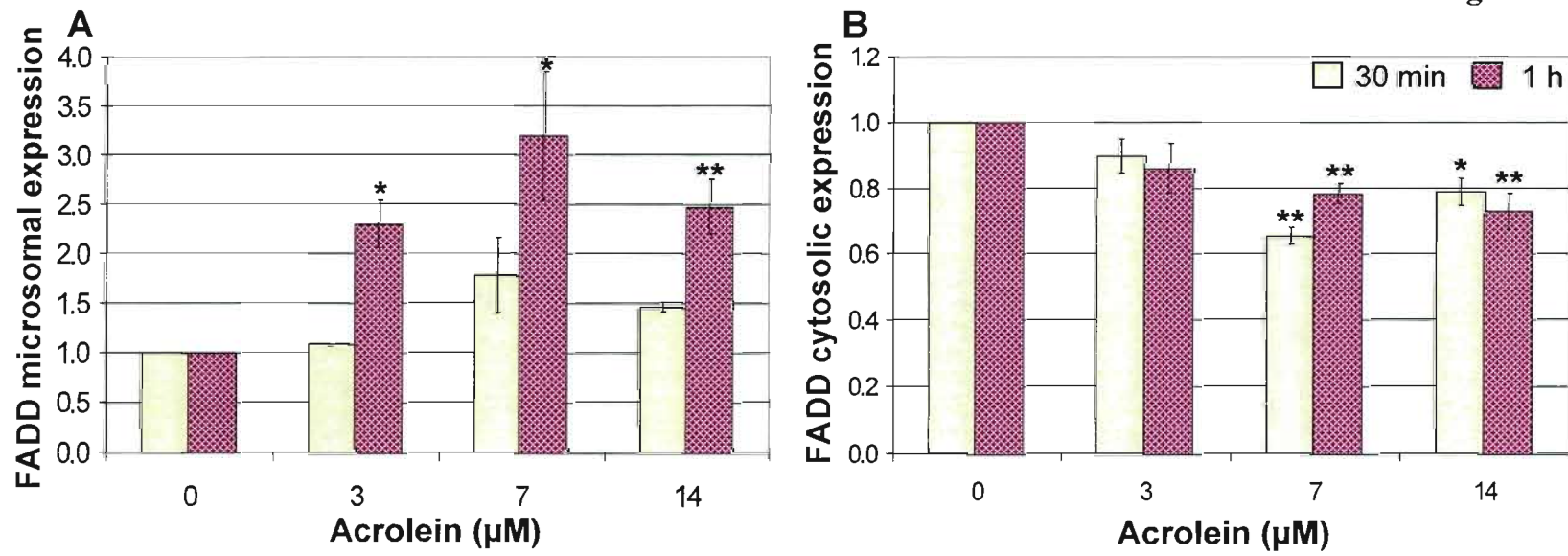


Figure 2



C

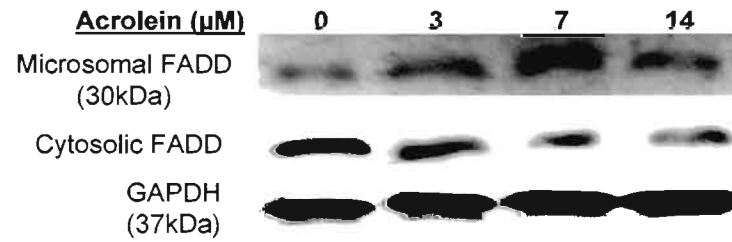
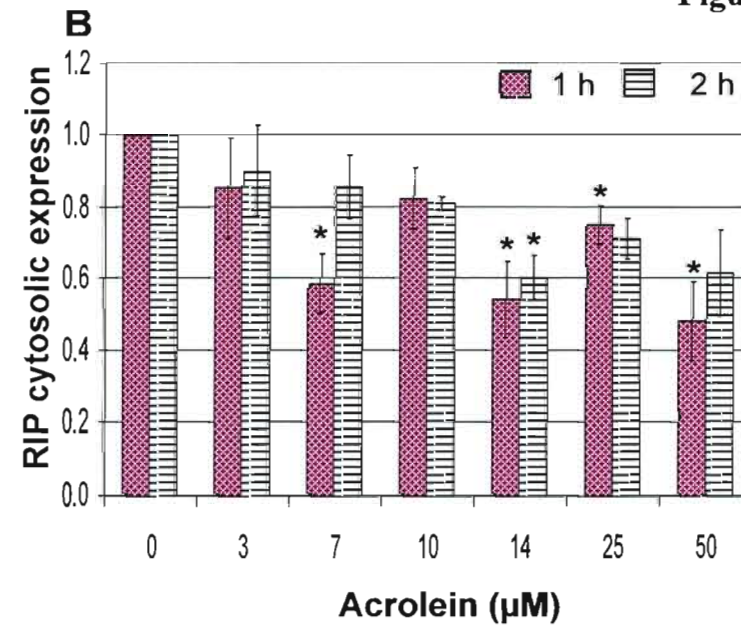
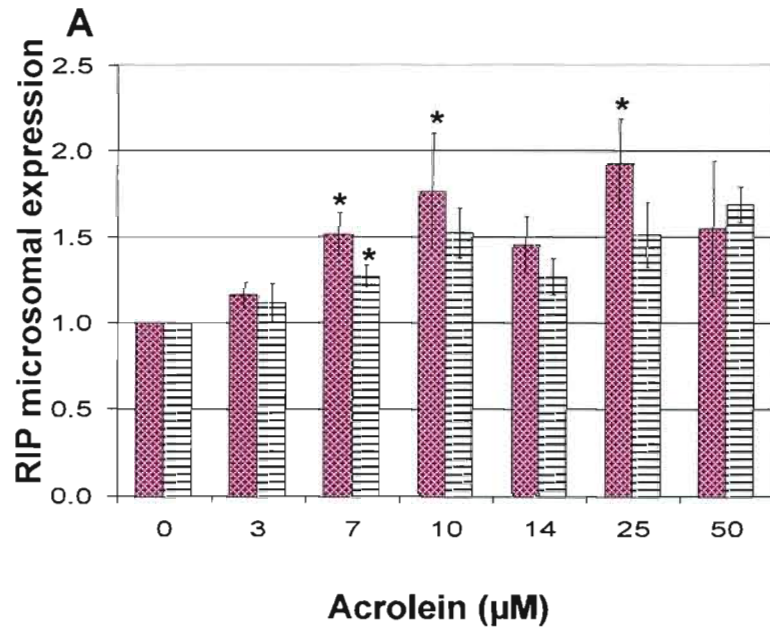


Figure 3



C



Figure 4

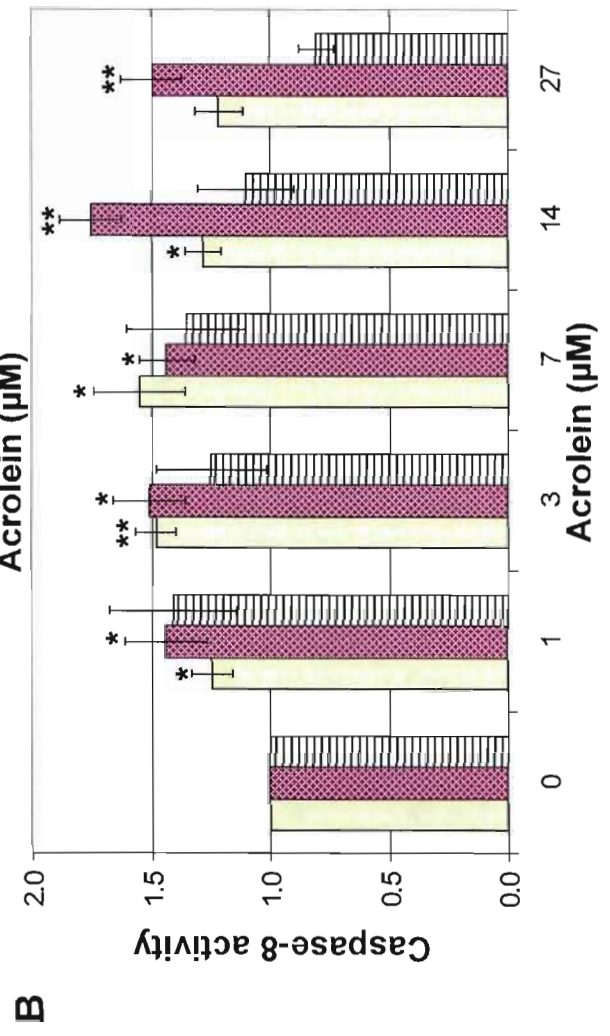
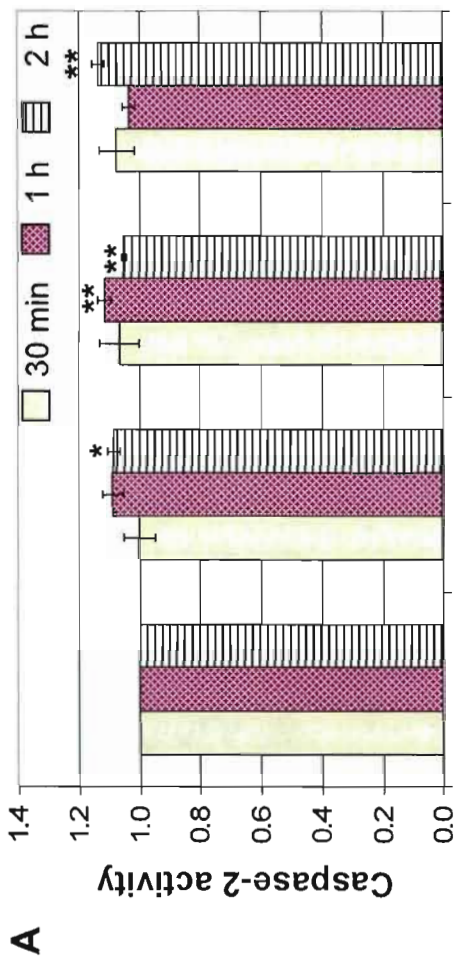


Figure 5

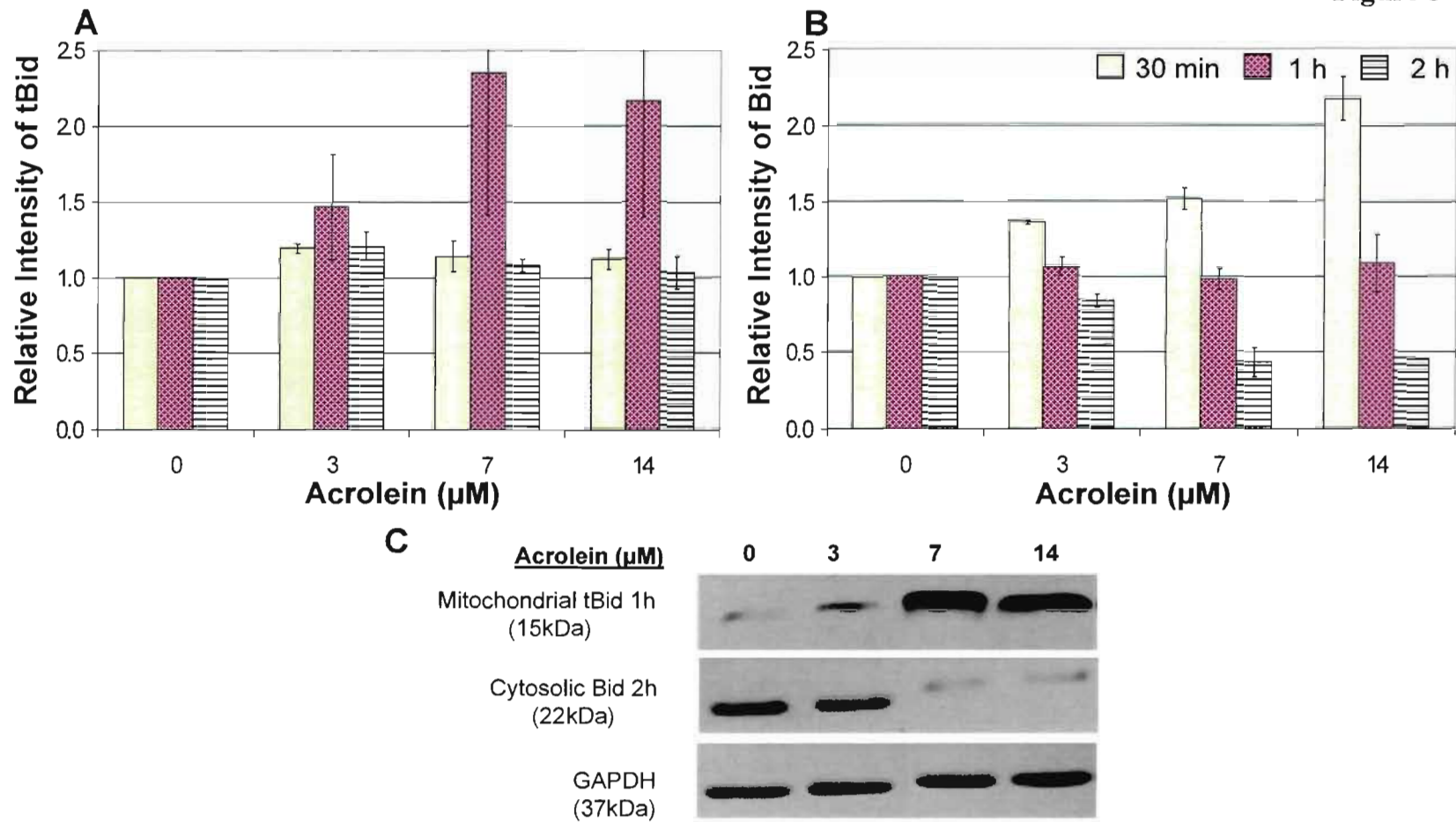


Figure 6

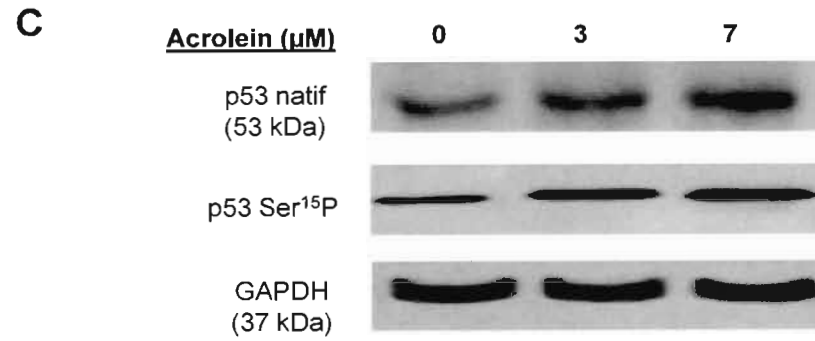
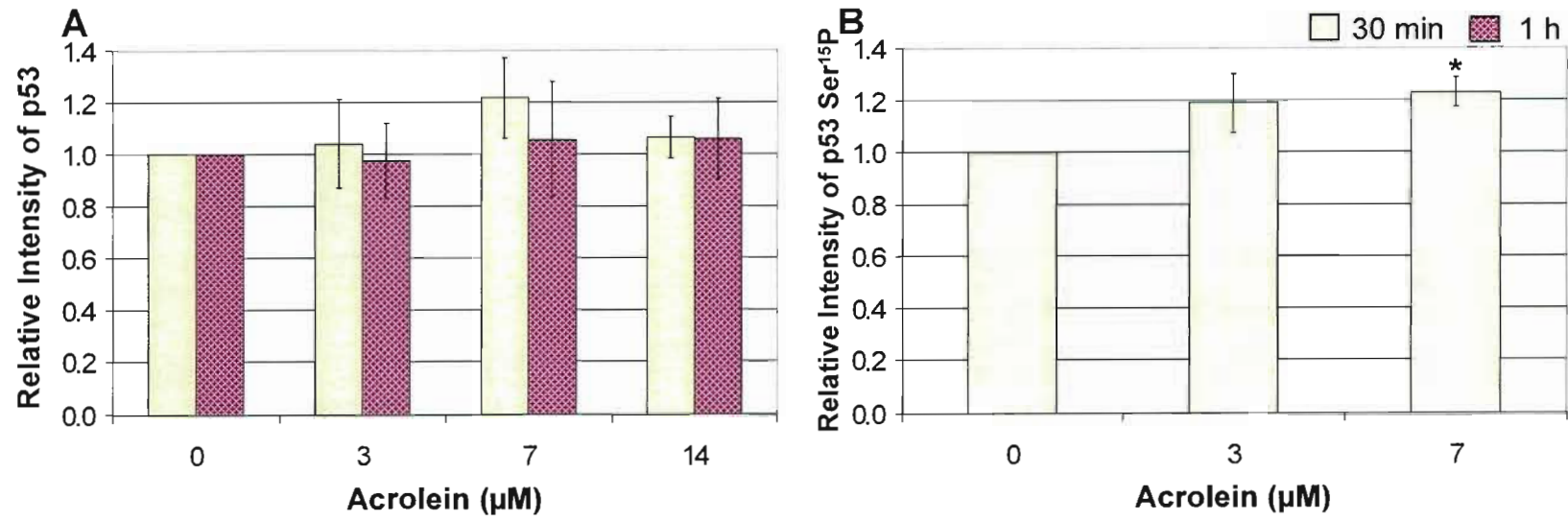


Figure 7

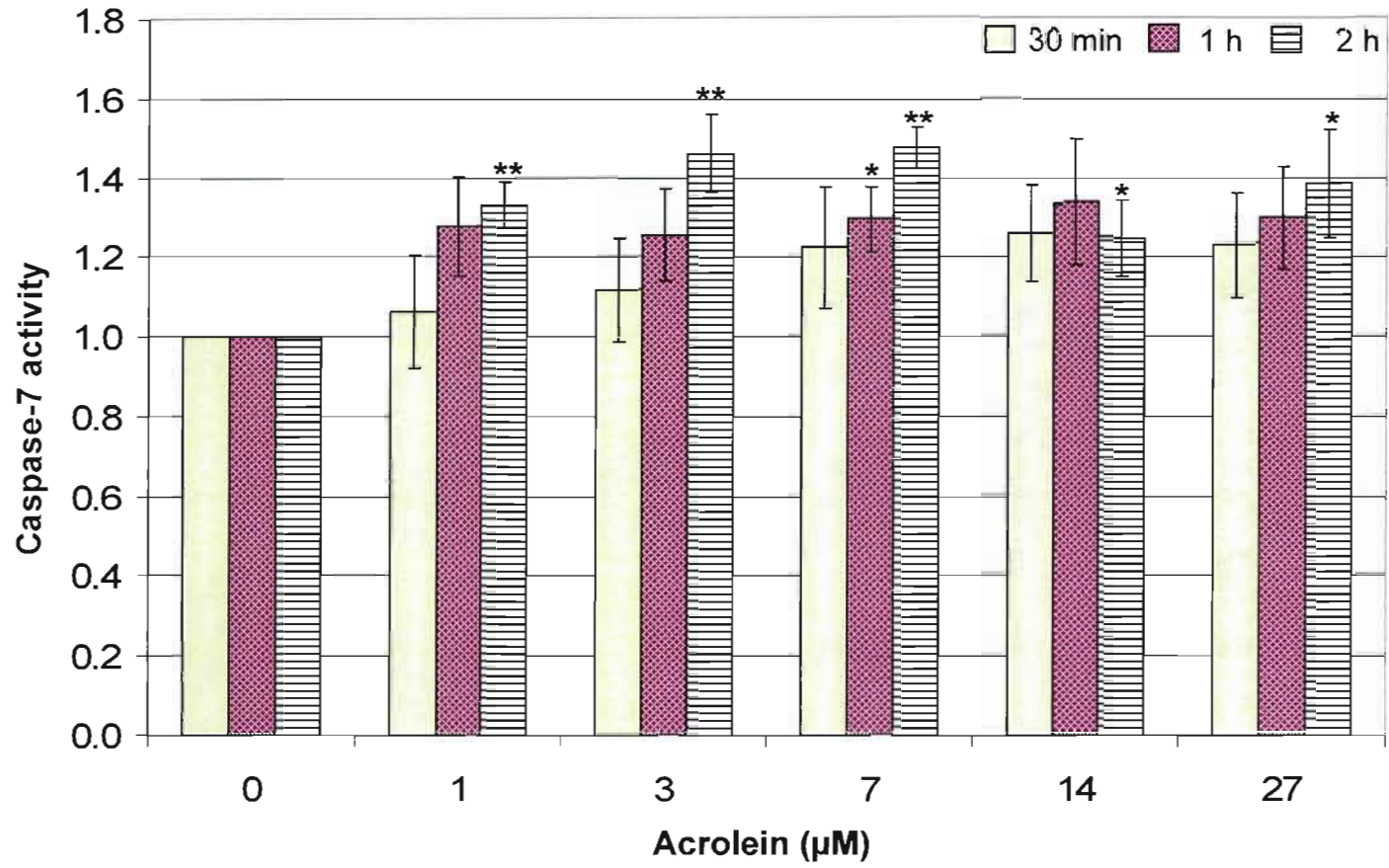
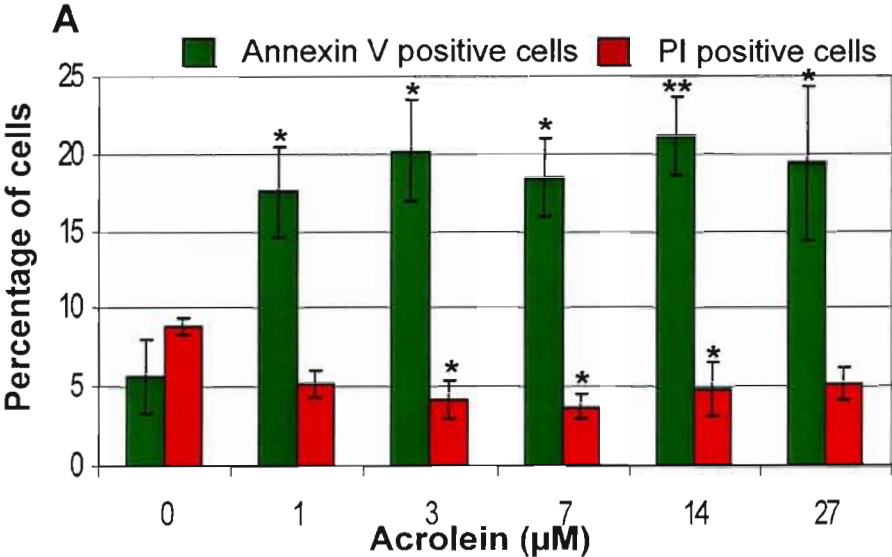
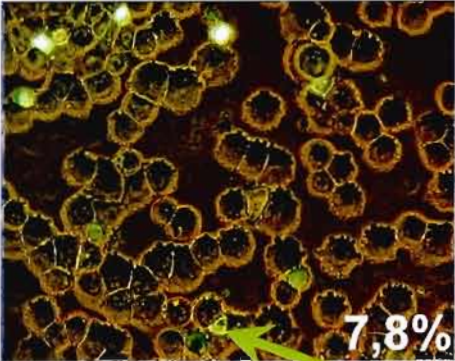


Figure 8

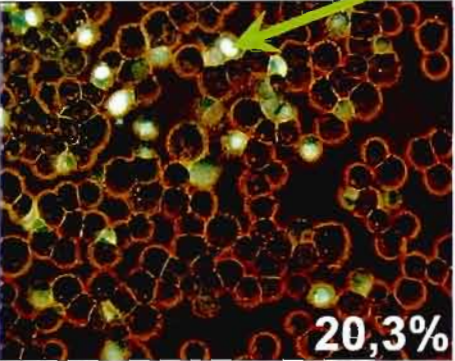


D Control

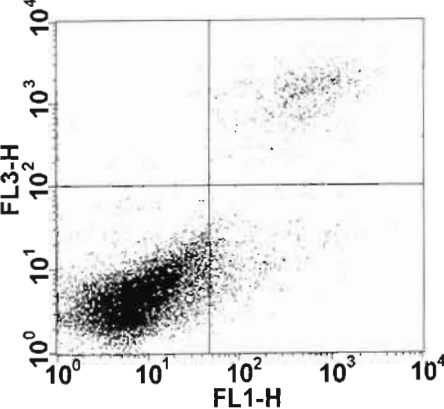


E Acrolein 14 μM

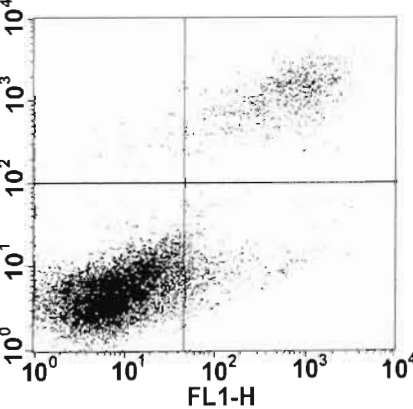
Apoptosis



B Control



C Acrolein 14 μM



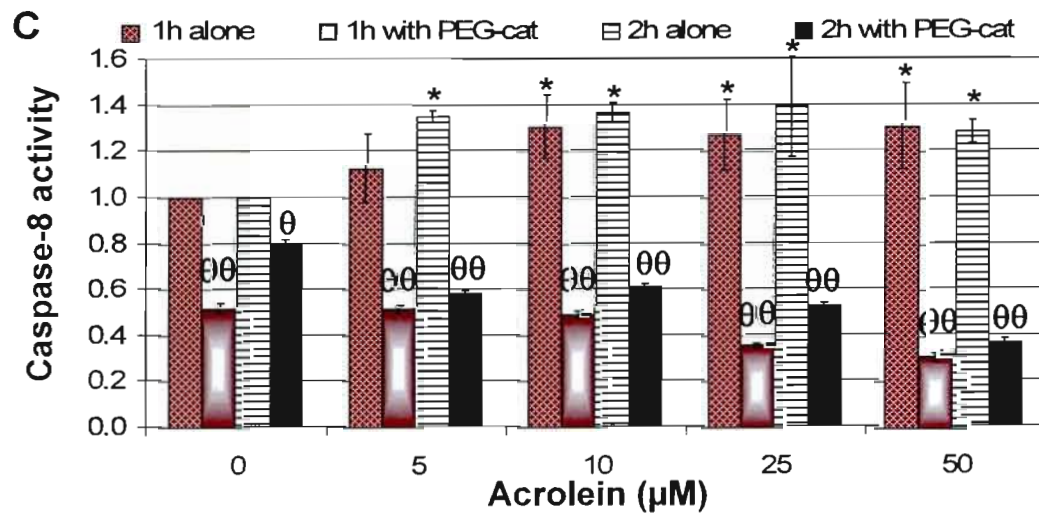
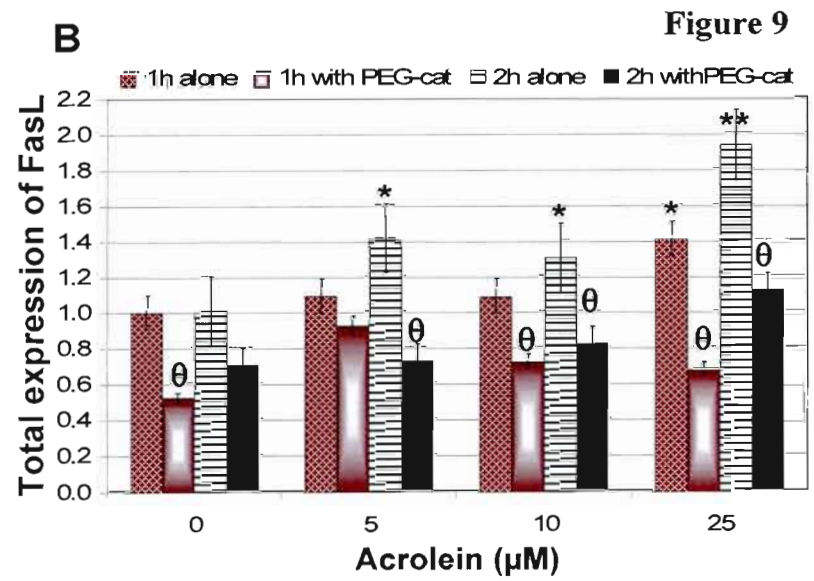
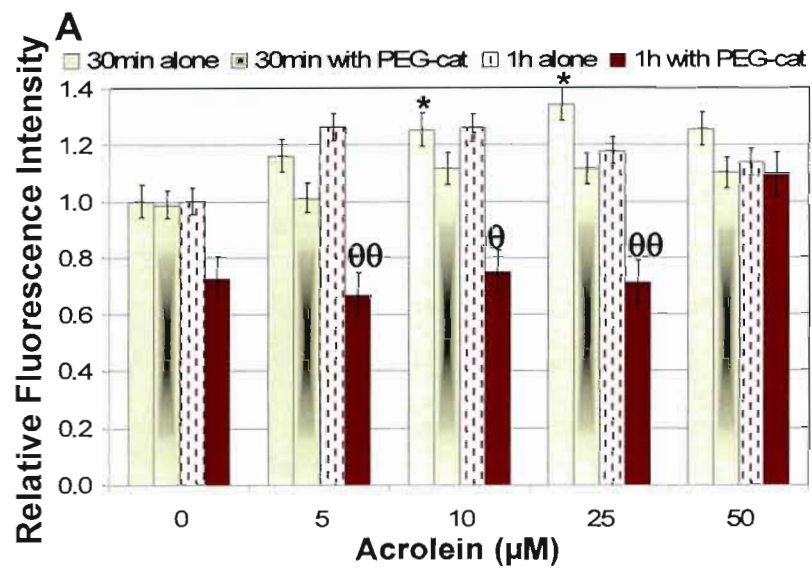


Figure 9

2.11 Figure Legends

Fig. 1: FasL expression is increased by acrolein. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 1h at 37°C with acrolein (0 to 27 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. (A) A549 treated cells were analysed by flow cytometry for their external expression of Fas receptor (FasR) and FasL. Data represent means and SEM from three independent experiments relative to the untreated control. The histogram blots are representative results of expression of (B) FasR or (C) FasL in A549 cells exposed to 0 μ M without antibody (—), 0 μ M with antibody (filled line) and 50 μ M acrolein (---). (D) After 1h exposure of A549 cells to acrolein, immunodetection of FasR (48kDa) in whole cell lysates is shown, using GAPDH (37kDa) as loading control. Densitometric analyses of the expression of FasR are relative to the untreated control. (E) A representative blot is shown from three independent experiments. $P < 0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 2: Acrolein causes translocation of adaptor protein FADD to the plasma membrane. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min or 1h at 37°C with acrolein (0 to 14 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of FADD (30kDa) in microsomal and cytosolic fractions was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control for the cytosolic fraction. Densitometric analyses of the expression of (A) membrane FADD and (B) cytosolic FADD are relative to the untreated control. (C) A representative blot for FADD expression (1h) is shown from three independent experiments. $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 3: Translocation of adaptor protein RIP to the plasma membrane in the presence of acrolein. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 1h or 2h at 37°C with acrolein (0 to 50 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of RIP (74kDa) in microsomal and cytosolic fractions was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control for the cytosolic fraction. Densitometric analyses of the expression of (A) membrane RIP and (B) cytosolic RIP are relative to the untreated control. (C) A representative blot for RIP expression (1h) is shown from three independent experiments. $P < 0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 4: Acrolein induces activation of initiator caspases-2 and -8. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min, 1h or 2h at 37°C with acrolein (0 to 27 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. (A) Caspase-2 and (B) caspase-8 activity were measured in cell lysates using the fluorescent substrates Z-VDVAD-AFC and Z-IETD-AFC, respectively. Caspase activity was expressed relative to the untreated control. Data represent means and SEM from three independent experiments performed with multiple estimations per point. $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 5: Cleavage of Bid to tBid by acrolein. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min, 1h or 2h at 37°C with acrolein (0 to 14 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of cytosolic Bid (22kDa) and mitochondrial t-Bid (15kDa) was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control for the cytosolic fraction. Densitometric analyses of the expression of (A) mitochondrial tBid and (B) cytosolic Bid are relative to the untreated control. (C) A representative blot from three independent experiments is shown for expression of tBid (1h) and Bid (2h).

Fig. 6: Acrolein induces activation of p53. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min or 1h at 37°C with acrolein (0 to 14 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of p53 and of p53 Ser¹⁵P in whole cell lysates was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control. Densitometric analyses of the expression of (A) p53 and (B) p53 Ser¹⁵P are relative to the untreated control. (C) A representative blot from three independent experiments is shown for expression of p53 and p53 Ser¹⁵P (30 min). P < 0.05 (*) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 7: Acrolein induces activation of effector caspase-7. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min, 1h or 2h at 37°C with acrolein (0 to 27 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. Caspase-7 activity was measured in cell lysates using the fluorescent substrate MCA-VDQVDGWK(DNP)-NH₂. Caspase activity was expressed relative to the untreated control. Data represent means and SEM from three independent experiments performed with multiple estimations per point. P < 0.05 (*) or P < 0.01 (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 8: Activation of execution phase of apoptosis by acrolein. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 4h at 37°C with acrolein (0 to 27 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. (A) Acrolein induces externalization of phosphatidylserine. A549 cells were subsequently stained using Annexin V-FITC as the apoptotic marker and PI as the necrotic marker. Ten thousand cells were analysed by flow cytometry to determine the percentage of Annexin V positive labeled cells and PI positive stained cells. Data represent means and SEM from three independent experiments and the percentages are relative to the untreated control. The dot blots are representative results of Annexin V and PI stained cells following exposure for 4h to 0 μ M (B) and 14 μ M acrolein (C). Morphological analysis of apoptosis in (D) untreated A549 cells and (E) cells exposed for 4h to 14 μ M of acrolein. Cells were stained with Hoechst 33258 and PI and visualized by fluorescence microscopy (magnification 320X). Photographs are representative of five independent experiments. P < 0.05 (*) or P < 0.01 (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 9: Production of ROS by acrolein causes upregulation of FasL and caspase-8 activation. A549 cells (10^6 /ml) were pretreated with or without 300 μ M PEG-catalase for 3h and then exposed to acrolein concentrations ranging from 0 to 50 μ M for the indicated periods of time. (A) Levels of ROS in 10 000 cells were analysed by flow cytometry, using the FL-1 channel for H₂DCFDA. (B) Treated cells, relative to untreated control cells, were analysed by flow cytometry for their total expression of FasL. (C) Caspase-8 activity was

measured in cell lysates using the fluorescent substrate Z-IETD-AFC. $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control. Data are relative to the untreated control and represent means and SEM from three independent experiments performed with multiple estimations per point. $P < 0.05$ (θ) or $P < 0.01$ (θ θ) indicates a statistically significant difference between cells exposed to acrolein, with or without PEG-catalase, at the same concentration of acrolein.

REFERENCES

- Alarcon, R. (1976). "Formation of acrolein from various amino-acids and polyamines under degradation at 100 degrees C." Environ Res **12**: 317-326.
- Aranyi, C., W.J. O'Shea, J.A. Graham et F.J. Miller (1986). "The effects of inhalation of organic chemical air contaminants on murine lung host defenses." Fundam Appl Toxicol **6**: 713-720.
- Averill-Bates, D.A., A. Chérif, E. Agostinelli, A. Tanel et G. Fortier (2005). "Anti-tumoral effect of native and immobilized bovin serum amine oxidase in a mouse melanoma model." Biochemical Pharmacology **69**: 1693-1704.
- Beauchamp, R. O., Jr., D. A. Andjelkovich, A. D. Kligerman, K. T. Morgan et H. D. Heck (1985). "A critical review of the literature on acrolein toxicity." Crit Rev Toxicol **14**: 309-380.
- Bettaieb, A. et D. A. Averill-Bates (2005). "Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis." J Cell Physiol **205**: 47-57.
- Borchers, M.T., M.P. Carty et G.D. Leikauf (1999). "Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators." Am J Physiol **276**: L549-555.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bras, M., B. Queenan et S.A. Susin (2005). "Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying." Biochemistry (Mosc) **70**: 231-239.
- Cifone, M. G., R. De Maria, P. Roncaioli, M. R. Rippo, M. Azuma, L. L. Lanier, A. Santoni et R. Testi (1994). "Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase." J Exp Med **180**: 1547-1552.
- Curtin, J.F. et T.G. Cotter (2003). "Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis." Cell Signal **15**: 983-992.
- Degtarev, A., M. Boyce et J. Yuan (2003). "A decade of caspases." Oncogene **22**: 8543-8567.
- Denning, T. L., H. Takaishi, S. E. Crowe, I. Boldogh, A. Jevnikar et P. B. Ernst (2002). "Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells." Free Radic Biol Med **33**: 1641-1650.

- Eiserich, J.P., A. van der Vliet, G.J. Handelman, B. Halliwell et C.E. Cross (1995). "Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction." Am J Clin Nutr **62**: 1490S-1500S.
- Esposti, M. D., J. T. Erler, J. A. Hickman et C. Dive (2001). "Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity." Mol Cell Biol **21**: 7268-7276.
- Facchinetti, F., F. Amadei, P. Geppetti, F. Tarantini, C. Di Serio, A. Dragotto, P. M. Gigli, S. Catinella, M. Civelli et R. Patacchini (2007). "{alpha},{beta}-unsaturated Aldehydes in Cigarette Smoke Release Inflammatory Mediators from Human Macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **37**: 617-623.
- Fan, T. J., L. H. Han, R. S. Cong et J. Liang (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **37**: 719-727.
- Feng, Z., W. Hu, Y. Hu et M.S. Tang (2006). "Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair." Proc Natl Acad Sci U S A **103**: 15404-15409.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe et P. Vandenabeele (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." Biochim Biophys Acta **1757**: 1371-1387.
- Filion, M. C., B. Filion, J. Roy, S. Menard, S. Reader et N. C. Phillips (2004). "Development of immunomodulatory six base-length non-CpG motif oligonucleotides for cancer vaccination." Vaccine **22**: 2480-2488.
- Finkelstein, E.I., M. Nardini et A. van der Vliet (2001). "Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**: L732-739.
- Ghilarducci, D.P. et R. Tjeerdema (1995). "Fate and effects of acrolein." Rev Environ Contam Toxicol **144**: 95-146.
- Grafstrom, R.C. (1990). "In vitro studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis." Mutat Res **238**: 175-184.
- Guicciardi, M. E. et G.J. Gores (2003). "The Death Receptor Family and the Extrinsic Pathway". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 67-84.
- Guo, Y., S. M. Srinivasula, A. Druilhe, T. Fernandes-Alnemri et E. S. Alnemri (2002). "Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria." J Biol Chem **277**: 13430-13437.

