

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Activation par l'IL-1 de cellules synoviales et de fibroblastes humains en culture: effets sur la libération et la métabolisation de l'acide arachidonique

Vanderbeck, Sophie

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

**Activation par l'IL-1 de cellules synoviales et de
fibroblastes humains en culture.
Effets sur la libération et la métabolisation de l'acide
arachidonique.**

Vanderbeck Sophie

Résumé

Nous avons étudié l'activation par l'IL-1 de deux types de cellules humaines en culture, les cellules synoviales et des fibroblastes de poumon foetal. L'IL-1 déclenche une série de réponses cellulaires, mais nous nous sommes plus particulièrement intéressés au métabolisme de l'acide arachidonique (AA). Dans une première approche, indirecte, nous avons comparé dans les deux types cellulaires stimulés à l'IL-1, leur capacité de mobiliser l'AA à partir des phospholipides membranaires, l'enzyme principalement impliquée étant la phospholipase A2 (PLA2). Cette capacité a été analysée de manière quantitative, par comptage de la radioactivité après marquage des cellules avec de l'AA radioactif, et de manière qualitative par chromatographie sur couche mince. Pour préciser le rôle de la PLA2, les cellules ont été traitées par après, avec de l'acide aristolochique, un inhibiteur de la PLA2. Dans un second temps, dans le but de mieux dissocier les effets respectifs de l'IL-1 sur la PLA2 et sur les enzymes métabolisant l'AA (la cyclooxygénase et les lipoxygénases), nous avons essayé de mettre au point un dosage direct de la PLA2.

MEMOIRE de licence en Sciences biologiques

Juin 1991

Promoteur : M. RAES

Je remercie Monsieur Remacle de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir conseillée au cours de ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Martine Raes qui m'a guidée tout au long de l'année par ses nombreux et judicieux conseils. Sa disponibilité et son aide m'ont été précieuses.

De tout coeur merci à Véronique Lecomte et à Maggi Burton qui m'ont aidée à cloturer ce mémoire.

A Isabelle Knott, Isabelle Alexandre et Nathalie Zamatteo pour leur soutien.

A Carine Michiels pour l'aide apportée lors de la dactylographie.

A Andrée Houbion pour sa constante disponibilité au laboratoire.

Pour la collaboration des Drs Paquay (Ste Camille, Namur) et Bertrand (St Luc, Bruxelles) pour avoir mis à notre disposition des membranes de cellules synoviales indispensables à l'élaboration de ce travail.

A Sylviane, Dominique et Eric. A tous les membres de ce laboratoire et à l'ambiance agréable qu'ils y font régner. A Marie sans qui nous ne pourrions travailler.

A mes parents pour m'avoir encouragée tout au long de mes études.

A ma soeur Valérie pour sa bienveillance et sa collaboration.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

- AA : acide arachidonique
AAr : acide aristolochique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
BME : milieu basal de Eagle
CPM : coups par minute
DAG : diacylglycérol
DPM : désintégrations par minute
EDTA : acide éthylènedinitrilotetraacétique
EGF : endothelial growth factor
GC-MS : gas chromatography - mass spectrometer
HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque
HPETE : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque
HPLC : high performance liquid chromatography
IL-1 : interleukine-1
IL-1 α : forme α de l'interleukine-1
IL-1 β : forme β de l'interleukine-1
IP₃ : inositol triphosphate
LTA₄ : leucotriène A₄
LTB₄ : leucotriène B₄
LTC₄ : leucotriène C₄
LTD₄ : leucotriène D₄
LTE₄ : leucotriène E₄
LTs : leucotriènes
MTT : bromure de 3,(4,5-diméthyl-thiazoyl-2-yl) 2,5 diphényltétrazolium
OPTI-MEM (ou OPTI) + HLA 0,2 % : milieu OPTI-MEM additionné d'hydrolysate de lactalbumine à une concentration de 0,2 %
PAF : platelet derived growth factor
PGD₂ : Prostaglandine D₂
PGE₂ : Prostaglandine E₂
6-kéto-PGF_{1 α} : 6-kéto-Prostaglandine F_{1 α}
PGF_{2 α} : Prostaglandine F_{2 α}
PGG₂ : Prostaglandine G₂
PGH₂ : Prostaglandine H₂
PGI₂ : Prostaglandine I₂
PGs : prostaglandines

PKC : protéine kinase C

PLA₂ : phospholipase A₂

PLC : phospholipase C

PMNs : polymorphonucléaires neutrophiles

SB : sérum bovin = sérum de veau foetal

TLC : thin layer chromatography

TNF : tumor necrosis factor

I. INTRODUCTION

1. LES VOIES D'ACTIVATION CELLULAIRE

- 1.1. LA VOIE DE L'INOSITOL TRIPHOSPHATE ET DU DIACYLGLYCÉROL
- 1.2. LA VOIE DE L'AMP CYCLIQUE
- 1.3. LA VOIE DU CALCIUM

2. L'INTERLEUKINE-1

- 2.1. CARACTERISTIQUES DE L'IL-1
- 2.2. EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-1
- 2.3. TRANSDUCTION DU SIGNAL

3. LA CASCADE DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE

- 3.1. LE METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE
- 3.2. LA PHOSPHOLIPASE A₂
 - 3.2.1. Caractéristiques
 - 3.2.2. Inhibiteurs de la PLA₂
 - 3.2.3. Importance physiologique de la PLA₂

4. MODELES IN VITRO

5. OBJECTIF

II. MATERIELS ET METHODES

1. CULTURE DES CELLULES

1.1. CULTURE DES CELLULES SYNOVIALES

- 1.1.1. Matériels
- 1.1.2. Mise en culture des cellules synoviales
- 1.1.3. Repiquage des cellules synoviales
- 1.1.4. Congélation et décongélation des cellules synoviales
 - 1.1.4.1. *Congélation.*
 - 1.1.4.2. *Décongélation*

- 1.2. CULTURE DES FIBROBLASTES PULMONAIRES
 - 1.2.1. Matériels
 - 1.2.2. Repiquage des fibroblastes pulmonaires
 - 1.2.3. Congélation et décongélation des fibroblastes pulmonaires
 - 1.2.4. Clonage des fibroblastes pulmonaires

2. COURBES DE CROISSANCE PAR QUANTIFICATION DES CELLULES : METHODE AU CRISTAL VIOLET
 - 2.1. MATERIELS
 - 2.2. METHODE

3. TEST DE CYTOTOXICITE AU MTT
 - 3.1. MATERIELS
 - 3.2. METHODE

4. TEST DE LIBERATION D'ACIDE ARACHIDONIQUE RADIOACTIF PREALABLEMENT INCORPORE PAR LES CELLULES
 - 4.1. MATERIELS
 - 4.2. TEST DE LIBERATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE EN MICROPUIITS
 - 4.3. TEST DE LIBERATION D'ACIDE ARACHIDONIQUE EN MACROPUIITS

5. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE OU TLC (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY)
 - 5.1. MATERIELS
 - 5.2. EXTRACTION DES DERIVES DE L'AA*
 - 5.3. CHROMATOGRAPHIE PROPUREMENT DITE

6. DOSAGE DE LA PHOSPHOLIPASE A₂
 - 6.1. MATERIELS
 - 6.2. DOSAGE DE LA PLA₂ PURIFIEE
 - 6.3. DOSAGE DE LA PLA₂ CELLULAIRE
 - 6.3.1. Stimulation et récupération des cellules
 - 6.3.2. Extraction et dosage de la PLA₂ sans étape
 - 6.3.3. Extraction et dosage de la PLA₂ avec étape d'acidification

III. RESULTATS et DISCUSSION

1. MISE EN CULTURE DES CELLULES

- 1.1. LES CELLULES SYNOVIALES
- 1.2. LES FIBROBLASTES PULMONAIRES

2. MESURE DE LA CYTOTOXICITE CELLULAIRE

- 2.1. MISE AU POINT DU TEST DE CYTOTOXICITE
- 2.2. CYTOTOXICITE DE L'ACIDE ARISTOLOCHIQUE
 - 2.2.1. Les cellules synoviales
 - 2.2.2. Les fibroblastes pulmonaires

3. ACTIVATION PAR L'IL-1 DU METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE : ETUDE COMPARATIVE SUR LES CELLULES SYNOVIALES ET LES FIBROBLASTES PULMONAIRES EN CULTURE

- 3.1. ANALYSE QUANTITATIVE
- 3.2. ANALYSE QUALITATIVE : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (TLC)
 - 3.2.1. Les cellules synoviales
 - 3.2.2. Fibroblastes pulmonaires
 - 3.2.3. Discussion
- 3.3. EFFETS DE L'ACIDE ARISTOLOCHIQUE
 - 3.3.1. Cellules synoviales
 - 3.3.2. Les fibroblastes pulmonaires
 - 3.3.3. Discussion
 - 3.3.4. Conclusion

4. MISE AU POINT DU DOSAGE DE LA PLA2

- 4.1. DOSAGE DE L'ENZYME PURIFIEE
- 4.2. DOSAGE DE L'ENZYME CELLULAIRE
 - 4.2.1. Approche quantitative
 - 4.2.2. Approche qualitative

IV. DISCUSSION GENERALE et CONCLUSIONS

V. BIBLIOGRAPHIE

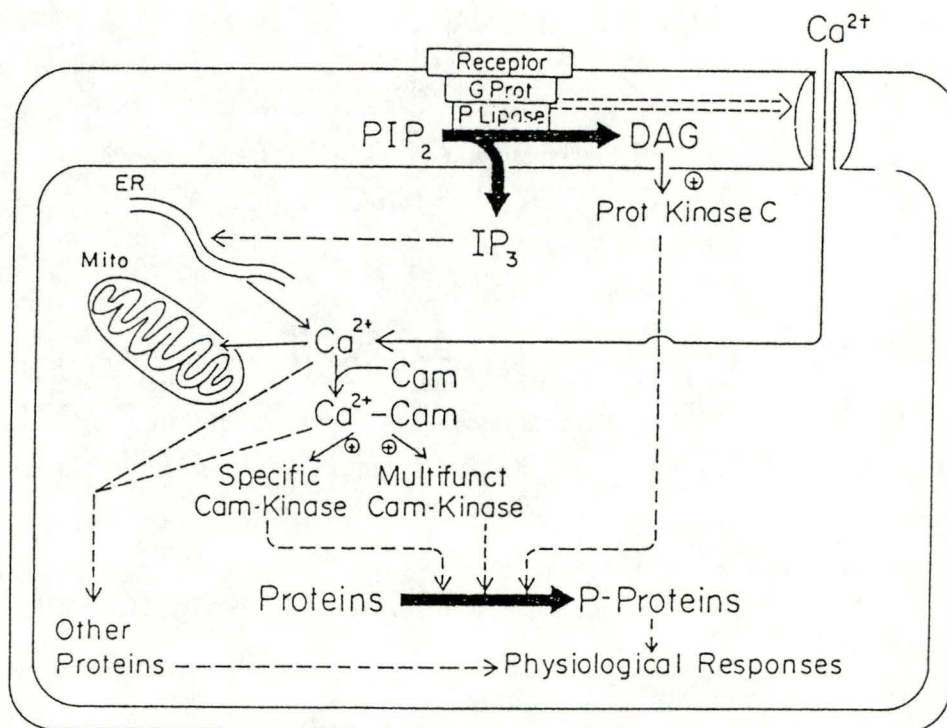


FIG. I-1 : Transmission du signal par la voie de l'IP₃ et du DAG. Le signal externe interagit avec le récepteur de la membrane. Il est transmis par la protéine G qui va activer la phospholipase C (PLipase). Celle-ci scinde alors le PIP₂ en messagers secondaires : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃). L'IP₃ diffuse alors et agit sur les stocks intracellulaires de calcium, tel le réticulum endoplasmique, qui libèrent alors les ions calcium. Ceux-ci activent diverses protéines kinases. Le DAG reste associé à la membrane et va activer la protéine kinase C (PKC). Les deux branches de la voie des inositides aboutissent à la phosphorylation d'un ensemble de protéines et de ce fait à la réponse cellulaire (d'après Exton, 1988).

I. INTRODUCTION

1. LES VOIES D'ACTIVATION CELLULAIRE

Un organisme pluricellulaire a besoin de systèmes de communication entre ses différentes populations de cellules et cette coopération intercellulaire se fait principalement via des signaux chimiques. La plupart des signaux chimiques étant incapables de traverser la membrane plasmique, des mécanismes de transduction existent et ont pour rôle de transformer les signaux externes en signaux internes, aussi appelés messagers secondaires. Le principe de fonctionnement est le même pour toutes les cellules : des messages externes se fixent sur des récepteurs situés sur la membrane plasmique. Ces récepteurs ainsi activés, interagissent alors avec diverses molécules transductrices et celles-ci transportent les signaux vers la face interne de la membrane où des enzymes amplificatrices produisent les messagers secondaires. Actuellement, on décrit trois voies principales de communication intracellulaire permettant la propagation rapide du signal dans toute la cellule (Berridge, 1985).

1.1. LA VOIE DE L'INOSITOL TRIPHOSPHATE ET DU DIACYLGLYCÉROL

Lors d'une stimulation, le message externe se lie à des récepteurs qui transmettent l'information par l'intermédiaire d'une protéine G à la phospholipase C (PLC) (Berridge, 1985; Fain *et al.*, 1988)(Fig. 1-1).