- Hacki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rosse, I. Fellay et C. Borner (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**: 2286-2295.
- Hampton, M. B. et S. Orrenius (1997). "Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis." FEBS Lett **414**: 552-556.
- Henkler, F., E. Behrle, K. M. Dennehy, A. Wicovsky, N. Peters, C. Warnke, K. Pfizenmaier et H. Wajant (2005). "The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability." J Cell Biol **168**: 1087-1098.
- Ho, P. K., A. M. Jabbour, P. G. Ekert et C. J. Hawkins (2005). "Caspase-2 is resistant to inhibition by inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and can activate caspase-7." Febs J **272**: 1401-1414.
- Hogg, J.C. (2001). "Chronic obstructive pulmonary disease: an overview of pathology and pathogenesis." Novartis Found Symp **234**: 4-19; discussion 19-26.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J.L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed et J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**: 489-495.
- Horton, N.D., S.S. Biswal, L.L. Corrigan, J. Bratta et J.P. Kehrer (1999). "Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells." J Biol Chem **274**: 9200-9206.
- Jaattela, M., M. Benedict, M. Tewari, J. A. Shayman et V. M. Dixit (1995). "Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells." Oncogene **10**: 2297-2305.
- Jäättelä, M. et M. Leist (2003). "From Caspases to Alternative Cell-Death Mechanisms". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 101-122.
- Kayagaki, N., A. Kawasaki, T. Ebata, H. Ohmoto, S. Ikeda, S. Inoue, K. Yoshino, K. Okumura et H. Yagita (1995). "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand." J Exp Med **182**: 1777-1783.
- Kehrer, J. et S. Biswal (2000). "The Molecular Effects of Acrolein." Toxicological Sciences **57**: 6-15.
- Kern, J. et J. Kehrer (2002). "Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis." Chem Biol Interact **139**: 79-95.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
- Laster, S. M., J. G. Wood et L. R. Gooding (1988). "Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis." *J Immunol* **141**: 2629-2634.
- Lavrik, I. N., A. Golks, S. Baumann et P. H. Krammer (2006). "Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis." *Blood* **108**: 559-565.
- Lee, Y. et E. Shacter (1997). "Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death." *Blood* **89**: 4480-4492.
- Li, L., R.F. Hamilton, Jr., D.E. Taylor et A. Holian (1997a). "Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages." *Toxicol Appl Pharmacol* **145**: 331-339.
- Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez et Z. G. Liu (1999). "Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis." *Genes Dev* **13**: 2514-2526.
- Luo, J. et R. Shi (2004). "Acrolein induces axolemmal disruption, oxidative stress, and mitochondrial impairment in spinal cord tissue." *Neurochem Int* **44**: 475-486.
- Luo, J., J.P. Robinson et R. Shi (2005). "Acrolein-induced cell death in PC12 cells: Role of mitochondria-mediated oxidative stress." *Neurochemistry International* **47**: 449-457.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, A. Kimchi et G. Kroemer (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 741-752.
- Malhi, H., G. J. Gores et J. J. Lemasters (2006). "Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?" *Hepatology* **43**: S31-44.
- Mannick, J. B., A. Hausladen, L. Liu, D. T. Hess, M. Zeng, Q. X. Miao, L. S. Kane, A. J. Gow et J. S. Stamler (1999). "Fas-induced caspase denitrosylation." *Science* **284**: 651-654.
- Marano, F. et S. Puisieux-Dao (1982). "Acrolein and cell cycle." *Toxicol Lett* **14**: 143-149.
- Mendoza-Rodriguez, C. A. et M. A. Cerbon (2001). "[Tumor suppressor gene p53: mechanisms of action in cell proliferation and death]." *Rev Invest Clin* **53**: 266-273.
- Mollinedo, F. et C. Gajate (2006). "Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy." *Drug Resist Updat* **9**: 51-73.
- Nardini, M., E. I. Finkelstein, S. Reddy, G. Valacchi, M. Traber, C. E. Cross et A. van der Vliet (2002). "Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid." *Toxicology* **170**: 173-185.

- Patel, J. M. et E. R. Block (1993). "Acrolein-induced injury to cultured pulmonary artery endothelial cells." Toxicol Appl Pharmacol **122**: 46-53.
- Perez-Cruz, I., J. M. Carcamo et D. W. Golde (2007). "Caspase-8 dependent TRAIL-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase." Apoptosis **12**: 225-234.
- Rudra, P.K. et H.E. Krokan (1999). "Acrolein cytotoxicity and glutathione depletion in n-3 fatty acid sensitive- and resistant human tumor cells." Anticancer Res **19**: 461-469.
- Saetta, M. (1999). "Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **160**: S17-20.
- Samet, J.M. et P.W. Cheng (1994). "The role of airway mucus in pulmonary toxicology." Environ Health Perspect **102 Suppl 2**: 89-103.
- Satoh, K., S. Yamada, Y. Koike, Y. Igarashi, S. Toyokuni, T. Kumano, T. Takahata, M. Hayakari, S. Tsuchida et K. Uchida (1999). "A 1-hour enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of acrolein- and hydroxynonenal-modified proteins by epitope-bound casein matrix method." Anal Biochem **270**: 323-328.
- Sax, J. K., P. Fei, M. E. Murphy, E. Bernhard, S. J. Korsmeyer et W. S. El-Deiry (2002). "BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity." Nat Cell Biol **4**: 842-849.
- Schwarz, M., M. A. Andrade-Navarro et A. Gross (2007). "Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program?" Apoptosis **12**: 869-876.
- Slee, E.A., M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E.S. Alnemri, D.R. Green et S.J. Martin (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." J Cell Biol **144**: 281-292.
- Stevens, J. F. et C. S. Maier (2008). "Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease." Mol Nutr Food Res **52**: 7-25.
- Strasser, A., L. O'Connor et V.M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-245.
- Tanel, A. et D. Averill-Bates (2005). "The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation of the mitochondrial pathway." Biochim Biophys Acta **1743**: 255-267.
- Tanel, A. et D. Averill-Bates (2007a). "Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein." Free Radic Biol Med **42**: 798-810.

- Tanel, A. et D. A. Averill-Bates (2007c). "P38 and ERK mitogen-activated protein kinases mediate acrolein-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells." Cell Signal **19**: 968-977.
- Tinel, A., S. Janssens, S. Lippens, S. Cuenin, E. Logette, B. Jaccard, M. Quadroni et J. Tschopp (2007). "Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway." Embo J **26**: 197-208.
- van Engeland, M., L. J. Nieland, F. C. Ramaekers, B. Schutte et C. P. Reutelingsperger (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." Cytometry **31**: 1-9.
- Vitriol, E. A., A. C. Uetrecht, F. Shen, K. Jacobson et J. E. Bear (2007). "Enhanced EGFP-chromophore-assisted laser inactivation using deficient cells rescued with functional EGFP-fusion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 6702-6707.
- Wang, L., N. Azad, L. Kongkaneramt, F. Chen, Y. Lu, B. H. Jiang et Y. Rojanasakul (2008b). "The Fas Death Signaling Pathway Connecting Reactive Oxygen Species Generation and FLICE Inhibitory Protein Down-Regulation." J Immunol **180**: 3072-3080.
- Witschi, H., J.P. Joad et K.E. Pinkerton (1997). "The toxicology of environmental tobacco smoke." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 29-52.
- Yang, X., X. Wu, Y.E. Choi, J.C. Kern et J.P. Kehrer (2004). "Effect of acrolein and glutathione depleting agents on thioredoxin." Toxicology **204**: 209-218.
- Youle, R. J. et A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**: 47-59.

CHAPITRE III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

3.1 Préface

Ce chapitre inclut un second article scientifique décrivant les résultats expérimentaux de ce projet, qui a été réalisé au cours des deux années dans le laboratoire de la Dre Diana A. Averill-Bates. Le manuscrit intitulé "*Acrolein Induced Apoptosis via Activation of the Mitochondrial Pathway in A549 Adenocarcinoma Cells*" sera soumis sous peu à la revue *Toxicology*. Ce manuscrit a été rédigé par moi-même et a été révisé par la Dre Diana A. Averill-Bates. De plus, j'ai effectué toutes les expériences pour cet article, à l'exception des résultats présentés à la Figure 10 portant sur la PEG-catalase, qui ont été réalisés par Ahmed Bettaieb. Cette étude *in vitro*, sur la lignée cellulaire tumorale A549, porte sur l'évaluation des mécanismes de toxicité induits par l'acroléine et sur la voie apoptotique de la mitochondrie qu'elle déclenche.

3.2 Article

ACROLEIN INDUCED APOPTOSIS VIA ACTIVATION OF THE MITOCHONDRIAL PATHWAY IN A549 ADENOCARCINOMA CELLS

Julie Roy, Ahmed Bettaieb and Diana A. Averill-Bates^{1,2}

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada.

¹To whom correspondence should be addressed

²Formerly Dr Diana A. Bates

Acknowledgments: Financial support was obtained from CIHR (Canadian Institutes of Health Research) (DAB). JR gratefully acknowledges financial support from the Bourse Francine Beaudoin-Denizeau, Fondation UQAM, FRSQ (Fonds de la recherche en santé du Québec), and CIHR. The authors thank Yulia Zilber and André Tanel for technical assistance.

Abbreviations: AIF: apoptosis-inducing factor; AKT: protein kinase B; Apaf-1: apoptosis protease activating factor-1; Bax: Bcl-associated X protein; Bcl-2: B-cells lymphoma 2; Bcl-XL: Bcl-associated X long protein; Bid: BH3-interacting domain death agonist; BSA: bovine serum albumin; CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid; CARD: caspase recruitment domain; cIAP: cellular inhibitors of apoptosis; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; DMEM: Dulbecco's modification of Eagle's medium; EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid; ERK: extracellular signal-regulated kinase; Fas: fibroblast-associated receptor; FasL: Fas ligand; sFasL: soluble Fas ligand; FACS: fluorescence activated cell sorter; FBS: fetal bovine serum; FCCP: *p*-trifluoromethoxy-phenyl-hydrazone FITC: fluorescein isothiocyanate; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; H₂DCFDA: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate; α MEM: minimum essential medium alpha; MOPS: 3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid; NADH: nicotinamide adenine dinucleotide; OMM: outer mitochondrial membrane; PARP: poly(ADP-ribose) polymerase; PBS: phosphate-buffered saline; PI: propidium iodide; PS: phosphatidylserine; PTP: mitochondrial permeability transition pore; PVDF: polyvinylidene difluoride; Rho123: rhodamine 123; ROS: reactive oxygen species; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; tBid: truncated Bid.

Running title: Acrolein, Apoptosis and Mitochondria

3.3 Résumé

L'acroléine, un aldéhyde *alpha,beta*-insaturé très réactif, est un polluant omniprésent dans l'environnement et l'humain s'expose de façon considérable à cet agent toxique dans son alimentation, par exemple dans la vapeur d'huile de cuisson, et par la combustion de matières organiques. Elle est un des sous-produits toxiques de la peroxydation des lipides endogènes lors d'un stress oxydatif, qui est impliqué dans plusieurs désordres, dont certaines maladies pulmonaires, cardiaques et neurodégénératives. L'étude présente les mécanismes de toxicité induits par l'acroléine *in vitro*, sur la lignée cellulaire A549, un adénocarcinome pulmonaire humain. Plus précisément, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose par l'acroléine via la voie mitochondriale. L'exposition des cellules A549 à l'acroléine (0 à 50 μM) a causé une augmentation du potentiel membranaire mitochondrial ainsi qu'une surproduction des espèces réactives de l'oxygène. De plus, cette exposition a amené une translocation de Bax à la mitochondrie, le relâchement du cytochrome c dans le cytosol et la translocation de la protéine AIF au noyau. À ces concentrations subléthales, l'acroléine a induit l'activation de la caspase-9 initiatrice, ainsi que des caspases exécutrices, caspases-3 et -6. L'acroléine a aussi conduit à l'exécution de l'apoptose par le clivage de l'enzyme PARP. L'inhibition par l'antioxydant PEG-catalase a démontré que la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène induite par l'acroléine est responsable de l'augmentation du potentiel membranaire mitochondrial et de l'activation de la caspase-3. Cette étude démontre que l'acroléine induit la voie intrinsèque de l'apoptose médiée par le stress oxydatif chez les cellules A549. Néanmoins, plus d'études sont nécessaires pour améliorer nos connaissances sur les mécanismes de toxicité de cet aldéhyde, qui a d'importantes répercussions sur la santé humaine.

MOTS CLÉS : Acroléine, apoptose, mitochondrie, caspase.

3.4 Abstract

Acrolein, a highly reactive *alpha,beta*-unsaturated aldehyde, is an omnipresent environmental pollutant to which humans are exposed in their food, vapors of overheated cooking oil and by combustion of organic products. Acrolein is a toxic by-product of endogenous lipid peroxidation resulting from oxidative stress, which is implicated in many pulmonary, cardiac and neurodegenerative diseases. The present study evaluates the toxic mechanisms induced by acrolein *in vitro*, in human lung adenocarcinoma A549 cells. We investigated the mechanisms implicated in the induction of apoptosis by acrolein via the mitochondrial pathway. Exposure of A549 cells to acrolein (0 to 50 μ M) caused an increase in mitochondrial membrane potential and of reactive oxygen species production. There was translocation of Bax to the mitochondria, cytochrome c release to the cytosol and translocation of AIF protein to the nucleus. At these sublethal concentrations, acrolein induced activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3 and -6. Acrolein also triggered the execution phase of apoptosis by cleaving DNA repair enzyme PARP. Inhibition by antioxidant PEG-catalase showed that overproduction of reactive oxygen species induced by acrolein was responsible for increased mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation. These findings allow us to conclude that acrolein induces the intrinsic pathway of apoptosis mediated by oxidative stress in A549 cells. Nevertheless, further studies are necessary to increase our knowledge on the toxic mechanisms of this aldehyde, which has important repercussions for human health.

KEYWORDS: Acrolein, Apoptosis, Mitochondria , Caspase.

3.5 Introduction

Acrolein, an α,β -unsaturated aldehyde, is generated as a product of the incomplete combustion during forest and house fires, combustion of plastics, cooking of food and motor vehicle emissions. A major source of acrolein is cigarette smoke, which is responsible for the formation of 50 to 90 ppm of acrolein per cigarette. In addition to being mainly utilized as a biocide, acrolein is used as an intermediate in the production of acrylic acid and DL-methionine, as a starting material for acrylate polymers and numerous other agents. Therefore, humans are exposed in many contexts to this toxic pollutant, which is omnipresent in the environment (Kehrer et Biswal, 2000).

Acrolein is also produced *in situ*, during the normal intermediary catabolism of various amino acids and polyamines (Alarcon, 1976), when allylic alcohol or the anticancer drug cyclophosphamide are metabolized (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). An important source of acrolein is as a by-product of cellular lipid peroxidation associated with oxidative stress (Kehrer et Biswal, 2000).

Acrolein is mutagenic and genotoxic to human cells (Kehrer et Biswal, 2000). This has been attributed to its highly reactive and extremely electrophilic nature (Beauchamp *et al.*, 1985), which permits it to bind and deplete cellular nucleophiles. For example, acrolein causes rapid depletion of the antioxidant glutathione and is able to initiate lipid peroxidation (Kehrer et Biswal, 2000) while increasing generation of reactive oxygen species (ROS) (Luo *et al.*, 2005). Furthermore, acrolein can bind to nucleophilic sites in DNA and can also form protein adducts (Kehrer et Biswal, 2000; Furuhashi *et al.*, 2002). Given that inhalation is the major route of acrolein exposure, it has been associated with many lung diseases such as asthma (Samet et Cheng, 1994), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Hogg, 2001), which often includes chronic bronchitis and emphysema (Saetta, 1999), cystic fibrosis (Samet et Cheng, 1994) and lung carcinogenesis (Feng *et al.*, 2006).

Sublethal doses of acrolein, inferior to 50 μM , were shown to decrease the proliferation of human lung carcinoma cell lines (Rudra et Krokan, 1999) and induce

apoptosis in some cell types, such as alveolar macrophages (Li *et al.*, 1997a) and bronchial epithelial cells (Nardini *et al.*, 2002). Apoptosis plays an important part in homeostatic cell turnover and in the regulation of cell numbers during development (Jacobson *et al.*, 1997). Distinct morphological and biochemical alterations characterize this cell suicide process such as DNA fragmentation into 180-200 pb, phosphatidylserine externalization, chromatin condensation and cellular fragmentation into apoptotic bodies (Schwarz *et al.*, 2007). The mitochondrial pathway of apoptosis is activated by various developmental cues or cytotoxic insults, such as viral infection, DNA damage and growth-factor deprivation, and is strictly controlled by the Bcl-2 family of proteins (Malhi *et al.*, 2006). Activation of proapoptotic members of this family, such as Bax or truncated Bid (tBid), induces permeabilization of the outer mitochondrial membrane, which releases soluble proteins from the intermembrane space into the cytosol, where they promote caspase activation and cell death (Youle et Strasser, 2008). The best studied of these proteins is cytochrome c, which binds to apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) and leads to the assembly of a heptameric protein ring called an apoptosome, that can bind procaspase-9 and induce its activation through a conformational change (Schwarz *et al.*, 2007; Youle et Strasser, 2008). Upon activation, caspase-9 propagates the caspase cascade through activation of effector caspases-3 and -7 (Youle et Strasser, 2008). Caspase-3 in turn activates caspase-6 and can also participate in a feedback amplification loop to further process caspase-9 (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004; Timmer et Salvesen, 2007). Thus, activated caspase-9 can rapidly amplify the death signal.

Proteins, such as endonuclease G and apoptosis-inducing factor (AIF), normally reside in the mitochondria but are released into the cytosol during apoptosis. When they translocate from the mitochondria to the nucleus, they induce DNA fragmentation in a caspase-independent manner (Timmer et Salvesen, 2007). Thus, mitochondrial proteins once released can trigger at least two different death-signaling pathways, which are caspase-dependent and caspase-independent (Jin et El-Deiry, 2005).

Recently, it was demonstrated that acrolein activates the mitochondrial and the death receptor pathways of apoptosis in normal Chinese hamster ovary (CHO) cells (Tanel et Averill-Bates, 2005; Tanel et Averill-Bates, 2007a). However, the molecular mechanisms

and biochemical pathways implicated in acrolein-induced apoptosis are not well understood. Since one of major routes of exposure to acrolein is the lung via inhalation, we therefore chose the A549 adenocarcinoma cell line for this study for its human pulmonary origin. This research investigates whether exposure to low doses of acrolein (1 to 50 μ M) can activate and execute cell death by apoptosis through the mitochondrial signaling pathway *in vitro*. In particular, we evaluate whether acrolein can increase cellular oxidative stress, which can increase the outer mitochondrial membrane permeability and by consequence, cause the release of proapoptotic proteins, such as cytochrome c and AIF, into the cytosol. Improving our understanding of acrolein-induced mechanisms of toxicity is important given the widespread exposure of humans to low doses of this toxic agent and its effect on human health.

3.6 Material and Methods

3.6.1 Cell culture

A549 cells (ATCC #CCL-185) were grown in monolayer in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Canada), 2 mM L-glutamine, 3.7 g/l sodium bicarbonate, 1.0 mM sodium pyruvate and 1% penicillin (50 U/ml)-streptomycin (50 μ g/ml) (Flow Laboratories, Mississauga, ON, Canada), in tissue culture flasks (Starstedt, St-Laurent, QC, Canada). The cells were grown to near confluence in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in a water-jacketed incubator at 37°C and were then incubated for 24 h with fresh culture medium. Confluent cells were harvested using 0.25% (w/v) trypsin-0.02% (w/v) EDTA solution, washed by centrifugation (1000 g, 3 min) and resuspended in minimum essential medium alpha (α MEM) plus 10% FBS for experimental studies (Horton *et al.*, 1999).

3.6.2 Measurement of mitochondrial membrane potential by flow cytometry

To measure changes in mitochondrial membrane potential, the fluorescent probe rhodamine 123 (Rho123) was used. Freshly harvested A549 cells (1×10^6), resuspended in α MEM plus 10% FBS, were pretreated with or without 300 μ M polyethylene glycol catalase (PEG-catalase) (Sigma-Aldrich Canada, ON, Canada) for 3 h and then exposed to acrolein (0 to 50 μ M) or to 25 μ M of positive control *p*-trifluoromethoxy-phenyl-hydrazone (FCCP), in a final volume of 1.0 ml at 37°C. After 30 min, 1 h and 2 h of exposure, the cells were washed three times by centrifugation (1000 g, 3 min) with cold PBS. Then, 2 μ M of Rho123 was added for 30 min at 37°C in the dark. After washing, the labeled cells were analysed by flow cytometry using a FACScan equipped with an argon laser (488 nm) and analysed using Lysis II software (Becton Dickinson, Oxford, UK) on the FL-1 detector. The mean fluorescence intensity of 10 000 cells was calculated for each sample and corrected for the autofluorescence obtained from the samples of unlabeled cells (Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

3.6.3 Measurement of ROS production

The generation of pro-oxidants was measured as described by Denning and coworkers (Denning *et al.*, 2002), with modifications. Freshly harvested A549 cells (1×10^6) were resuspended in α MEM plus 10% FBS and pretreated with or without 300 μ M PEG-catalase for 3 h and then exposed to acrolein for the indicated periods of time. 10 μ M of 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) was added for 30 min at 37°C in the dark. As a positive control, A549 cells were treated with 1 mM of hydrogen peroxide (H_2O_2), and then incubated for 30 min with 10 μ M H_2DCFDA . Samples were washed and analysed by flow cytometry on the FL-1 detector. The mean fluorescence intensity of 10 000 cells was calculated for each sample and corrected for the autofluorescence obtained from the samples of unlabeled cells.

3.6.4 Preparation of whole cell lysates

Following treatment with acrolein, cells were washed in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM 3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid (MOPS), pH 7.4) by centrifugation (1000 g, 3 min). Briefly, the supernatant was discarded, pelleted cells were resuspended in lysis buffer H (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 80 mM β -glycerophosphate, 10 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM NaF, 2% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 1% cocktail of protease inhibitors) and incubated on ice for 1 h, vortexing cells every 15 min. Then, by a 10 min centrifugation at 2500 g, the proteins of whole cell lysates were isolated in the supernatant for the immunodetection of p53, phospho-p53(ser15), AKT, phospho-AKT(ser473), Bad, phospho-Bad(ser136), cIAP1/2 and PARP (Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

3.6.5 Preparation of subcellular fractions

Following treatment with acrolein, cells were washed in buffer A and resuspended in buffer B (buffer A plus 5% Percoll, 0.01% digitonin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT and 1% cocktail of protease inhibitors: 10 μM aprotinin, 10 μM pepstatin A, 10 μM leupeptin, 25 μM calpain inhibitor I). After a 30 min incubation on ice, lysates were homogenised using a hand potter (Kontes glass CO, Duall 22, Fisher, QC, Canada). Unbroken cells were pelleted by centrifugation at 500 g for 5 min. The supernatant was centrifuged further at 2500 g for 10 min to isolate the pelleted nuclear fraction from the supernatant containing at this point the non-purified mitochondrial, microsomal and cytosolic proteins. The purification of the nuclear fraction was achieved by resuspending the pellet with 100 μl of buffer N (20 mM HEPES-KOH, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 0.2 mM PMSF, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% cocktail of protease inhibitors, pH 7.9 at 4 °C) and incubating it on ice for 20 min, vortexing softly every 5 min. After the incubation, the nuclear fraction was purified and isolated from the cellular debris by centrifugation at 15000 g, 5 min. This fraction was used for the detection of nuclear AIF.

After the 2500 g centrifugation, the isolation supernatant was further centrifuge at 15000 g, 15 min. The subsequent pellet was washed with 500 μ L of buffer A and centrifuged at 15000 g for 15 min. The final pellet containing the purified mitochondrial fraction was then resuspended in lysis buffer H for the detection of Bax, cytochrome c and AIF.

The supernatant obtained by the first 18000g centrifugation was then centrifuged at 100 000 g for 1 h. The resultant supernatant was designated as the cytosolic fraction, which was used for the detection of cytochrome c and AIF (Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

3.6.6 Immunodetection

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the cellular proteins was carried out according to Laemmli (Laemmli, 1970). Proteins (40 μ g) were quantified according to Bradford (Bradford, 1976) and then solubilised in Laemmli sample buffer. The samples were boiled for 5 min at 100°C and loaded onto a SDS-polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 125 V. Cellular proteins were transferred electrophoretically to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a MilliBlot Graphite Electrobloetter I apparatus (Milli-pore, Bedford, MA, USA) (Tanel et Averill-Bates, 2005). The transfer buffer contained 96 mM glycine, 10 mM Tris, and 10% methanol. The transfer was carried out for 1.5 h at constant amperage at 80 mA/gel. Hydrophobic or nonspecific sites were blocked overnight at 4°C with 5% powdered skim milk in Tris-buffered saline (50 mM Tris and 150 mM NaCl) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T). Membranes were washed four times for 15 min in TBS-T. The blots were probed with the primary antibodies: anti-PARP, anti-cIAP1/2, anti-AIF, anti-cytochrome c, anti-Bax, anti-Bad, anti-phospho-Bad(ser136), anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and anti-AKT, anti-phospho-AKT(ser473) (Stressgen, San Diego, CA, USA) in TBS-T, 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature. Membranes were washed four times for 15 min and incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000) in TBS-T containing 5% milk powder. Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse, anti-rabbit, and

anti-goat IgG (Biosource, Camarillo, CA, USA). PVDF membranes were washed four times for 15 min, and all proteins were detected using the ECL plus chemiluminescence kit (PerkinElmer, Boston, MA, USA). Purity of mitochondrial, nuclear, cytosolic and microsomal fractions were verified using antibodies to cyclooxygenase IV, lamin B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), glutathione S-transferase (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) and calnexin (BD Biosciences Canada, Mississauga, ON, Canada), respectively (data not shown). For verification of equivalence in protein loading, the blot was probed with the anti-GAPDH antibody and by coloration of the membrane using Coomassie blue (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Protein expression was analysed using a scanning laser densitometer, relative to GAPDH (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

3.6.7 Intracellular expression of Bax, Bcl-2 and survivin by flow cytometry

Briefly, 1×10^6 cells were resuspended in α MEM plus 10% FBS and incubated with acrolein (0 to 27 μ M) in a final volume of 1.0 ml at 37°C. After 1 h or 2 h of exposure, the cells were washed twice by centrifugation (1000g, 3min) in PBS and resuspended in 1.0 ml of freshly made cold 0.25% paraformaldehyde. Cells were then incubated for 1 h on ice. After washing cells with PBS-1% FBS by centrifugation, they were resuspended in 1 ml of PBS-1% FBS-0.05% Tween 20 and incubated for 15 min at 37 °C for cell membrane permeabilization. Cells were then washed with PBS-1% FBS by centrifugation (1000 g, 3 min) and then labeled: with anti-Bax, anti-Bcl-2 or anti-survivin monoclonal antibodies (5 μ l per 10^6 cells) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 30 min at room temperature. After washing labeled cells three times, they were incubated for another 30 min at room temperature in the dark with a secondary FITC-labeled antimouse or antirabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Cells were again washed three times and then analysed by flow cytometry on the FL-1 detector. The mean fluorescence intensity of 10 000 cells was calculated for each sample and corrected for the autofluorescence obtained from the samples of unlabeled cells. The specificity of the secondary antibodies was tested by labeling cells, with or without acrolein treatment, with just the secondary fluorescent antibodies without primary antibody (Del Poeta *et al.*, 2003; Filion *et al.*, 2004).

3.6.8 Determination of caspase activity by fluorescence spectroscopy

The activity of caspases was measured according to Hampton and Orrenius (Hampton et Orrenius, 1997), with minor modifications. Cells were pretreated with or without 300 μ M PEG-catalase for 3 h and then exposed to acrolein for 30 min, 1 h or 2 h. After incubation, cells were washed three times by centrifugation (1000 g, 3 min) in cold PBS and resuspended in 75 μ l of reaction buffer (20 mM piperazine-N-N-bis-(2-ethanesulfonic acid), 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% 3-(3-cholamidopropyl-dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propane sulfonic acid and 10% sucrose, pH 7.2). Cells were lysed at -80°C for 30 min. The kinetic reaction was followed for 30 min after addition of the appropriate caspase substrate at a final concentration of 50 μ M, at 37°C (Tanel et Averill-Bates, 2005) using a Spectra Max Gemini spectrofluorimeter (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Caspase-9 activity was measured by cleavage of the fluorogenic peptide substrate Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC (Ac-LEHD-AFC) with λ_{max} excitation at 400 nm and λ_{max} emission at 505 nm. For caspase-3, the substrate was Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Ac-DEVD-AMC) with λ_{max} excitation at 380 nm and λ_{max} emission at 460 nm, and for caspase-6, the substrate was Ac-Val-Glu-Ile-Asp-AMC (Ac-VEID-AMC) with λ_{max} excitation at 380 nm and λ_{max} emission at 460 nm (Calbiochem, La Jolla, CA, USA).

3.6.9 Cell cycle analysis

Following a 24 h treatment with acrolein, 1×10^6 cells were washed twice in PBS-1% FBS by centrifugation (1000 g, 3 min). The pelleted cells were resuspended in 1 ml of cold PBS-1% FBS and 3 ml of cold 100% ethanol was added drop by drop with agitation to avoid cell clumping. Cells were fixed at -20°C for 1 h and then washed twice in PBS. The pelleted fixed cells were resuspended in 500 μ l of cell cycle solution (0.05 mg/ml of propidium iodide and 0.5 μ g/ml of RNase A in PBS) and incubated at 4°C for 24 h in the dark (Krishan, 1975). Cells (10 000) were analysed by flow cytometry on the FL-2, FL2-A and FL2-W detectors and analysed using ModFit software (Verity Software House, Topsham, ME, USA) to determine the percentage of cells in apoptosis, G0/G1 phase, S phase and G2/M phase.

3.6.10 Statistics

Data represent means \pm SEM from at least 3 independent experiments. When not shown, error bars lie within symbols. Comparisons among multiple groups were made by one-way ANOVA, which measures the linear contrast of means. The Bonferroni-Holmes adjustment was used to control for the Family-wise error rate at a desired level ($\alpha=5\%$). Software used was JMP Statistical Discovery 4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). For significant differences, $P < 0.05$. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ as compared with control (0 μ M); (θ) $P < 0.05$, ($\theta\theta$) $P < 0.01$ as compared with cells non pretreated with PEG-catalase at the same concentration of acrolein.

3.7 Results

3.7.1 Acrolein increases mitochondrial membrane potential and ROS production

The potential ability of acrolein to induce apoptosis by the mitochondrial signaling pathway was determined in A549 cells. We first evaluated its effect on mitochondrial membrane potential (Fig. 1A, 1B). A hyperpolarisation of the mitochondrial membrane was induced when cells were exposed to low concentrations of acrolein ranging from 0 to 50 μ M, for 30 min to 1 h. Rho123 fluorescence increased by 20 to 66 % compared to the untreated control. FCCP was used as a positive control for membrane depolarisation, which decreased by 20 % after a 1 h exposure.

Since acrolein increases mitochondrial membrane potential, we therefore investigated whether this could arise from increased ROS production (Fig. 1C, 1D). Several studies have linked mitochondrial membrane hyperpolarisation with ROS generation (Russell *et al.*, 2002; Vincent *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Toninello *et al.*, 2006). Indeed, acrolein increased ROS production by about 20 to 46 % in A549 cells, when compared to the untreated cells. The positive control for ROS production, 1 mM hydrogen peroxide, caused a 215 % increase in ROS production.

3.7.2 Acrolein increases Bax levels at mitochondria

Since the mitochondrial pathway is strictly regulated by the Bcl-2 family proteins (Youle et Strasser, 2008), we determined whether acrolein could alter the proapoptotic:antiapoptotic ratio of these proteins at the mitochondrial membrane. When, A549 cells were exposed to acrolein for 1 h at concentrations of 0 to 14 μM , there was a dose-dependent increase of 18 to 40 % in Bax expression at the mitochondria, relative to the untreated cells (Fig. 2A, 2B). However, there was no change in total cellular expression of Bax and Bcl-2, or in the ratio of Bax / Bcl-2 (Fig. 2C, 2D, 2E).

3.7.3 Cytochrome c release from mitochondria in the presence of acrolein

One of the most important steps in the mitochondrial pathway is the release of cytochrome c into the cytosol, where it can bind Apaf-1 (Li *et al.*, 1997b) and amplify the apoptotic cascade. Acrolein (0 to 14 μM) caused the liberation of cytochrome c into the cytosol after 30 min in A549 cells. In the mitochondrial fraction, cytochrome c levels decreased to about 60 %, relative to the untreated cells (Fig. 3A, 3C). Cytochrome c was exported to the cytosol with a maximum increase in translocation of 41 % in the cytosolic fraction, when compared to the untreated control (Fig. 3B, 3C).

3.7.4 Acrolein induces activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3 and -6

The binding of Apaf-1 to cytochrome c leads to the assembly of an apoptosome, which promotes caspase-9 activation (Youle et Strasser, 2008). The enzymatic activity of initiator caspase-9 was analysed by exposing A549 cells to acrolein at concentrations ranging from 0 to 27 μM , for 30 min, 1 h and 2 h (Fig. 4A). Increased activity of caspase-9 was obtained after a 30 min incubation and reached a maximum increase of 30 % after 1 h. Caspase-9 also remained activated after 2 h.

Upon activation within the apoptosome, caspase-9 then propagates the caspase cascade through activation of effector caspase-3, which in turn activates caspases-6 and -7 (Timmer et

Salvesen, 2007). To determine the downstream events from caspase-9 in the apoptotic cascade initiated by acrolein exposure, we pursued our investigation by looking at the enzymatic activity of effector caspases-3 and -6, compared to the untreated cells. Caspase-3 activity increased by about 20 to 29 % after a 1 h exposure to acrolein (1 to 27 μ M) and up to 44 % after 2 h (Fig. 4B). Furthermore, acrolein caused a low increase (12 to 17 %) in the enzymatic activity of caspase-6 (Fig. 4C) after exposure times of 30 min, 1 h and 2 h, when compared to the untreated cells.

3.7.5 Acrolein induces AIF release from mitochondria and translocation to the nucleus

AIF, normally residing in the mitochondrial intermembrane space, is released into the cytosol during apoptosis, where it can translocate to the nucleus to induce DNA degradation in a caspase-independent manner (Jin et El-Deiry, 2005). We subsequently investigated the ability of acrolein (0 to 14 μ M) to induce the release of AIF from mitochondria. In the mitochondrial fraction (Fig. 5B, 5D), a 1 h exposure to acrolein caused a dose-dependent increase in AIF expression, to 58 % above the control level. For the cytosolic fraction (Fig. 5C, 5D), exposure to acrolein for 30 and 60 min resulted in a 8 to 35 % decrease in AIF expression. Finally, in the nuclear fraction (Fig. 5A, 5D), acrolein induced an 8 to 202 % increase in AIF expression after an exposure of 30 min to 1 h.

3.7.6 Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein

After establishing that the mitochondrial pathway was initiated by acrolein, the execution phase of apoptosis was analysed to determine the potential cytotoxicity of this aldehyde in A549 cells. This was evaluated by changes in the cell cycle, including DNA fragmentation (Fig. 6A, 6B) and by changes in PARP expression (Fig. 6C, 6D), two distinctive changes occurring during apoptosis. However, the percentage of cells in different stages of the cell cycle, G0/G1, S, and G2/M, did not change during a 24 h exposure to acrolein. Nevertheless, the percentage of SubG0/G1 population, corresponding to fragmented DNA in apoptotic cells, increased up to 10 % in acrolein-treated A549 cells,

compared to the untreated cells. Furthermore, expression of full-length PARP decreased by 28 % after a 2 h exposure to acrolein, in relation to the untreated cells.

3.7.7 Activation of AKT by acrolein

AKT (protein kinase B or PKB) is activated in response to many different growth factors, hormones and external stresses such as heat shock and osmolarity (Talapatra et Thompson, 2001). We evaluated the capacity of acrolein to regulate the expression of AKT and its phosphorylation by exposing A549 cells to different concentrations of acrolein (0 to 14 μ M). Acrolein induced an increase in the total cellular expression of AKT ranging from 9 to 50 % after a 30 min exposure, whereas after 1 h, AKT expression returned to the control level (Fig. 7A, 7C). The total cellular expression of phospho AKT (ser473) also increased up to 52 %, in relation to the untreated cells (Fig. 7B, 7C).

3.7.8 Acrolein induces phosphorylation of Bad

Bad regulates apoptosis upstream from mitochondrial-mediated caspase-9 activation. When Bad is unphosphorylated, it binds to Bcl-2 and Bcl-XL, neutralizing their antiapoptotic activity (Jin et El-Deiry, 2005). We therefore determined the ability of acrolein to modulate the expression of Bad and its phosphorylation (Fig. 8A, 8B). Exposure to 14 μ M of acrolein for 30 min induced a 29 % increase in total cellular expression of Bad. However, a 30 min exposure to acrolein caused a pronounced dose-dependent increase in total cellular expression of phospho Bad (ser136) from 50 to 230 %, in relation to the untreated cells.

3.7.9 Acrolein increases cIAP1/2 expression in A549 cells

The cellular inhibitors of apoptosis (cIAPs) are proteins that function as intrinsic regulators of the caspase cascade (Liston *et al.*, 2003). We evaluated the capacity of acrolein (0 to 14 μ M) to regulate the expression of cIAP1/2 in A549 cells (Fig. 9A, 9B). Indeed, acrolein induced a dose-dependent increase in the total cellular expression of cIAP1/2, ranging from 25 to 91 % above the control level.

Survivin, the only cIAP to associate with chromatin structures (Li *et al.*, 1998a), plays a role in monitoring the success of chromosome replication and the suppression of caspase activity in the nucleus (Liston *et al.*, 2003). We investigated whether acrolein could alter the expression of this antiapoptosis protein in A549 cells. After a 1 h exposure (0 to 14 μM), there was a small (10 to 16 %) decrease in the total cellular expression of survivin, compared to the untreated control (Fig. 9C, 9D).

3.7.10 Effects of acrolein-induced ROS on mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation

Since acrolein caused mitochondrial apoptosis in A549 cells, we further investigated whether this pathway could be triggered by increased ROS production. We therefore evaluated whether the cell permeable antioxidant PEG-catalase could inhibit the acrolein-induced mitochondrial membrane hyperpolarisation and activation of caspase-3. Indeed, the overproduction of ROS, hyperpolarisation of the mitochondrial membrane, and activation of caspase-3 caused by acrolein were significantly attenuated by pretreatment of cells with 300 μM PEG-catalase, a well-known ROS scavenger, which detoxifies hydrogen peroxide (Fig. 10A, 10B, 10C). These findings show that acrolein-induced mitochondrial changes are mediated by ROS.