La PLC catalyse alors l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4-5, biphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP₃) (Rillema, 1989). L'IP₃ induit la libération d'ions calcium à partir des réserves intracellulaires, ce qui déclenche une réponse cellulaire (pour plus de détails, voir le point 1.3.) alors que le DAG reste associé à la membrane et provoque la translocation de la protéine kinase C (PKC) du cytoplasme à la face interne de la membrane plasmique. La formation de ce complexe DAG-PKC est par

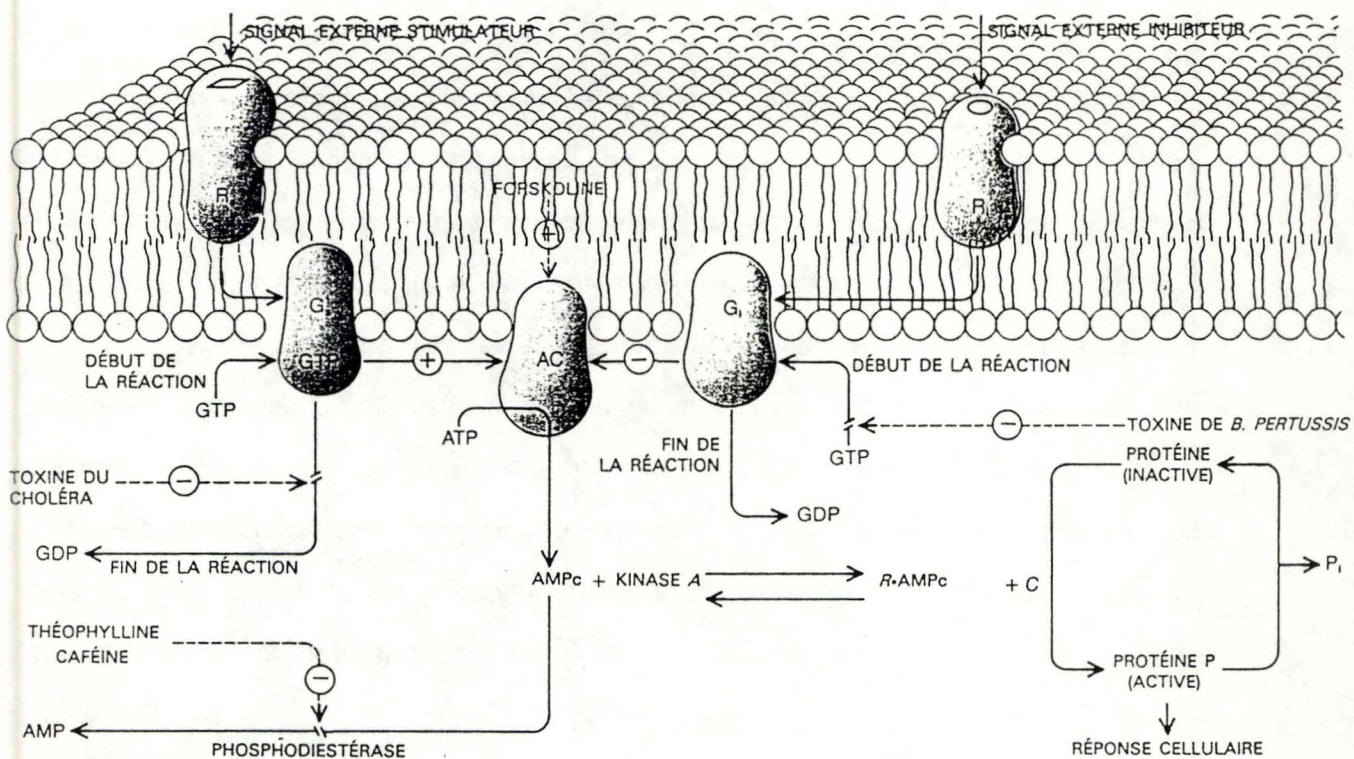


FIG. I-2 : Transmission du signal par la voie de l'AMP cyclique : le signal externe interagit avec le récepteur R de la membrane et est ensuite transmis à la protéine G qui assure le couplage avec l'adénylate cyclase (elle est activée par le GTP et inactivée par le GDP). L'AMP cyclique se lie alors à la sous-unité de régulation de la protéine kinase dont il libère la sous-unité catalytique. Celle-ci peut alors phosphoryler les protéines responsables d'une réponse cellulaire donnée (d'après Berridge, 1985).

ailleurs promue par la phosphatidylsérine membranaire et les ions calcium. Ce complexe est à l'origine de la phosphorylation de protéines intracellulaires (Kaiser *et al.*, 1990).

1.2. LA VOIE DE L'AMP CYCLIQUE

Dans cette voie (Fig. 1-2), les signaux provenant des récepteurs stimulateurs et inhibiteurs convergent par l'intermédiaire de protéines G vers l'adénylate cyclase qui transforme l'ATP en AMP cyclique (Berridge, 1985). Celui-ci se lie à la sous-unité de régulation de certaines protéines kinases, ce qui provoque la libération et l'activation de la sous-unité catalytique qui va phosphoryler les protéines responsables d'une réponse cellulaire donnée (Taylor *et al.*, 1988).

1.3. LA VOIE DU CALCIUM

L'importance du calcium a déjà été entrevue dans la voie de l'IP₃ et du DAG. En effet, l'IP₃ entraîne une libération des ions calcium à partir des sites de stockage intracellulaires par ouverture de canaux calciques, ce qui conduit à une augmentation des ions calcium dans le cytoplasme, après la liaison du messenger externe au récepteur (Rink et Merrit.,1990; Kaiser *et al.*, 1990).

Dans un deuxième temps, les ions calcium se lient à la calmoduline et le complexe calmoduline-calcium formé active des protéines kinases. Celles-ci phosphorylent certaines protéines déclenchant ainsi une réaction cellulaire (Rillema, 1989).

Ainsi, la phospholipase A₂ (PLA₂), enzyme-clé de la cascade de l'acide arachidonique (AA) et à laquelle nous allons nous intéresser plus particulièrement, serait activée entre autre via la voie de l'IP₃ et du DAG ainsi que la voie du calcium. En effet, la PLA₂ semble exister dans les cellules au repos sous forme de complexe PLA₂-lipocortine. Lorsque la cellule est activée par un signal externe donné, le complexe DAG-PKC formé entraîne la phosphorylation de la lipocortine, ce qui libère la PLA₂. D'autre part, le calcium libéré à partir des réserves intracellulaires par l'IP₃ est nécessaire à l'activation de la PLA₂

(Kaiser *et al.*, 1990). Une fois activée, elle va hydrolyser les phospholipides membranaires et plus particulièrement la phosphatidylcholine et libérer l'AA, métabolite très important dans l'activation cellulaire, puisqu'il sera métabolisé en une série de molécules dont les effets biologiques sont très diversifiés, les prostaglandines (PGs) et les leucotriènes (LTs). Le métabolisme de l'AA est stimulé par diverses molécules, telles les esters de phorbol, certains facteurs de croissance (Hassid, 1982), mais aussi par une série de cytokines, dont l'interleukine-1.