3.8 Discussion

3.8.1 Acrolein increases ROS production and mitochondrial membrane potential

This study establishes that short exposures (30 min to 2 h) to low concentrations of acrolein (0 to 50 μM) induced ROS overproduction in proliferating human pulmonary adenocarcinoma A549 cells. Luo and coworkers reported that acrolein induced cell death by necrosis in PC-12 cells, through stimulating the production of mitochondrial ROS and inflicting mitochondrial dysfunction (Luo *et al.*, 2005). Acrolein caused hyperpolarisation of the mitochondrial membrane in A549 cells, which underwent cell death by apoptosis, rather

than necrosis. Several studies using other toxic compounds (Joshi *et al.*, 1999) are in agreement with our findings. A novel anti-prostate cancer compound, named BMD 188, was shown to trigger apoptosis by activating the mitochondrial respiratory complex subunits, with consequent enhancement of mitochondrial membrane potential and overproduction of ROS (Toninello *et al.*, 2006). Furthermore, in cultured neuronal cells, high glucose induced initial hyperpolarisation followed by depolarisation of the inner mitochondrial membrane potential, which was associated with increased generation of ROS (Russell *et al.*, 2002; Vincent *et al.*, 2004). Others have found that high-glucose- and angiotensin-II-induced mitochondrial membrane hyperpolarisation, which reflects impairment of mitochondrial electron transfer and respiration, would increase NAD(P)H oxidase activity (a major source of ROS generation) by increasing the cytosolic NADH:NAD⁺ ratio, which in turn induced up-regulation of ROS production (Park *et al.*, 2005). Hyperpolarisation of the mitochondrial membrane was also reported during staurosporine-induced apoptosis (Scarlett *et al.*, 2000).

The mitochondrial membrane potential has been reported to decrease, increase or not change, during cytochrome c release. Some authors demonstrated that cytochrome c release was upstream of caspase activation and that loss of mitochondrial membrane potential was not required for its release, suggesting that depolarisation was a consequence of caspase activation and not the cause of it (Schuler *et al.*, 2000; Toninello *et al.*, 2006). In PC-12 cells, acrolein did not induce apoptosis, but rather necrosis, which involved mitochondrial dysfunction and loss of mitochondrial membrane potential (Luo *et al.*, 2005). Consequently, acrolein-induced activation of the mitochondrial pathway of apoptosis does not necessarily depend on opening the mitochondrial permeability transition pore (Schuler *et al.*, 2000).

3.8.2 Acrolein increases Bax concentration at mitochondria

In most *in vitro* studies, Bax shows a different intracellular distribution before and after apoptotic stimuli (Youle et Strasser, 2008). BH3-only proteins such as Bid (full length and protease-cleaved, tBid, forms) have been shown to provoke conformational changes in Bax causing its relocation to mitochondria, which induces mitochondrial dysfunction, including cytochrome c release (Kim et Chung, 2007). Our findings show that the total cellular

expression of Bax and Bcl-2 and the ratio between these proteins are not modulated by short exposures to low concentrations (0 to 27 μM) of acrolein. However, acrolein does stimulate the translocation of Bax to mitochondria. This agrees with acrolein-induced Bax translocation from the cytoplasm to mitochondria in CHO cells after 1 h exposure (Tanel et Averill-Bates, 2007b).

3.8.3 Release of cytochrome c from mitochondria in the presence of acrolein

Since the movement of Bax is not sufficient for the engagement of apoptosis (Degli Esposti et Dive, 2003), we pursued our research on cytochrome c release. Our findings show that low concentrations of acrolein induced liberation of cytochrome c into the cytosol, after 30 min. These results are in agreement with acrolein-induced cytochrome c translocation from mitochondria to the cytoplasm in CHO cells after 1 h exposure (Tanel et Averill-Bates, 2005). Acrolein could cause mitochondrial dysfunction through the cross-talk pathway involving caspases-2 and -8 mediated cleavage of proapoptotic protein Bid (Roy *et al.*, 2008a), along with increased levels of mitochondrial Bax. It was reported that caspase-2 is implicated in cytochrome c release and is essential for drug-induced apoptosis in several human cell lines (Robertson *et al.*, 2002). At the same time as cytochrome c release, our previous results with acrolein demonstrated an upregulation in cytosolic Bid, an increase in mitochondrial tBid expression and caspase-2 activation (Roy *et al.*, 2008a). Furthermore, tBid can interact with Bax and induce the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane, which triggers cytochrome c release (Eskes *et al.*, 2000). Our findings suggest that acrolein induces cytochrome c by mechanisms which appear to involve proapoptotic Bcl-2 proteins, rather than loss of MMP.

3.8.4 Acrolein induces activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3 and -6

At the post-mitochondrial level, cytochrome c is an essential component of the cytosolic apoptosome complex, along with Apaf-1 and procaspase-9, which then propagate the caspase cascade (Timmer et Salvesen, 2007; Youle et Strasser, 2008). Our results demonstrate that acrolein induced activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3 and -6. Acrolein-

induced caspase-9 activation was also shown in CHO cells after 1 h exposure (Tanel et Averill-Bates, 2005), but for the first time, we demonstrate that acrolein induces activation of caspase-6 in A549 cells. Caspase activation by acrolein seems to be cell type dependent since other reports indicated that it inhibits activation of caspase-3 in CHO (Tanel et Averill-Bates, 2005; Tanel et Averill-Bates, 2007a) and in PC-12 (Liu-Snyder *et al.*, 2006) cell lines. The weak activation of caspases can be explained by the fact that acrolein reacts rapidly with their thiol group. It was hypothesized that acrolein may inhibit in part the activity of this family of enzymes through direct alkylation of its active cysteine residue site (Kern et Kehrer, 2002; Tanel et Averill-Bates, 2005). It appears that acrolein can simultaneously activate and inhibit certain caspases and the final outcome (activation or inhibition) is the net result of these two processes.

Since activated effector caspases are able to cleave caspase substrates, such as PARP (Fan *et al.*, 2005) and induce chromatin condensation (Degterev *et al.*, 2003), we further investigated the ability of acrolein to execute apoptosis in a caspase-independent manner.

3.8.5 Acrolein induces AIF release from mitochondria and translocation to the nucleus

AIF normally resides in the mitochondrial intermembrane space and can act as a ROS scavenger. In this capacity, AIF can exert a cytoprotective role, enabling cells to cope more effectively with oxidative stress. But once AIF is released during apoptosis, it translocates to the nucleus to induce cell death by binding DNA, stimulating DNase activity, triggering chromatin condensation and DNA fragmentation in a caspase-independent manner (Stambolsky *et al.*, 2006).

We report, for the first time, that low doses (0 to 14 μM) of acrolein induce AIF translocation from mitochondria to the nucleus in A549 cells after short exposure times (30 to 60 min). With the aim of understanding the increase in mitochondrial AIF after 1 h exposure to acrolein in A549 cells, it was recently reported that the AIF gene is positively regulated by p53 (Stambolsky *et al.*, 2006). Since we demonstrated that acrolein upregulates p53 activation after 30 min in A549 cells (Roy *et al.*, 2008a), it is possible that the direct action of

p53 on the mitochondrial outer membrane (Mihara *et al.*, 2003) might exert a synergistic effect by enabling the rapid release of AIF from mitochondria (Stambolsky *et al.*, 2006). Therefore, this multi-step sequence of events including p53 accumulation, induction of AIF transcription, translation and localization to the mitochondria may consequently cause an increase in mitochondria AIF after exposure to acrolein, before its final translocation to the nucleus. Thus, it appears that the mitochondrial proteins released by acrolein can trigger a caspase-dependent and a caspase-independent death-signaling pathway. We subsequently investigated the execution phase of apoptosis in the presence of acrolein.

3.8.6 Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein

Acrolein did not cause cell cycle arrest, but rather, the execution phase of apoptosis was activated, which was confirmed by DNA fragmentation and PARP cleavage, in A549 cells. These results are supported by different studies where acrolein stimulated apoptosis by DNA fragmentation in isolated human alveolar macrophages (Li *et al.*, 1997a) and in the human lung epithelial cell line HBE1 (Nardini *et al.*, 2002). In CHO cells, acrolein caused cleavage of the DNA repair enzyme PARP, after 2 h exposure (Tanel et Averill-Bates, 2007a).

3.8.7 Acrolein induces activation of AKT and phosphorylation of Bad

AKT promotes cell survival by exerting an antiapoptosis effect against various stimuli (Franke *et al.*, 1995) and plays a significant role in glucose metabolism (Faber *et al.*, 2006). Activation of AKT by phosphorylation prevents the proapoptotic action of Bcl-2 family protein Bad through its phosphorylation at Ser¹³⁶P (Datta *et al.*, 1997). Bad regulates apoptosis upstream from mitochondrial-mediated caspase-9 activation, by binding to Bcl-2 and Bcl-XL, neutralizing their antiapoptotic activity (Antonsson, 2003).

Our findings show that acrolein induces an early upregulation of AKT and its phosphorylation, as well as an upregulation in Bad phosphorylation, in A549 cells. AKT activation could be associated with the Fas death receptor signaling pathway induced by

acrolein, since FasR engagement with the membrane-bound form of FasL and soluble FasL (sFasL) was recently found to induce AKT activation in endothelial cells (Takemura *et al.*, 2004). These results concord with previous findings that AKT is implicated in the cell survival response against an acrolein insult in CHO cells (Tanel et Averill-Bates, 2007c). However, they contradict the acrolein-induced proapoptotic Bad translocation from the cytosol to mitochondria in CHO cells (Tanel et Averill-Bates, 2007b). This last contradiction may be in part due to the different cell type or the lack of study of direct phosphorylation of Bad in CHO cells. It is plausible that acrolein induces translocation of Bad to mitochondria, which is a proapoptotic event, and its phosphorylation, which is antiapoptotic, at the same time. Exposure to toxic compounds, under less severe stress conditions, can induce cellular defenses to enable the cell to survive. If this does not succeed, the cell will then die by apoptosis.

3.8.8 Increased cIAP1/2 expression in the presence of acrolein

Not long ago, cIAP-1 and cIAP-2 were found to directly inhibit some of the caspases, more precisely caspases-3 and -7, by ubiquitination (Huang *et al.*, 2000). For the first time, we report that low doses (0 to 14 μM) of acrolein induced an upregulation of the total cellular content of antiapoptosis cIAP1/2 proteins in A549 cells after 2 h exposure. This survival response could be associated with the acrolein-induced early AKT overexpression and activation. Previous results demonstrated that enhanced transcription and translation of cIAP-2 is mediated by activated AKT (Hu *et al.*, 2004). Also, others have found that overexpression of AKT resulted in an upregulation of cIAP-1 expression (Gagnon *et al.*, 2003). These results suggest a pivotal role of AKT in the regulation of cell survival through the upregulation of a specific inhibitor of apoptosis protein.

Survivin is restricted to expression at the G2/M point in the cell cycle, and is the only IAP to associate with chromatin structures (Li *et al.*, 1998a). For the first time, we report that low doses (0 to 14 μM) of acrolein induced a slight downregulation of the total cellular content of antiapoptosis protein survivin in A549 cells after 1 h exposure. This result could be associated with acrolein-induced p53 activation and/or to acrolein-generated ROS. In

A549 cells, previous reports suggested that p53 down-regulates the expression of survivin, by binding to the survivin promoter and suppressing its transcription (Ikeda *et al.*, 2007). Furthermore, another study indicates that downregulation of survivin expression is mediated by ROS generation, which may exceed a certain threshold that finally overcomes antiapoptotic forces, shifting the cell survival/death balance towards cell death (Jin *et al.*, 2006).

3.8.9 Effects of acrolein-induced ROS on mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation

To further our knowledge on acrolein-induced apoptosis by the mitochondrial pathway, we determined whether the hyperpolarisation of the mitochondrial membrane and the activation of caspase-3 were dependent on acrolein-induced ROS overproduction. ROS were partially implicated in the activation of caspase-3 during apoptosis induced by chromium (VI/V) in lymphocytes (Vasant *et al.*, 2003). Quenching of ROS by PEG-catalase prevented the hyperpolarisation of the mitochondrial membrane and caspase-3 enzymatic activity, indicating that ROS are required for acrolein-induced activation of the intrinsic apoptotic pathway in A549 cells.

3.9 Conclusions

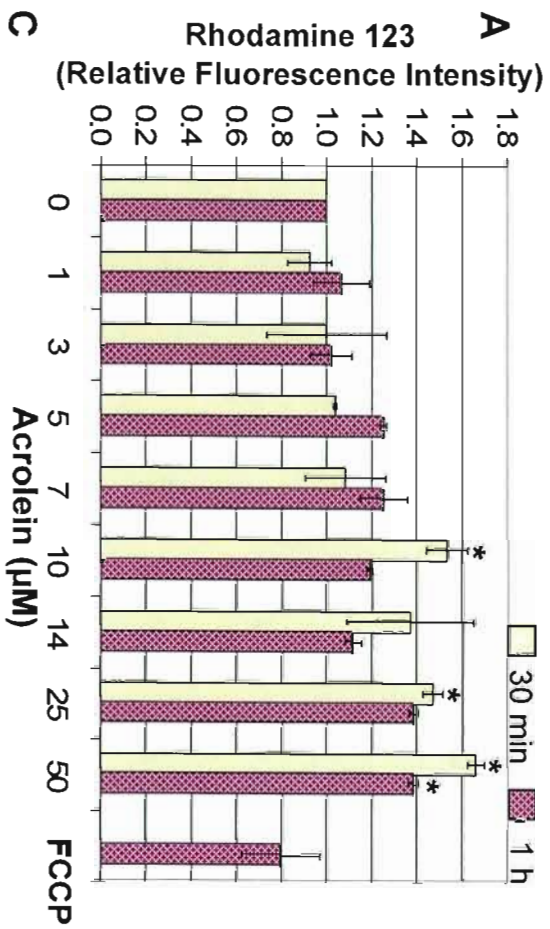
In conclusion, the present study detailed the mechanism of acrolein-induced apoptosis by the mitochondrial pathway in A549 proliferating human pulmonary adenocarcinoma cells. At the same time, acrolein induced cell survival mechanisms by the phosphorylation of AKT, Bad, and the upregulation of the cIAP1/2. Often, the cell fate and death mechanism is determined by the relative speed of each process in a given model system, and by the antagonists of the individual pathways differentially expressed in the cell (Jäättelä *et al.*, 2003). AIF, caspases, and ROS can act on mitochondria through feedback mechanisms, causing enough structural and functional damage to trigger the release of other death factors, independent of the upstream signals (Strasser *et al.*, 2000). In the case of IAPs, they can be

degraded by the caspases (Liston *et al.*, 2003). The overall fate of the cell is a question of balance between the pro- and antiapoptotic signals. In this study, even though the antiapoptotic proteins are upregulated and activated, we can still detect an activation of the proapoptotic signals by acrolein and the execution of death by apoptosis in A549 cells. On the other hand, this does not rule out the possibility that acrolein could induce apoptosis by alternative or complementary mechanisms. Future studies will investigate the implication of the endoplasmic reticulum pathway of apoptosis, as well as the MAPK pathway, in acrolein-induced toxicity, in A549 cells.

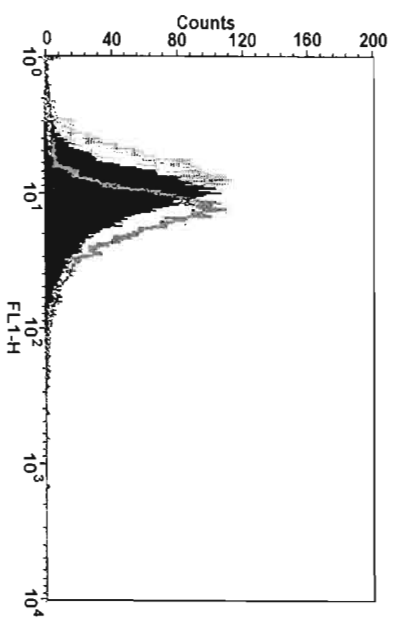
These findings are relevant to the toxicity of acrolein in many contexts, including the pharmacological action and/or side effects of the anticancer agent cyclophosphamide, which has acrolein as one of its metabolites, the regulation of cellular proliferation and tumor growth by polyamines, Alzheimer's disease, as well as the toxicity of environmental exposures to low doses of acrolein.

3.10 Acknowledgments

Financial support was obtained from NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada) and CIHR (Canadian Institutes of Health Research) (DAB). Financial support is gratefully acknowledged from the Bourse Francine Beaudoin-Denizeau (Fondation UQAM), FRSQ (Fonds de la recherche en santé du Québec) and CIHR (JR). The authors thank Yulia Zilber and André Tanel for technical assistance.



B Mitochondrial membrane potential



D ROS generation

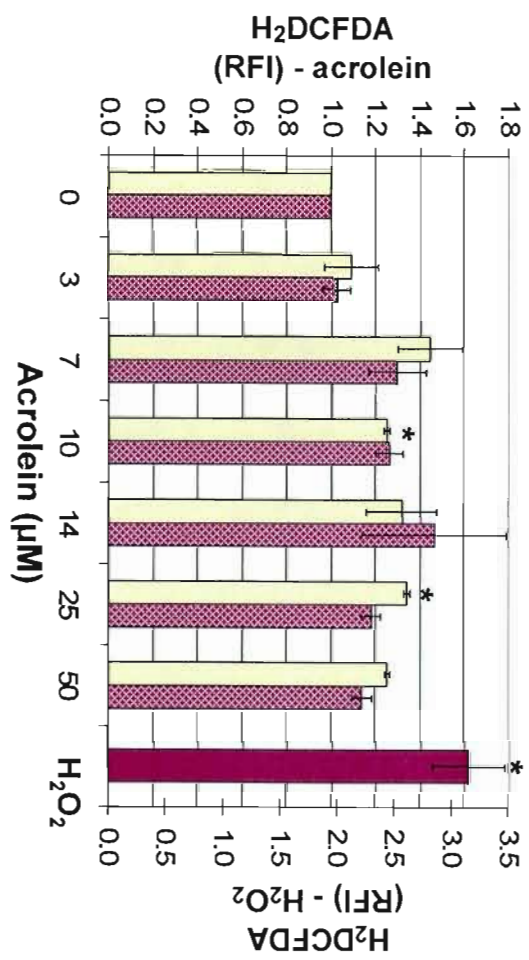
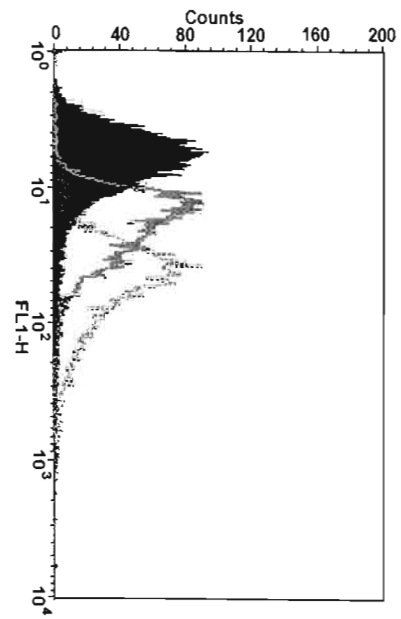


Figure 2

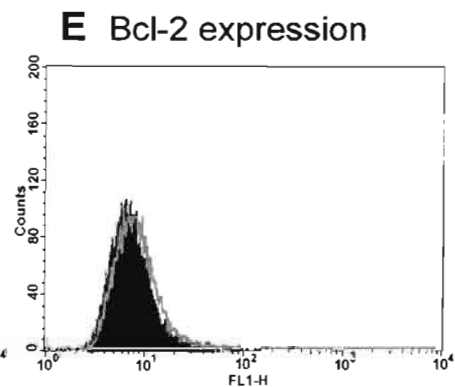
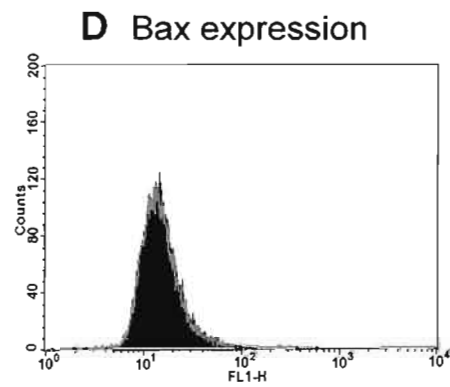
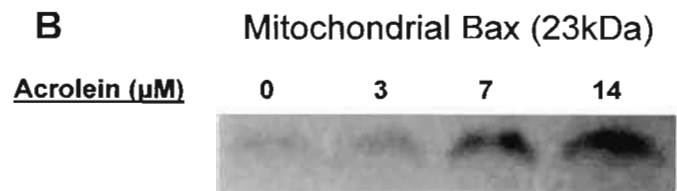
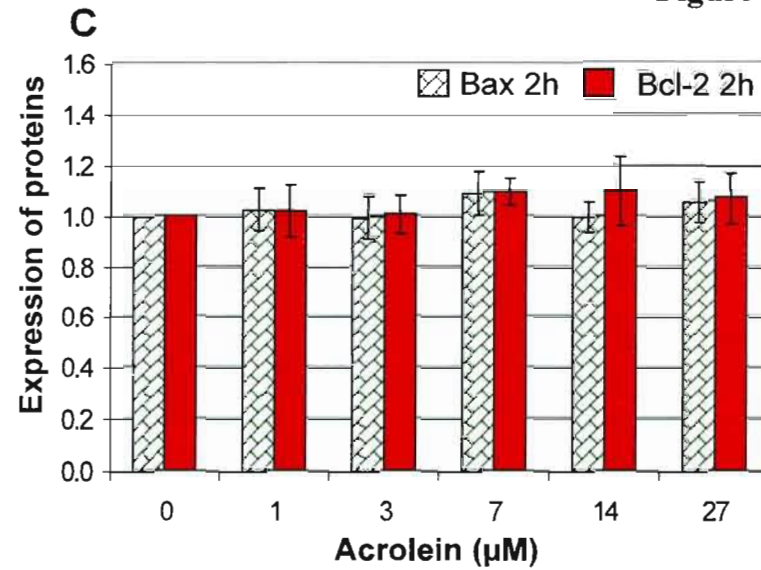
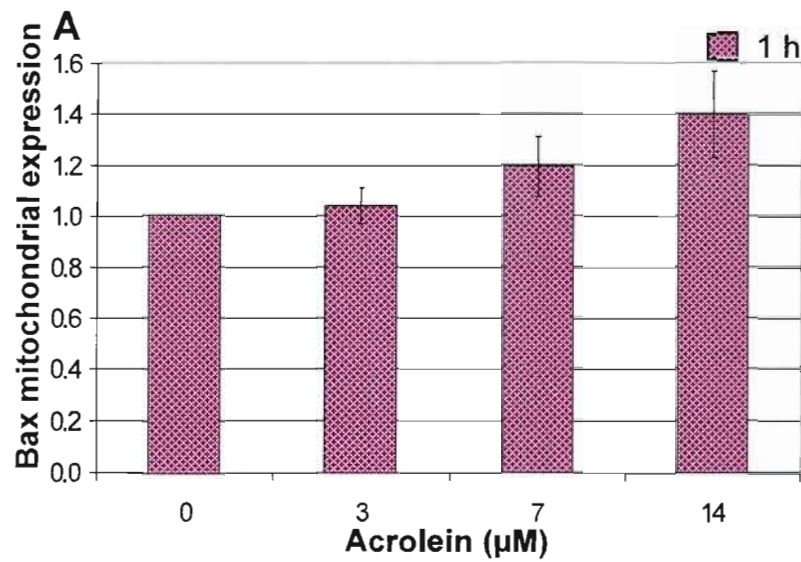


Figure 3

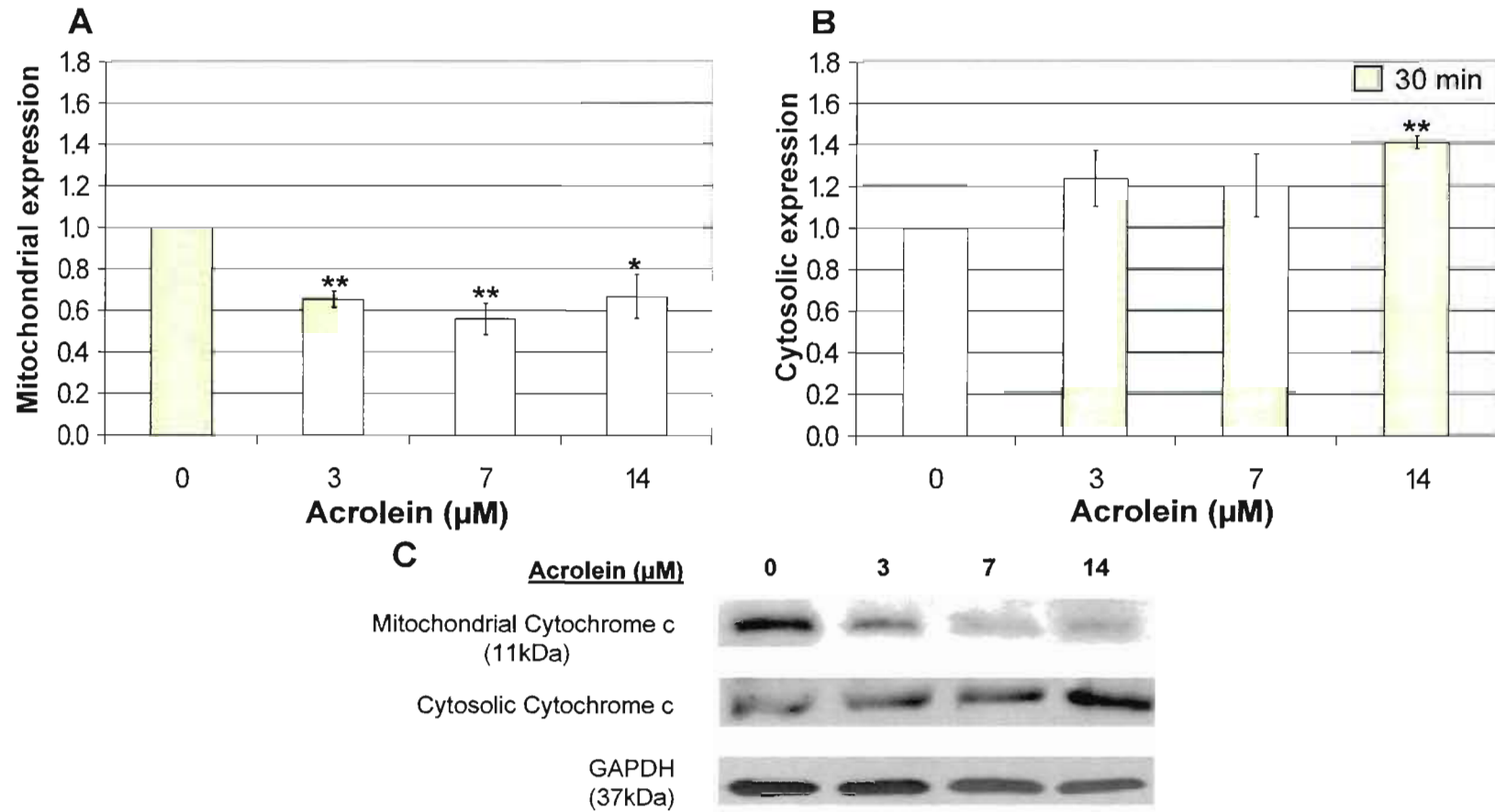


Figure 4

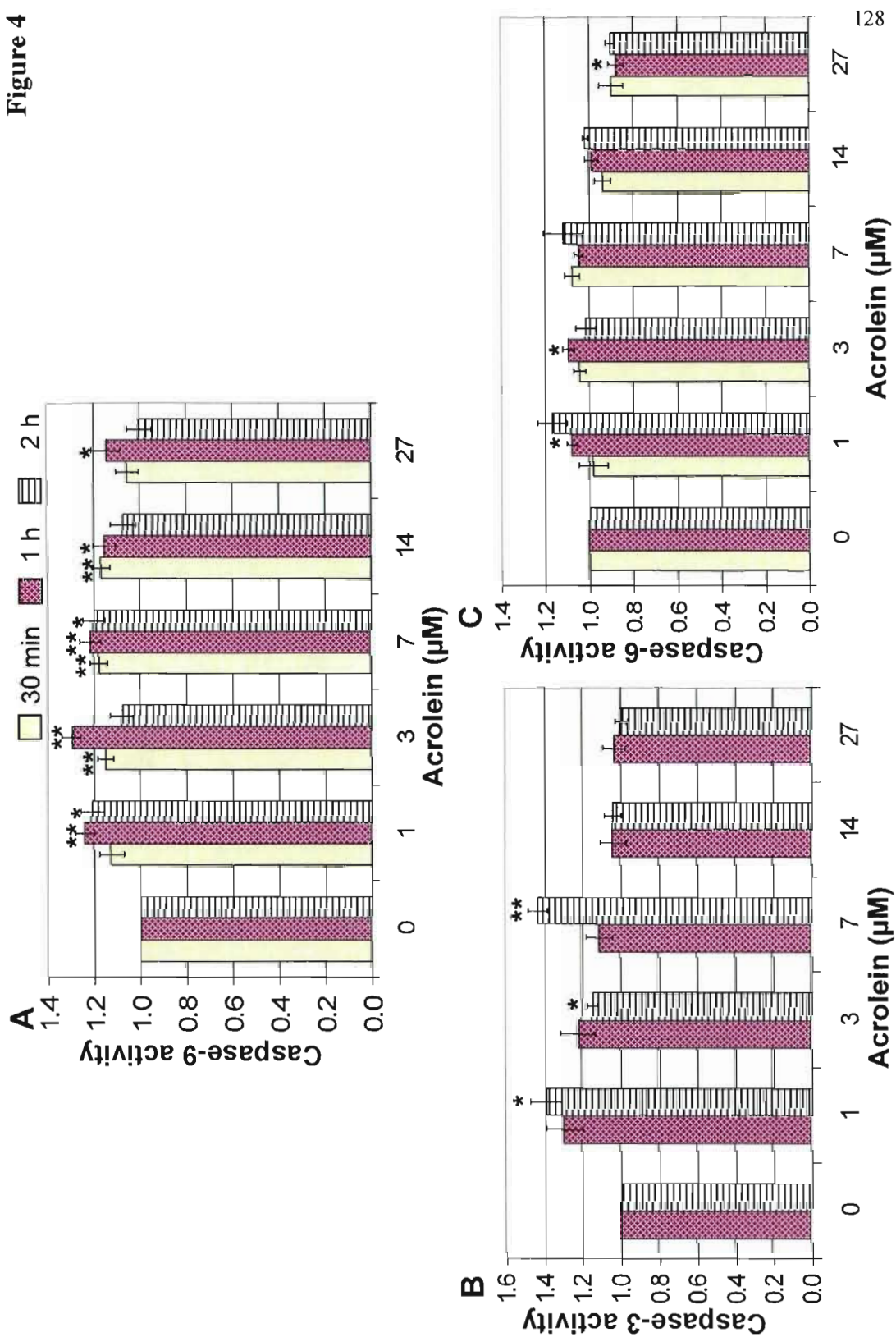


Figure 5

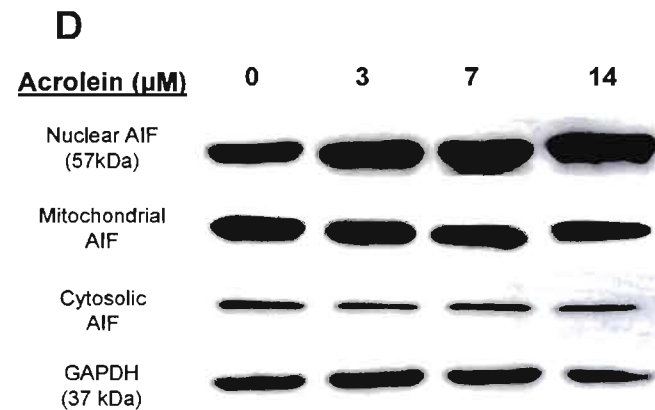
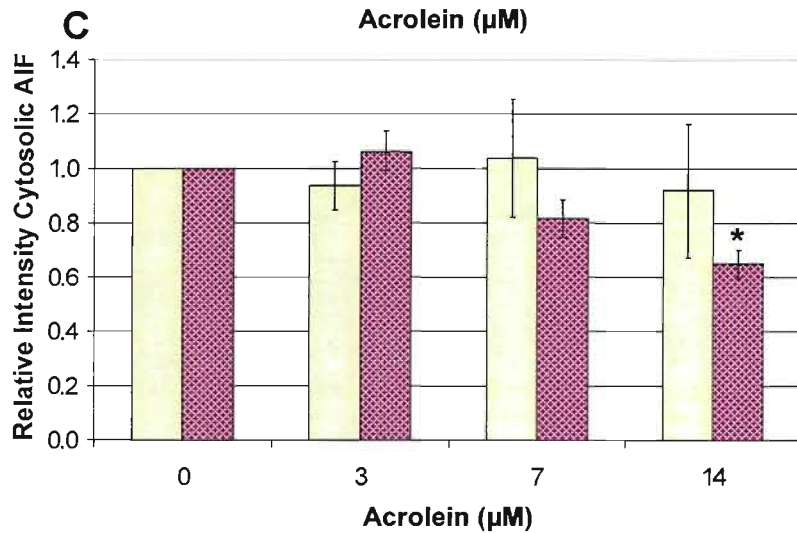
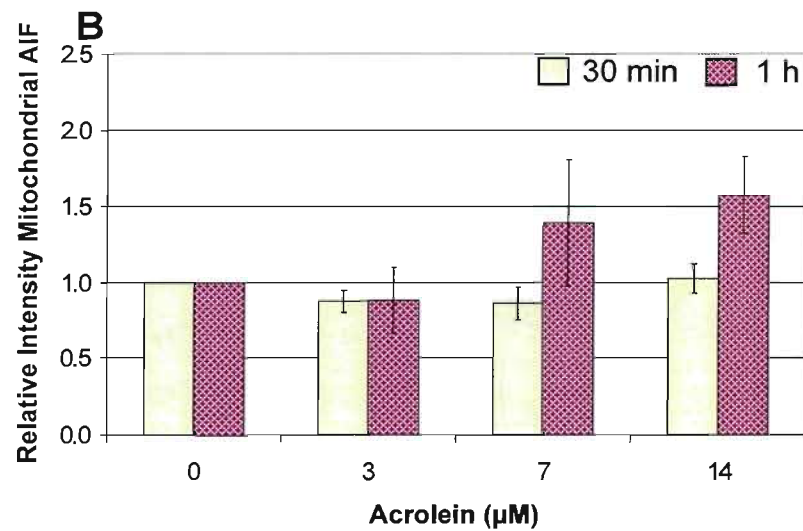
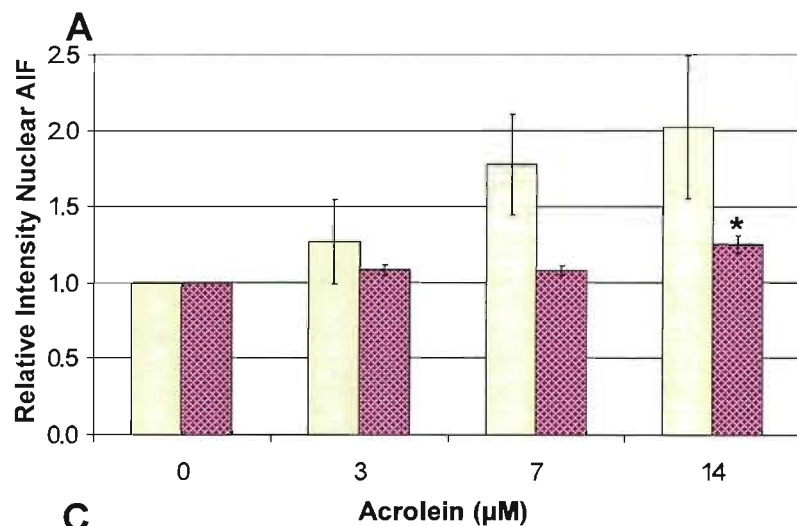


Figure 6

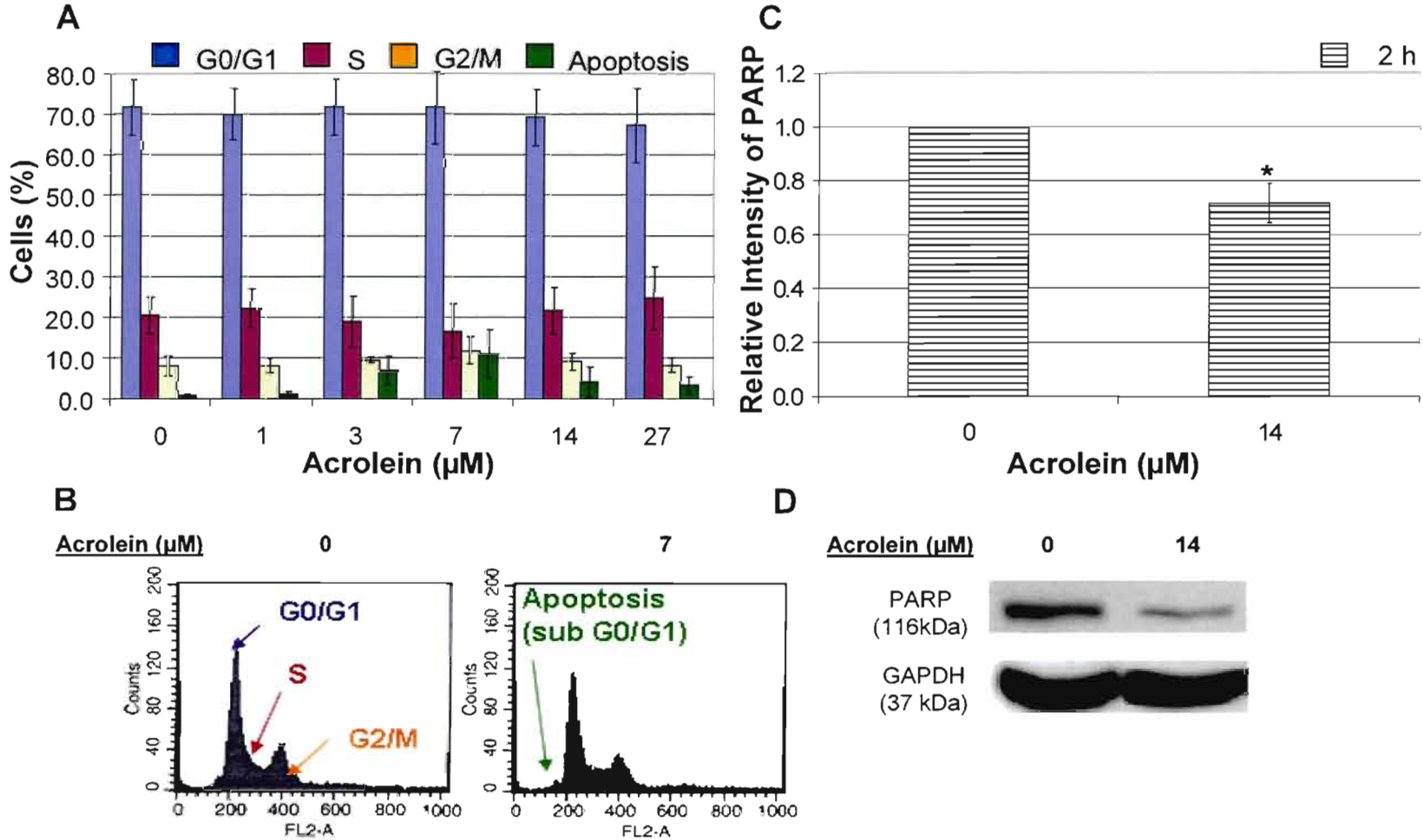


Figure 7

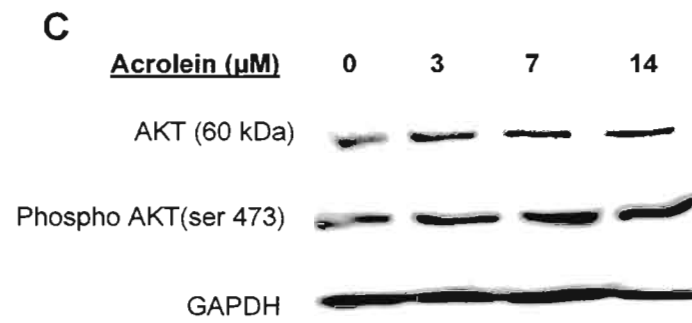
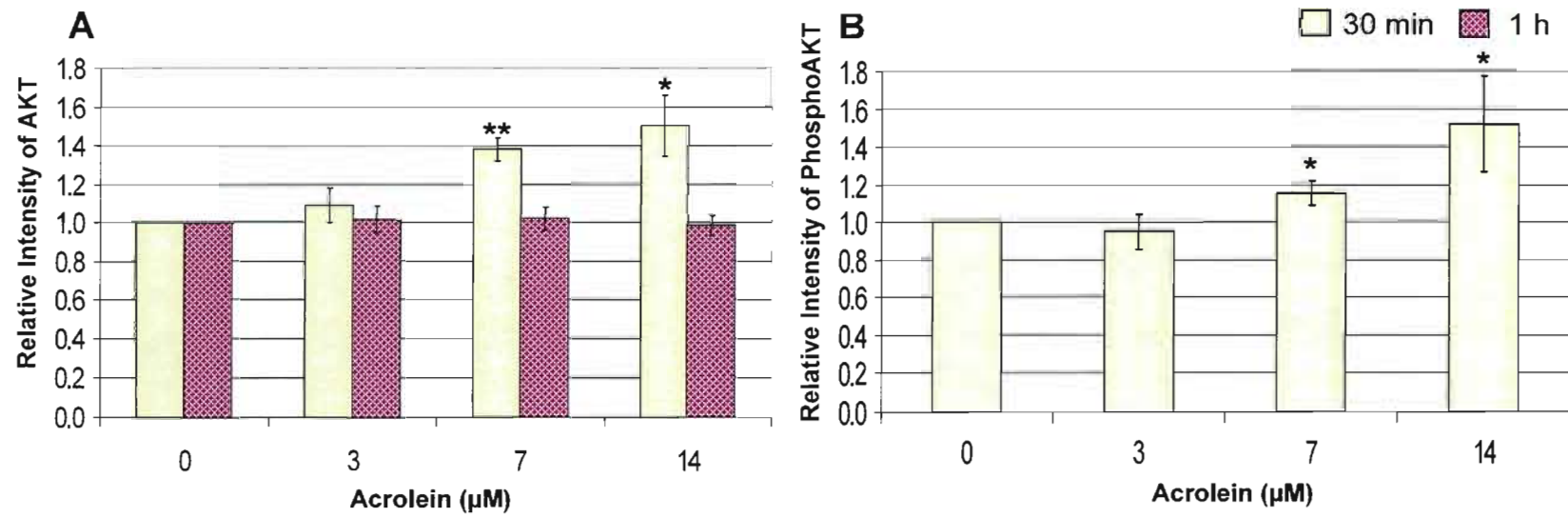
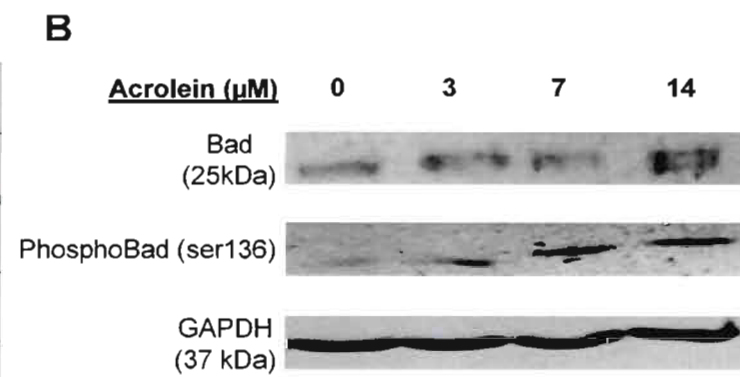
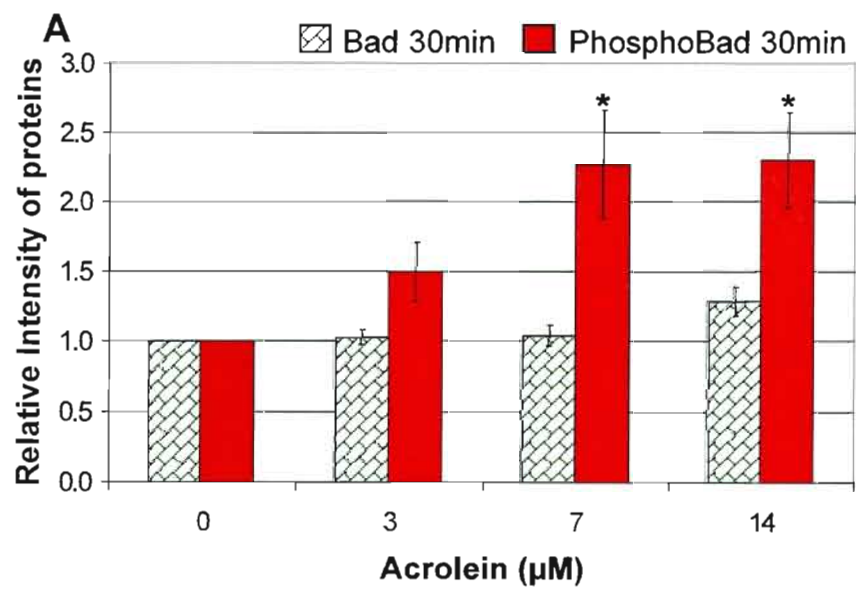


Figure 8



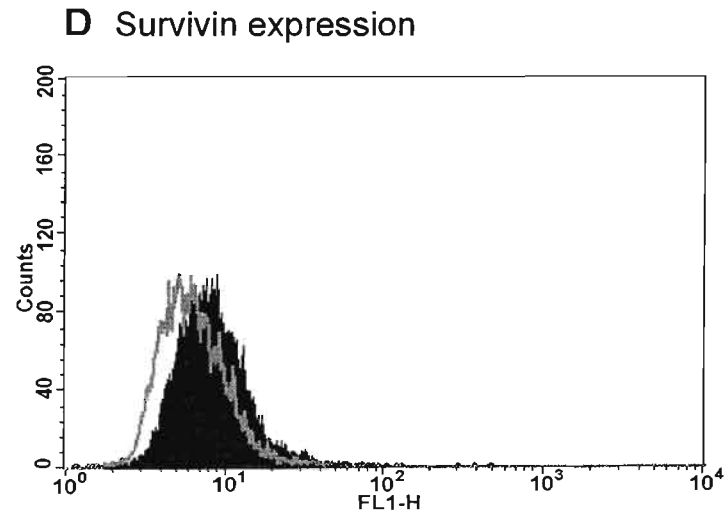
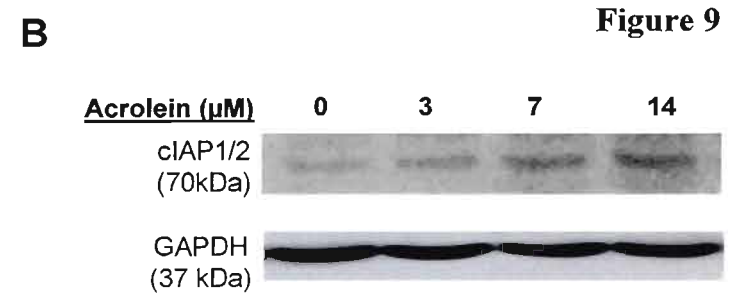
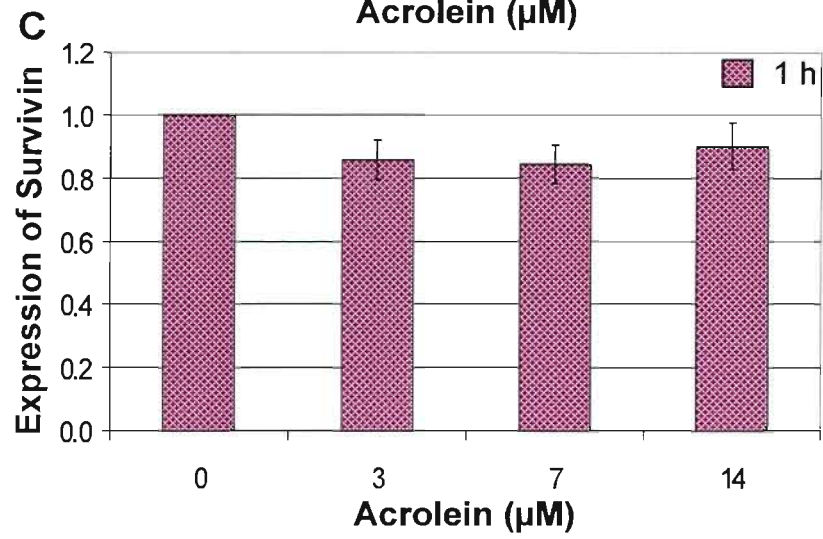
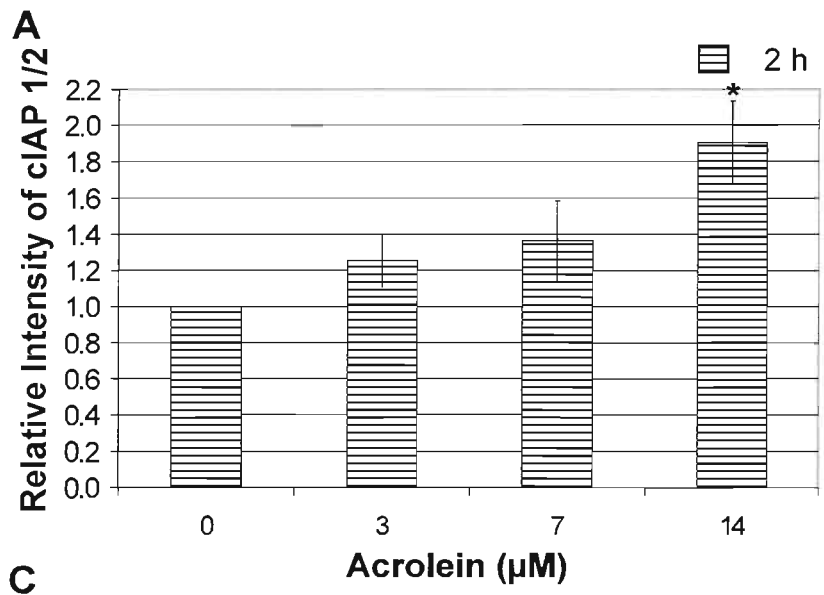
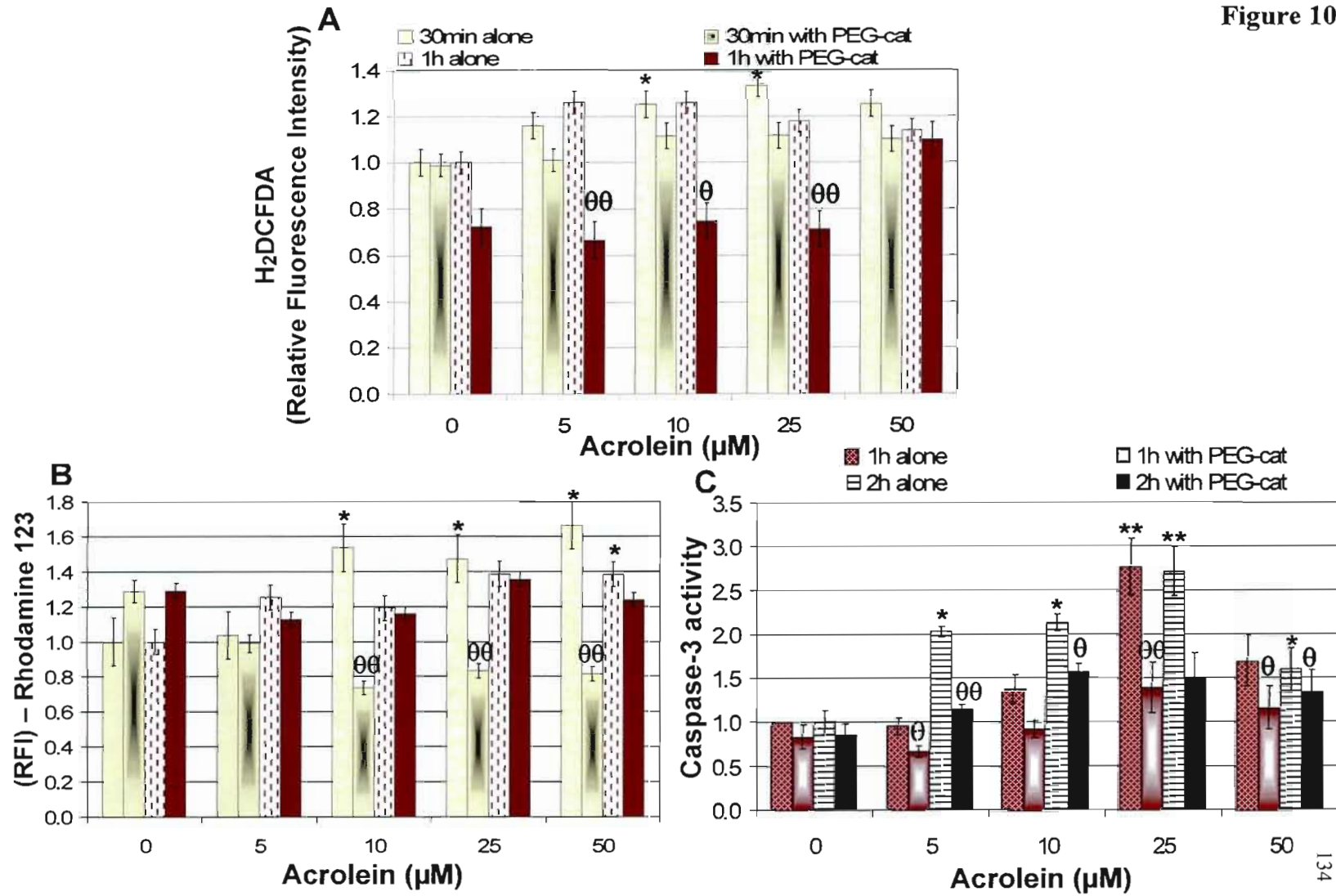


Figure 10



3.10 Figure Legends

Fig. 1: Acrolein induces mitochondrial membrane hyperpolarisation and increases ROS production. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min, 1h or 2h at 37°C with acrolein (0 to 50 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. (A) A549 treated cells, relative to untreated control cells, were analysed by flow cytometry for Rho123 (2 μ M) fluorescence in channel FL1. Data represent means and SEM of relative fluorescence intensity from three independent experiments. FCCP (25 μ M) was the positive control for depolarisation of the mitochondrial membrane. (B) The histogram blots are representative results of mitochondrial membrane potential in A549 cells exposed for 2h to 0 μ M (filled line), 14 μ M acrolein (-), and 1h to FCCP (---). (C) A549 treated cells, relative to the untreated control cells, were analysed by flow cytometry for H₂DCFDA (10 μ M), fluorescence in channel FL1. Data represent means and SEM of relative fluorescence intensity from three independent experiments. H₂O₂ (1mM) was the positive control for ROS production. (D) The histogram blots are representative results of ROS expression in A549 cells exposed for 1h to 0 μ M (filled line), 14 μ M acrolein (-), and to H₂O₂ (---). $P < 0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 2: Acrolein increases Bax expression at mitochondria but does not affect the cellular Bax / Bcl-2 ratio. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 2h at 37°C with acrolein (0 to 14 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. (A) Immunodetection of Bax (23kDa) in mitochondrial fraction was carried out by Western blotting. Densitometric analyses of the expression of mitochondrial Bax are relative to the untreated control. (B) A representative blot is shown from three independent experiments. (C) A549 treated cells, relative to the untreated control cells, were analysed by flow cytometry for internal expression of Bax or Bcl-2 proteins. (D) The histogram blots are representative results of Bax expression in A549 cells exposed for 2h to 0 μ M (filled line), and 14 μ M acrolein (-). (E) The histogram blots are representative results of Bcl-2 expression in A549 cells exposed for 2h to 0 μ M (filled line), and 14 μ M acrolein (-).

Fig. 3: Release of cytochrome c from mitochondria in the presence of acrolein. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min at 37°C with acrolein (0 to 14 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of cytochrome c (11kDa) in mitochondrial and cytosolic fractions was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control for the cytosolic fraction. Densitometric analyses of expression of (A) mitochondrial cytochrome c and (B) cytosolic cytochrome c are relative to the untreated control. (C) A representative blot is shown from three independent experiments. $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 4: Acrolein induces activation of initiator caspase-9 and effector caspases-3 and -6. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min, 1h or 2h at 37°C with acrolein (0 to 27 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. Caspase activity was expressed relative to the untreated control. Data represent means and SEM from three independent experiments performed with multiple estimations per point. (A) Caspase-9 activity was measured in cell lysates using the

fluorescent substrate Ac-LEHD-AFC. (B) Caspase-3 activity was measured in cell lysates using the fluorescent substrate Ac-DEVD-AMC. (C) Caspase-6 activity was measured in cell lysates using the fluorescent substrate Ac-VEID-AMC. $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 5: Acrolein induces release of AIF from mitochondria and translocation to the nucleus. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min or 1h at 37°C with acrolein (0 to $14\mu\text{M}$) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of nuclear, mitochondrial and cytosolic AIF (57kDa) was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control for the cytosolic fraction. Densitometric analyses of the expression of (A) nuclear AIF, (B) mitochondrial AIF and (C) cytosolic AIF are relative to the untreated control. (D) A representative blot from three independent experiments is shown for cells exposed for 30 min to acrolein. $P < 0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 6: Activation of the execution phase of apoptosis by acrolein. (A) A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 24h at 37°C with acrolein (0 to $27\mu\text{M}$) in α -MEM containing 10% FBS. Using PI as a marker for cell cycle, 10 000 cells were then analysed by flow cytometry to determine the percentage of cells in each phase. Data represent means and SEM from three independent experiments. (B) A representative histogram of flow cytometry analysis for cell cycle in channel FL2-A is shown for the untreated cells and A549 cells treated with $14\mu\text{M}$ of acrolein. (C) Immunodetection of PARP (116kDa) in whole cell lysates was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 2h at 37°C with acrolein (0 or $14\mu\text{M}$) in α -MEM containing 10% FBS. Densitometric analyses of the expression of PARP are relative to the untreated control. (D) A representative blot is shown from three independent experiments. $P < 0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 7: Activation of AKT in the presence of acrolein. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min or 1h at 37°C with acrolein (0 to $14\mu\text{M}$) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of AKT and PhosphoAKT (ser473) (60kDa) in whole cell lysates was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control. Densitometric analyses of the expression of (A) AKT and (B) PhosphoAKT (ser473) are relative to the untreated control. (C) A representative blot from three independent experiments is shown for cells exposed 30 min to acrolein. $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 8: Acrolein induces phosphorylation of Bad. A549 cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min at 37°C with acrolein (0 to $14\mu\text{M}$) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of Bad and PhosphoBad (ser136) (25kDa) in whole cell lysates was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control. Densitometric analyses of the expression of (A) Bad and PhosphoBad (ser136) are relative to the untreated control. (B) A representative blot is shown from three independent experiments. $P < 0.05$ (*)

indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 9: Acrolein increases cIAP 1/2 expression in A549 cells. Cells (10^6 /ml) were incubated for 1h or 2h at 37°C with acrolein (0 to 14 μ M) in α -MEM containing 10% FBS. Immunodetection of cIAP 1/2 (70kDa) in whole cell lysates was carried out by Western blotting, using GAPDH (37kDa) as loading control. Densitometric analyses of the expression of (A) cIAP 1/2 are relative to the untreated control. (B) A representative blot is shown from three independent experiments. (C) A549 treated cells, relative to the untreated control, were analysed by flow cytometry for internal expression of survivin. Data represent means and SEM from three independent experiments. (D) The histogram blot is representative results of survivin expression in A549 cells exposed for 1h to 0 μ M (filled line), and 7 μ M acrolein (-). $P < 0.05$ (*) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control.

Fig. 10: Overproduction of ROS by acrolein increases mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation. A549 cells (10^6 /ml) were pretreated with or without 300 μ M PEG-catalase for 3h and then exposed to acrolein (0 to 50 μ M) for the indicated periods of time. Data represent means and SEM from three independent experiments and are relative to the untreated control. (A) Levels of ROS and (B) mitochondrial membrane potential in 10 000 cells were analysed by flow cytometry, using FL1 channel for H₂DCFDA and Rho123. (C) Caspase-3 activity was measured in cell lysates using the fluorescent substrate Ac-DEVD-AMC. $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**) indicates a statistically significant difference between treatment with acrolein and the untreated control. $P < 0.05$ (θ) or $P < 0.01$ ($\theta \theta$) indicates a statistically significant difference between cells exposed to acrolein, with or without PEG-catalase at the same concentration of acrolein.

REFERENCES

- Alarcon, R. (1976). "Formation of acrolein from various amino-acids and polyamines under degradation at 100 degrees C." Environ Res **12**: 317-326.
- Antonsson, B. (2003). "The Mitochondrial Apoptosis Pathway". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 85-99.
- Beauchamp, R. O., Jr., D. A. Andjelkovich, A. D. Kligerman, K. T. Morgan et H. D. Heck (1985). "A critical review of the literature on acrolein toxicity." Crit Rev Toxicol **14**: 309-380.
- Bettaieb, A. et D. A. Averill-Bates (2005). "Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis." J Cell Physiol **205**: 47-57.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh et M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**: 231-241.
- Degli Esposti, M. et C. Dive (2003). "Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak." Biochem Biophys Res Commun **304**: 455-461.
- Degterev, A., M. Boyce et J. Yuan (2003). "A decade of caspases." Oncogene **22**: 8543-8567.
- Denning, T. L., H. Takaishi, S. E. Crowe, I. Boldogh, A. Jevnikar et P. B. Ernst (2002). "Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells." Free Radic Biol Med **33**: 1641-1650.
- Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson et J.C. Martinou (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." Mol Cell Biol **20**: 929-935.
- Faber, A. C., F. J. Dufort, D. Blair, D. Wagner, M. F. Roberts et T. C. Chiles (2006). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated glucose metabolism coincides with resveratrol-induced cell cycle arrest in human diffuse large B-cell lymphomas." Biochem Pharmacol **72**: 1246-1256.
- Fan, T. J., L. H. Han, R. S. Cong et J. Liang (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **37**: 719-727.

- Feng, Z., W. Hu, Y. Hu et M.S. Tang (2006). "Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair." Proc Natl Acad Sci U S A **103**: 15404-15409.
- Filion, M. C., B. Filion, J. Roy, S. Menard, S. Reader et N. C. Phillips (2004). "Development of immunomodulatory six base-length non-CpG motif oligonucleotides for cancer vaccination." Vaccine **22**: 2480-2488.
- Fuentes-Prior, P. et G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J **384**: 201-232.
- Gagnon, V., M. E. St-Germain, S. Parent et E. Asselin (2003). "Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1." Int J Oncol **23**: 803-810.
- Ghilarducci, D.P. et R. Tjeerdema (1995). "Fate and effects of acrolein." Rev Environ Contam Toxicol **144**: 95-146.
- Hampton, M. B. et S. Orrenius (1997). "Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis." FEBS Lett **414**: 552-556.
- Hogg, J.C. (2001). "Chronic obstructive pulmonary disease: an overview of pathology and pathogenesis." Novartis Found Symp **234**: 4-19; discussion 19-26.
- Horton, N.D., S.S. Biswal, L.L. Corrigan, J. Bratta et J.P. Kehrer (1999). "Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells." J Biol Chem **274**: 9200-9206.
- Hu, P., Z. Han, A. D. Couvillon et J. H. Exton (2004). "Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death." J Biol Chem **279**: 49420-49429.
- Huang, H., C. A. Joazeiro, E. Bonfoco, S. Kamada, J. D. Levenson et T. Hunter (2000). "The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." J Biol Chem **275**: 26661-26664.
- Ikeda, M., I. Okamoto, K. Tamura, T. Satoh, K. Yonesaka, M. Fukuoka et K. Nakagawa (2007). "Down-regulation of survivin by ultraviolet C radiation is dependent on p53 and results in G(2)-M arrest in A549 cells." Cancer Lett **248**: 292-298.
- Jäättelä, M. et M. Leist (2003). "From Caspases to Alternative Cell-Death Mechanisms". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 101-122.
- Jacobson, M.D., M. Weil et M.C. Raff (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**: 347-354.

- Jin, H. O., S. I. Yoon, S. K. Seo, H. C. Lee, S. H. Woo, D. H. Yoo, S. J. Lee, T. B. Choe, S. An, T. J. Kwon, J. I. Kim, M. J. Park, S. I. Hong, I. C. Park et C. H. Rhee (2006). "Synergistic induction of apoptosis by sulindac and arsenic trioxide in human lung cancer A549 cells via reactive oxygen species-dependent down-regulation of survivin." Biochem Pharmacol **72**: 1228-1236.
- Jin, Z. et W. S. El-Deiry (2005). "Overview of cell death signaling pathways." Cancer Biol Ther **4**: 139-163.
- Joshi, B., L. Li, B. G. Taffe, Z. Zhu, S. Wahl, H. Tian, E. Ben-Josef, J. D. Taylor, A. T. Porter et D. G. Tang (1999). "Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain." Cancer Res **59**: 4343-4355.
- Kehrer, J. et S. Biswal (2000). "The Molecular Effects of Acrolein." Toxicological Sciences **57**: 6-15.
- Kim, B. M. et H. W. Chung (2007). "Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through a ROS-mediated caspase-8/Bid/Bax pathway in human lymphocytes." Biochem Biophys Res Commun **363**: 745-750.
- Krishan, A. (1975). "Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining." J Cell Biol **66**: 188-193.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Li, F., G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio et D. C. Altieri (1998a). "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin." Nature **396**: 580-584.
- Li, L., R.F. Hamilton, Jr., D.E. Taylor et A. Holian (1997a). "Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages." Toxicol Appl Pharmacol **145**: 331-339.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri et X. Wang (1997b). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**: 479-489.
- Liston, P., W.G. Fong et R.G. Korneluk (2003). "Inhibitors of Apoptosis Proteins". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 29-46.
- Liu-Snyder, P., H. McNally, R. Shi et R.B. Borgens (2006). "Acrolein-mediated mechanisms of neuronal death." J Neurosci Res **84**: 209-218.
- Luo, J., J.P. Robinson et R. Shi (2005). "Acrolein-induced cell death in PC12 cells: Role of mitochondria-mediated oxidative stress." Neurochemistry International **47**: 449-457.

- Malhi, H., G. J. Gores et J. J. Lemasters (2006). "Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?" Hepatology **43**: S31-44.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska et U. M. Moll (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." Mol Cell **11**: 577-590.
- Nardini, M., E. I. Finkelstein, S. Reddy, G. Valacchi, M. Traber, C. E. Cross et A. van der Vliet (2002). "Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid." Toxicology **170**: 173-185.
- Park, J. Y., K. G. Park, H. J. Kim, H. G. Kang, J. D. Ahn, H. S. Kim, Y. M. Kim, S. M. Son, I. J. Kim, Y. K. Kim, C. D. Kim, K. U. Lee et I. K. Lee (2005). "The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation, migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells." Diabetologia **48**: 1022-1028.
- Robertson, J. D., M. Enoksson, M. Suomela, B. Zhivotovsky et S. Orrenius (2002). "Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis." J Biol Chem **277**: 29803-29809.
- Roy, J., A. Bettaieb et Averill-Bates D.A. (2008a). "A549 Adenocarcinoma Cells Undergo Apoptosis by Activation of the Death Receptor Pathway Upon Exposure to Acrolein." Chemico-Biological Interactions: manuscript in preparation.
- Rudra, P.K. et H.E. Krokan (1999). "Acrolein cytotoxicity and glutathione depletion in n-3 fatty acid sensitive- and resistant human tumor cells." Anticancer Res **19**: 461-469.
- Russell, J. W., D. Golovoy, A. M. Vincent, P. Mahendru, J. A. Olzmann, A. Mentzer et E. L. Feldman (2002). "High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons." Faseb J **16**: 1738-1748.
- Saetta, M. (1999). "Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **160**: S17-20.
- Samet, J.M. et P.W. Cheng (1994). "The role of airway mucus in pulmonary toxicology." Environ Health Perspect **102 Suppl 2**: 89-103.
- Scarlett, J. L., P. W. Sheard, G. Hughes, E. C. Ledgerwood, H. H. Ku et M. P. Murphy (2000). "Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells." FEBS Lett **475**: 267-272.
- Schuler, M., E. Bossy-Wetzel, J. C. Goldstein, P. Fitzgerald et D. R. Green (2000). "p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release." J Biol Chem **275**: 7337-7342.

- Schwarz, M., M. A. Andrade-Navarro et A. Gross (2007). "Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program?" Apoptosis **12**: 869-876.
- Stambolsky, P., L. Weisz, I. Shats, Y. Klein, N. Goldfinger, M. Oren et V. Rotter (2006). "Regulation of AIF expression by p53." Cell Death Differ **13**: 2140-2149.
- Strasser, A., L. O'Connor et V.M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-245.
- Takemura, Y., K. Fukuo, O. Yasuda, T. Inoue, N. Inomata, T. Yokoi, H. Kawamoto, T. Sahara et T. Ogihara (2004). "Fas signaling induces Akt activation and upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression." Hypertension **43**: 880-884.
- Talapatra, S. et C. B. Thompson (2001). "Growth factor signaling in cell survival: implications for cancer treatment." J Pharmacol Exp Ther **298**: 873-878.
- Tanel, A. et D. Averill-Bates (2005). "The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation of the mitochondrial pathway." Biochim Biophys Acta **1743**: 255-267.
- Tanel, A. et D. Averill-Bates (2007a). "Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein." Free Radic Biol Med **42**: 798-810.
- Tanel, A. et D. A. Averill-Bates (2007b). "Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant N-acetylcysteine." J Pharmacol Exp Ther **321**: 73-83.
- Tanel, A. et D. A. Averill-Bates (2007c). "P38 and ERK mitogen-activated protein kinases mediate acrolein-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells." Cell Signal **19**: 968-977.
- Timmer, J. C. et G. S. Salvesen (2007). "Caspase substrates." Cell Death Differ **14**: 66-72.
- Toninello, A., P. Pietrangeli, U. De Marchi, M. Salvi et B. Mondovi (2006). "Amine oxidases in apoptosis and cancer." Biochim Biophys Acta **1765**: 1-13.
- Vasant, C., R. Rajaram et T. Ramasami (2003). "Apoptosis of lymphocytes induced by chromium(VI/V) is through ROS-mediated activation of Src-family kinases and caspase-3." Free Radic Biol Med **35**: 1082-1100.
- Vincent, A. M., J. A. Olzmann, M. Brownlee, W. I. Sivitz et J. W. Russell (2004). "Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death." Diabetes **53**: 726-734.
- Youle, R. J. et A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**: 47-59.

CHAPITRE IV. CONCLUSIONS

4.1 Introduction

Un polluant omniprésent dans l'environnement est l'acroléine, un aldéhyde α,β -insaturé, auquel l'être humain est exposé de manière considérable dans plusieurs situations. Elle est principalement utilisée comme biocide, mais l'acroléine est aussi générée lors de feu de forêt, de la combustion de plastiques, de la fumée de cigarette, de la cuisson des aliments, et des gaz d'échappement des véhicules motorisés (Kehrer et Biswal, 2000). De plus, elle est formée *in situ*, comme intermédiaire dans le catabolisme normal d'une variété d'acides aminés et des polyamines (Alarcon, 1976), lors du métabolisme de l'alcool allylique ou de la cyclophosphamide (Ghilarducci et Tjeerdema, 1995). Elle est aussi responsable de la peroxydation lipidique associée à la génération de ROS (Kehrer et Biswal, 2000). L'acroléine est mutagène et génotoxique pour les cellules humaines car elle est hautement réactive et extrêmement électrophile (Beauchamp *et al.*, 1985), ce qui lui permet de lier les nucléophiles cellulaires (Kehrer et Biswal, 2000). L'acroléine a aussi la capacité de se lier à l'ADN et former des protéines adduites (Kehrer et Biswal, 2000; Furuhashi *et al.*, 2002). En épuisant la défense antioxydante (Yang *et al.*, 2004) et en augmentant le stress oxydatif (Luo et Shi, 2004), l'acroléine induit une inflammation chronique (Facchinetti *et al.*, 2007) et elle est donc associée à plusieurs maladies pulmonaires (Hogg, 2001) et neurodégénératives (Arlt *et al.*, 2002).

Il a été démontré que des concentrations d'acroléine (supérieures à 50 μM) sont létales et conduisent les cellules vers une mort par nécrose (Tanel et Averill-Bates, 2005). La nécrose est la forme principale de mort cellulaire lors d'accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou de déficits métaboliques (Malhi *et al.*, 2006). Elle est souvent caractérisée par des dommages irréversibles à la membrane plasmique, à la désintégration des organelles, ce qui mène au largage du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire et à une réaction inflammatoire (Festjens *et al.*, 2006). Lors d'expositions à des doses supérieures à 50 μM , l'acroléine est clairement cytotoxique pour toutes cellules causant une destruction massive de la structure et de la fonction cellulaire (Kehrer et Biswal, 2000; Kern et Kehrer,

2002). En effet, l'acroléine cause une inhibition de la croissance cellulaire (Marano et Puiseux-Dao, 1982), augmente la perméabilité de la membrane cellulaire et altère les taux de glutathion, de protéines sulfhydryles (Patel et Block, 1993) et les enzymes contenant un groupement thiol, en plus de former des adduits avec l'ADN (Kehrer et Biswal, 2000).

De plus, il est aussi bien connu qu'aux doses non létales, inférieures à 50 μM , l'acroléine diminue la prolifération des cellules pulmonaires cancéreuses humaines (Ramu *et al.*, 1996; Horton *et al.*, 1997; Rudra et Krokan, 1999) et induit l'apoptose chez certaines lignées cellulaires, comme les macrophages alvéolaires (Li *et al.*, 1997a) et les cellules épithéliales des bronches (Nardini *et al.*, 2002). L'apoptose est essentielle pour le développement embryonique, le maintien de l'homéostasie tissulaire et la régulation du système immunitaire (Schwarz *et al.*, 2007). Cette mort cellulaire est caractérisée par une série de modifications morphologiques et biochimiques distinctes comme l'externalisation de la phosphatidylsérine, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN puis de la cellule en corps apoptotiques (Malhi *et al.*, 2006). Récemment, chez les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), il a été démontré que l'acroléine est responsable de l'activation des voies apoptotiques mitochondriales (Tanel et Averill-Bates, 2005) et des récepteurs de mort (Tanel et Averill-Bates, 2007a). De plus, les protéines p38 et kinase régulatrice de signal extracellulaire (ERK) de la voie des protéines kinases activées par mitogènes (MAPKinases) étaient impliquées dans l'apoptose induite par l'acroléine dans les cellules CHO (Tanel et Averill-Bates, 2007c).

4.2 Voie apoptotique des récepteurs de mort induite par l'acroléine

Pour approfondir nos connaissances sur les voies de signalisation de mort initiées par l'acroléine, la lignée cellulaire A549, un adénocarcinome humain, a été choisie à cause de son origine pulmonaire, le premier organe ciblé par ce polluant. Par conséquent, les cellules A549 ont été exposées à de faibles doses d'acroléine, variant de 0 à 50 μM , pour représenter les concentrations *in vivo*, pouvant atteindre 50 μM dans le sérum d'un humain normal (Sato *et al.*, 1999) et 80 μM dans les fluides des voies respiratoires d'un fumeur (Eiserich *et al.*, 1995). Nos recherches ont investigué les mécanismes impliqués dans l'induction de la voie de signalisation du récepteur de mort Fas de l'apoptose par une exposition à l'acroléine, car les effets toxiques déclenchés par ce polluant au niveau moléculaire et les voies de signalisation biochimique sont peu comprises.

Cette étude démontre que l'acroléine (0 à 50 μM) induit l'apoptose par la voie de signalisation des récepteurs de mort chez les cellules A549 en prolifération, ce qui a été confirmée par l'activation de la caspase-8. Nos résultats suggèrent l'implication du récepteur de mort Fas. L'acroléine a causé une augmentation d'expression du FasL et une diminution d'expression du FasR à la membrane extracellulaire, sans modifier la quantité du FasR contenue dans toute la cellule. Ces résultats impliquent que l'augmentation d'expression du FasL à la membrane extracellulaire encombre le FasR par liaison spécifique empêchant ainsi sa détection par l'anti-FasR-FITC. La diminution du FasR à la membrane extracellulaire peut aussi être due à l'internalisation d'aggrégations de FasL-FasR suivant l'activation de ce récepteur (Henkler *et al.*, 2005). De plus, l'activation de la voie des récepteurs de mort par une exposition à l'acroléine est aussi confirmée par la translocation de FADD et de RIP à la membrane cytoplasmique.

La complexité des voies de signalisation apoptotique et nécrotique que peuvent induire les récepteurs de mort dépasse grandement la simple voie linéaire originalement suggérée par la découverte de ces récepteurs qui déclenchent une cascade d'activation de caspases (Jäättelä et Leist, 2003). Tout comme les différentes familles de protéases, c'est la concentration de protéines adaptatrices telles que FADD qui peut être la clé de la décision entre la voie

apoptotique ou nécrotique déclenchée par les récepteurs de mort (Jäättelä et Leist, 2003). Une fois que la signalisation du récepteur de mort Fas est initiée par son ligand, les domaines de mort (DD) de FasR recrutent alors FADD et/ou RIP à la membrane cytoplasmique. Pour ce qui est de RIP, il est connu pour initier la voie nécrotique caspase-indépendante médiée par la formation de ROS, mais ce processus peut être inhibé par l'activation de la caspase-8 (Lin *et al.*, 1999; Holler *et al.*, 2000). Cette étude a démontré qu'une exposition aux faibles concentrations d'acroléine, inférieures à 50 μM , mène au recrutement de RIP et FADD à la membrane cytoplasmique chez les cellules A549.