2. L'INTERLEUKINE-1

L'interleukine-1 (IL-1) est l'un des médiateurs-clés de la réponse de l'organisme à une invasion microbienne, à l'inflammation, aux réactions immunologiques et aux lésions tissulaires. L'IL-1 est l'un des membres prédominants d'un groupe de médiateurs polypeptidiques appelés cytokines. Ses rôles biologiques sont largement étudiés et elle se lie à une grande variété de cellules. Cependant, la nature précise et l'hétérogénéité structurelle et fonctionnelle des récepteurs à l'IL-1 sont loin d'être comprises (Ghiara *et al.*, 1990) et les mécanismes de transduction après fixation de l'IL-1 sur son récepteur ne sont pas encore complètement élucidés (Saklatvala *et al.*, 1990).

2.1. CARACTERISTIQUES DE L'IL-1

Bien que le macrophage soit la source principale de l'IL-1, les tissus épidermiques, épithéliaux, lymphoïdes et vasculaires la synthétisent également. Quand l'IL-1 accède à la circulation, elle agit de la même façon qu'une hormone et induit des changements dans les différents systèmes neurologiques, métaboliques, hématologiques et endocriniens. Après sa synthèse, elle peut également rester associée à la membrane plasmique et induire des changements locaux sans pour autant produire des réponses systémiques (Dinarello, 1988a).

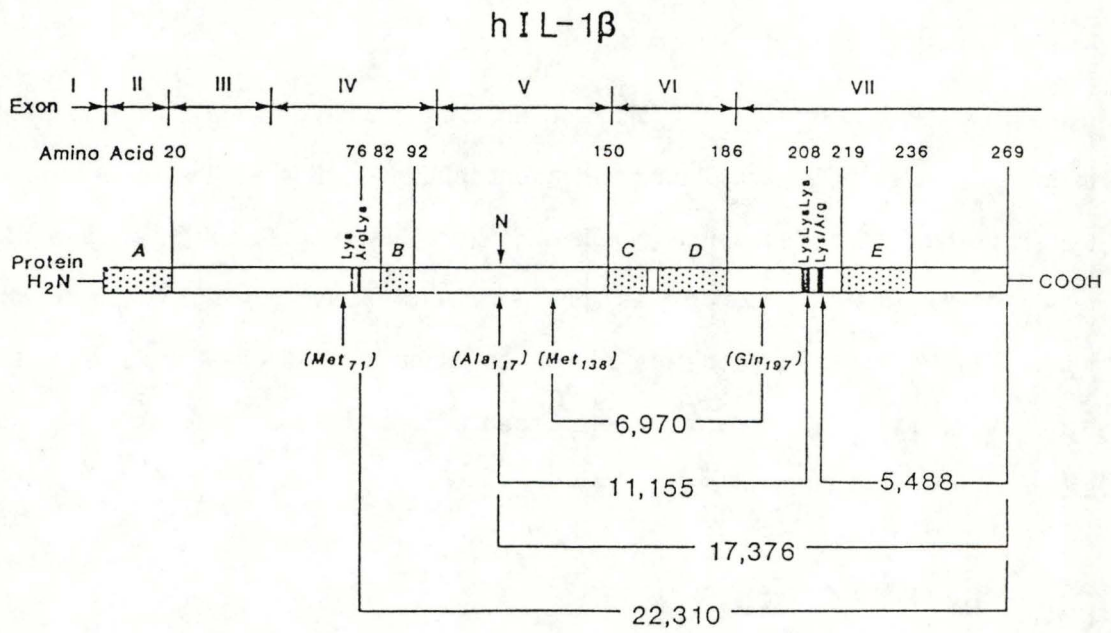


FIG. I-3 : Gène de l'IL-1 β et structure de la protéine précurseur. Les zones d'homologies avec l'IL-1 α sont renseignées (zones en pointillés A, B, C, D et E). La figure reprend également les sites de clivage protéiniques et les longueurs des fragments peptidiques correspondants. L'IL-1 β mature correspond au peptide de 17 500 Da et se termine à son extrémité N-terminale au niveau de l'Ala₁₁₇ (d'après Dinarello, 1988).

A l'heure actuelle, on sait qu'il existe deux formes d'IL-1 : la forme α qui semble plutôt associée aux membranes; elle exercerait les effets stimulants locaux dans certains tissus tels que les articulations ou la peau, elle est la forme la plus acide avec un point isoélectrique de 5 ; la forme β qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire et est caractérisée par un point isoélectrique de 7 (Dinarello, 1988b). Ces deux formes partagent les mêmes récepteurs qui peuvent être de basse affinité ou de haute affinité. Il existerait de 2.000 à 20.000 récepteurs par cellule cible et chaque récepteur aurait un poids moléculaire compris entre 75 et 95 kDa (Billingham, 1987).

Bien que leurs activités biologiques soient très similaires, les formes α et β n'ont que 26 % d'homologie dans leur séquence en acides aminés et 45 % d'homologie pour la séquence nucléotidique de leur gène.

Les deux formes d'IL-1 sont codées par deux gènes séparés, tous deux localisés sur le chromosome 2 et chaque gène contient 7 exons. Les deux formes d'IL-1 sont tout d'abord traduites en polypeptides précurseurs (31 kDa), comme illustré pour l'IL-1 β dans la Fig. I-3. La maturation du polypeptide précurseur est engagée par l'action de sérines protéinases et aboutit à la formation de plus petits peptides (Dinarello, 1988a).

Parmi les 5 séquences communes en acides aminés (A, B, C, D et E), les séquences A et B sont contenues dans la séquence précurseur et manquent dans la forme mature de l'IL-1. Les seules séquences d'homologie pour les deux formes de l'IL-1 sont donc les séquences C, D et E de l'extrémité carboxyl-terminale. Ces régions représenteraient le site actif de la molécule. Ceci expliquerait que, malgré leurs deux formes structurellement distinctes, elles partagent les mêmes propriétés biologiques (Dinarello, 1988b).