De plus, chez les cellules A549, des doses relativement faibles d'acroléine, inférieures à 50 μM , ont activé la caspase-8 initiatrice après de courts temps d'exposition. Il est bien connu que la caspase-8 est activée après son recrutement au FADD et aux récepteurs de mort. La caspase-8 semble être la principale caspase initiatrice pendant l'apoptose médiée par la voie des récepteurs de mort (Curtin et Cotter, 2003). De plus, la caspase-8 active peut cliver RIP et son fragment C-terminal produit semble favoriser les processus apoptotiques puisqu'il amplifie la formation du DISC (Holler *et al.*, 2000; Curtin et Cotter, 2003). Par conséquent, la caspase-8 semble jouer un rôle essentiel dans l'initiation de l'apoptose par les récepteurs de mort, plutôt que dans la nécrose.

La caspase-8 peut provoquer l'activation des caspases effectrices directement ou indirectement en induisant la voie mitochondriale de l'apoptose par le clivage de Bid, une protéine cytosolique proapoptotique membre de la famille de Bcl-2 (Strasser *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2002). Par conséquent, ce clivage de Bid mène à l'amplification de l'activation des caspases effectrices par le largage de facteurs proapoptotiques de la mitochondrie et à l'exécution de l'apoptose (Lavrik *et al.*, 2006). Effectivement, nos résultats ont démontré une augmentation significative de l'expression de tBid à la mitochondrie. Il semble que l'acroléine peut causer le dysfonctionnement de la mitochondrie par la signalisation des récepteurs de mort via l'activation de la caspase-8, qui clivent la protéine Bid en tBid.

Chez les cellules A549, des doses inférieures à 50 μM d'acroléine ont aussi causé une faible activation de la caspase-2 initiatrice, qui suggère un rôle mineur comparé à la

caspase-8, selon les niveaux d'activation. Les mécanismes moléculaires de l'activation de la caspase-2 sont encore controversés et semblent dépendre du type cellulaire. Certains auteurs ont rapporté que des dommages à l'ADN peuvent activer la caspase-2 dans un complexe multinucléaire impliquant la protéine inductible avec un domaine de mort (PIDD) et la protéine associée à RIP avec un domaine de mort (RAIDD) (ensemble formant un piddosome) (Maiuri *et al.*, 2007; Tinel *et al.*, 2007). D'autres auteurs mentionnent que les DD de RIP peuvent lier le FasR et recruter RAIDD ainsi que la caspase-2 aux agrégats de ce récepteur de mort (Curtin et Cotter, 2003; Stevens et Maier, 2008). Chez plusieurs lignées cellulaires, cette procaspase-2 a été trouvée au DISC du FasR et elle a été activée par la signalisation de ce récepteur de mort. De plus, la caspase-2 active peut aussi induire la voie mitochondriale de l'apoptose par le clivage de Bid en tBid (Lavrik *et al.*, 2006).

Une fois activée, la caspase-8 (Slee *et al.*, 1999) initiatrice peut provoquer l'activation de la caspase-7, via l'activation de la caspase-3 (McStay *et al.*, 2008). Chez les cellules A549, l'acroléine peut déclencher l'apoptose via les caspases-3 et -7 effectrices, puisque leur activité enzymatique a été significativement augmentée après de courtes expositions. Comme les caspases-3 et -7 sont reconnues pour cliver les substrats de caspases, tels que PARP (Fan *et al.*, 2005) et induire la condensation de la chromatine (Degterev *et al.*, 2003), nous avons poursuivi nos recherches sur l'habileté de l'acroléine à induire l'exécution de l'apoptose. L'induction de la phase d'exécution de l'apoptose par l'acroléine a été confirmée par trois caractéristiques distinctes, soit l'augmentation de l'externalisation de la phosphatidylsérine, l'augmentation de la condensation de la chromatine et le clivage du substrat de caspases PARP, chez les cellules A549 exposées.

Pour approfondir nos connaissances sur la voie de signalisation des récepteurs de mort que l'acroléine active, nous voulions déterminer si l'augmentation de l'expression du FasL et de l'activation de la caspase-8 dépendent de la surproduction de ROS que cause l'acroléine. Il est connu que l'acroléine induit la formation de ROS chez les cellules PC-12 (Luo *et al.*, 2005). Diverses recherches ont aussi démontré que les ROS peuvent induire l'expression du FasL (Wang *et al.*, 2008b) et qu'elles sont impliquées dans l'activation de la caspase-8 durant l'apoptose via les récepteurs TRAIL (Perez-Cruz *et al.*, 2007). Chez les cellules A549,

l'inhibition des ROS générées par l'acroléine grâce à l'antioxydant PEG-catalase, a empêché l'augmentation de l'expression totale du FasL ainsi que l'augmentation de l'activité enzymatique de la caspase-8. Par conséquent, les ROS sont préalablement requises pour que l'acroléine induise l'apoptose par la voie du récepteur Fas chez les cellules A549. Ceci est une nouvelle contribution pour l'acroléine, qui peut produire des ROS en épuisant rapidement les antioxydants cellulaires, comme le glutathion, empêchant ainsi la détoxification du H₂O₂. Une accumulation significative de H₂O₂ dans les cellules, produit par des mécanismes endogènes (dont la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie), est responsable des effets toxiques d'une exposition à l'acroléine et bouleverse les fonctions mitochondriales, telles que la respiration cellulaire et la production d'ATP. En conclusion, cette étude détaille l'induction de l'apoptose, via l'activation de la voie du récepteur de mort Fas, par l'acroléine à de faibles doses, inférieures à 50 µM, chez les cellules pulmonaires humaines en prolifération. Par contre, ceci n'empêche pas le fait que l'acroléine pourrait aussi induire l'apoptose par des voies de signalisation alternative ou complémentaire.

4.3 Voie apoptotique mitochondriale induite par l'acroléine

Il existe différentes formes de stress cellulaire comme le dommage à l'ADN et les ROS, qui peuvent augmenter la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie et causer le largage de protéines proapoptotiques dans le cytosol de la cellule (Schwarz *et al.*, 2007; Youle et Strasser, 2008). La voie mitochondriale de l'apoptose peut aussi se produire via l'activation des caspases-2 ou -8, qui initie la voie du « cross-talk » par le clivage de Bid, menant ainsi au relâchement du cytochrome c (Robertson *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2007). Considérant ces dernières affirmations et qu'il a été démontré que l'acroléine peut induire le clivage de Bid chez les cellules A549, nous avons poursuivi nos recherches sur les mécanismes impliqués dans l'induction de la voie mitochondriale de l'apoptose par une exposition à de faibles concentrations (0 à 50 µM) d'acroléine.

Nous avons commencé par déterminer que l'acroléine n'induit pas une dépolarisation de la membrane mitochondriale chez les cellules A549, mais plutôt une hyperpolarisation. Certains chercheurs ont aussi démontré qu'un composé d'acide gras, le BMD188, a

déclenché l'apoptose en activant des sous-unités du complexe respiratoire mitochondrial, qui ont eu comme conséquence d'augmenter le potentiel membranaire mitochondrial et d'augmenter la production de ROS (Toninello *et al.*, 2006). Il a été rapporté par Luo et ses collègues que l'acroléine induit la mort cellulaire par nécrose en stimulant la formation de ROS à la mitochondrie et en infligeant la dysfonction mitochondriale chez les cellules PC-12 (Luo *et al.*, 2005). Effectivement, l'acroléine a induit une surproduction de ROS chez les cellules A549.

La perte du potentiel membranaire mitochondrial n'est pas toujours requis pour la libération du cytochrome c (Schuler *et al.*, 2000). Le cytochrome c peut être libéré de la mitochondrie par d'autres mécanismes impliquant les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2. Dans la majorité des études *in vitro* avec différentes lignées cellulaires, la distribution intracellulaire de Bax varie avant et après les stimuli apoptotiques, en augmentant de manière invariable son association à la membrane externe de la mitochondrie durant l'apoptose (Youle et Strasser, 2008). Il a été affirmé que les protéines Bid et tBid peuvent provoquer des changements de conformations à Bax, causant sa relocalisation à la mitochondrie, induisant le dysfonctionnement de cet organelle et le relâchement du cytochrome c (Eskes *et al.*, 2000; Kim et Chung, 2007).

Nos recherches ont démontré que l'expression cellulaire totale de Bax et de Bcl-2, ainsi que le ratio entre ces deux protéines ne sont pas modulés par la courte présence de faibles doses d'acroléine, inférieures à 50 μ M, chez les cellules A549. Par contre, l'acroléine a stimulé la translocation de Bax à la mitochondrie. Mais, considérant que le mouvement de Bax à la mitochondrie n'est pas suffisant pour engager le processus apoptotique (Degli Esposti et Dive, 2003), nous avons poursuivi nos recherches sur la libération du cytochrome c de la mitochondrie et sur l'activation des caspases. Nous avons donc démontré que ces faibles doses d'acroléine induisent le relâchement du cytochrome c dans le cytosol des cellules A549.

En plus des protéines Apaf-1 et procaspase-9, le cytochrome c est un élément essentiel à la formation de l'apoptosome, qui promouvoit l'activation de la caspase-9 (Youle et

Strasser, 2008). Une fois activée, la caspase-9 peut alors propager la cascade de caspases via l'activation des caspases effectrices (Fuentes-Prior et Salvesen, 2004; Timmer et Salvesen, 2007). Nos résultats ont démontré que l'acroléine peut effectivement induire l'activation de la caspase-9 initiatrice et des caspases-3 et -6 effectrices. La faible activation de certaines caspases pourrait provenir du fait que l'acroléine, hautement électrophile, réagit rapidement avec les groupements thiols des caspases. Il a été proposé que l'acroléine pourrait inhiber en partie l'activité de cette famille d'enzymes par alkylation directe de la cystéine de son site actif (Kern et Kehrer, 2002; Tanel et Averill-Bates, 2005). Comme l'activation des caspases-3, -6 et -7 effectrices peuvent cliver les substrats de caspases tels que PARP (Fan *et al.*, 2005) et induire la condensation de la chromatine (Degterev *et al.*, 2003), nous avons poursuivi notre étude sur l'habileté de l'acroléine à exécuter l'apoptose d'une manière caspase-indépendante.

Le facteur inducteur d'apoptose (AIF) réside normalement dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et peut être relâché dans le cytosol durant l'apoptose. Il a été proposé qu'AIF réagit avec les ROS de la mitochondrie et exerce un rôle cytoprotecteur, permettant ainsi aux cellules de surmonter plus facilement les effets d'un stress oxydatif (Susin *et al.*, 1999a; Urbano *et al.*, 2005). Lors de sa libération durant l'apoptose, il est transloqué au noyau où il devient un puissant élément déclencheur de l'apoptose (Cande *et al.*, 2002; Cregan *et al.*, 2004). AIF semble induire la mort cellulaire en partie par sa liaison à l'ADN, en stimulant l'activité de DNases, en déclenchant la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN d'une manière caspase-indépendante (Jin et El-Deiry, 2005). Pour la toute première fois, nous rapportons que de faibles doses d'acroléine, inférieures à 50 μM , induisent la translocation d'AIF de la mitochondrie au noyau chez les cellules A549. L'augmentation tardive d'AIF à la mitochondrie après une exposition à l'acroléine pourrait venir du fait que le gène d'AIF est régulé positivement par p53. L'étendue de cette modulation de l'expression d'AIF par p53 varie selon le type cellulaire (Stambolsky *et al.*, 2006), mais nous avons démontré que l'acroléine augmente l'activation de p53 chez les cellules A549. Alors, il semble que les protéines mitochondriales relâchées par une exposition à l'acroléine peuvent déclencher au moins deux voies de signalisation de mort cellulaire différentes, une caspase-dépendante et l'autre caspase-indépendante.

Il a donc été démontré que l'acroléine peut induire l'apoptose chez les cellules pulmonaires humaines en prolifération par l'activation de la voie mitochondriale. Malgré que l'acroléine ne cause pas d'arrêt du cycle cellulaire, elle induit la phase d'exécution de l'apoptose par fragmentation de l'ADN, une autre caractéristique distincte de l'apoptose.

Par contre, la protéine kinase B ou PKB (AKT) promouvoit la survie cellulaire en exerçant un effet antiapoptotique contre différents stimuli (Franke *et al.*, 1995). AKT est activée par différents facteurs de croissance, hormones et stress cellulaires externes comme le choc thermique ou l'osmolarité (Talapatra et Thompson, 2001). L'activation d'AKT par phosphorylation prévient l'action proapoptotique de la protéine Bad en promouvant sa dégradation (Datta *et al.*, 1997). Bad régule l'apoptose en amont de l'activation de la caspase-9. Lorsque Bad n'est pas phosphorylée, elle se lie à Bcl-2 et Bcl-XL neutralisant ainsi leur activité antiapoptotique (Antonsson, 2003). Notre étude a démontré que l'acroléine induit rapidement une augmentation d'expression d'AKT et de son activation, en plus d'une augmentation de la phosphorylation de Bad chez les cellules A549. Par conséquent, suite à une exposition à l'acroléine chez ces cellules, la protéine Bad ne pourra pas accomplir sa fonction proapoptotique, en liant Bcl-2 et Bcl-XL, et sa phosphorylation va donc promouvoir sa dégradation. De son côté, l'activation d'AKT pourrait être associée à la voie de signalisation du récepteur de mort Fas induite par la présence d'acroléine, car Takemura et ses collègues ont démontré que l'activation de cette voie apoptotique par différents ligands peut activer AKT, chez les cellules endothéliales humaines (Takemura *et al.*, 2004).

Ils ont démontré que la signalisation de Fas peut médier un effet apoptotique non relié sur les cellules endothéliales (Takemura *et al.*, 2004). Cet effet dépend fortement du signal de survie provenant d'AKT. En présence de l'inhibiteur d'AKT, wortmannin, le FasL n'a pas induit une augmentation de la régulation de l'expression de eNOS, mais l'apoptose et la voie de signalisation du récepteur Fas a induit l'activation d'AKT, chez les cellules endothéliales. Ces résultats étaient en accord avec une autre étude qui a démontré que la voie du récepteur de mort Fas inhibe la glycogène synthase kinase 3 via la phosphorylation par la kinase AKT située en amont, chez les cardiomyocytes (Badorff *et al.*, 2002). Notamment, la

voie de signalisation phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K) / AKT est importante pour le maintien de l'expression de FLIP, une protéine inhibitrice de la caspase-8 de la voie du récepteur de mort Fas (Panka *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003). De plus, cette voie de signalisation peut médier l'activation de l'eNOS, qui induit une augmentation de la régulation du relâchement d'oxyde nitrique des cellules endothéliales (Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999). L'oxyde nitrique peut alors activer la voie de signalisation d'AKT chez ces cellules. Par conséquent, les niveaux d'activité d'AKT semblent être critiques pour déterminer les directions de la voie du récepteur de mort Fas en terme des effets apoptotiques non reliés chez les cellules endothéliales (Takemura *et al.*, 2004).

Pour ce qui est des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs), ce sont des régulateurs intrinsèques de la cascade de caspases. Il a été démontré que cIAP-1 et cIAP-2 peuvent inhiber directement certaines caspases, dont les caspases-3 et -7 (Huang *et al.*, 2000). Pour la toute première fois, nous rapportons qu'une courte exposition (2 h) à de faibles doses d'acroléine (inférieures à 50 μ M) induit une augmentation de l'expression cellulaire totale des protéines antiapoptotiques cIAP1/2 chez les cellules A549. Ces résultats peuvent être associés à l'augmentation d'expression et d'activation d'AKT par l'acroléine, car des recherches précédentes ont démontré que l'AKT endogène est impliquée dans l'augmentation de la régulation de la transcription d'IAPs spécifiques (Gagnon *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004).

Pour approfondir nos connaissances sur l'induction de l'apoptose par l'acroléine, nous voulions déterminer si l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale et l'activation de la caspase-3 dépendent de la surproduction de ROS que cause l'acroléine. Il a été préalablement démontré que l'acroléine peut induire la formation de ROS (Luo *et al.*, 2005), qui peuvent augmenter le potentiel membranaire mitochondrial (Toninello *et al.*, 2006). Les ROS sont aussi impliquées dans l'activation de la caspase-3 durant l'apoptose (Vasant *et al.*, 2003). Chez les cellules A549, l'inhibition des ROS générées par l'acroléine grâce à la PEG-catalase, a empêché l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale ainsi que l'augmentation de l'activité enzymatique de la caspase-3. Par conséquent, les ROS sont préalablement requises pour que l'acroléine induise l'apoptose par la voie mitochondriale chez les cellules A549.

En conclusion, la seconde étude décrit le mécanisme de mort cellulaire induit par de faibles doses d'acroléine, inférieures à 50 μ M, via la voie mitochondriale chez les cellules A549 en prolifération. Cette voie apoptotique a été confirmée par le relâchement du cytochrome c, l'activation de caspases et l'exécution de l'apoptose induite suite à une exposition à l'acroléine, chez cette lignée cellulaire. Par contre, l'acroléine induit aussi des mécanismes de survie cellulaire par la phosphorylation d'AKT, de Bad et l'augmentation d'expression des cIAP1/2. Souvent, une réponse à un stress, généralement peu sévère, peut induire des signaux de survie cellulaire afin de sauver la cellule. Si le stress est trop sévère, la cellule va plutôt mourir par apoptose ou nécrose. Couramment, plus d'une voie de signalisation biochimique peut être activée simultanément. Le sort de la cellule et du mécanisme de mort sont alors déterminés par la vitesse relative de chaque processus et par les antagonistes de chaque voie individuelle de signalisation différemment exprimés selon les types cellulaires (Jäättelä et Leist, 2003). Tout est une question de balance entre les signaux pro- et anti-apoptotiques. Dans cette étude, même si les protéines antiapoptotiques sont surexprimées et activées, il est encore possible de détecter une activation des signaux proapoptotiques et l'acroléine peut encore exécuter la mort cellulaire par apoptose chez les cellules A549.

4.4 Conclusions et perspectives

Ces deux études présentent l'induction de l'apoptose, via l'activation de la voie du récepteur de mort Fas et la voie mitochondriale, par l'acroléine à de faibles doses, inférieures à 50 μ M, chez les cellules pulmonaires humaines en prolifération. Les recherches futures sur l'acroléine pourraient s'attarder sur la chronologie des événements dans l'induction de l'apoptose via l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. De plus, considérant que l'acroléine est impliquée dans l'activation d'AKT et de p53, il serait convenable d'investiguer l'implication de cet aldéhyde dans la voie des MAPKs chez les cellules A549.

En conclusion, puisqu'il y a peu d'études sur les voies de signalisation biochimique que ce polluant déclenche, il est important de poursuivre les recherches pour augmenter nos connaissances sur l'acroléine, considérant l'étendue de l'exposition des humains à cet agent toxique et ses impacts sur la santé humaine. Ces études sont pertinentes dans plusieurs contextes affectant la santé humaine, comme l'action pharmacologique et/ou les effets secondaires de la cyclophosphamide, un agent anticancéreux, où l'acroléine est l'un de ses métabolites, la régulation de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale par les polyamines, les maladies pulmonaires et neurodégénératives, ainsi que la toxicité provenant d'expositions environnementales aux faibles doses d'acroléine.

ANNEXE I. RÉSULTATS PUBLIÉS

1. Préface

Cette annexe inclut un troisième article scientifique décrivant les résultats expérimentaux d'un second projet, qui a été réalisé au cours des deux années de maîtrise dans le laboratoire de la Dre Diana A. Averill-Bates. Le manuscrit intitulé « *Mechanism of Cell Death Induced by Spermine and Amine Oxidase in Mouse Melanoma Cells* » a été publié dans la revue « *International Journal of Oncology* », en 2008, dans le volume 32, aux pages 79 à 88. Ce manuscrit a été rédigé et révisé par la Dre Diana A. Averill-Bates. De plus, puisque j'ai effectué en entier les expériences des figures 2 et 9 de cet article, ceci m'a permis d'être nommée comme quatrième auteure. Cette étude *in vitro*, sur un adénocarcinome cervical, la lignée cellulaire HeLa parentale, porte sur l'évaluation des mécanismes d'apoptose induits par l'action enzymatique de l'amine oxydase de sérum bovin (BSAO) sur la polyamine spermine. L'amine oxydase pourrait être très utile comme approche novatrice dans le traitement du cancer par enzymothérapie, sachant que les taux de polyamines sont plus élevés dans l'environnement tumoral.

Mechanism of cell death induced by spermine and amine oxidase in mouse melanoma cells

DIANA A. AVERILL-BATES¹, QIXIANG KE¹, ANDRÉ TANEL¹, JULIE ROY¹,
GUY FORTIER² and ENZO AGOSTINELLI³

¹Département des Sciences Biologiques, ²Département de chimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada; ³Department of Biochemical Sciences 'A. Rossi Fanelli', University of Rome 'La Sapienza' and CNR, Biology and Molecular Pathology Institutes, Piazzale Aldo Moro 5, I-00185 Rome, Italy

Received July 12, 2007; Accepted August 20, 2007

Abstract. Polyamines such as spermine, spermidine and putrescine are necessary for cell proliferation and are detected at higher concentrations in most tumor tissues, compared to normal tissues. The amine oxidase enzymes can generate cytotoxic products such as hydrogen peroxide and aldehydes from these polyamines. This study investigates the mechanisms of cell death in B16-F0 mouse melanoma tumor cells exposed to bovine serum amine oxidase and exogenous spermine. The bovine serum amine oxidase/spermine enzymatic system induced inhibition of cell proliferation in B16-F0 melanoma cells and cell death by both apoptotic and necrotic processes. Bovine serum amine oxidase or spermine, alone, did not induce cytotoxicity or cell death by apoptosis, indicating that the enzymatic reaction products were responsible. Catalase and NAD-dependent aldehyde dehydrogenase, inhibitors of hydrogen peroxide and aldehydes, respectively, decreased cell death by apoptosis and necrosis. This further confirms that the cytotoxic products are responsible for causing cell death. Use of inhibitors of different caspases showed that melanoma cells were sensitive to processes involving caspase-3 and -9, but were insensitive to caspase-6. Bovine serum amine oxidase in the presence of spermine could be useful as a promising new tool for anticancer treatment by the selective generation of toxic compounds from polyamines in tumors.

Introduction

The polyamines spermine, spermidine and putrescine are ubiquitous cell components, which are essential for cell proliferation and differentiation (1). If they accumulate excessively within cells, either due to very high extracellular amounts or deregulation of the systems that control polyamine homeostasis, they can induce toxic effects (2). These molecules are substrates of a family of enzymes, the amine oxidases, that includes copper containing amine oxidases isolated from serum (3). These enzymes are important because they contribute to regulating the levels of monoamines and polyamines (4). Amine oxidases catalyze the oxidative deamination of polyamines to generate the reaction products hydrogen peroxide and aldehydes (3). Such toxic products are able to induce stress-activated signal transduction pathways, leading to cell death, necrosis or apoptosis, in several cultured tumor cell lines (5-7). The diversity between normal and tumor cells is related to polyamine content and metabolism. Polyamine concentrations are high in growing tissues such as tumors of, for example, the breast and colon (8), compared to normal tissues. These increased levels can be explained by enhanced putrescine synthesis by ornithine decarboxylase (ODC) and increased uptake of polyamines (9). It was reported that depletion of polyamines led to the inhibition of tumor growth (4).

During the past decades, considerable research has been devoted to the discovery of new and more effective agents for clinical antitumor therapy, involving the polyamine pathway (4,10-14). This research explores the possibility of using purified bovine serum amine oxidase (BSAO), in the presence of exogenous spermine or endogenous polyamines, to induce cytotoxicity, after injection of the enzyme into the tumor (15). BSAO (J.C. 1.4.3.6) is a copper-containing glycoprotein weighing 170 kDa, which oxidatively deaminates the primary amino groups of polyamines, such as spermine and spermidine. The reaction involves dioxygen and water as substrates (16). The products are H₂O₂, aldehydes and ammonia (16,17). In the case of spermine, the monoaldehyde, the unstable dialdehyde intermediate [N,N'-bis(3-propionaldehyde)-1,4-butanediamine], and a further breakdown product, likely to be acrolein, may be formed (18,19). Taking into account the higher levels of

Correspondence to: Dr Diana A. Averill-Bates, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada
E-mail: averill.diana@uqam.ca

Abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase; BSAO, bovine serum amine oxidase; CHO, Chinese hamster ovary; FBS, fetal bovine serum; GPx, glutathione peroxidase; GST, glutathione S-transferase; ODC, ornithine decarboxylase; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MDR, multidrug resistance; PEG, polyethylene glycol; PS, phosphatidylserine; PI, propidium iodide; SEM, standard error of mean

Key words: bovine serum amine oxidase, spermine, apoptosis, caspase, aldehyde dehydrogenase, catalase

polyamines in tumor tissues (9,16). BSAO could be delivered to tumors and used to generate cytotoxic molecules from spermine and spermidine *in situ*, leading to a promising new treatment for the destruction of tumors by enzymotherapy.

It was previously reported that purified BSAO and spermine, in causing cytotoxicity, can induce inhibition of cell proliferation and severe glutathione depletion in Chinese hamster ovary (CHO) cells (20,21). The cytotoxic effect induced by spermine and BSAO appeared to be mediated by the oxidation products, H₂O₂ and aminodialdehyde or acrolein. In our experimental conditions, H₂O₂ was the main factor causing cytotoxicity in cells, since the addition of catalase provided almost complete protection against cell killing. The residual cytotoxicity was attributed to the other reaction product, aminodialdehyde or acrolein. We previously demonstrated that the simultaneous presence of exogenous enzymes, catalase and NAD-dependent aldehyde dehydrogenase (ALDH), completely inhibited cytotoxicity (6,22).

The development of multidrug-resistant (MDR) tumor cells, following exposure to cytotoxic drugs, is a major obstacle of conventional anticancer chemotherapy. Considering previous observations in P-glycoprotein overexpressing MDR CHO cells (23) and human cancer cells (6,7,24,25), our results demonstrate that MDR cells are significantly more sensitive than the corresponding wild-type (WT) cells to H₂O₂ and aldehyde(s), the products of BSAO-catalyzed oxidation of spermine, suggesting a possible new strategy against MDR tumors. However, the mechanisms by which BSAO causes cell death in the presence of spermine are not entirely understood.

Physiologically, apoptosis is an integral part of embryonic development and the regulation of organ homeostasis. There are two main processes by which cells die: apoptosis or necrosis (26). Apoptosis is a highly regulated process involving numerous genes and proteins. Apoptotic mechanisms are also exploited for tumour therapy (2). An early morphological event in apoptosis is the loss of plasma membrane asymmetry, resulting in exposure of phosphatidylserine (PS) at the outer membrane leaflet (27). Caspases are proteolytic enzymes, which play an important role during apoptosis. They are divided into initiator (caspase-2, -8 and -9) and effector (caspase-3, -6 and -7) groups (28). The effector caspases cleave various protein substrates in the cell, leading to morphological and biochemical features characteristic of apoptosis. During later stages of apoptosis, internucleosomal degradation of DNA occurs, blebs appear on the cell membrane and the cell subsequently breaks down into apoptotic bodies, which are engulfed by phagocytic cells, thus avoiding inflammatory damage to surrounding tissues. However, severe changes of the mitochondrial structure, such as dilatation of the cristae and disruption of membranes with characteristic morphological changes, are common features of necrosis. Necrosis involves cellular swelling and leakage of cell contents into surrounding tissues, provoking inflammation and tissue damage.

Given that polyamine concentrations are high in growing tissues such as tumors (9,16), this research explores the possibility of using purified BSAO to produce toxic products, which are able to induce a cytotoxic effect in mouse melanoma B16-F0 cells, human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and human cervical carcinoma HeLa cells. This study investigates the mechanism(s) of cell death induced by spermine in the

presence of purified BSAO *in vitro*. The objective is to determine whether, in our experimental conditions, mouse melanoma tumor cells die by apoptosis and/or necrosis, when exposed to H₂O₂ and aldehyde(s) formed by the BSAO/spermine enzymatic system. We also examined whether inhibitors of the cytotoxic reaction products, catalase and/or ALDH, can inhibit cell death. Moreover, the involvement of different caspases in cell death caused by spermine and BSAO was evaluated using inhibitors of different caspases.

Materials and methods

Tissue culture. B16-F0 cells (ATCC #CRL-6322) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen Canada, Burlington, ON) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Canada), 4 mM L-glutamine, 4.5 g/l glucose, 1.0 mM sodium pyruvate and 1% penicillin (50 U/ml)-streptomycin (50 µg/ml), supplemented with hydrocortisone (1.4 µM), insulin (10 µg/ml), apo-transferrin (10 µg/ml) and epidermal growth factor (10 ng/ml) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) (15). HepG2 cells (ATCC #HB-8065) were cultured in minimum essential medium (Invitrogen Canada) with Earle's salts, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids and 10% FBS. HeLa cells (ATCC #CCL-2) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% FBS, non-essential amino acids (0.1 mM) and antibiotics. Tumor cells were grown to near confluence in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in a water-jacketed incubator at 37°C and were then incubated for 24 h with fresh culture medium (15). Confluent cells were harvested using 0.25% (w/v) trypsin-0.02% (w/v) EDTA solution, centrifuged (1000 x g, 3 min) and resuspended in PBS containing 1% BSA and 10 mM glucose for experimental studies.

Purification of BSAO. Bovine blood was withdrawn at a slaughterhouse and mixed with 3.8% sodium citrate solution (an anticoagulant) and then treated according to Turini *et al.* (29) to purify the enzyme amine oxidase. The following modifications were made to the method: a) a CM-Cellulose column, equilibrated with phosphate buffer (0.01 M) at pH 5.8, to remove haemoglobin, followed by b) an AE-Agarose column, in phosphate buffer (0.01 M) at pH 7.2 to eliminate centropilamin. Finally, two ionic exchange chromatographies were performed using a Q-Sepharose column, in phosphate buffer (0.025 M) at pH 6.8 and a Q-Sepharose column, in phosphate buffer (0.02 M) at pH 8.0, according to James *et al.* (30). The enzyme was eluted and highly purified with an NaCl gradient. All purification steps were carried out in a cold room, at 4°C.

Cytotoxicity assay. The colony survival assay measures the ability of cells to proliferate and form macroscopic colonies following exposure to cytotoxic treatments (31). Freshly harvested B16 and HepG2 cells (10⁵/ml) were incubated with BSAO (6.0 mU/ml) and spermine (0-50 µM), either with or without catalase (300 U/ml), for 1 h at 37°C. The cells were then washed three times by centrifugation (1000 x g, 3 min), and then diluted and plated in tissue culture dishes, which were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ for 12 days. Macroscopic colonies (>50 cells) were stained with

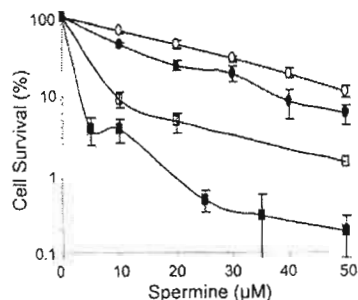


Figure 1. BSAO and spermine induced cytotoxicity in B16 melanoma and HepG2 liver cells: inhibition by catalase. (●) B16 and (■) HepG2 cells (10^5 /ml) were treated with BSAO (6.0 mU/ml) and different concentrations of spermine for 1 h at 37°C. (○) B16 and (□) HepG2 cells were exposed to BSAO and spermine for 1 h with catalase (300 U/ml). Means and SEM are from 3 separate experiments.

methylene blue. Percent cell survival was expressed as the mean number of colonies obtained relative to the mean number of colonies formed in the untreated control (31).

Morphological analysis of apoptosis and necrosis. Near confluent B16 cells were exposed to BSAO (6.0 mU/ml) and spermine (0–200 μ M), either alone, or with either ALDH (0.4 U/ml) (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany), or catalase (300 U/ml) (Sigma), catalase and ALDH together, or polyethylene glycol-catalase (PEG-catalase) (300 U/ml) (Sigma), in culture dishes for 3 h at 37°C in a water-jacketed incubator. Where appropriate, cells were pretreated for 1 h with different caspase inhibitors (8 μ M) (Calbiochem, San Diego, CA), washed to remove inhibitors and then incubated with BSAO (6.0 mU/ml) and spermine (50 μ M) for 3 h. Dishes were then washed twice with PBS and Hoechst 33258 (60 μ g/ml) was added for 15 min to stain apoptotic cells. Cells were washed and propidium iodide (PI) (50 μ g/ml) was added to stain necrotic cells. Images obtained by fluorescence microscopy (Carl Zeiss Canada Ltd, Montreal, QC) were analysed by Northern Eclipse software and pictures were taken by digital camera (camera 3CCD, Sony DXC-950P, Empix Imaging Inc, Mississauga, ON) (32). Cells were classified using the following criteria: a) live cells, normal nuclei, pale blue chromatin with organized structure; b) membrane-intact apoptotic cells, bright blue condensed or fragmented chromatin; and c) necrotic cells, red, enlarged nuclei with smooth normal structure (33). The fractions of apoptotic and necrotic cells were determined relative to total cells (obtained using bright field illumination). A minimum of 200 cells were counted per dish.

Analysis of apoptosis by annexin V-FITC staining. Externalized phosphatidylserine (PS) on the outer surface of the cytoplasmic membrane becomes labelled by fluorescein (FITC)-labelled annexin V, which has a high affinity for PS-containing phospholipid bilayers (27). To analyze apoptotic cell death by flow cytometry, B16 melanoma cells (1×10^5 /ml) were incubated for 1 h with acrolein (50 μ M) or with H_2O_2 (50 μ M), or for 2 h with BSAO (6.0 mU/ml) and spermine (50 μ M),

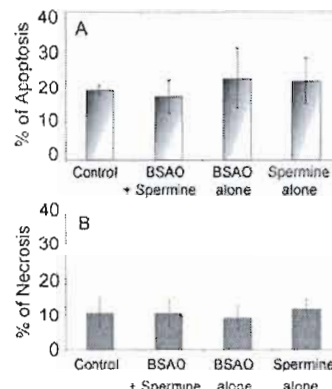


Figure 2. Lack of toxicity of BSAO and spermine in HeLa cells. HeLa cells were exposed to 1 and 2 h (data not shown) of treatment with BSAO (6 mU/ml) + spermine (100 μ M) together, BSAO alone, or spermine alone, relative to untreated controls. Cells were analysed for apoptosis (A) using Hoechst 33258, and necrosis with PI (B). Means and SEM are from 3 separate experiments.

either alone or together. Where appropriate, catalase (300 U/ml) and ALDH (0.4 U/ml) were added to the cells, before exposure to BSAO and spermine. Cells were then washed twice with PBS and resuspended in 1 ml of binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 140 mM NaCl, and 2.5 mM $CaCl_2$). A volume of 500 μ l of cell suspension was incubated with 5 μ l of annexin V-FITC (BD Biosciences Canada, Mississauga, ON) and 5 μ l of PI for 10 min at room temperature in the dark. Cells were then analysed by flow cytometry using a FACScan equipped with an argon laser emitting at 488 nm and analyzed using Lysis II software (Becton Dickinson, Oxford, UK) (15). Annexin V-FITC and PI fluorescence were detected on FL-1 and FL-3 detectors, respectively. Four populations of cells were analysed: live control cells in the lower-left quadrant (annexin V⁻/PI⁻); early-stage apoptotic cells in the lower-right quadrant (annexin V⁺/PI⁻); late-stage apoptotic cells in the upper-right quadrant (annexin V⁺/PI⁺); and necrotic cells in the upper-left quadrant (annexin V⁻/PI⁺). The results are reported as the fraction of total apoptotic cells (early- and late-stage apoptosis).

Caspase activity. The activity of caspases was measured according to Hampton and Orrenius (34), with minor modifications (32). Briefly, 3×10^5 cells/ml were incubated with BSAO (6.0 mU/ml) and spermine (0–100 μ M) at 37°C, or with H_2O_2 (0–75 μ M) or acrolein (0–50 μ M). Cells were then washed twice by centrifugation (1000 \times g, 3 min) in cold PBS and resuspended in reaction buffer [20 mM piperazine-N-N-bis-(2-ethanesulfonic acid), 100 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 0.1% 3-(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propane sulfonic acid and 10% sucrose, pH 7.2]. Cells were lysed at -20°C for 12 min. The kinetic reaction was started after addition of the appropriate caspase substrate (final concentration of 50 μ M) at 37°C using a Spectra Max Gemini spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). For caspase-3, the peptide substrate DEVD-AMC (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) was added to cell

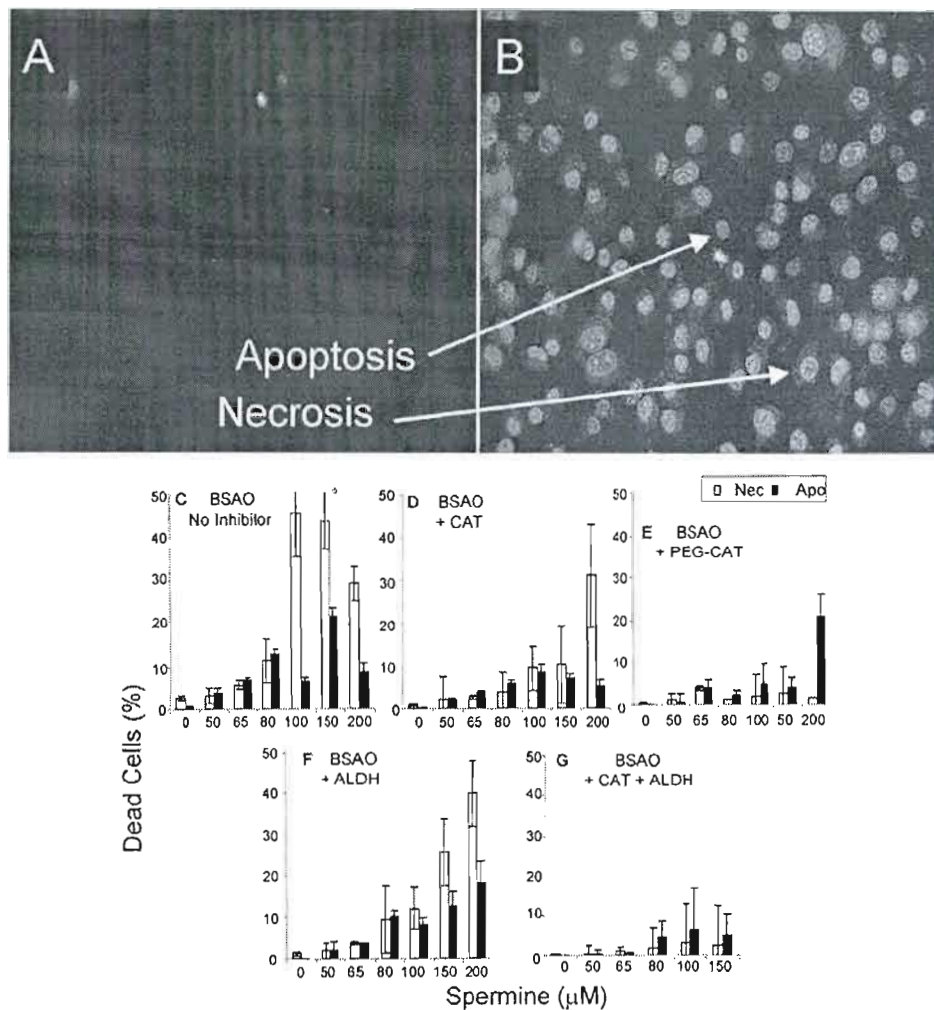


Figure 3. Inhibitors of H_2O_2 and aldehydes decreased apoptosis and necrosis induced by spermine and BSAO in B16 melanoma cells. B16 cells were treated with spermine (150 μM) and BSAO (6.0 mU/ml) for 3 h (B), relative to untreated control cells (A). Apoptotic cells (chromatin condensation) were stained with Hoechst 33258 and necrotic cells with PI. Magnification: $\times 320$. B16 cells were treated with spermine (0–200 μM) and BSAO (6.0 mU/ml) for 3 h, either with (C) no inhibitor, or with the inhibitors (D) catalase (300 U/ml), (E) PEG-catalase (300 U/ml) (pretreatment for 4 h), (F) ALDH (0.4 U/ml), or (G) both catalase and ALDH. The fractions of (■) apoptotic and (□) necrotic cells are given relative to total cells. Means and SEM are from 3 separate experiments.

lysates and followed by kinetics for 30 min with excitation wavelength (λ Ex) at 380 nm and emission wavelength (λ Em) at 460 nm. For caspase-6, the substrate was VEID-AMC (Ac-Val-Glu-Hc-Asp-AMC), for caspase-7, the substrate was MCA-VDQVDGWK(DNP)-NH₂ [MCA-Val-Asp-Gln-Val-Gly-Trp-Lys-(DNP)-NH₂] (λ Ex, 325 nm; λ Em, 392 nm) and for caspase-9, the substrate was LEHD-AFC (Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC) (λ Ex, 415 nm; λ Em, 490 nm) (Calbiochem).

Results

Cytotoxicity of spermine and BSAO. Purified BSAO (6 mU/ml) and exogenous spermine (5–50 μM) caused cytotoxicity (loss of cell proliferation) in mouse melanoma B16 cells and in

human hepatocellular carcinoma HepG2 cells during 1 h at 37°C (Fig. 1). Human HepG2 cells were more sensitive to cytotoxicity of spermine and BSAO than mouse melanoma cells. BSAO and spermine (50 μM) decreased the percentage of cell survival to 0.2% in HepG2 cells, relative to only 6% in melanoma cells. As individual agents, BSAO (4.1–12.2 mU/ml) and spermine (0–500 μM) did not cause cytotoxicity in B16 and HepG2 cells (data not shown). Catalase partially inhibited cytotoxicity induced by spermine and BSAO in both cell types. The toxicity of BSAO and spermine was also investigated in human HeLa cells. However, there was no induction of cell death by either necrosis or apoptosis (Fig. 2A and B) following 1-h or 2-h exposures to BSAO (6 mU/ml) and spermine (100 μM), compared to untreated controls.

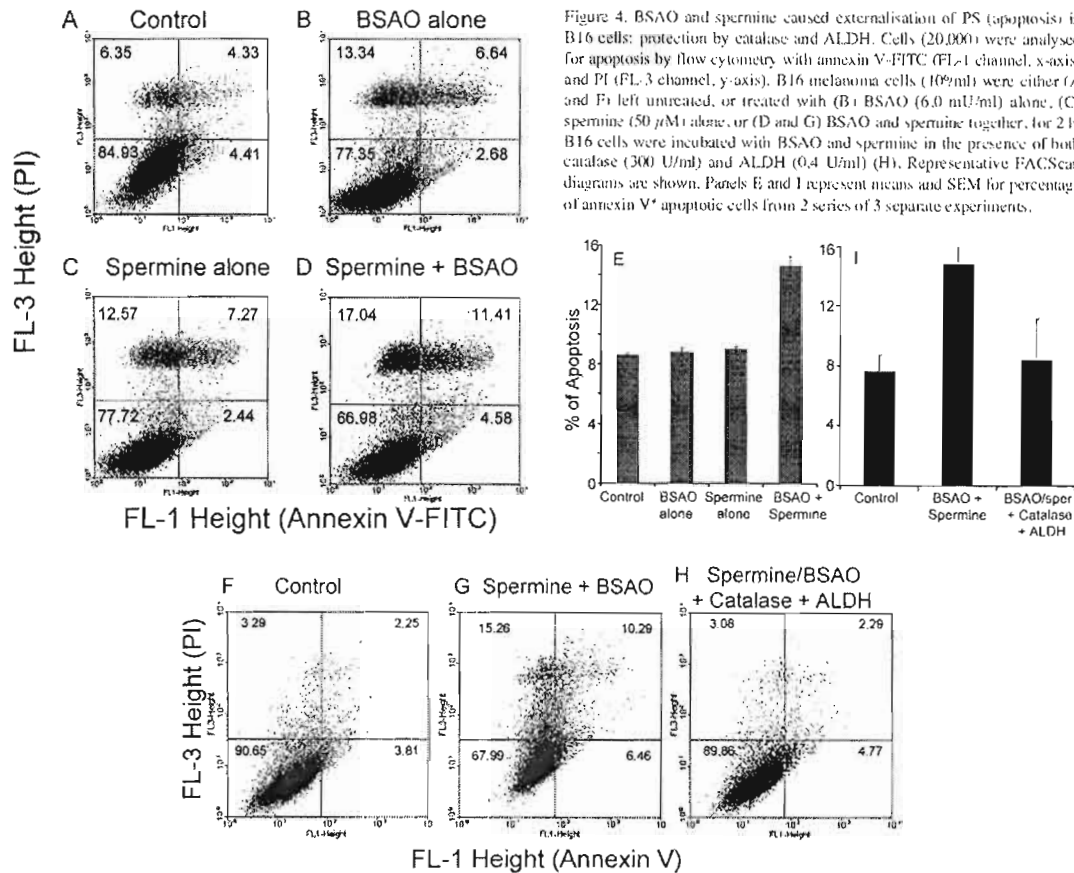


Figure 4. BSAO and spermine caused externalisation of PS (apoptosis) in B16 cells: protection by catalase and ALDH. Cells (20,000) were analysed for apoptosis by flow cytometry with annexin V-FITC (FL-1 channel, x-axis) and PI (FL-3 channel, y-axis). B16 melanoma cells ($10^6/ml$) were either (A and F) left untreated, or treated with (B) BSAO (6.0 mU/ml) alone, (C) spermine (50 μM) alone, or (D and G) BSAO and spermine together, for 2 h. B16 cells were incubated with BSAO and spermine in the presence of both catalase (300 U/ml) and ALDH (0.4 U/ml) (H). Representative FACS diagrams are shown. Panels E and I represent means and SEM for percentage of annexin V⁺ apoptotic cells from 2 series of 3 separate experiments.

Morphological analysis of apoptosis and necrosis in B16 melanoma cells treated with spermine and BSAO: protective effects of catalase and aldehyde dehydrogenase. The type of cell death induced by BSAO and spermine was subsequently investigated in B16 melanoma cells. Induction of apoptosis was confirmed morphologically by the appearance of cells with condensation of nuclear chromatin (fragmented nuclei, blue fluorescence) (Fig. 3B). This is a well-characterized nuclear event which occurs at later stages in the apoptotic cascade. There was also a large induction of cellular necrosis (red fluorescence) (Fig. 3B). There were very few dead cells in untreated controls (Fig. 3A). Spermine alone and BSAO alone did not cause chromatin condensation or necrosis in our experimental conditions (data not shown), indicating that cell death was caused by the products of the enzymatic reaction. The numbers of apoptotic and necrotic cells in BSAO and spermine-treated melanoma cells were quantified from the microscope images (Fig. 3C). Both necrosis and apoptosis increased as the spermine concentration increased from 50 to 150 μM (Fig. 3C). At higher concentrations of spermine (100-200 μM), necrosis rather than apoptosis was the major cause of cell death, due to the larger amount of cytotoxic products formed in the presence of BSAO.

Subsequently, we determined whether the cytotoxic reaction products, H_2O_2 and aldehyde(s), were responsible for causing cell death. The ability of inhibitors of the cytotoxic products to decrease the level of apoptosis and necrosis generated by the enzymatic reaction of spermine and BSAO was evaluated (Fig. 3D-G). The inhibitors used were catalase (CAT) and PEG-catalase, which are both inhibitors of H_2O_2 (35) and ALDH, which inhibits aldehydes (including acrolein). Exogenously added catalase remains outside cells, whereas PEG-catalase allows the enzyme to enter cells (36) and to increase intracellular catalase activity (35). Exogenous catalase inhibited both necrosis and apoptosis caused by spermine and BSAO in melanoma cells (Fig. 3D). PEG-catalase (Fig. 3E) was a more effective inhibitor than exogenous catalase. This suggests that H_2O_2 exerts toxicity at both the intracellular and extracellular levels. However, BSAO remains outside cells and generates H_2O_2 and aldehyde(s) at the extracellular level. This indicates that H_2O_2 formed outside the cells is able to cross the membrane and to enter cells (6). ALDH also decreased both necrosis and apoptosis (Fig. 3F). Catalase had a greater inhibitory effect than ALDH. H_2O_2 was previously shown to be more cytotoxic to C110 cells at lower concentrations than aldehyde(s) (22). Also, aldehyde(s) became cytotoxic at later

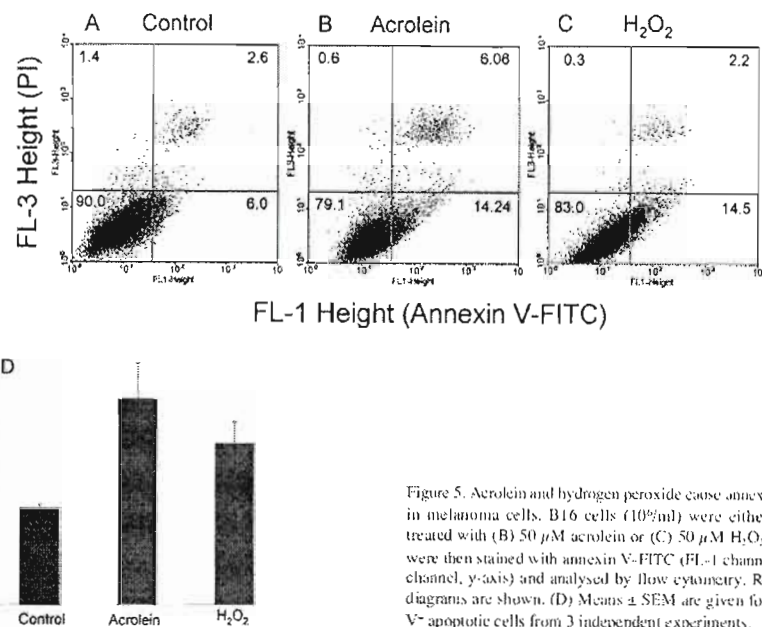


Figure 5. Acrolein and hydrogen peroxide cause annexin V binding (apoptosis) in melanoma cells. B16 cells (10%ml) were either (A) left untreated or treated with (B) 50 μ M acrolein or (C) 50 μ M H₂O₂ for 1 h. Cells (200,000) were then stained with annexin V-FITC (FL-1 channel, x-axis) and PI (FL-3 channel, y-axis) and analysed by flow cytometry. Representative FACScan diagrams are shown. (D) Means \pm SEM are given for percentage of annexin V⁺ apoptotic cells from 3 independent experiments.

times during the reaction than H₂O₂. However, catalase and ALDH together (Fig. 3C) provided more effective inhibition of apoptosis and necrosis than either catalase or ALDH alone. These findings suggest that both toxic products [H₂O₂ and aldehyde(s)] contribute to the induction of apoptosis and necrosis by BSAO and spermine in melanoma cells.

Analysis of apoptosis by annexin V binding to PS in B16 cells treated with spermine and BSAO: inhibition by catalase and aldehyde dehydrogenase. Apoptosis is characterized by a variety of morphological features. Changes in the plasma membrane are one of the earliest of these features. In apoptotic cells, the membrane phospholipid PS is translocated from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane, thereby exposing PS to the external cellular environment (27). Annexin V, a phospholipid-binding protein with high affinity for PS, binds to apoptotic cells with externalized PS. Fig. 4 shows typical FACScan diagrams of annexin V-FITC/PI fluorescence obtained after treatment of B16 cells with BSAO (6 mU/ml) and spermine (50 μ M). When B16 cells were treated with both BSAO and spermine for 2 h, there was a 60% increase in apoptotic cells (annexin V⁺) (Fig. 4D and E), compared to untreated controls (annexin V/PI⁻) (Fig. 4A). BSAO (Fig. 4B) or spermine alone (Fig. 4C) did not cause apoptosis under these experimental conditions (Fig. 4E).

To confirm the role of the cytotoxic reaction products in causing externalisation of PS in the presence of spermine and BSAO, the ability of their inhibitors to decrease apoptosis was evaluated (Fig. 4F-I). The induction of annexin V membrane binding in spermine- and BSAO-treated B16 cells (Fig. 4G) was markedly inhibited in the presence of both catalase and ALDH (Fig. 4H and I), and returned to the control level (Fig. 4F and I). Subsequently, we evaluated whether H₂O₂

and the aldehyde acrolein, two of the enzymatic oxidation products of spermine oxidation, could induce PS externalisation in melanoma cells (Fig. 5). Effectively, acrolein (50 μ M) (Fig. 5B and D) and H₂O₂ (50 μ M) (Fig. 5C and D) were both able to increase annexin V binding to the plasma membrane, relative to untreated controls (Fig. 5A). Together, these findings further confirm that toxic products, such as aldehydes (e.g. acrolein) and H₂O₂, contribute to the induction of apoptosis by BSAO and spermine.

Role of caspase activation in the induction of apoptosis by BSAO and spermine. The ability of purified BSAO and spermine to activate caspases has received little attention. Figs. 6 and 7 show the activities of caspase-9, -3, -6 and -7 in B16 melanoma cells exposed to BSAO (6.0 mU/ml) and spermine, or to their reaction products H₂O₂ and acrolein. The initiator caspase-9 was activated by BSAO and spermine (10-50 μ M) in B16 cells after 30 min (Fig. 6A). Caspase-9 activity declined at higher concentrations of the polyamine (Fig. 6A). The toxic reaction products H₂O₂ (Fig. 6C) and acrolein (Fig. 6D) also activated caspase-9. BSAO (6.0 mU/ml) alone and spermine (5-200 μ M) alone did not activate caspase-9 (Fig. 6B). This indicates that the reaction products generated by BSAO and spermine were responsible for activation of caspase-9.

The effector caspase-3 was also activated during 2-h exposures to BSAO and spermine (10-20 μ M) (Fig. 7A), and H₂O₂ (Fig. 7C). However, caspase-3 activity was inhibited by acrolein in melanoma cells (Fig. 7D). BSAO (6.0 mU/ml) alone or spermine (5-200 μ M) alone had no effect on caspase-3 activity (Fig. 7B). However, the activities of the other effector caspases, caspase-6 (Fig. 7E) and caspase-7 (Fig. 7F) were inhibited by BSAO and spermine (5-100 μ M). These findings

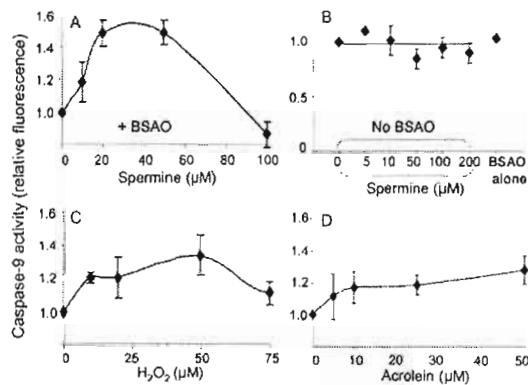


Figure 6. Activation of caspase-9 by spermine and BSAO in B16 cells. Melanoma cells were treated with (A) BSAO (6.0 mU/ml) and different concentrations of spermine (0-100 μ M), (B) spermine alone (5-200 μ M) or BSAO (6.0 mU/ml) alone, or (C) H_2O_2 (0-75 μ M), or (D) acrolein (0-50 μ M), for 30 min. Caspase-9 activity in treated cells was expressed relative to the untreated control (cells alone), designated as 1.0. Means and SEM are from 4-6 separate experiments.

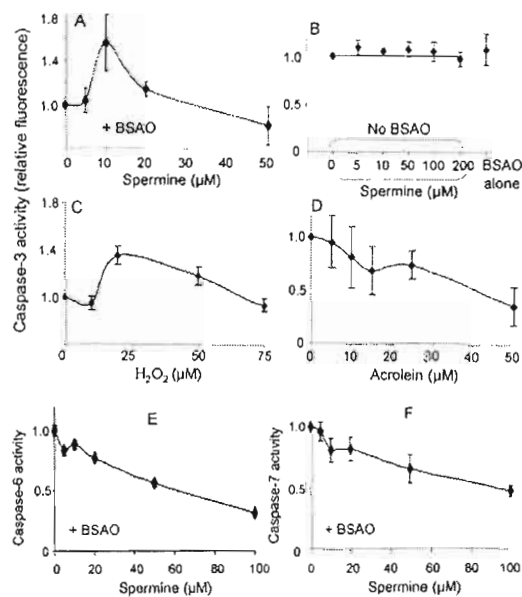


Figure 7. Activity of effector caspase-3, -6 and -7 in B16 cells exposed to BSAO and spermine. B16 cells were treated with (A) BSAO (6.0 mU/ml) and spermine (0-50 μ M), (B) spermine alone (0-200 μ M) or BSAO (6.0 mU/ml) alone, (C) H_2O_2 (0-75 μ M), or (D) acrolein (0-50 μ M), for 2 h. Caspase-3 activity in treated cells was expressed relative to the control (cells alone), designated as 1.0. Cells were treated with BSAO (6.0 mU/ml) and spermine (0-100 μ M) for 2 h. (E) Caspase-6 and (F) caspase-7 activity was expressed relative to untreated controls. Means and SEM are from 4-6 separate experiments.

indicate that the cytotoxic products of the enzymatic reaction of BSAO and spermine induce apoptosis in B16 cells via activation of caspase-9 and -3.

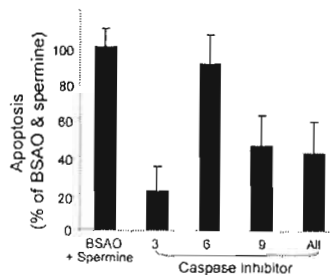


Figure 8. Inhibition of caspases decreases chromatin condensation induced by BSAO and spermine in melanoma cells. B16 cells were pretreated with specific inhibitors of caspase-3, -6 and -9 and a general caspase inhibitor (indicated as 3, 6, 9 and All) and then incubated with spermine (50 μ M) and BSAO (6.0 mU/ml) for 3 h. The fraction of apoptotic cells in the presence of caspase inhibitors is expressed relative to the fraction of apoptotic cells following exposure to BSAO and spermine, without inhibitors, designated as 100%. Means and SEM are from 3 separate experiments.

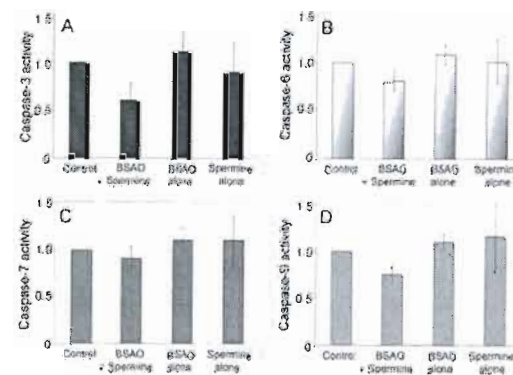


Figure 9. Spermine and BSAO do not activate caspases in HeLa cells. HeLa cells were exposed to 1 and 2 h (data not shown) of treatment with BSAO (6 mU/ml) + spermine (100 μ M), BSAO alone and spermine alone, relative to untreated controls. Cells were then analysed for activity of caspase-3 (A), -6 (B), -7 (C) and -9 (D). Means and SEM are from 3 separate experiments.

The role of different caspases in the induction of apoptosis in B16 cells by BSAO and spermine was further confirmed by using specific caspase inhibitors (Fig. 8) (37). Inhibitors of caspase-3 and -9 and a general caspase inhibitor decreased the induction of chromatin condensation by spermine and BSAO in B16 cells (Fig. 8). An inhibitor of caspase-6 did not inhibit chromatin condensation, which is consistent with the lack of activation of caspase-6 by BSAO and spermine. A specific inhibitor of caspase-7 is not commercially available.

Given that BSAO and spermine did not cause toxicity in HeLa cells, we investigated their effect on activity of caspases (Fig. 9). Interestingly, when HeLa cells were treated with BSAO (6.0 mU/ml) and spermine (100 μ M), there was a decrease in activity of caspase-3 (Fig. 9A), -6 (Fig. 9B) and -9 (Fig. 9D), relative to untreated controls. There was no clear effect on caspase-7 activity (Fig. 9C). The lack of caspase activation is consistent with the lack of induction of apoptosis by BSAO and spermine in HeLa cells (Fig. 2A).

Discussion

Inhibition of tumor cell proliferation by enzymatic oxidation products of polyamines. The present findings show that BSAO and spermine caused cytotoxicity (loss of cell proliferation) in B16 melanoma and HepG2 liver carcinoma cells. The enzymatic reaction products, H_2O_2 and aldehyde(s), were both responsible for cytotoxicity, since catalase did not afford complete protection. Cytotoxicity induced by purified BSAO and spermine in CHO, human melanoma M14 and LoVo colon adenocarcinoma cells was also induced by both of the oxidation products, although it was mainly due to H_2O_2 (6,7,22). However, spermine caused cytotoxicity in mouse mammary carcinoma FM3A cells, L1210 leukemia cells and NIH3T3 cells, in the presence of fetal calf serum (FCS) (19). In these studies, cytotoxicity was evaluated using the trypan blue exclusion assay, which is an indicator of damage to the membrane that corresponds to necrotic cell death. The cytotoxic effect of spermine was dependent on the presence of amino oxidase, which is known to be present in FCS. In these cell types, cell death was inhibited by ALDH, but not by catalase, and was mainly attributed to acrolein.

Induction of apoptosis by enzymatic oxidation products of polyamines. The first study to link polyamine oxidation to programmed cell death was reported during blastocyte development in murine embryos (38). Our findings show that purified BSAO and spermine induced cell death by apoptosis in B16 melanoma cells. The induction of apoptosis was revealed by condensation of nuclear chromatin, externalization of PS, activation of caspase-3 and -9 and inhibition of apoptosis by caspase inhibitors. Induction of apoptosis was attributed to the toxic reaction products since catalase and ALDH, which are inhibitors of H_2O_2 and aldehydes, respectively, inhibited chromatin condensation and PS externalization induced by exposure to BSAO and spermine. Activation of caspase-9 appeared to be mediated by both toxic reaction products. Caspase-3 activation by BSAO and spermine, however, appeared to be mediated by H_2O_2 , but not by acrolein. Inhibition of caspase-3 activity by acrolein is consistent with another study in Chinese hamster ovary cells (32).

Our findings show that purified BSAO and spermine induced cell death in B16 melanoma cells by both apoptosis and necrosis, as well as cytotoxicity (loss of cell proliferation). Necrosis was confirmed by uptake of PI, which is an indicator of damage to the cell membrane. Apoptosis and necrosis constitute a two-stage continuum, where the same toxin or stimulus can induce, in a dose-related manner, either apoptosis or necrosis (39). For example, the toxic aldehyde acrolein was shown to induce cell death by both apoptosis and necrosis, with apoptosis occurring at lower doses and shorter exposure times, compared to necrosis (32).

However, studies in human colon adenocarcinoma WT and MDR LoVo cells did not reveal ultrastructural characteristics of apoptosis in the presence of BSAO and spermine (6 μM), during 60 min of incubation, by transmission electron microscopy (6). In L1210 leukemia cells, none of the characteristic morphological features of apoptotic cell death [chromatin condensation, nuclear fragmentation, internucleosomal DNA cleavage, and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage] were

observed during cell death attributed to spermine oxidation mediated by serum containing a high level of amine oxidase (40). However, cell death was attributed to necrosis, which was preceded by a loss of phospholipid asymmetry, although this latter phenomenon is usually a feature of cell death by apoptosis. Moreover, inhibition of a wide spectrum of caspases did not prevent spermine and serum amine oxidase-dependent cell death in L1210 cells. Overall, it appears that the mode of cell death caused by oxidation products of spermine and BSAO appears to be cell type dependent.

Induction of apoptosis directly by polyamines. Polyamines are important regulators of cell growth and proliferation. They are involved in the progression of cells through the cell cycle (41,42). Polyamine levels are altered during the cell cycle and can regulate important checkpoints of the cell cycle. As a consequence, depletion of polyamines results in growth arrest, mainly at the G1 phase (43). Polyamines are also involved in the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathway, which is involved in cell proliferation, as well as stimulating the expression of the oncogenes *c-myc*, *c-fos* and *c-jun* (44,45).

More recently, polyamines have also been implicated in events inherent to genetically programmed cell death (46,47). However, the link between polyamines and apoptosis is complex and results are somewhat contradictory. Both up-regulation and down-regulation of polyamine levels and ODC activity, a key step in polyamine biosynthesis, have been reported during apoptosis. Furthermore, depletion of polyamines can either protect or sensitize cells to apoptosis, depending on the cell type and the death-inducing signal (45). Elevation of polyamine concentrations may lead to apoptosis, independent of polyamine oxidase (48,49), or to malignant transformation (46).

Polyamines appear to be involved at both the mitochondrial and post-mitochondrial levels of apoptosis. Spermine was shown to induce release of cytochrome *c* from mitochondria and to activate caspase-3 (48,49). On the other hand, polyamine depletion triggered the mitochondrial pathway of apoptosis by causing disruption of mitochondrial membrane potential leading to activation of caspase-3 (50).

Relevance of amine oxidase-mediated polyamine oxidation to anticancer treatment. Melanoma is an aggressive form of skin cancer, whose incidence is increasing steadily (51). Melanoma cells frequently exhibit inherent resistance to commonly used chemotherapeutic drugs. Despite a variety of anticancer strategies, there is a high level of treatment failure and the average patient survival rate is only 6 to 10 months. The present study shows that melanoma cells are sensitive to the toxic effects of oxidation products of BSAO and spermine. These findings are in agreement with recent results showing cytotoxic effects of spermine metabolites in human melanoma M14 cells (M14 WT) and their doxorubicin-resistant variant line (M14 ADR) (7). Therefore, a potential therapeutic strategy using BSAO and polyamines could be envisaged as a new targeted treatment in earlier stages of malignant melanoma, thus avoiding surgery.

The antitumor potential of BSAO was therefore evaluated *in vivo*, using a B16 mouse melanoma model in C57BL mice.

BSAO, when directly injected into the solid tumors, was able to induce tumoricidal activity by converting endogenous polyamines to toxic products *in situ* (15). The enzyme was administered in its native form and also immobilized in a biocompatible polymer composed of bovine serum albumin and polyethylene glycol (PEG). The immobilized enzyme showed higher operational stability and functional activities, relative to its native form (52). When immobilized BSAO was injected into the tumor, there was a marked decrease (70%) in tumor growth, compared to a lower decrease of 32% of tumor size when native BSAO was administered. The mechanisms of cell death were determined *in vivo* (15). When tumors were treated with immobilized BSAO, there was a high level of apoptotic cell death (~70%), compared to <10% with the native enzyme. Native BSAO, probably due to a burst of cytotoxic products, induced a high level of necrosis (~40%), compared to <10% with immobilized BSAO. The advantage is that immobilized BSAO can act by allowing the slow release of cytotoxic products, which induces tumor cell death by apoptosis rather than necrosis, thus decreasing inflammatory damage to surrounding tissues.

From a therapeutic point of view, the improvement of the efficacy of *in situ* formation of cytotoxic polyamine metabolites is essential. This may be achieved by combinations of the treatment with cytotoxic drugs, or by heat. It was previously demonstrated that hyperthermia (42°C) potentiates the cytotoxic effects of the oxidation products of spermine and BSAO in C110, LoVo colon carcinoma cells and M14 human melanoma cells and in their MDR counterparts (6,7,25,53). Hyperthermia is making considerable progress in the cancer clinic (54). Hyperthermia in combination with cytotoxic drugs, preferentially those with enhanced cytotoxicity at an elevated temperature (55), and the administration of drug combinations are clinically accepted methods. In 2002, it was reported that the combination of hyperthermia with either radiotherapy and/or chemotherapy led to improved clinical outcome in 18 randomized studies (reviewed in ref. 54). This was demonstrated for melanoma and cancers of the head and neck, breast, brain, rectum, cervix, oesophagus, lung and vulva/vagina. There have been many more promising results from clinical studies since then. Regional hyperthermia has the potential to increase cytotoxic effects of radiation or chemotherapeutic agents within the tumor mass, without increasing normal tissue toxicity. Hyperthermia is applied in cancer patients in the clinic by either localized heating of the tumor at temperatures such as 42-43°C for 1-2 h, or by milder heating at 39.5-41°C for longer times (6-24 h). The latter, whole body hyperthermia is often used to treat carcinomas with distant metastases. In this kind of cancer, the cytotoxic effect of aldehydes could be effective. In fact, patients with inoperable carcinomas in terminal stages were treated with benzaldehyde with satisfactory results (56).

Currently, we are studying drug combinations with the aim of improving the induction of cell death by toxic polyamine metabolites. When combined with BSAO, pretreatment with the lysosomotropic drug, N³,N²-bis(2,3-butadienyl)-1,4-butanediamine dihydrochloride (MDL 72527), sensitized M14 melanoma cells to toxic spermine metabolites (7). MDL 72527 is an inactivator of FAD-dependent polyamine oxidase. It has cytotoxic properties, which are, however, unrelated to

its ability to inactivate polyamine oxidase (57). Since MDL 72527 has a different mechanism of toxicity, it could be useful by amplifying cell death induced by H₂O₂ and aldehydes (58).

In conclusion, the toxic enzymatic oxidation products generated by BSAO and polyamines could be useful as a combined treatment approach with hyperthermia (39.5-42°C) or with other drugs, such as lysosomotropic compounds, with the hope of discovering new avenues for eliminating several types of solid tumours, including melanomas and carcinomas, particularly those with MDR phenotypes, in earlier and later stages of disease.

Acknowledgements

We thank Dr Jacques Jean-Francois, Denis Flipo, Michel Marion, Giampiero Tempera and Alessandro Martone for technical assistance and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Collaborative Health Research Projects Program) (DAB, GF) and the Canadian Institutes for Health Research (DAB) for their financial support. This study was partially supported by Ministero della Sanità (1% Fondo Sanitario Nazionale), the Italian MIUR (Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca) and by funds MIUR-PRIN (Cofin) (EA). Thanks are due to the University of Rome 'La Sapienza' for grant support for Professor D. Averill-Bates as visiting Professor in June 2004 to carry out a joint research project supported by NSERC Canada and CIHR.

References

1. Pegg AE: Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* 48: 759-774, 1988.
2. Wallace HM and Fraser AV: Polyamine analogues as anticancer drugs. *Biochem Soc Trans* 31: 393-396, 2003.
3. Mondovi B, Riccio P, Agostinelli E and Marozzi G: Oxidation of diamines and polyamines. In: *The Physiology of Polyamines*. Bachrach U and Heimer YM (eds). Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, pp177-201, 1989.
4. Bachrach U: Polyamines as indicators of disease activity and response to therapy in cancer patients. In: *The Physiology of Polyamines*. Bachrach U and Heimer YM (eds). Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, pp234-249, 1989.
5. Lindsay GS and Wallace HM: Changes in polyamine catabolism in HL-60 human promyelogenous leukaemic cells in response to etoposide-induced apoptosis. *Biochem J* 337: 83-87, 1999.
6. Calcabrini A, Arancia G, Marra M, Crateri P, Befani O, Martone A and Agostinelli E: Enzymatic oxidation products of spermine induce greater cytotoxic effects on human multidrug-resistant colon carcinoma cells (LoVo) than on their wild-type counterparts. *Int J Cancer* 99: 43-52, 2002.
7. Agostinelli E, Belli F, Molinari A, Condello M, Palmigiani P, Dalla Vedova L, Marra M, Seiler N and Arancia G: Toxicity of enzymatic oxidation products of spermine to human melanoma cells (M14): sensitisation by heat and MDL 72527. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1040-1050, 2006.
8. Heby O and Persson L: Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 15: 153-158, 1990.
9. Marton LJ and Pegg AE: Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 55-91, 1995.
10. Babbar N and Gerner EW: Polyamines as modifiers of genetic risk factors in human intestinal cancers. *Biochem Soc Trans* 31: 388-392, 2003.
11. Bachrach U: Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids* 26: 307-309, 2004.
12. Seiler N: Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Curr Drug Targets* 4: 537-564, 2003.
13. Seiler N: Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 2. Structural analogues and derivatives. *Curr Drug Targets* 4: 565-585, 2003.

14. Toninello A, Pietrangeli P, De Marchi U, Salvi M and Mondovì B: Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1765: 1-13, 2006.
15. Averill-Bates DA, Cherif A, Agostinelli E, Tanel A and Fortier G: Anti-tumoral effect of native and immobilized bovine serum amine oxidase in a mouse melanoma model. *Biochem Pharmacol* 69: 1693-1704, 2005.
16. Tabor CW and Tabor H: Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53: 749-790, 1984.
17. Tabor CW, Tabor H and Bachrach U: Identification of the aminoaldehydes produced by the oxidation of spermine and spermidine with purified plasma amine oxidase. *J Biol Chem* 239: 2194-2203, 1964.
18. Alarcon RA: Acrolein. IV. Evidence for the formation of the cytotoxic aldehyde acrolein from enzymatically oxidized spermine or spermidine. *Arch Biochem Biophys* 137: 365-372, 1970.
19. Sharmin S, Sakata K, Kashiwagi K, Ueda S, Iwasaki S, Shirahata A and Igarashi K: Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 228-235, 2001.
20. Averill-Bates DA, Agostinelli E, Przybytkowski E, Mateescu MA and Mondovì B: Cytotoxicity and kinetic analysis of purified bovine serum amine oxidase in the presence of spermine in Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys* 300: 75-79, 1993.
21. Agostinelli E, Przybytkowski E and Averill-Bates DA: Glucose, glutathione, and cellular response to spermine oxidation products. *Free Rad Biol Med* 20: 649-656, 1996.
22. Averill-Bates DA, Agostinelli E, Przybytkowski E and Mondovì B: Aldehyde dehydrogenase and cytotoxicity of purified bovine serum amine oxidase and spermine in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Cell Biol* 72: 36-42, 1994.
23. Lord-Fontaine S, Agostinelli E, Przybytkowski E and Averill-Bates DA: Amine oxidase, spermine, and hyperthermia induce cytotoxicity in P-glycoprotein overexpressing multidrug resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem Cell Biol* 79: 165-175, 2001.
24. Arancia G, Calcabrini A, Marra M, Crateri P, Artico M, Martone A, Martelli F and Agostinelli E: Mitochondrial alterations induced by serum amine oxidase and spermine on human multidrug resistant tumor cells. *Amino Acids* 26: 273-282, 2004.
25. Agostinelli E, Belli F, Dalla Vedova L, Marra M, Crateri P and Arancia G: Hyperthermia enhances cytotoxicity of amine oxidase and spermine on drug-resistant LoVo colon adenocarcinoma cells. *Int J Oncol* 28: 1543-1553, 2006.
26. Robertson JD and Orrenius S: Role of mitochondria in toxic cell death. *Toxicology* 181-182: 491-496, 2002.
27. Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B and Rutelingsperger CP: Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9, 1998.
28. Creagh EM and Martin SJ: Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 29: 696-702, 2001.
29. Turini P, Sabatini S, Befani O, Chimenti F, Casanova C, Riccio PL and Mondovì B: Purification of bovine plasma amine oxidase. *Anal Biochem* 125: 294-298, 1982.
30. Janes SM, Mu D, Wemmer D, Smith AJ, Kaur S, Maltby D, Burlingame AL and Klinman JP: A new redox cofactor in eukaryotic enzymes: 6-hydroxydopa at the active site of bovine serum amine oxidase. *Science* 248: 981-987, 1990.
31. Bates DA and Mackillop WJ: Hyperthermia, adriamycin transport, and cytotoxicity in drug-sensitive and -resistant Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 46: 5477-5481, 1986.
32. Tanel A and Averill-Bates DA: The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation of the mitochondrial pathway. *Biochim Biophys Acta* 1743: 255-267, 2005.
33. Lee Y and Shacter E: Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death. *Blood* 89: 4480-4492, 1997.
34. Hampton MB and Orrenius S: Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 414: 552-556, 1997.
35. Lord-Fontaine S and Averill-Bates DA: Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radic Biol Med* 32: 752-765, 2002.
36. Beckman JS, Minor RL, White CW, Repine JE, Rosen GM and Freeman BA: Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* 263: 6884-6892, 1988.
37. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW and Thornberry NA: Inhibition of human caspase by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273: 32608-32613, 1998.
38. Parchment RA and Pierce GB: Polyamine oxidation, programmed cell death, and regulation of melanoma in the murine embryonic limb. *Cancer Res* 49: 6680-6686, 1989.
39. Kroemer G, Dallaporta B and Resche-Rigon M: The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60: 619-642, 1998.
40. Bonneau MJ and Poulin R: Spermine oxidation leads to necrosis with plasma membrane phosphatidylserine redistribution in mouse leukemia cells. *Exp Cell Res* 259: 23-34, 2000.
41. Oredsson SM: Polyamine dependence of normal cell-cycle progression. *Biochem Soc Trans* 31: 366-370, 2003.
42. Wallace HM, Fraser AV and Hughes A: A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376: 1-14, 2003.
43. Kramer DL, Chang BD, Chen Y, Diegelman P, Alm K, Black AR, Rominson IB and Porter CW: Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21^{WAF1/CIP1/INK4}, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype. *Cancer Res* 61: 7754-7762, 2001.
44. Flamigni F, Facchini A, Capami C, Stefanelli C, Tantini B and Calderara CM: p44/42 Mitogen-activated protein kinase is involved in the expression of ornithine decarboxylase in leukemia L1210 cells. *Biochem J* 341: 363-369, 1999.
45. Bachrach U, Wang YC and Tabib A: Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci* 16: 106-109, 2001.
46. Seiler N and Raul F: Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* 9: 623-642, 2005.
47. Schipper RG, Penning LC and Verhofsstad AA: Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin Cancer Biol* 10: 55-68, 2000.
48. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, Mignani M, Facchini A, Pignatti C, Flamigni F and Calderara CM: Spermine causes caspase activation in leukaemia cells. *FEBS Lett* 437: 233-236, 1998.
49. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, Pignatti C, Flamigni F, Guarnieri C and Calderara CM: Spermine triggers the activation of caspase-3 in a cell-free model of apoptosis. *FEBS Lett* 451: 95-98, 1999.
50. Nitta T, Igarashi K and Yamamoto N: Polyamine depletion induces apoptosis through mitochondria-mediated pathway. *Exp Cell Res* 276: 120-128, 2002.
51. Soengas MS and Lowe SW: Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22: 3138-3151, 2003.
52. Demers N, Agostinelli E, Averill-Bates DA and Fortier G: Immobilization of native and polyethylene glycol-treated (PEGylated) bovine serum amine oxidase into a biocompatible hydrogel. *Biotechnol Appl Biochem* 33: 201-207, 2001.
53. Agostinelli E, Przybytkowski E, Mondovì B and Averill-Bates DA: Heat enhancement of cytotoxicity induced by oxidation products of spermine in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 48: 1181-1186, 1994.
54. Van Der Zee J: Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol* 13: 1173-1184, 2002.
55. Urano M, Kuroda M and Nishimura Y: For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia* 15: 79-107, 1999.
56. Kochi M, Takeuchi S, Mizutani T, Mochizuki K, Matsumoto Y and Saito Y: Antitumor activity of benzaldehyde. *Cancer Treat Rep* 64: 21-23, 1980.
57. Seiler N, Duranton B and Raul F: The polyamine oxidase inactivator MDL 72527. *Prog Drug Res* 59: 1-40, 2002.
58. Agostinelli E, Dalla Vedova L, Belli F, Condello M, Arancia G and Seiler N: Sensitization of human colon adenocarcinoma cells (LoVo) to reactive oxygen species by a lysosomotropic compound. *Int J Oncol* 29: 947-955, 2006.