2.2. EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-1

L'IL-1 est un agent fondamental dans certains processus inflammatoires. Parmi les manifestations de l'IL-1, il est important de distinguer les effets autocrines et paracrines dans le cas d'inflammation localisée et les effets systémiques prépondérants lors d'infections généralisées. En effet, l'IL-1 peut agir à grande distance de son site de production (Fig. I-4)

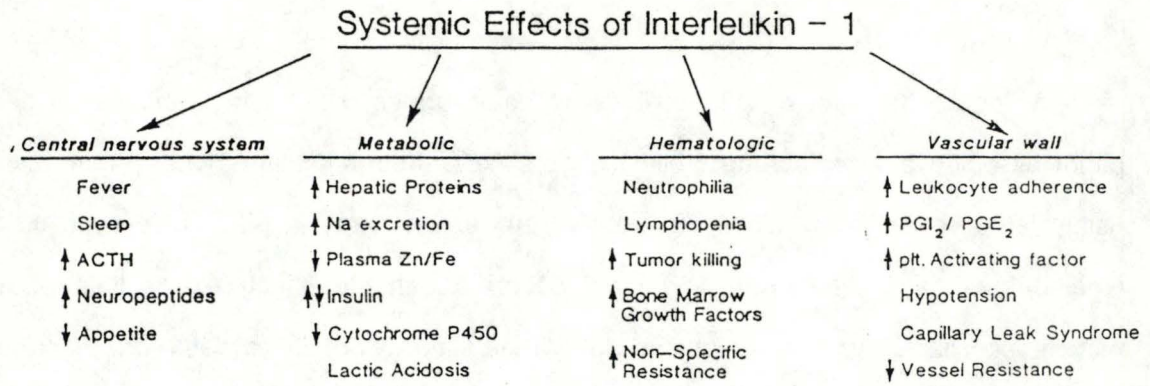


FIG. I-4 : Effets systémiques majeurs de l'IL-1 (d'après Dinarello, 1988).

Type of effect	Effects
Cell growth	Fibroblast, keratinocyte, mesangial and glial cell proliferation
Proinflammatory and degradative properties	Increased collagen and procollagenase synthesis Chondrocyte protease and proteoglycan release Increased chondrocyte plasminogen activator Bone resorption (osteoclast-activating factor) PGE ₂ synthesis in dermal and synovial fibroblasts
Effects on leukocytes	Chemotaxis of T and B lymphocytes Neutrophil and monocyte thromboxane synthesis Basophil histamine release Eosinophil degranulation
Cytotoxic effects	Cytotoxic for tumor cells, β islet cells, and thyrocytes
Effects on vascular tissue	Vascular smooth muscle cell proliferation Synthesis of interferon- β 1 and β 2 (IL 6) Increased endothelial plasminogen activator inhibitors Expression of endothelial cell leukocyte adherence receptors
Metabolic effects	Increased intestinal mucus production Decreased synthesis of adipocyte lipoprotein lipase Decreased hepatic albumin transcription Increased hepatic metallothionein transcription

FIG. 1-5 : Récapitulation des principaux effets de l'IL-1, observés sur des cellules en culture (d'après Dinarello, 1988).

notamment sur le système nerveux central où son action sur les centres thermorégulateurs provoquent la fièvre et sur le foie où l'IL-1 induit la synthèse des composants sanguins du système inflammatoire. L'IL-1 agit également sur la moëlle osseuse où elle provoque l'augmentation du nombre de globules blancs accompagnant toute inflammation (Gualde, 1986). Les effets systémiques de l'IL-1 n'entrant pas dans le cadre de ce travail, nous nous limiterons à cette brève description afin de développer plus amplement les effets locaux de l'IL-1.

Actuellement, il semble que les effets autocrines et paracrines de l'IL-1 prédominent dans certaines maladies. Bien que les effets de l'IL-1 ne soient pas tous connus, il apparaît que les tissus produisant de l'IL-1 soient eux-mêmes la cible des effets de l'IL-1 ou soient capables d'interférer avec un tissu adjacent. L'IL-1 produite par les macrophages, qui constituent le premier niveau de défense contre les corps étrangers dans l'organisme, peut accroître la migration de ceux-ci vers le lieu de l'inflammation, de même qu'il peut induire la production d'IL-2, d'IL-3 et d'autres facteurs tels que l'interféron γ , à qui leur tour, vont agir sur les lymphocytes T et B et les cellules NK (Dinarello, 1988b).

L'utilisation des cultures de cellules a permis de préciser une série d'effets qu'exerce l'IL-1 sur différents types cellulaires (Fig. 1-5) : stimulation de la croissance de certaines cellules, mise en route de processus cataboliques,...

Mais la capacité de l'IL-1 d'initier la synthèse de prostaglandines (PGs) est également essentielle, car elle rend compte d'une série de phénomènes tant locaux que systémiques. Des études ont montré aussi la capacité qu'a l'IL-1 d'augmenter les effets cataboliques du TNF (Tumor Necrosis Factor). En fait, l'IL-1 et le TNF partagent plusieurs propriétés biologiques et les effets synergiques de l'IL-1 et du TNF ont été observés dans une série de cellules cibles (Dinarello, 1988b). Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes limités à l'étude de l'IL-1.

En contraste avec ces activités pro-inflammatoires, l'IL-1 participe également au processus de réparation des tissus inflammés en augmentant la prolifération des fibroblastes ainsi que la synthèse de collagène et des glycosaminoglycannes (Dinarello, 1988b).

On voit donc que la production de même que les activités biologiques de l'IL-1 sont prépondérantes dans certains processus pathologiques en ce sens que l'IL-1 est capable d'amplifier à la fois la défense cellulaire et humorale de la réponse immune face à un antigène étranger (Billingham, 1987).

2.3. TRANSDUCTION DU SIGNAL

La transduction du signal de l'IL-1 est encore très controversée. Les mécanismes de régulation d'action de l'IL-1 sont très complexes et supposent probablement l'intervention de plusieurs médiateurs. Plusieurs hypothèses furent émises impliquant, entre autres, la voie de l'AMPc, la voie des DAG et IP₃.

L'IL-1 induirait une augmentation transitoire dans la production de AMPc dans un large spectre de cellules répondant à l'IL-1 dont les thymocytes, les cellules synoviales, les fibroblastes de peau et d'autres fibroblastes humains et murins (Mizel *et al.*, 1990).

Des résultats préalables sur la production d'IL-1 par les neutrophiles indiquent également que le récepteur à l'IL-1 pourrait être lié à une protéine se liant au GTP, mais insensible à la toxine de pertussis (Mizel *et al.*, 1990).

Mais, il est possible que l'interaction de l'IL-1 avec ses récepteurs de surface puisse induire en plus de l'AMPc, la production d'autres messagers secondaires nécessaires à une expression entière du programme d'activation par l'IL-1.

Parmi ceux-ci, les DAG et IP₃ ont été proposés par plusieurs auteurs: Bunning *et al.* (1986) ont montré que les esters de phorbol pouvaient mimer l'effet de l'IL1 dans d'autres systèmes. Or, les esters de phorbol sont des analogues du DAG, ce qui suggère que la PKC puisse intervenir dans les mécanismes d'action de l'IL1 (Bunning *et al.*, 1986).