RÉFÉRENCES

- Acehan, D., X. Jiang, D.G. Morgan, J.E. Heuser, X. Wang et C.W. Akey (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." Mol Cell **9**: 423-432.
- Adams, J.D., Jr. et L.K. Klaidman (1993). "Acrolein-induced oxygen radical formation." Free Radic Biol Med **15**: 187-193.
- Adams, J. M. et S. Cory (2001). "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family." Trends Biochem Sci **26**: 61-66.
- Adibhatla, R., J.F. Hatcher et R.J. Dempsey (2006). "Lipids and lipidomics in brain injury and diseases." Aaps J **8**: E314-321.
- Adler, K.B., W.J. Holden-Stauffer et J.E. Repine (1990). "Oxygen metabolites stimulate release of high-molecular-weight glycoconjugates by cell and organ cultures of rodent respiratory epithelium via an arachidonic acid-dependent mechanism." J Clin Invest **85**: 75-85.
- Adrain, C. et S.J. Martin (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas." Trends Biochem Sci **26**: 390-397.
- Agostinelli, E., E. Przybytkowski, B. Mondovi et D. A. Averill-Bates (1994). "Heat enhancement of cytotoxicity induced by oxidation products of spermine in Chinese hamster ovary cells." Biochem Pharmacol **48**: 1181-1186.
- Agostinelli, E., E. Przybytkowski et D. A. Averill-Bates (1996). "Glucose, glutathione, and cellular response to spermine oxidation products." Free Radic Biol Med **20**: 649-656.
- Ahmad, M., S. M. Srinivasula, L. Wang, R. V. Talanian, G. Litwack, T. Fernandes-Alnemri et E. S. Alnemri (1997). "CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP." Cancer Res **57**: 615-619.
- Akao, Y., Y. Otsuki, S. Kataoka, Y. Ito et Y. Tsujimoto (1994). "Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes." Cancer Res **54**: 2468-2471.
- Alarcon, R. A. (1970). "Acrolein. IV. Evidence for the formation of the cytotoxic aldehyde acrolein from enzymatically oxidized spermine or spermidine." Arch Biochem Biophys **137**: 365-372.

- Alarcon, R. (1976). "Formation of acrolein from various amino-acids and polyamines under degradation at 100 degrees C." Environ Res **12**: 317-326.
- Allen, R. G. et M. Tresini (2000). "Oxidative stress and gene regulation." Free Radic Biol Med **28**: 463-499.
- American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (2005). "Keys to managing childhood asthma".
- American Cancer Society, Inc. (2007).
- Anderson, M., M. Hazen, S.L. Hsu et J.W. Heinecke (1997). "Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycoaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein: a mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation." J. Clin. Invest. **99**: 424-432.
- Antonsson, B., F. Conti, A. Ciavatta, S. Montessuit, S. Lewis, I. Martinou, L. Bernasconi, A. Bernard, J.J. Mermod, G. Mazzei, K. Maundrell, F. Gambale, R. Sadoul et J.C. Martinou (1997). "Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2." Science **277**: 370-372.
- Antonsson, B. (2003). "The Mitochondrial Apoptosis Pathway". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 85-99.
- Aranyi, C., W.J. O'Shea, J.A. Graham et F.J. Miller (1986). "The effects of inhalation of organic chemical air contaminants on murine lung host defenses." Fundam Appl Toxicol **6**: 713-720.
- Arlt, S., U. Beisiegel et A. Kontush (2002). "Lipid peroxidation in neurodegeneration: new insights into Alzheimer's disease." Curr Opin Lipidol **13**: 289-294.
- Arrigo, A.P. (1999). "Gene expression and the thiol redox state." Free Radic Biol Med **27**: 936-944.
- Ashkenazi, A. et V.M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**: 1305-1308.
- Association pulmonaire du Canada (2007).

- Astry, C.L. et G.J. Jakab (1983). "The effects of acrolein exposure on pulmonary antibacterial defenses." Toxicol Appl Pharmacol **67**: 49-54.
- Averill-Bates, D.A., A. Chérif, E. Agostinelli, A. Tanel et G. Fortier (2005). "Anti-tumoral effect of native and immobilized bovin serum amine oxidase in a mouse melanoma model." Biochemical Pharmacology **69**: 1693-1704.
- Badorff, C., H. Ruetten, S. Mueller, M. Stahmer, D. Gehring, F. Jung, C. Ihling, A. M. Zeiher et S. Dimmeler (2002). "Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload." J Clin Invest **109**: 373-381.
- Banerjee, J. et S. Ghosh (2004). "Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid." Biochem Biophys Res Commun **323**: 310-314.
- Banki, K., E. Hutter, N. J. Gonchoroff et A. Perl (1999). "Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling." J Immunol **162**: 1466-1479.
- Barnhart, B. C. et M. E. Peter (2003). "The TNF receptor 1: a split personality complex." Cell **114**: 148-150.
- Bates, D. A. et W. J. Mackillop (1986). "Hyperthermia, adriamycin transport, and cytotoxicity in drug-sensitive and -resistant Chinese hamster ovary cells." Cancer Res **46**: 5477-5481.
- Beauchamp, R. O., Jr., D. A. Andjelkovich, A. D. Kligerman, K. T. Morgan et H. D. Heck (1985). "A critical review of the literature on acrolein toxicity." Crit Rev Toxicol **14**: 309-380.
- Bedner, E., X. Li, W. Gorczyca, M.R. Melamed et Z. Darzynkiewicz (1999). "Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry." Cytometry **35**: 181-195.
- Belzacq, A.S., H.L. Vieira, G. Kroemer et C. Brenner (2002). "The adenine nucleotide translocator in apoptosis." Biochimie **84**: 167-176.
- Bernardi, P., A. Krauskopf, E. Basso, V. Petronilli, E. Blachly-Dyson, F. Di Lisa et M. A. Forte (2006). "The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target." Febs J **273**: 2077-2099.

- Bertolotti, A., Y. Zhang, L.M. Hendershot, H.P. Harding et D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**: 326-332.
- Bettaieb, A. et D. A. Averill-Bates (2005). "Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis." J Cell Physiol **205**: 47-57.
- Biswal, S., G. Acquah-Mensah, K. Datta, X. Wu et J.P. Kehrer (2002). "Inhibition of cell proliferation and AP-1 activity by acrolein in human A549 lung adenocarcinoma cells due to thiol imbalance and covalent modifications." Chem Res Toxicol **15**: 180-186.
- Biswal, S., T. Maxwell, T. Rangasamy et J.P. Kehrer (2003). "Modulation of benzo[a]pyrene-induced p53 DNA activity by acrolein." Carcinogenesis **24**: 1401-1406.
- Bodmer, J. L., P. Schneider et J. Tschopp (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**: 19-26.
- Borchers, M.T., M.P. Carty et G.D. Leikauf (1999). "Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators." Am J Physiol **276**: L549-555.
- Bossen, C., K. Ingold, A. Tardivel, J. L. Bodmer, O. Gaide, S. Hertig, C. Ambrose, J. Tschopp et P. Schneider (2006). "Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human." J Biol Chem **281**: 13964-13971.
- Bossy-Wetzel, E., D. D. Newmeyer et D. R. Green (1998). "Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization." Embo J **17**: 37-49.
- Bouillet, P., D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Kontgen, J. M. Adams et A. Strasser (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." Science **286**: 1735-1738.
- Boyd, E., G. Keeney et S. Patton (1965). "The measurement of monocarbonyl classes in cocoa beans and chocolate liquor with special reference to flavour." Journal of Food Science **30**: 854-859.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brancolini, C., D. Lazarevic, J. Rodriguez et C. Schneider (1997). "Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin." J Cell Biol **139**: 759-771.
- Brancolini, C., M. Benedetti et C. Schneider (1995). "Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases." Embo J **14**: 5179-5190.
- Bras, M., B. Queenan et S.A. Susin (2005). "Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying." Biochemistry (Mosc) **70**: 231-239.
- Brazil, D. P. et B. A. Hemmings (2001). "Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow." Trends Biochem Sci **26**: 657-664.
- Breckenridge, D. G., M. Germain, J. P. Mathai, M. Nguyen et G. C. Shore (2003). "Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways." Oncogene **22**: 8608-8618.
- Brewer, J.W. et J.A. Diehl (2000). "PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response." Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 12625-12630.
- Briviba, K. , G. Fraser, H. Sies et B. Ketterer (1993). "Distribution of the monochlorobimane-glutathione conjugate between nucleus and cytosol in isolated hepatocytes." Biochem J **294 (Pt 3)**: 631-633.
- Burcham, P. et L. Marnett (1994). "Site-specific mutagenesis by a propanodeoxyguanosine adduct carried on an M13 genome." J Biol Chem **269**: 28844-28850.
- Butterfield, D. A., A. Castegna, C. M. Lauderback et J. Drake (2002). "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death." Neurobiol Aging **23**: 655-664.
- Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark et D. Ron (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." Nature **415**: 92-96.
- Calingasan, N.Y., K. Uchida et G.E. Gibson (1999). "Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease." J Neurochem **72**: 751-756.

- Campos, L., J. P. Rouault, O. Sabido, P. Oriol, N. Roubi, C. Vasselon, E. Archimbaud, J. P. Magaud et D. Guyotat (1993). "High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy." Blood **81**: 3091-3096.
- Cande, C., F. Cecconi, P. Dessen et G. Kroemer (2002). "Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?" J Cell Sci **115**: 4727-4734.
- Cande, C., N. Vahsen, C. Garrido et G. Kroemer (2004). "Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all." Cell Death Differ **11**: 591-595.
- Caulin, C., G.S. Salvesen et R.G. Oshima (1997). "Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis." J Cell Biol **138**: 1379-1394.
- Chakravarthi, S., C.E. Jessop et N.J. Bulleid (2006). "The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress." EMBO Rep **7**: 271-275.
- Chan, F. K., J. Shisler, J. G. Bixby, M. Felices, L. Zheng, M. Appel, J. Orenstein, B. Moss et M. J. Lenardo (2003). "A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses." J Biol Chem **278**: 51613-51621.
- Chang, H.Y., H. Nishitoh, X. Yang, H. Ichijo et D. Baltimore (1998). "Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx." Science **281**: 1860-1863.
- Charette, S. J., J. N. Lavoie, H. Lambert et J. Landry (2000). "Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27." Mol Cell Biol **20**: 7602-7612.
- Charette, S.J., H. Lambert et J. Landry (2001). "A kinase-independent function of Ask1 in caspase-independent cell death." J Biol Chem **276**: 36071-36074.
- Chen, X., J. Shen et R. Prywes (2002). "The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi." J Biol Chem **277**: 13045-13052.
- Cheng, E.H., M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten et S.J. Korsmeyer (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." Mol Cell **8**: 705-711.

- Chipuk, J. E. et D. R. Green (2003). "p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death." J Clin Immunol **23**: 355-361.
- Chittenden, T., C. Flemington, A.B. Houghton, R.G. Ebb, G.J. Gallo, B. Elangovan, G. Chinnadurai et R.J. Lutz (1995). "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions." Embo J **14**: 5589-5596.
- Cho, S.G. et E.J. Choi (2002). "Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases." J Biochem Mol Biol **35**: 24-27.
- Chung, F.L., R. Young et S.S. Hecht (1984). "Formation of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde." Cancer Res **44**: 990-995.
- Chung, F.L., R.G. Nath, M. Nagao, A. Nishikawa, G.D. Zhou et K. Randerath (1999). "Endogenous formation and significance of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts." Mutat Res **424**: 71-81.
- Church, D.F. et W.A. Pryor (1985). "Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications." Environ Health Perspect **64**: 111-126.
- Cifone, M. G., R. De Maria, P. Roncaioli, M. R. Rippo, M. Azuma, L. L. Lanier, A. Santoni et R. Testi (1994). "Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase." J Exp Med **180**: 1547-1552.
- Cohan, V.L., A.L. Scott, C.A. Dinarello et R.A. Prendergast (1991). "Interleukin-1 is a mucus secretagogue." Cell Immunol **136**: 425-434.
- Cohen, G.M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326** (Pt 1): 1-16.
- Cooper, K.O., G. Witz et C. Witmer (1992). "The effects of alpha, beta-unsaturated aldehydes on hepatic thiols and thiol-containing enzymes." Fundam Appl Toxicol **19**: 343-349.
- Corradi, M., P. Pignatti, P. Manini, R. Andreoli, M. Goldoni, M. Poppa, G. Moscato, B. Balbi et A. Mutti (2004). "Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation." Eur Respir J **24**: 1011-1017.
- Cox, P. (1979). "Cyclophosphamide cystitis-Identification of acrolein as the causative agent." Biochem. Pharmacol. **28**: 2045-2049.

- Coyle, J.T. et P. Puttfarcken (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." Science **262**: 689-695.
- Cregan, S. P., V. L. Dawson et R. S. Slack (2004). "Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death." Oncogene **23**: 2785-2796.
- Crissman, H. A. et J. A. Steinkamp (1973). "Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations." J Cell Biol **59**: 766-771.
- Curren, R., L.L. Yang, P.M. Conklin, R.C. Grafstrom et C.C. Harris (1988). "Mutagenesis of xeroderma pigmentosum fibroblasts by acrolein." Mutat Res **209**: 17-22.
- Curtin, J.F. et T.G. Cotter (2003). "Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis." Cell Signal **15**: 983-992.
- Datta, S. R., A. Brunet et M. E. Greenberg (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes Dev **13**: 2905-2927.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh et M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**: 231-241.
- de los Santos, C., T. Zaliznyak et F. Johnson (2001). "NMR characterization of a DNA duplex containing the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct gamma -OH-1,-N2-propano-2'-deoxyguanosine." J Biol Chem **276**: 9077-9082.
- Degli Esposti, M. (2002). "Sequence and functional similarities between pro-apoptotic Bid and plant lipid transfer proteins." Biochim Biophys Acta **1553**: 331-340.
- Degli Esposti, M. et C. Dive (2003). "Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak." Biochem Biophys Res Commun **304**: 455-461.
- Degterev, A., M. Boyce et J. Yuan (2003). "A decade of caspases." Oncogene **22**: 8543-8567.
- Del Poeta, G., A. Venditti, M. I. Del Principe, L. Maurillo, F. Buccisano, A. Tamburini, M. C. Cox, A. Franchi, A. Bruno, C. Mazzone, P. Panetta, G. Suppo, M. Masi et S. Amadori (2003). "Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML)." Blood **101**: 2125-2131.

- Delhalle, S., A. Duvoix, M. Schnekenburger, F. Morceau, M. Dicato et M. Diederich (2003). "An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1010**: 1-8.
- Denis, G. V., Q. Yu, P. Ma, L. Deeds, D. V. Faller et C. Y. Chen (2003). "Bcl-2, via its BH4 domain, blocks apoptotic signaling mediated by mitochondrial Ras." J Biol Chem **278**: 5775-5785.
- Denning, T. L., H. Takaishi, S. E. Crowe, I. Boldogh, A. Jevnikar et P. B. Ernst (2002). "Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells." Free Radic Biol Med **33**: 1641-1650.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, A. Nichols, R. Eskes, S. Montessuit, S. Lauper, K. Maundrell, B. Antonsson et J.C. Martinou (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." J Cell Biol **144**: 891-901.
- Desagher, S. et J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." Trends Cell Biol **10**: 369-377.
- Deveraux, Q. L. et J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**: 239-252.
- Devin, A., Y. Lin et Z. G. Liu (2003). "The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases." EMBO Rep **4**: 623-627.
- Diaz, J.L., T. Oltersdorf, W. Horne, M. McConnell, G. Wilson, S. Weeks, T. Garcia et L.C. Fritz (1997). "A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members." J Biol Chem **272**: 11350-11355.
- Dickinson, D.A. et H.J. Forman (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." Biochem Pharmacol **64**: 1019-1026.
- Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse et A. M. Zeiher (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**: 601-605.
- Downward, J. (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." Curr Opin Cell Biol **10**: 262-267.

- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li et X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**: 33-42.
- Dypbukt, J.M., L. Atzori, C.C. Edman et R.C. Grafstrom (1993). "Thiol status and cytopathological effects of acrolein in normal and xeroderma pigmentosum skin fibroblasts." Carcinogenesis **14**: 975-980.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen et F. L. Scott (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." EMBO Rep **7**: 988-994.
- Eckhart, L., C. Ballaun, A. Uthman, C. Kittel, M. Stichenwirth, M. Buchberger, H. Fischer, W. Sipos et E. Tschachler (2005). "Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity." J Biol Chem **280**: 35077-35080.
- Eguchi, Y., S. Shimizu et Y. Tsujimoto (1997). "Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis." Cancer Res **57**: 1835-1840.
- Einhorn, I.N. (1975). "Physiological and toxicological aspects of smoke produced during the combustion of polymeric materials." Environ Health Perspect **11**: 163-189.
- Eiserich, J.P., A. van der Vliet, G.J. Handelman, B. Halliwell et C.E. Cross (1995). "Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction." Am J Clin Nutr **62**: 1490S-1500S.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu et S. Nagata (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**: 43-50.
- Enss, M.L., S. Wagner, U. Schmidt-Wittig, H.K. Heim, W. Beil et H.J. Hedrich (1997). "Effects of PGE2 on amount and composition of high molecular weight glycoproteins released by human gastric mucous cells in primary culture." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **56**: 93-98.
- Erler, J. T., C. J. Cawthorne, K. J. Williams, M. Koritzinsky, B. G. Wouters, C. Wilson, C. Miller, C. Demonacos, I. J. Stratford et C. Dive (2004). "Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance." Mol Cell Biol **24**: 2875-2889.

- Eskes, R., B. Antonsson, A. Osen-Sand, S. Montessuit, C. Richter, R. Sadoul, G. Mazzei, A. Nichols et J. C. Martinou (1998). "Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions." J Cell Biol **143**: 217-224.
- Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson et J.C. Martinou (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." Mol Cell Biol **20**: 929-935.
- Esposito, M. D., J. T. Emler, J. A. Hickman et C. Dive (2001). "Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity." Mol Cell Biol **21**: 7268-7276.
- Esterbauer, H., R.J. Schaur et H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**: 81-128.
- Faber, A. C., F. J. Dufort, D. Blair, D. Wagner, M. F. Roberts et T. C. Chiles (2006). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated glucose metabolism coincides with resveratrol-induced cell cycle arrest in human diffuse large B-cell lymphomas." Biochem Pharmacol **72**: 1246-1256.
- Facchinetti, F., F. Amadei, P. Geppetti, F. Tarantini, C. Di Serio, A. Dragotto, P. M. Gigli, S. Catinella, M. Civelli et R. Patacchini (2007). "{alpha},{beta}-unsaturated Aldehydes in Cigarette Smoke Release Inflammatory Mediators from Human Macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **37**: 617-623.
- Faitova, J., D. Krekac, R. Hrstka et B. Vojtesek (2006). "Endoplasmic reticulum stress and apoptosis." Cell Mol Biol Lett **11**: 488-505.
- Fan, T. J., L. H. Han, R. S. Cong et J. Liang (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **37**: 719-727.
- Feng, Z., W. Hu, Y. Hu et M.S. Tang (2006). "Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair." Proc Natl Acad Sci U S A **103**: 15404-15409.
- Feron, V.J., H.P. Til, F. de Vrijer, R.A. Woutersen, F.R. Cassee et P.J. van Bladeren (1991). "Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment." Mutat Res **259**: 363-385.

- Festjens, N., T. Vanden Berghe et P. Vandenabeele (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." Biochim Biophys Acta **1757**: 1371-1387.
- Fiers, W., R. Beyaert, W. Declercq et P. Vandenabeele (1999). "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage." Oncogene **18**: 7719-7730.
- Filion, M. C., B. Filion, J. Roy, S. Menard, S. Reader et N. C. Phillips (2004). "Development of immunomodulatory six base-length non-CpG motif oligonucleotides for cancer vaccination." Vaccine **22**: 2480-2488.
- Filomeni, G., G. Rotilio et M.R. Ciriolo (2002). "Cell signalling and the glutathione redox system." Biochem Pharmacol **64**: 1057-1064.
- Finkelstein, E.I., M. Nardini et A. van der Vliet (2001). "Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**: L732-739.
- Fondation canadienne de la fibrose kystique (2007). "La fibrose kystique".
- Foghsgaard, L., D. Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, M. Leist et M. Jaattela (2001). "Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor." J Cell Biol **153**: 999-1010.
- Ford, J. G., D. Rennick, D. D. Donaldson, R. Venkayya, C. McArthur, E. Hansell, V. P. Kurup, M. Warnock et G. Grunig (2001). "Il-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation." J Immunol **167**: 1769-1777.
- Franke, T. F., S. I. Yang, T. O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D. K. Morrison, D. R. Kaplan et P. N. Tsichlis (1995). "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase." Cell **81**: 727-736.
- Fuentes-Prior, P. et G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J **384**: 201-232.
- Fulton, D., J. P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos et W. C. Sessa (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." Nature **399**: 597-601.

- Furuhata, A., M. Nakamura, T. Osawa et K. Uchida (2002). "Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols." J Biol Chem **277**: 27919-27926.
- Gagnon, V., M. E. St-Germain, S. Parent et E. Asselin (2003). "Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1." Int J Oncol **23**: 803-810.
- Gan, J. C. et G. A. Ansari (1987). "Plausible mechanism of inactivation of plasma alpha 1-proteinase inhibitor by acrolein." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **55**: 419-422.
- Germain, M., E. B. Affar, D. D'Amours, V. M. Dixit, G. S. Salvesen et G. G. Poirier (1999). "Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7." J Biol Chem **274**: 28379-28384.
- Gern, J. E. et W. W. Busse (1999). "Association of rhinovirus infections with asthma." Clin Microbiol Rev **12**: 9-18.
- Gething, M.J. et J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**: 33-45.
- Ghilarducci, D.P. et R. Tjeerdema (1995). "Fate and effects of acrolein." Rev Environ Contam Toxicol **144**: 95-146.
- Ghribi, O., M.M. Herman, D.A. DeWitt, M.S. Forbes et J. Savory (2001). "Abeta(1-42) and aluminum induce stress in the endoplasmic reticulum in rabbit hippocampus, involving nuclear translocation of gadd 153 and NF-kappaB." Brain Res Mol Brain Res **96**: 30-38.
- Giaccia, A. J. et M. B. Kastan (1998). "The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals." Genes Dev **12**: 2973-2983.
- Gilmore, A. P., A. D. Metcalfe, L. H. Romer et C. H. Streuli (2000). "Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization." J Cell Biol **149**: 431-446.
- 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." Nat Cell Biol **2**: 156-162.
- Golstein, P. (1997). "Cell death: TRAIL and its receptors." Curr Biol **7**: R750-753.

- Gomes, R., M.E. Meek et M. Eggleton (2002). "Concise International Chemical Assessment". World Health Organization. Geneva. **43**.
- Gores, G. J., B. Herman et J. J. Lemasters (1990). "Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury." Hepatology **11**: 690-698.
- Grafstrom, R. C., J. M. Dypbukt, J. C. Willey, K. Sundqvist, C. Edman, L. Atzori et C. C. Harris (1988). "Pathobiological effects of acrolein in cultured human bronchial epithelial cells." Cancer Res **48**: 1717-1721.
- Grafstrom, R.C. (1990). "In vitro studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis." Mutat Res **238**: 175-184.
- Grafstrom, R.C. , J.M. Dypbukt, K. Sundqvist, L. Atzori, I. Nielsen, R.D. Curren et C.C. Harris (1994). "Pathobiological effects of acetaldehyde in cultured human epithelial cells and fibroblasts." Carcinogenesis **15**: 985-990.
- Gray, P.W., K. Barrett, D. Chantry, M. Turner et M. Feldmann (1990). "Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 7380-7384.
- Green, G.M. (1985). "Mechanisms of tobacco smoke toxicity on pulmonary macrophage cells." Eur J Respir Dis Suppl **139**: 82-85.
- Green, D.R. et J.C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**: 1309-1312.
- Griffith, T.S. et D.H. Lynch (1998). "TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms." Curr Opin Immunol **10**: 559-563.
- Grooten, J., V. Goossens, B. Vanhaesebroeck et W. Fiers (1993). "Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity." Cytokine **5**: 546-555.
- Gross, A., J. Jockel, M.C. Wei et S.J. Korsmeyer (1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis." Embo J **17**: 3878-3885.
- Gross, A., J.M. McDonnell et S.J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**: 1899-1911.

- Guicciardi, M. E., J. Deussing, H. Miyoshi, S.F. Bronk, P.A. Svingen, C. Peters, S.H. Kaufmann et G.J. Gores (2000). "Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c." J Clin Invest **106**: 1127-1137.
- Guicciardi, M. E. et G.J. Gores (2003). "The Death Receptor Family and the Extrinsic Pathway". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 67-84.
- Guo, Y., S. M. Srinivasula, A. Druilhe, T. Fernandes-Alnemri et E. S. Alnemri (2002). "Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria." J Biol Chem **277**: 13430-13437.
- Gutteridge, J.M. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." Clin Chem **41**: 1819-1828.
- Hacki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rosse, I. Fellay et C. Borner (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**: 2286-2295.
- Halayko, A. J. et Y. Amrani (2003). "Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma." Respir Physiol Neurobiol **137**: 209-222.
- Hampton, M. B. et S. Orrenius (1997). "Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis." FEBS Lett **414**: 552-556.
- Hanada, M., C. Aime-Sempe, T. Sato et J.C. Reed (1995). "Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax." J Biol Chem **270**: 11962-11969.
- Harada, H. et S. Grant (2003). "Apoptosis regulators." Rev Clin Exp Hematol **7**: 117-138.
- Harding, H. P., Y. Zhang et D. Ron (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature **397**: 271-274.
- Hayase, F. (1984). "Changes of volatile components of tomato fruits during ripening." Food Chemistry **14**: 113-124.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura et K. Mori (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **10**: 3787-3799.

- He, N., S. Awasthi, S.S. Singhal, M.B. Trent et P.J. Boor (1998). "The role of glutathione S-transferases as a defense against reactive electrophiles in the blood vessel wall." Toxicol. Appl. Pharmacol. **152**: 83-89.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, P. Datta, M. Madesh, R. Wassell, Z. Zhang, N. Cheong, J. Nejmeh, T. Fernandes-Alnemri, S. Hoshino et E. S. Alnemri (2003). "The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein." J Biol Chem **278**: 38699-38706.
- Henkler, F., E. Behrle, K. M. Dennehy, A. Wicovsky, N. Peters, C. Warnke, K. Pfizenmaier et H. Wajant (2005). "The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability." J Cell Biol **168**: 1087-1098.
- Herman, B., A. L. Nieminen, G. J. Gores et J. J. Lemasters (1988). "Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability." Faseb J **2**: 146-151.
- Higuchi, Y. (2003). "Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress." Biochem Pharmacol **66**: 1527-1535.
- Ho, P. K., A. M. Jabbour, P. G. Ekert et C. J. Hawkins (2005). "Caspase-2 is resistant to inhibition by inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and can activate caspase-7." Febs J **272**: 1401-1414.
- Hoffman, W. H., S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen et M. Murphy (2002). "Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53." J Biol Chem **277**: 3247-3257.
- Hogg, J.C. (2001). "Chronic obstructive pulmonary disease: an overview of pathology and pathogenesis." Novartis Found Symp **234**: 4-19; discussion 19-26.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J.L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed et J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**: 489-495.
- Horton, N. D., B. M. Mamiya et J. P. Kehrer (1997). "Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein." Toxicology **122**: 111-122.

- Horton, N.D., S.S. Biswal, L.L. Corrigan, J. Bratta et J.P. Kehrer (1999). "Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells." J Biol Chem **274**: 9200-9206.
- Hrdlicka, J. et G. Janicek (1968). "Volatile carbonyl compounds isolated from sugar cane molasses. (abstract)." Chemical Abstracts **71**: 62461a.
- Hrdlicka, J. et J. Kuca (1965). "The Changes of Carbonyl Compounds in the Heat-Processing of Meat. 2. Turkey Meat." Poult Sci **44**: 27-31.
- Hsu, Y. T. et R. J. Youle (1998). "Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations." J Biol Chem **273**: 10777-10783.
- Hu, P., Z. Han, A. D. Couvillon et J. H. Exton (2004). "Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death." J Biol Chem **279**: 49420-49429.
- Huang, D.C., J.M. Adams et S. Cory (1998). "The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4." Embo J **17**: 1029-1039.
- Huang, H., C. A. Joazeiro, E. Bonfoco, S. Kamada, J. D. Levenson et T. Hunter (2000). "The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." J Biol Chem **275**: 26661-26664.
- Hunter, J.J., B.L. Bond et T.G. Parslow (1996). "Functional dissection of the human Bcl2 protein: sequence requirements for inhibition of apoptosis." Mol Cell Biol **16**: 877-883.
- Idriss, H.T. et J.H. Naismith (2000). "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)." Microsc Res Tech **50**: 184-195.
- Ikeda, M., I. Okamoto, K. Tamura, T. Satoh, K. Yonesaka, M. Fukuoka et K. Nakagawa (2007). "Down-regulation of survivin by ultraviolet C radiation is dependent on p53 and results in G(2)-M arrest in A549 cells." Cancer Lett **248**: 292-298.
- International Agency for Research on Cancer (1995). "Acrolein." IARC Monog. Eval. Carcinog. Risks Hum. **63**: 337-372.

- Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto et S. Nagata (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." Cell **66**: 233-243.
- Jaattela, M., M. Benedict, M. Tewari, J. A. Shayman et V. M. Dixit (1995). "Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells." Oncogene **10**: 2297-2305.
- Jäättelä, M. et M. Leist (2003). "From Caspases to Alternative Cell-Death Mechanisms". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 101-122.
- Jacobson, M.D., M. Weil et M.C. Raff (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**: 347-354.
- Jakab, G.J. (1977). "Adverse effect of a cigarette smoke component, acrolein, on pulmonary antibacterial defenses and on viral-bacterial interactions in the lung." Am Rev Respir Dis **115**: 33-38.
- Jeffrey, I. W., M. Bushell, V. J. Tilleray, S. Morley et M. J. Clemens (2002). "Inhibition of protein synthesis in apoptosis: differential requirements by the tumor necrosis factor alpha family and a DNA-damaging agent for caspases and the double-stranded RNA-dependent protein kinase." Cancer Res **62**: 2272-2280.
- Jiang, H. Y. et R. C. Wek (2005). "Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition." J Biol Chem **280**: 14189-14202.
- Jin, H. O., S. I. Yoon, S. K. Seo, H. C. Lee, S. H. Woo, D. H. Yoo, S. J. Lee, T. B. Choe, S. An, T. J. Kwon, J. I. Kim, M. J. Park, S. I. Hong, I. C. Park et C. H. Rhee (2006). "Synergistic induction of apoptosis by sulindac and arsenic trioxide in human lung cancer A549 cells via reactive oxygen species-dependent down-regulation of survivin." Biochem Pharmacol **72**: 1228-1236.
- Jin, Z. et W. S. El-Deiry (2005). "Overview of cell death signaling pathways." Cancer Biol Ther **4**: 139-163.
- Joshi, B., L. Li, B. G. Taffe, Z. Zhu, S. Wahl, H. Tian, E. Ben-Josef, J. D. Taylor, A. T. Porter et D. G. Tang (1999). "Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188 (a fatty acid-containing hydroxamic acid), requires the mitochondrial respiratory chain." Cancer Res **59**: 4343-4355.

- Kadowaki, H., H. Nishitoh et H. Ichijo (2004). "Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases." J Chem Neuroanat **28**: 93-100.
- Kanuri, M., I.G. Minko, L.V. Nechev, T.M. Harris, C.M. Harris et R.S. Lloyd (2002). "Error prone translesion synthesis past gamma-hydroxypropano deoxyguanosine, the primary acrolein-derived adduct in mammalian cells." J Biol Chem **277**: 18257-18265.
- Kawahara, A., Y. Ohsawa, H. Matsumura, Y. Uchiyama et S. Nagata (1998). "Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain." J Cell Biol **143**: 1353-1360.
- Kawanishi, M., T. Matsuda, A. Nakayama, H. Takebe, S. Matsui et T. Yagi (1998). "Molecular analysis of mutations induced by acrolein in human fibroblast cells using supF shuttle vector plasmids." Mutat Res **417**: 65-73.
- Kayagaki, N., A. Kawasaki, T. Ebata, H. Ohmoto, S. Ikeda, S. Inoue, K. Yoshino, K. Okumura et H. Yagita (1995). "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand." J Exp Med **182**: 1777-1783.
- Kaye, C. (1973). "Biosynthesis of Mercapturic Acids from Allyl Alcohol, Allyl Esters and Acrolein." Biochem. J. **134**: 1093-1101.
- Kehrer, J. et S. Biswal (2000). "The Molecular Effects of Acrolein." Toxicological Sciences **57**: 6-15.
- Kelliher, M. A., S. Grimm, Y. Ishida, F. Kuo, B. Z. Stanger et P. Leder (1998). "The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal." Immunity **8**: 297-303.
- Kern, J. et J. Kehrer (2002). "Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis." Chem Biol Interact **139**: 79-95.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie et A.R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**: 239-257.
- Khelifi, A. F., M. S. D'Alcontres et P. Salomoni (2005). "Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation." Cell Death Differ **12**: 724-733.
- Khullar, S., C.V. Varaprasad et F. Johnson (1999). "Postsynthetic generation of a major acrolein adduct of 2'-deoxyguanosine in oligomeric DNA." J Med Chem **42**: 947-950.

- Kim, J. W., E. J. Choi et C. O. Joe (2000). "Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP." Oncogene **19**: 4491-4499.
- Kim, J.S., L. He et J.J. Lemasters (2003). "Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **304**: 463-470.
- Kim, P. K., M. G. Annis, P. J. Dlugosz, B. Leber et D. W. Andrews (2004). "During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria." Mol Cell **14**: 523-529.
- Kim, B. M. et H. W. Chung (2007). "Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through a ROS-mediated caspase-8/Bid/Bax pathway in human lymphocytes." Biochem Biophys Res Commun **363**: 745-750.
- Kinnally, K. W. et B. Antonsson (2007). "A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis." Apoptosis **12**: 857-868.
- Kirk, R. et al. (1991). "Encyclopedia of chemical technology". New York, Wiley.
- Kirkham, P. et I. Rahman (2006). "Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy." Pharmacology & Therapeutics **111**: 476-494.
- Klinger, J.D., B. Tandler, C.M. Liedtke et T.F. Boat (1984). "Proteinases of *Pseudomonas aeruginosa* evoke mucin release by tracheal epithelium." J Clin Invest **74**: 1669-1678.
- Knudson, C. M., K. S. Tung, W. G. Tourtellotte, G. A. Brown et S. J. Korsmeyer (1995). "Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death." Science **270**: 96-99.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh et P. H. Schlesinger (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." Cell Death Differ **7**: 1166-1173.
- Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T.J. McGarry, M.W. Kirschner, K. Kohts, D.J. Kwiatkowski et L.T. Williams (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." Science **278**: 294-298.
- Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M.J. Gething et J. Sambrook (1988). "The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins." Nature **332**: 462-464.

- Kreuz, S., D. Siegmund, J. J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Hacker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, P. Scheurich et H. Wajant (2004). "NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP." J Cell Biol **166**: 369-380.
- Krishan, A. (1975). "Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining." J Cell Biol **66**: 188-193.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata et G. Melino (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lalier, L., P. F. Cartron, P. Juin, S. Nedelkina, S. Manon, B. Bechinger et F. M. Vallette (2007). "Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis." Apoptosis **12**: 887-896.
- Lamkanfi, M., K. D'Hondt, L. Vande Walle, M. van Gorp, G. Denecker, J. Demeulemeester, M. Kalai, W. Declercq, X. Saelens et P. Vandenabeele (2005). "A novel caspase-2 complex containing TRAF2 and RIP1." J Biol Chem **280**: 6923-6932.
- Lamkanfi, M., N. Festjens, W. Declercq, T. Vanden Berghe et P. Vandenabeele (2007). "Caspases in cell survival, proliferation and differentiation." Cell Death Differ **14**: 44-55.
- Lassus, P., X. Opitz-Araya et Y. Lazebnik (2002). "Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization." Science **297**: 1352-1354.
- Laster, S. M., J. G. Wood et L. R. Gooding (1988). "Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis." J Immunol **141**: 2629-2634.
- Lavrik, I. N., A. Golks, S. Baumann et P. H. Krammer (2006). "Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis." Blood **108**: 559-565.
- Lawlor, M. A. et D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" J Cell Sci **114**: 2903-2910.

- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi et L. H. Glimcher (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." Mol Cell Biol **23**: 7448-7459.
- Lee, Y. et E. Shacter (1997). "Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death." Blood **89**: 4480-4492.
- Leist, M., B. Single, A.F. Castoldi, S. Kuhnle et P. Nicotera (1997). "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis." J Exp Med **185**: 1481-1486.
- Leist, M., B. Single, H. Naumann, E. Fava, B. Simon, S. Kuhnle et P. Nicotera (1999). "Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis." Exp Cell Res **249**: 396-403.
- Lemasters, J. J., C. J. Stemkowski, S. Ji et R. G. Thurman (1983). "Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in the isolated, perfused rat liver." J Cell Biol **97**: 778-786.
- Levine, S.J., P. Larivee, C. Logun, C.W. Angus, F.P. Ognibene et J.H. Shelhamer (1995). "Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **12**: 196-204.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**: 323-331.
- Li, F., G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio et D. C. Altieri (1998a). "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin." Nature **396**: 580-584.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu et J. Yuan (1998b). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**: 491-501.
- Li, L., R.F. Hamilton, Jr., D.E. Taylor et A. Holian (1997a). "Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages." Toxicol Appl Pharmacol **145**: 331-339.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri et X. Wang (1997b). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**: 479-489.