Enfin, Saklatvala *et al.* (1990), entre autres, proposent une troisième voie originale, qui serait propre à certaines cytokines telles que l'IL-1 et le TNF. Ils proposent l'activation d'une ou plusieurs sérine kinases via une protéine membranaire se liant au GTP. Ils identifient plusieurs protéines phosphorylées par cette voie, après traitement à l'IL-1, dont

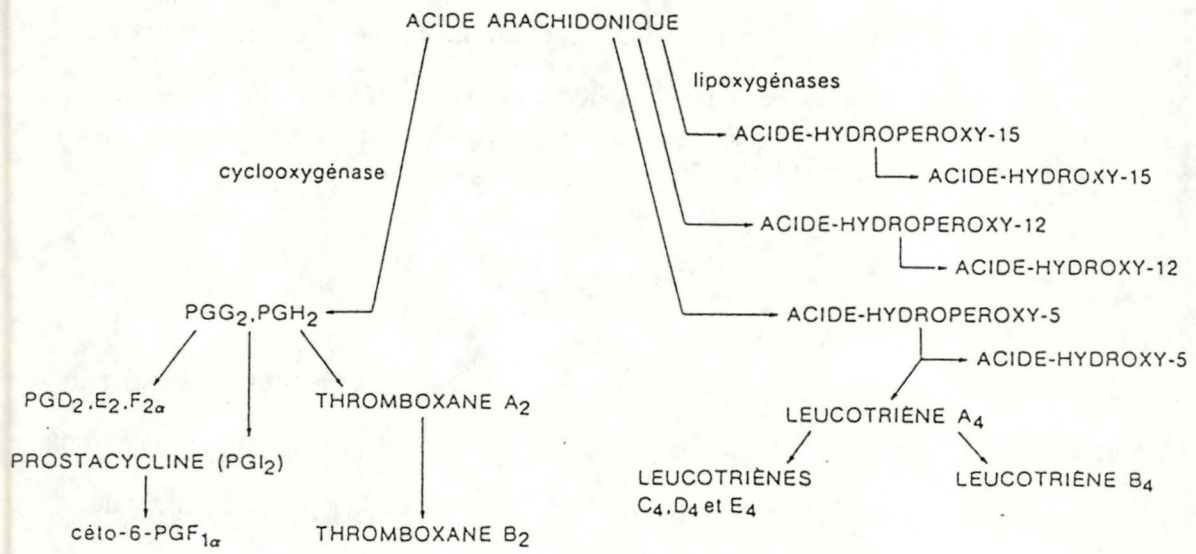


FIG. I-6 : Schéma général du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase et les lipoxygénases (d'après Crastès de Paulet, 1983).

le récepteur à l'EGF, une protéine de chocs thermiques de faible poids moléculaire (hsp 27) et d'autres constituants cytosoliques encore non identifiés.

Il semble donc que des expériences supplémentaires soient encore nécessaires pour clarifier définitivement les mécanismes de transduction qui suivent la fixation de l'IL-1 à son récepteur.

3. LA CASCADE DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE

3.1. LE METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE

Les cellules impliquées dans la réaction inflammatoire relâchent de nombreuses substances promotrices de l'inflammation. Lorsqu'une cellule capable de sécréter ces médiateurs est activée, une enzyme, la phospholipase A₂ (PLA₂), détache un composant normal des membranes, l'acide arachidonique (AA), qui peut alors être transformé en médiateur de l'inflammation selon deux voies (Fig. 1-6) : la voie de la lipoxigénase libérant les leucotriènes (LTs) et la voie de la cyclooxygénase libérant les prostaglandines (PGs), le thromboxane et la prostacycline. Les médiateurs sont produits en proportion variable selon le type cellulaire (Gualde, 1986). L'AA est libéré suite à l'hydrolyse du groupement 2-acyl des phospholipides présents dans la membrane cellulaire (Craстès de Paulet, 1983).

La cyclooxygénase convertit alors l'AA en PGG₂ puis en PGH₂. La PGH₂ ayant un temps de demi-vie assez court est directement transformée en PGE₂, PGD₂ et PGF_{2α} par les PG-endoperoxydes isomérases. La PGH₂, d'autre part, peut être transformée en thromboxane A₂ par action de la thromboxane synthétase et se stabilise ensuite sous forme de thromboxane B₂. La PGH₂ peut aussi être convertie en PGI₂ (prostacycline) via la prostacycline synthétase et stabilisé sous forme de 6-kéto-PGF_{1α}.

La 5-lipoxigénase transforme l'AA en acide-5-hydroperoxyéicosatétraénoïque (5-HPETE), celui-ci est alors convertit soit en LTA₄, soit en acide 5-hydroxyéicosatétraénoïque (5-HETE) suite à sa réduction. Le LTA₄ instable conduit aux

LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄. La lipoxygénase peut également produire des dérivés tels que le 15-HPETE et le 12-HPETE qui seront convertis par la suite en 15-HETE et 12-HETE.

Le lyso-PAF peut être acétylé en 1-*O*-alkyl-2-acétyl-*sn*-glycéro-3 phosphocholine, encore appelé PAF (Platelet-Activating Factor); celui-ci qui joue également un rôle dans les processus inflammatoires.

Les rôles joués par les PGs dans le processus inflammatoire sont évidents. Des différents produits de la cyclooxygénase, la PGE₂ et la PGI₂ sont les plus importants. Ces produits sont tous deux fortement vasodilatateurs et sont des agents hyperalgésiques. Ils contribueraient à l'oedème et à la sensation de douleur qui sont caractéristiques de la réponse inflammatoire.

Des LTs, le LTB₄ est l'un des meilleurs candidats dans la médiation de l'inflammation : c'est une des substances leucotactiques les plus actives et sa présence sur les lieux de l'inflammation pourrait représenter un mécanisme de contrôle local dans l'accumulation des leucocytes (pour une revue, voir Brain et Williams, 1990).

L'équilibre entre les voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase est un phénomène probablement très important pour la cellule. Une connaissance précise des enzymes contrôlant ces deux voies métaboliques devrait conduire à l'éclaircissement des mécanismes impliqués lors de l'inflammation (Craстès de Paulet, 1983). Mais c'est à la PLA₂, enzyme située en amont de la cascade arachidonique, que nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce travail.

3.2. LA PHOSPHOLIPASE A₂

Les phospholipases représentent une large et abondante classe d'enzymes dans les systèmes biologiques.

L'existence de la PLA₂ est connue depuis longtemps mais c'est seulement durant ces dernières années que l'on a découvert son importance dans les processus biologiques (Béréziat *et al.*, 1990).