- Li, X., L. Du et Z. Darzynkiewicz (2000). "During apoptosis of HL-60 and U-937 cells caspases are activated independently of dissipation of mitochondrial electrochemical potential." Exp Cell Res **257**: 290-297.
- Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez et Z. G. Liu (1999). "Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis." Genes Dev **13**: 2514-2526.
- Lipari, F. *et al.* (1984). "Aldehyde emission from wood-burning fireplaces." Environmental Science and Technology **18**: 326-330.
- Lippens, S., M. Kockx, M. Knaepen, L. Mortier, R. Polakowska, A. Verheyen, M. Garmyn, A. Zwijsen, P. Formstecher, D. Huylebroeck, P. Vandenabeele et W. Declercq (2000). "Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing." Cell Death Differ **7**: 1218-1224.
- Liston, P., W.G. Fong et R.G. Korneluk (2003). "Inhibitors of Apoptosis Proteins". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 29-46.
- Lithgow, T., R. van Driel, J. F. Bertram et A. Strasser (1994). "The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane." Cell Growth Differ **5**: 411-417.
- Liu-Snyder, P., H. McNally, R. Shi et R.B. Borgens (2006). "Acrolein-mediated mechanisms of neuronal death." J Neurosci Res **84**: 209-218.
- Liu, C. Y. et R. J. Kaufman (2003). "The unfolded protein response." J Cell Sci **116**: 1861-1862.
- Liu, X., C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson et X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." Cell **86**: 147-157.
- Liu, X., H. Zou, C. Slaughter et X. Wang (1997). "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." Cell **89**: 175-184.
- Liu, X., M.A. Lovell et B.C. Lynn (2005). "Development of a method for quantification of acrolein-deoxyguanosine adducts in DNA using isotope dilution-capillary LC/MS/MS and its application to human brain tissue." Anal Chem **77**: 5982-5989.

- Locksley, R.M., N. Killeen et M.J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**: 487-501.
- Loetscher, H., Y.C. Pan, H.W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, H. Tabuchi et W. Lesslauer (1990). "Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor." Cell **61**: 351-359.
- Lovell, M.A., C. Xie et W.R. Markesbery (2000). "Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures." Free Radic Biol Med **29**: 714-720.
- Lundgren, J.D. et J.H. Shelhamer (1990). "Pathogenesis of airway mucus hypersecretion." J Allergy Clin Immunol **85**: 399-417.
- Luo, J. et R. Shi (2004). "Acrolein induces axolemmal disruption, oxidative stress, and mitochondrial impairment in spinal cord tissue." Neurochem Int **44**: 475-486.
- Luo, J., J.P. Robinson et R. Shi (2005). "Acrolein-induced cell death in PC12 cells: Role of mitochondria-mediated oxidative stress." Neurochemistry International **47**: 449-457.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter et X. Wang (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**: 481-490.
- Ma, Y., V. Temkin, H. Liu et R. M. Pope (2005). "NF-kappaB protects macrophages from lipopolysaccharide-induced cell death: the role of caspase 8 and receptor-interacting protein." J Biol Chem **280**: 41827-41834.
- Mackay, D., W.Y. Shiu et K.C. Ma (1995). "Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals". Boca Raton, FL, Lewis Publishers.
- Maddika, S., S. R. Ande, S. Panigrahi, T. Paranjothy, K. Weglarczyk, A. Zuse, M. Eshraghi, K. D. Manda, E. Wiechec et M. Los (2007). "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy." Drug Resist Updat **10**: 13-29.
- Maeda, H. et G.A. Kraus (1997). "A Direct Route to Biologically Active Kainic Acid Analogs." J Org Chem **62**: 2314-2315.
- Maeng, J. et R.L. Funk (2001). "Total synthesis of the immunosuppressant FR901483 via an amidoacrolein cycloaddition." Org Lett **3**: 1125-1128.

- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, A. Kimchi et G. Kroemer (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**: 741-752.
- Makin, G. W., B. M. Corfe, G. J. Griffiths, A. Thistlethwaite, J. A. Hickman et C. Dive (2001). "Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate." Embo J **20**: 6306-6315.
- Malhi, H., G. J. Gores et J. J. Lemasters (2006). "Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?" Hepatology **43**: S31-44.
- Malis, C.D. et J.V. Bonventre (1988). "Susceptibility of mitochondrial membranes to calcium and reactive oxygen species: implications for ischemic and toxic tissue damage." Prog Clin Biol Res **282**: 235-259.
- Mannick, J. B., A. Hausladen, L. Liu, D. T. Hess, M. Zeng, Q. X. Miao, L. S. Kane, A. J. Gow et J. S. Stamler (1999). "Fas-induced caspase denitrosylation." Science **284**: 651-654.
- Marano, F. et M. Demestere (1976). "Ultrastructural autoradiographic study of the intracellular fixation of 3H-acrolein." Experientia **32**: 501-503.
- Marano, F. et S. Puisseux-Dao (1982). "Acrolein and cell cycle." Toxicol Lett **14**: 143-149.
- Marom, Z., J.H. Shelhamer, F. Sun et M. Kaliner (1983). "Human airway monohydroxyeicosatetraenoic acid generation and mucus release." J Clin Invest **72**: 122-127.
- Marsters, S.A., J.P. Sheridan, C.J. Donahue, R.M. Pitti, C.L. Gray, A.D. Goddard, K.D. Bauer et A. Ashkenazi (1996). "Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B." Curr Biol **6**: 1669-1676.
- Martin, S.J. et D.R. Green (1995a). "Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?" Cell **82**: 349-352.
- Martin, S.J., G.A. O'Brien, W.K. Nishioka, A.J. McGahon, A. Mahboubi, T.C. Saido et D.R. Green (1995b). "Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis." J Biol Chem **270**: 6425-6428.
- Martinon, F. et J. Tschopp (2004). "Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases." Cell **117**: 561-574.

- Martinou, J. C. et D. R. Green (2001). "Breaking the mitochondrial barrier." Nat Rev Mol Cell Biol **2**: 63-67.
- Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, J.M. Jurgensmeier, S.A. Susin, H.L. Vieira, M.C. Prevost, Z. Xie, S. Matsuyama, J.C. Reed et G. Kroemer (1998a). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." Science **281**: 2027-2031.
- Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, S. A. Susin, G. Beutner, D. Brdiczka, R. Remy, Z. H. Xie, J. C. Reed et G. Kroemer (1998b). "The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins." J Exp Med **187**: 1261-1271.
- Mattson, M. P. (2000). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." Nat Rev Mol Cell Biol **1**: 120-129.
- McStay, G. P., G. S. Salvesen et D. R. Green (2008). "Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways." Cell Death Differ **15**: 322-331.
- Mendoza-Rodriguez, C. A. et M. A. Cerbon (2001). "[Tumor suppressor gene p53: mechanisms of action in cell proliferation and death]." Rev Invest Clin **53**: 266-273.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska et U. M. Moll (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." Mol Cell **11**: 577-590.
- Minn, A.J., P. Velez, S.L. Schendel, H. Liang, S.W. Muchmore, S.W. Fesik, M. Fill et C.B. Thompson (1997). "Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes." Nature **385**: 353-357.
- Miramar, M. D., P. Costantini, L. Ravagnan, L. M. Saraiva, D. Haouzi, G. Brothers, J. M. Penninger, M. L. Peleato, G. Kroemer et S. A. Susin (2001). "NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor." J Biol Chem **276**: 16391-16398.
- Mirza, A., M. McGuirk, T. N. Hockenberry, Q. Wu, H. Ashar, S. Black, S. F. Wen, L. Wang, P. Kirschmeier, W. R. Bishop, L. L. Nielsen, C. B. Pickett et S. Liu (2002). "Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway." Oncogene **21**: 2613-2622.
- Misonou, Y., M. Asahi, S. Yokoe, E. Miyoshi et N. Taniguchi (2006). "Acrolein produces nitric oxide through the elevation of intracellular calcium levels to induce apoptosis

- in human umbilical vein endothelial cells: implications for smoke angiopathy." Nitric Oxide **14**: 180-187.
- Miyashita, T. et J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**: 293-299.
- Mollinedo, F. et C. Gajate (2006). "Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy." Drug Resist Updat **9**: 51-73.
- Mori, K. (2000). "Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum." Cell **101**: 451-454.
- Morishima, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata et Y. Yasuhiko (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." J Biol Chem **277**: 34287-34294.
- Moriya, M., W. Zhang, F. Johnson et A.P. Grollman (1994). "Mutagenic potency of exocyclic DNA adducts: marked differences between Escherichia coli and simian kidney cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 11899-11903.
- Morris, J.A., A.J. Dorner, C.A. Edwards, L.M. Hendershot et R.J. Kaufman (1997). "Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins." J Biol Chem **272**: 4327-4334.
- Moulé, Y., C. Frayssinet et N. Rousseau (1971). "Effects of acrolein on transcription in vitro." FEBS Lett **16**: 216-218.
- Muchmore, S.W., M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettlesheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng et S.W. Fesik (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." Nature **381**: 335-341.
- Mufti, A. R., E. Burstein et C. S. Duckett (2007). "XIAP: cell death regulation meets copper homeostasis." Arch Biochem Biophys **463**: 168-174.
- Murphy, B.M. et S.J. Martin (2003). "Caspases: Structure, Activation Pathways, and Substrates". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 3-12.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**: 355-365.

- Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner et J. Yuan (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." Nature **403**: 98-103.
- Nakano, K. et K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell **7**: 683-694.
- Napirei, M., S. Wulf et H.G. Mannherz (2004). "Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase I and the plasminogen system." Arthritis Rheum **50**: 1873-1883.
- Napoli, C. (2003). "Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1010**: 698-709.
- Nardini, M., E. I. Finkelstein, S. Reddy, G. Valacchi, M. Traber, C. E. Cross et A. van der Vliet (2002). "Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid." Toxicology **170**: 173-185.
- Nath, R. et F. L. Chung (1994). "Detection of exocyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 7491-7495.
- Nath, R.G., J. Ocando et F. Chung (1996). "Detection of 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenous DNA lesions in rodent and human tissues." Cancer Res. **56**: 452-456.
- Nath, R. , J. Ocando, J. Richie et F. Chung (1997). "Effects of L-butathionine-[S,R]-sulfoximine on 1,N2-propanodeoxyguanosine adduct levels in tissue DNA of F344 rats." Proceedings of the Annual Meeting of the American Association on Cancer Research **38**: A848.
- Neamati, N., A. Fernandez, S. Wright, J. Kiefer et D.J. McConkey (1995). "Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei." J Immunol **154**: 3788-3795.
- Newmeyer, D. D. et S. Ferguson-Miller (2003). "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death." Cell **112**: 481-490.
- Ng, F.W., M. Nguyen, T. Kwan, P.E. Branton, D.W. Nicholson, J.A. Cromlish et G.C. Shore (1997). "p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **139**: 327-338.

- Nguyen, H., E. Finkelstein, A. Reznick, C. Cross et A. van der Vliet (2001). "Cigarette smoke impairs neutrophil respiratory burst activation by aldehyde-induced thiol modifications." Toxicology **160**: 207-217.
- Nicholson, D.W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." Cell Death Differ **6**: 1028-1042.
- Nophar, Y., O. Kemper, C. Brakebusch, H. Englemann, R. Zwang, D. Aderka, H. Holtmann et D. Wallach (1990). "Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor." Embo J **9**: 3269-3278.
- Nunoshiba, T. et K. Yamamoto (1999). "Role of glutathione on acrolein-induced cytotoxicity and mutagenicity in Escherichia coli." Mutat Res **442**: 1-8.
- Oda, K., H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura et Y. Taya (2000). "p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53." Cell **102**: 849-862.
- Ohno, Y. et K. Ormstad (1985). "Formation, toxicity and inactivation of acrolein during biotransformation of cyclophosphamide as studied in freshly isolated cells from rat liver and kidney." Arch. Toxicol. **57**: 99-103.
- Oltvai, Z.N., C.L. Milliman et S.J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**: 609-619.
- Oltvai, Z.N. et S.J. Korsmeyer (1994). "Checkpoints of dueling dimers foil death wishes." Cell **79**: 189-192.
- Ong, Y. L., M. F. McMullin, K. E. Bailie, T. R. Lappin, F. G. Jones et A. E. Irvine (2000). "High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **111**: 182-189.
- Owen, S., D. Pearson, V. Suarez-Mendez, R. O'Driscoll et A. Woodcock (1991). "Evidence of free-radical activity in asthma." N Engl J Med **325**: 586-587.
- Pahl, H.L. et P.A. Baeuerle (1995). "A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B." Embo J **14**: 2580-2588.

- Pan, G., J. Ni, Y.F. Wei, G. Yu, R. Gentz et V.M. Dixit (1997). "An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL." Science **277**: 815-818.
- Pan, G., J.H. Bauer, V. Haridas, S. Wang, D. Liu, G. Yu, C. Vincenz, B.B. Aggarwal, J. Ni et V.M. Dixit (1998). "Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor." FEBS Lett **431**: 351-356.
- Panka, D. J., T. Mano, T. Suhara, K. Walsh et J. W. Mier (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells." J Biol Chem **276**: 6893-6896.
- Park, J. Y., K. G. Park, H. J. Kim, H. G. Kang, J. D. Ahn, H. S. Kim, Y. M. Kim, S. M. Son, I. J. Kim, Y. K. Kim, C. D. Kim, K. U. Lee et I. K. Lee (2005). "The effects of the overexpression of recombinant uncoupling protein 2 on proliferation, migration and plasminogen activator inhibitor 1 expression in human vascular smooth muscle cells." Diabetologia **48**: 1022-1028.
- Patel, J. , J.C. Wood et K.C. Leibman (1980). "The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations." Drug Metab. Dispos **8**: 305-308.
- Patel, J. M. et E. R. Block (1993). "Acrolein-induced injury to cultured pulmonary artery endothelial cells." Toxicol Appl Pharmacol **122**: 46-53.
- Perez-Cruz, I., J. M. Carcamo et D. W. Golde (2007). "Caspase-8 dependent TRAIL-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase." Apoptosis **12**: 225-234.
- Pocker, Y. et N. Janjic (1988). "Differential modification of specificity in carbonic anhydrase catalysis." J Biol Chem **263**: 6169-6176.
- Poli, G., G. Leonarduzzi, F. Biasi et E. Chiarotto (2004). "Oxidative stress and cell signalling." Curr Med Chem **11**: 1163-1182.
- Polyak, K., Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler et B. Vogelstein (1997). "A model for p53-induced apoptosis." Nature **389**: 300-305.
- Potten, C. et J. Wilson (2004). "Apoptosis: The Life and Death of Cells". New York, The Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Price, B.D. et S.K. Calderwood (1992). "Gadd45 and Gadd153 messenger RNA levels are increased during hypoxia and after exposure of cells to agents which elevate the levels of the glucose-regulated proteins." Cancer Res **52**: 3814-3817.

- Proskuryakov, S.Y., A.G. Konoplyannikov et V.L. Gabai (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?" Exp Cell Res **283**: 1-16.
- Prostko, C.R., M.A. Brostrom, E.M. Malara et C.O. Brostrom (1992). "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78." J Biol Chem **267**: 16751-16754.
- Pryor, W. A., B. J. Hales, P. I. Premovic et D. F. Church (1983). "The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications." Science **220**: 425-427.
- Punj, V. et A. M. Chakrabarty (2003). "Redox proteins in mammalian cell death: an evolutionarily conserved function in mitochondria and prokaryotes." Cell Microbiol **5**: 225-231.
- Puthalakath, H. et A. Strasser (2002). "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins." Cell Death Differ **9**: 505-512.
- Ramu, K., C.S. Perry, T. Ahmed, G. Pakenham et J.P. Kehrer (1996). "Studies on the Basis for the Toxicity of Acrolein Mercapturates." Toxicology and Applied Pharmacology **140**: 487-498.
- Rao, R.V., E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L.M. Ellerby, H.M. Ellerby et D.E. Bredesen (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." J Biol Chem **276**: 33869-33874.
- Reed, J.C. (1997). "Bcl-2 family proteins: role in dysregulation of apoptosis and chemoresistance in cancer." Apoptosis and Cancer. Martin SJ. Basel, Karger Landes Systems: 64-97.
- Renatus, M., H.R. Stennicke, F.L. Scott, R.C. Liddington et G.S. Salvesen (2001). "Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9." Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 14250-14255.
- Riedl, S. J. et Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**: 897-907.
- Robert, P. (1991). "Le Petit Robert 1". Dictionnaires Le Robert. Paris: 2172.

- Robertson, J. D., M. Enoksson, M. Suomela, B. Zhivotovsky et S. Orrenius (2002). "Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis." J Biol Chem **277**: 29803-29809.
- Robinson, M., P. Jiang, J. Cui, J. Li, Y. Wang, M. Swaroop, S. Madore, T. S. Lawrence et Y. Sun (2003). "Global genechip profiling to identify genes responsive to p53-induced growth arrest and apoptosis in human lung carcinoma cells." Cancer Biol Ther **2**: 406-415.
- Rochelle, L.G., B.M. Fischer et K.B. Adler (1998). "Concurrent production of reactive oxygen and nitrogen species by airway epithelial cells in vitro." Free Radic Biol Med **24**: 863-868.
- Rostovtseva, T.K., B. Antonsson, M. Suzuki, R.J. Youle, M. Colombini et S.M. Bezrukov (2004). "Bid, but not Bax, regulates VDAC channels." J Biol Chem **279**: 13575-13583.
- Roy, J., A. Bettaieb et Averill-Bates D.A. (2008a). "A549 Adenocarcinoma Cells Undergo Apoptosis by Activation of the Death Receptor Pathway Upon Exposure to Acrolein." Chemico-Biological Interactions: manuscript in preparation.
- Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen et J. C. Reed (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." Embo J **16**: 6914-6925.
- Rudra, P.K. et H.E. Krokan (1999). "Acrolein cytotoxicity and glutathione depletion in n-3 fatty acid sensitive- and resistant human tumor cells." Anticancer Res **19**: 461-469.
- Russell, J. W., D. Golovoy, A. M. Vincent, P. Mahendru, J. A. Olzmann, A. Mentzer et E. L. Feldman (2002). "High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons." Faseb J **16**: 1738-1748.
- Sadeghi-Hashjin, G., G. Folkerts, P.A. Henricks, A.K. Verheyen, H.J. van der Linde, I. van Ark, A. Coene et F.P. Nijkamp (1996). "Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vitro and in vivo." Am J Respir Crit Care Med **153**: 1697-1701.
- Saetta, M. (1999). "Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **160**: S17-20.
- Salvesen, G.S. et V.M. Dixit (1997). "Caspases: intracellular signaling by proteolysis." Cell **91**: 443-446.

- Salvesen, G.S. et V.M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 10964-10967.
- Samet, J.M. et P.W. Cheng (1994). "The role of airway mucus in pulmonary toxicology." Environ Health Perspect **102 Suppl 2**: 89-103.
- Sanchez-Alcazar, J. A., J. G. Ault, A. Khodjakov et E. Schneider (2000). "Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells." Cell Death Differ **7**: 1090-1100.
- Sandes, E., C. Lodillinsky, R. Cwirenbaum, C. Arguelles, A. Casabe et A. M. Eijan (2007). "Cathepsin B is involved in the apoptosis intrinsic pathway induced by Bacillus Calmette-Guerin in transitional cancer cell lines." Int J Mol Med **20**: 823-828.
- Santé Canada (2001). "Les maladies respiratoires au Canada".
- Satoh, K., S. Yamada, Y. Koike, Y. Igarashi, S. Toyokuni, T. Kumano, T. Takahata, M. Hayakari, S. Tsuchida et K. Uchida (1999). "A 1-hour enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of acrolein- and hydroxynonenal-modified proteins by epitope-bound casein matrix method." Anal Biochem **270**: 323-328.
- Sax, J. K., P. Fei, M. E. Murphy, E. Bernhard, S. J. Korsmeyer et W. S. El-Deiry (2002). "BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity." Nat Cell Biol **4**: 842-849.
- Scarlett, J. L., P. W. Sheard, G. Hughes, E. C. Ledgerwood, H. H. Ku et M. P. Murphy (2000). "Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells." FEBS Lett **475**: 267-272.
- Schall, T.J., M. Lewis, K.J. Koller, A. Lee, G.C. Rice, G.H. Wong, T. Gatanaga, G.A. Granger, R. Lentz, H. Raab et al. (1990). "Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor." Cell **61**: 361-370.
- Schendel, S.L., Z. Xie, M.O. Montal, S. Matsuyama, M. Montal et J.C. Reed (1997). "Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 5113-5118.
- Schendel, S.L., R. Azimov, K. Pawlowski, A. Godzik, B.L. Kagan et J.C. Reed (1999). "Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID." J Biol Chem **274**: 21932-21936.

- Schlesinger, P.H., A. Gross, X.M. Yin, K. Yamamoto, M. Saito, G. Waksman et S.J. Korsmeyer (1997). "Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 11357-11362.
- Schuler, M., E. Bossy-Wetzel, J. C. Goldstein, P. Fitzgerald et D. R. Green (2000). "p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release." J Biol Chem **275**: 7337-7342.
- Schuler, M. et D. R. Green (2001). "Mechanisms of p53-dependent apoptosis." Biochem Soc Trans **29**: 684-688.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg et M.E. Peter (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." Eur J Biochem **254**: 439-459.
- Schwarz, M., M. A. Andrade-Navarro et A. Gross (2007). "Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program?" Apoptosis **12**: 869-876.
- Sedlak, T.W., Z.N. Oltvai, E. Yang, K. Wang, L.H. Boise, C.B. Thompson et S.J. Korsmeyer (1995). "Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 7834-7838.
- Sen, C.K. (2000). "Cellular thiols and redox-regulated signal transduction." Curr Top Cell Regul **36**: 1-30.
- Shapiro, H.M. (1994). "Functional assays for cell activation". Practical flow cytometry. New York, Wiley-Liss: 339-342.
- Shen, H. M., Y. Lin, S. Choksi, J. Tran, T. Jin, L. Chang, M. Karin, J. Zhang et Z. G. Liu (2004). "Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death." Mol Cell Biol **24**: 5914-5922.
- Shen, J., X. Chen, L. Hendershot et R. Prywes (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." Dev Cell **3**: 99-111.
- Shi, Y., K.M. Vattem, R. Sood, J. An, J. Liang, L. Stramm et R.C. Wek (1998). "Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control." Mol Cell Biol **18**: 7499-7509.
- Shi, Y. (2003). "Structural Biology of Programmed Cell Death". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 47-65.

- Shi, Y. (2004). "Caspase activation: revisiting the induced proximity model." *Cell* **117**: 855-858.
- Shimizu, S., M. Narita et Y. Tsujimoto (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." *Nature* **399**: 483-487.
- Shimizu, S., T. Ide, T. Yanagida et Y. Tsujimoto (2000). "Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c." *J Biol Chem* **275**: 12321-12325.
- Shinoda, S., S. L. Skradski, T. Araki, C. K. Schindler, R. Meller, J. Q. Lan, W. Taki, R. P. Simon et D. C. Henshall (2003). "Formation of a tumour necrosis factor receptor 1 molecular scaffolding complex and activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 during seizure-induced neuronal death." *Eur J Neurosci* **17**: 2065-2076.
- Sierra, L.M., A.R. Barros, M. Garcia, J.A. Ferreira et M.A. Comendador (1991). "Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. I. Somatic and germinal mutagenesis under proficient repair conditions." *Mutat Res* **260**: 247-256.
- Slee, E.A., M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E.S. Alnemri, D.R. Green et S.J. Martin (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." *J Cell Biol* **144**: 281-292.
- Smith, C.A., T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M.P. Beckmann, R. Jerzy, S.K. Dower, D. Cosman et R.G. Goodwin (1990a). "A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins." *Science* **248**: 1019-1023.
- Smith, R., D.S. Williamson, R.L. Cerny et S.M. Cohen (1990b). "Detection of 1,N6-propanodeoxyadenosine in acrolein-modified polydeoxyadenylic acid and DNA by 32P postlabeling." *Cancer Res.* **50**: 3005-3012.
- Sommerhoff, C.P., J.A. Nadel, C.B. Basbaum et G.H. Caughey (1990). "Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells." *J Clin Invest* **85**: 682-689.
- Sprick, M. R., E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M. A. Weigand et H. Walczak (2002). "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." *Embo J* **21**: 4520-4530.

- Srinivasula, S.M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri et E.S. Alnemri (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." Mol Cell **1**: 949-957.
- Stambolsky, P., L. Weisz, I. Shats, Y. Klein, N. Goldfinger, M. Oren et V. Rotter (2006). "Regulation of AIF expression by p53." Cell Death Differ **13**: 2140-2149.
- Stevens, J. F. et C. S. Maier (2008). "Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease." Mol Nutr Food Res **52**: 7-25.
- Stewart, Z. A. et J. A. Pietenpol (2001). "p53 Signaling and cell cycle checkpoints." Chem Res Toxicol **14**: 243-263.
- Stoetzer, O. J., V. Nussler, M. Darsow, E. Gullis, R. Pelka-Fleischer, U. Scheel et W. Wilmanns (1996). "Association of bcl-2, bax, bcl-xL and interleukin-1 beta-converting enzyme expression with initial response to chemotherapy in acute myeloid leukemia." Leukemia **10 Suppl 3**: S18-S22.
- Strasser, A., L. O'Connor et V.M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-245.
- Sundar Rajan, S., V. Srinivasan, M. Balasubramanyam et U. Tatu (2007). "Endoplasmic reticulum (ER) stress & diabetes." Indian J Med Res **125**: 411-424.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger et G. Kroemer (1999a). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**: 441-446.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, C. Brenner, N. Larochette, M. C. Prevost, P. M. Alzari et G. Kroemer (1999b). "Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process." J Exp Med **189**: 381-394.
- Suzuki, D. et T. Miyata (1999). "Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy." Intern Med **38**: 309-314.
- Suzuki, T., K. Fukuo, T. Suhara, O. Yasuda, N. Sato, Y. Takemura, M. Tsubakimoto et T. Ogihara (2003). "Eicosapentaenoic acid protects endothelial cells against anoikis through restoration of cFLIP." Hypertension **42**: 342-348.

- Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio et R. Takahashi (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**: 613-621.
- Szegezdi, E., U. Fitzgerald et A. Samali (2003). "Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far." Ann N Y Acad Sci **1010**: 186-194.
- Tabor, C. W. et H. Tabor (1984). "Polyamines." Annu Rev Biochem **53**: 749-790.
- Tafani, M., N. O. Karpnich, K. A. Hurster, J. G. Pastorino, T. Schneider, M. A. Russo et J. L. Farber (2002). "Cytochrome c release upon Fas receptor activation depends on translocation of full-length bid and the induction of the mitochondrial permeability transition." J Biol Chem **277**: 10073-10082.
- Takabe, W., E. Niki, K. Uchida, S. Yamada, K. Satoh et N. Noguchi (2001). "Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein." Carcinogenesis **22**: 935-941.
- Takahashi, A., E.S. Alnemri, Y.A. Lazebnik, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, R.D. Moir, R.D. Goldman, G.G. Poirier, S.H. Kaufmann et W.C. Earnshaw (1996). "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 8395-8400.
- Takemura, Y., K. Fukuo, O. Yasuda, T. Inoue, N. Inomata, T. Yokoi, H. Kawamoto, T. Suhara et T. Ogihara (2004). "Fas signaling induces Akt activation and upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression." Hypertension **43**: 880-884.
- Takeuchi, K., M. Kato, H. Suzuki, A. A. Akhand, J. Wu, K. Hossain, T. Miyata, Y. Matsumoto, Y. Nimura et I. Nakashima (2001). "Acrolein induces activation of the epidermal growth factor receptor of human keratinocytes for cell death." J Cell Biochem **81**: 679-688.
- Talapatra, S. et C. B. Thompson (2001). "Growth factor signaling in cell survival: implications for cancer treatment." J Pharmacol Exp Ther **298**: 873-878.
- Tanel, A. et D. Averill-Bates (2005). "The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation of the mitochondrial pathway." Biochim Biophys Acta **1743**: 255-267.
- Tanel, A. et D. Averill-Bates (2007a). "Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein." Free Radic Biol Med **42**: 798-810.

- Tanel, A. et D. A. Averill-Bates (2007b). "Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant N-acetylcysteine." J Pharmacol Exp Ther **321**: 73-83.
- Tanel, A. et D. A. Averill-Bates (2007c). "P38 and ERK mitogen-activated protein kinases mediate acrolein-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells." Cell Signal **19**: 968-977.
- Thon, L., H. Mohlig, S. Mathieu, A. Lange, E. Bulanova, S. Winoto-Morbach, S. Schutze, S. Bulfone-Paus et D. Adam (2005). "Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death." Faseb J **19**: 1945-1956.
- Timmer, J. C. et G. S. Salvesen (2007). "Caspase substrates." Cell Death Differ **14**: 66-72.
- Tinel, A., S. Janssens, S. Lippens, S. Cuenin, E. Logette, B. Jaccard, M. Quadroni et J. Tschopp (2007). "Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway." Embo J **26**: 197-208.
- Toninello, A., P. Pietrangeli, U. De Marchi, M. Salvi et B. Mondovi (2006). "Amine oxidases in apoptosis and cancer." Biochim Biophys Acta **1765**: 1-13.
- Troisi, R. J., F. E. Speizer, B. Rosner, D. Trichopoulos et W. C. Willett (1995). "Cigarette smoking and incidence of chronic bronchitis and asthma in women." Chest **108**: 1557-1561.
- Tsukada, T., M. Watanabe et T. Yamashima (2001). "Implications of CAD and DNase II in ischemic neuronal necrosis specific for the primate hippocampus." J Neurochem **79**: 1196-1206.
- Tu, C., G.C. Wynns et D.N. Silverman (1989). "Chemical modification of carbonic anhydrase II with acrolein." J Biol Chem **264**: 12389-12393.
- Uchida, K., M. Kanematsu, Y. Morimitsu, T. Osawa, N. Noguchi et E. Niki (1998a). "Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins." J Biol Chem **273**: 16058-16066.
- Uchida, K., M. Kanematsu, K. Sakai, T. Matsuda, N. Hattori, Y. Mizuno, D. Suzuki, T. Miyata, N. Noguchi, E. Niki et T. Osawa (1998b). "Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 4882-4887.
- Uchida, K. (1999). "Current status of acrolein as a lipid peroxidation product." Trends Cardiovasc Med **9**: 109-113.

- Ueda, H. et R. Fujita (2004). "Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain." Biol Pharm Bull **27**: 950-955.
- Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding et D. Ron (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." Science **287**: 664-666.
- Urbano, A., U. Lakshmanan, P. H. Choo, J. C. Kwan, P. Y. Ng, K. Guo, S. Dhakshinamoorthy et A. Porter (2005). "AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells." Embo J **24**: 2815-2826.
- Vahsen, N., C. Cande, J. J. Briere, P. Benit, N. Joza, N. Larochette, P. G. Mastroberardino, M. O. Pequignot, N. Casares, V. Lazar, O. Feraud, N. Debili, S. Wissing, S. Engelhardt, F. Madeo, M. Piacentini, J. M. Penninger, H. Schagger, P. Rustin et G. Kroemer (2004). "AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation." Embo J **23**: 4679-4689.
- Vande Velde, C., J. Cizeau, D. Dubik, J. Alimonti, T. Brown, S. Israels, R. Hakem et A.H. Greenberg (2000). "BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore." Mol Cell Biol **20**: 5454-5468.
- van Engeland, M., L. J. Nieland, F. C. Ramaekers, B. Schutte et C. P. Reutelingsperger (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." Cytometry **31**: 1-9.
- Vanden Berghe, T., M. Kalai, G. Denecker, A. Meeus, X. Saelens et P. Vandenabeele (2006). "Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not." Cell Signal **18**: 328-335.
- Vander Heiden, M.G., N.S. Chandel, P.T. Schumacker et C.B. Thompson (1999). "Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange." Mol Cell **3**: 159-167.
- Vasant, C., R. Rajaram et T. Ramasami (2003). "Apoptosis of lymphocytes induced by chromium(VI) is through ROS-mediated activation of Src-family kinases and caspase-3." Free Radic Biol Med **35**: 1082-1100.
- Vaux, D. L. et J. Silke (2005). "IAPs, RINGs and ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **6**: 287-297.

- Vermes, I., C. Haanen et C. Reutelingsperger (2000). "Flow cytometry of apoptotic cell death." J Immunol Methods **243**: 167-190.
- Villa, P., S.H. Kaufmann et W.C. Earnshaw (1997). "Caspases and caspase inhibitors." Trends Biochem Sci **22**: 388-393.
- Vincent, A. M., J. A. Olzmann, M. Brownlee, W. I. Sivitz et J. W. Russell (2004). "Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death." Diabetes **53**: 726-734.
- Vitriol, E. A., A. C. Uetrecht, F. Shen, K. Jacobson et J. E. Bear (2007). "Enhanced EGFP-chromophore-assisted laser inactivation using deficient cells rescued with functional EGFP-fusion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 6702-6707.
- Vogelstein, B., D. Lane et A. J. Levine (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**: 307-310.
- Wagner, K. W., I. H. Engels et Q. L. Deveraux (2004). "Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway." J Biol Chem **279**: 35047-35052.
- Walczak, H. et P.H. Krammer (2000). "The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems." Exp Cell Res **256**: 58-66.
- Wang, H., X. Liu, T. Umino, C.M. Skold, Y. Zhu, T. Kohyama, J.R. Spurzem, D.J. Romberger et S.I. Rennard (2001). "Cigarette Smoke Inhibits Human Bronchial Epithelial Cell Repair Processes." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **25**: 772-779.
- Wang, L., F. Kong, C. L. Kokoski, D. W. Andrews et C. Xing (2008a). "Development of dimeric modulators for anti-apoptotic Bcl-2 proteins." Bioorg Med Chem Lett **18**: 236-240.
- Wang, L., N. Azad, L. Kongkanermit, F. Chen, Y. Lu, B. H. Jiang et Y. Rojanasakul (2008b). "The Fas Death Signaling Pathway Connecting Reactive Oxygen Species Generation and FLICE Inhibitory Protein Down-Regulation." J Immunol **180**: 3072-3080.
- Wang, X.Z., H.P. Harding, Y. Zhang, E.M. Jolicoeur, M. Kuroda et D. Ron (1998). "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses." Embo J **17**: 5708-5717.

- Wei, M.C., T. Lindsten, V.K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C.B. Thompson et S.J. Korsmeyer (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." Genes Dev **14**: 2060-2071.
- Wei, M.C., W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson et S.J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**: 727-730.
- Willis, S. N., J. I. Fletcher, T. Kaufmann, M. F. van Delft, L. Chen, P. E. Czabotar, H. Ierino, E. F. Lee, W. D. Fairlie, P. Bouillet, A. Strasser, R. M. Kluck, J. M. Adams et D. C. Huang (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." Science **315**: 856-859.
- Witschi, H., J.P. Joad et K.E. Pinkerton (1997). "The toxicology of environmental tobacco smoke." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 29-52.
- Witz, G. (1989). "Biological interactions of alpha,beta-unsaturated aldehydes." Free Radic Biol Med **7**: 333-349.
- Wolter, K.G., Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi et R.J. Youle (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." J Cell Biol **139**: 1281-1292.
- World Health Organization (1991). "Acrolein."
- World Health Organization (2002). "Acrolein".
- Xu, Y., S. Huang, Z. G. Liu et J. Han (2006). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation." J Biol Chem **281**: 8788-8795.
- Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L.H. Boise, C.B. Thompson et S.J. Korsmeyer (1995). "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death." Cell **80**: 285-291.
- Yang, X., R. Khosravi-Far, H.Y. Chang et D. Baltimore (1997). "Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis." Cell **89**: 1067-1076.
- Yang, X., X. Wu, Y.E. Choi, J.C. Kern et J.P. Kehrer (2004). "Effect of acrolein and glutathione depleting agents on thioredoxin." Toxicology **204**: 209-218.

- Ye, H., C. Cande, N. C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Larochette, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer et H. Wu (2002). "DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor." Nat Struct Biol **9**: 680-684.
- Yin, X.M., W.X. Ding et Y. Zhao (2003a). "Bcl-2 Family Proteins: Master Regulators of Apoptosis". Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. X-M. Yin and Z. Dong. Totowa, Humana Press Inc.: 13-27.
- Yin, X. M. et W. X. Ding (2003b). "Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury." Curr Mol Med **3**: 491-508.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama et M. Tohyama (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress." J Biol Chem **276**: 13935-13940.
- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada et K. Mori (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**: 881-891.
- Yoshida, H., T. Matsui, N. Hosokawa, R. J. Kaufman, K. Nagata et K. Mori (2003). "A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response." Dev Cell **4**: 265-271.
- Youle, R. J. et A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**: 47-59.
- Zamzami, N., C. Brenner, I. Marzo, S.A. Susin et G. Kroemer (1998a). "Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins." Oncogene **16**: 2265-2282.
- Zamzami, N., I. Marzo, S.A. Susin, C. Brenner, N. Larochette, P. Marchetti, J. Reed, R. Kofler et G. Kroemer (1998b). "The thiol crosslinking agent diamide overcomes the apoptosis-inhibitory effect of Bcl-2 by enforcing mitochondrial permeability transition." Oncogene **16**: 1055-1063.
- Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel et S.J. Korsmeyer (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." Cell **87**: 619-628.

- Zha, J., H. Harada, K. Osipov, J. Jockel, G. Waksman et S. J. Korsmeyer (1997). "BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity." J Biol Chem **272**: 24101-24104.
- Zhang, Z., S. M. Lapolla, M. G. Annis, M. Truscott, G. J. Roberts, Y. Miao, Y. Shao, C. Tan, J. Peng, A. E. Johnson, X. C. Zhang, D. W. Andrews et J. Lin (2004). "Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax." J Biol Chem **279**: 43920-43928.
- Zinszner, H., M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R. T. Lightfoot, H. Remotti, J. L. Stevens et D. Ron (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum." Genes Dev **12**: 982-995.
- Zitting, A. et T. Heinonen (1980). "Decrease of reduced glutathione in isolated rat hepatocytes caused by acrolein, acrylonitrile, and the thermal degradation products of styrene copolymers." Toxicology **17**: 333-341.
- Zong, W.X., T. Lindsten, A.J. Ross, G.R. MacGregor et C.B. Thompson (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." Genes Dev **15**: 1481-1486.
- Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg et X. Wang (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**: 405-413.
- Zou, H., Y. Li, X. Liu et X. Wang (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**: 11549-11556.