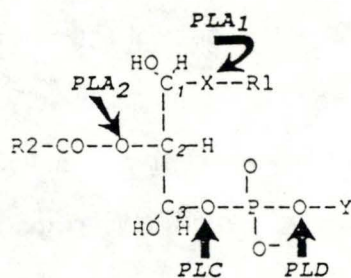


Fig. 1. Phospholipases and the locations of the ester bonds they hydrolyse. PLA₁, PLA₂, PLC and PLD: phospholipases A₁, A₂, C and D. X -O-CO- in acyl species, -O-CH=CH- in alkenyl species, -O- in alkyl species. Y: Choline, ethanolamine, serine, glycerol, inositol, and inositol mono- and diphosphate.

FIG. I-7 : Localisation des différentes phospholipases en fonction de la liaison ester qu'elles hydrolysent (d'après Béréziat *et al.*, 1990).

3.2.1. Caractéristiques

Les phospholipases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des phospholipides des membranes. Elles sont classées en accord avec le lien ester qu'elles hydrolysent dans le phospholipide (Fig. 1-7). Ainsi la phospholipase A₂ catalyse l'hydrolyse de la liaison 2-acyl ester (Gonzalez-Buritica *et al.*, 1989). La PLA₂ se retrouve dans presque toutes les cellules étudiées, de même que dans les bactéries et les protozoaires.

Il existe plusieurs PLA₂ qui se distinguent par leur sensibilité au pH et au calcium, leur spécificité vis-à-vis du substrat, leur localisation cellulaire et leur régulation par différents effecteurs (calmoduline, lipocortines,...).

On classe généralement les PLA₂ en deux types (Johnson *et al.*, 1990) :

- Les PLA₂ de type I : il s'agit principalement de la PLA₂ présente en grandes quantités dans les sécrétions pancréatiques mais on trouve des PLA₂ fort semblables dans d'autres tissus, tels que le poumon, l'estomac, le rein, ... Les fonctions des PLA₂ de type I dans ces tissus ne sont pas encore bien établies. Toutes les PLA₂ pancréatiques contiennent 14 résidus cystéines et sont fortement conservées dans le règne animal. L'enzymologie et la biochimie des PLA₂ ont été principalement étudiées sur les PLA₂ pancréatiques. Les PLA₂ de venin de cobra font également partie de cette catégorie.

- Les PLA₂ de type II, encore appelées PLA₂ non pancréatiques : elles se localisent soit dans le compartiment cellulaire cytosolique en association avec la membrane plasmique, soit dans des organelles telles que les granules de sécrétion ou les lysosomes. On les trouve dans plusieurs types cellulaires (plaquettes, cellules synoviales, chondrocytes, PMNs,...) mais également dans certains liquides tels le liquide synovial, les exsudats péritonéaux ou le fluide ascitique. Leurs séquences en acides aminés sont fort semblables, si pas identiques pour une même espèce animale et conservées dans le règne animal. Les PLA₂ de venin des crotalidés feraient également partie de ce groupe. Une PLA₂ humaine de type II a été récemment clonée et séquencée à partir du liquide synovial (Kramer *et al.*, 1990). D'après ces auteurs, on retrouve des caractéristiques propres à toutes les PLA₂ séquencées jusqu'à présent, telles que la présence de résidus His, Asp et Tyr au niveau du site actif, un segment

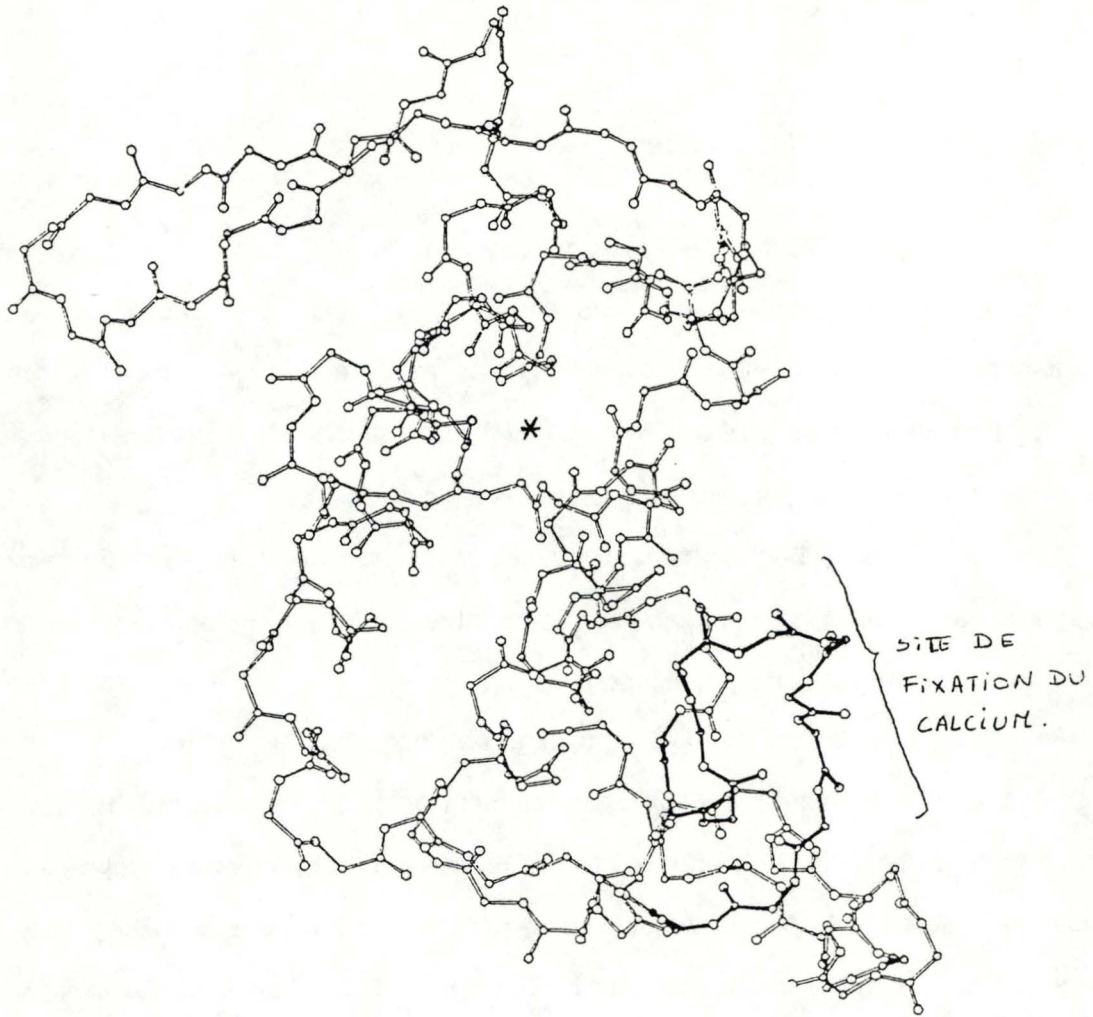


FIG. I-8 : Modèle de structure tridimensionnelle de PLA₂ non pancréatique, basé sur la structure de PLA₂ de type II de *Crotalus atrox*. Les sites actifs (*) et de liaison au calcium sont indiqués (d'après Béréziat *et al.*, 1990).

en hélice α amino-terminal riche en acides aminés lipophiles et la séquence correspondant au site de liaison du calcium riche en glycines. Mais elle présente un pattern de cystéines, caractéristique des PLA₂ de type II.

Vu les homologues entre toutes les PLA₂ et sur base de la structure tridimensionnelle connue pour la PLA₂ pancréatique, différents modèles de structure tridimensionnelle ont pu être établis pour les PLA₂ non pancréatiques. Un de ces modèles est donné à la Fig 1-8. (Béréziat *et al.*, 1990).

Dans ce travail, nous nous intéresserons à la PLA₂ non pancréatique, associée à la membrane plasmique, dans des cellules mésenchymateuses.

3.2.2. Inhibiteurs de la PLA₂

Un bon nombre d'agents sont reconnus actuellement comme inhibant les PLA₂, ils représentent une grande diversité de structure.

On classe souvent ces agents selon la façon dont ils interagissent avec l'enzyme : agents affectant l'interface enzyme-substrat, agents modulant le taux de calcium, anti-inflammatoires non stéroïdiens, produits naturels,... (Chang *et al.*, 1989; Marshall et Chang, 1990). Parmi ces inhibiteurs, on distingue le bromure de para-phényl bien qu'il ne soit pas spécifique, le manoalide inhibant l'hydrolyse de la phosphocholine mais pas de la phosphatidyléthanolamine, l'acide aristolochique qui aurait également une activité anti-transacylase (Rosenthal *et al.*, 1989)...

Aucun de ces composés n'est entièrement satisfaisant et de nouveaux inhibiteurs spécifiques seraient sans aucun doute utiles tant pour une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'enzyme que pour un meilleur contrôle pharmacologique de la PLA₂ in vitro et in vivo (Béréziat *et al.*, 1990; Marshall et Chang, 1990).

Signalons également l'existence de protéines endogènes capables d'inhiber ou de réguler l'activité de la PLA₂, telles les lipocortines (pour une revue, voir Kaiser *et al.*, 1990). Leur mécanisme d'action n'est pas encore tout à fait élucidé. Les lipocortines

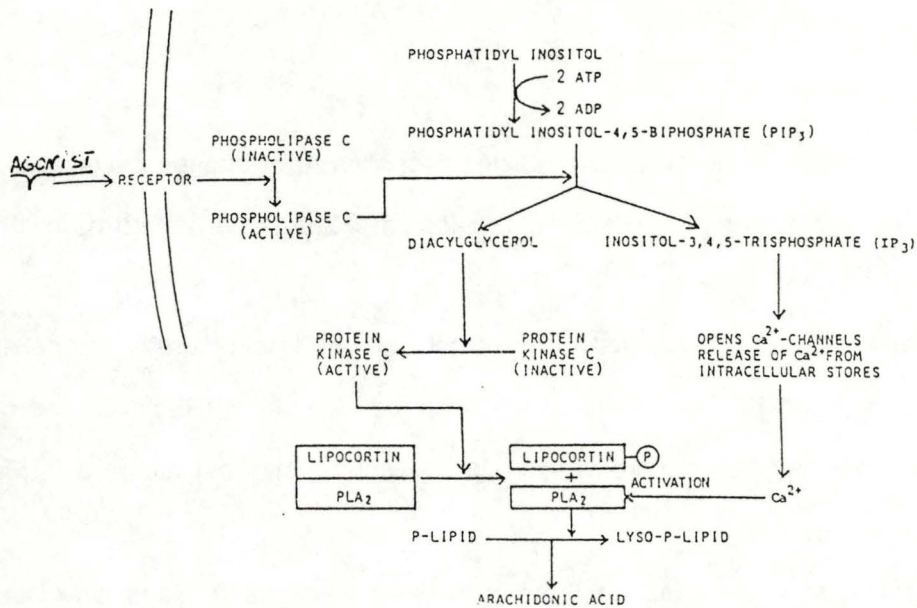


FIG. I-9 : Mécanismes proposés pour la régulation de la PLA₂ : la phospholipase C activée libère le diacylgcérol et l'IP₃. Le diacylgcérol active la protéine kinase C qui phosphoryle la lipocortine au niveau du complexe lipocortine-PLA₂. Cette phosphorylation libère la PLA₂ qui devient active en présence de calcium. Celui-ci est libéré par l'IP₃ à partir des stocks intracellulaires. La PLA₂ peut ensuite agir sur les phospholipides et les hydrolyser en composés lyso-phospholipides et en acide arachidonique (d'après Kaiser *et al.*, 1990).

pourraient entrer en compétition avec les phospholipides membranaires ou les réorganiser, perturbant ainsi la PLA₂ (Béréziat *et al.*, 1990). La phosphorylation des lipocortines par la PKC a également été invoquée (Fig. I-9) : la lipocortine formerait avec la PLA₂, en association avec d'autres constituants de la membrane plasmique, un complexe lipoprotéique inactif; la phosphorylation de la lipocortine par la PKC libérerait l'enzyme qui, en présence de calcium, deviendrait alors active et capable d'interférer avec les phospholipides membranaires.

Les acides gras insaturés pourraient également jouer un rôle dans les processus d'inhibition naturelle de la PLA₂. Ceci fut démontré sur différents types cellulaires tels que les plaquettes, des lignées de macrophages et dans les PMN (pour une revue, voir Béréziat *et al.*, 1990).

3.2.3. Importance physiologique de la PLA₂

Les PLA₂ non-pancréatiques jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques. Sécrétées, elles dégradent les phospholipides, remplissant une fonction digestive ou anti-microbienne. Cytosoliques, elles jouent un rôle actif dans le métabolisme des lipides cellulaires, qu'il s'agisse de la biosynthèse de phospholipides particuliers (par exemple, le lyso-PAF) ou de la dégradation des phospholipides peroxydés. Enfin, en libérant l'acide arachidonique, les PLA₂ cytosoliques contribuent à la synthèse d'une série de médiateurs lipidiques qui en dérivent, tels les PGs et LTs; ceux-ci jouent un rôle important dans les réponses inflammatoires (pour une revue, voir Kramer *et al.*, 1990). Mais les PLA₂ cytosoliques contribuent aussi à des phénomènes aussi diversifiés que la libération d'insuline stimulée par le glucose, la photoréception au niveau de la rétine, la mobilité spermatique et les phénomènes de fertilisation (Kaiser *et al.*, 1990).

Vu l'importance des PLA₂ dans les fonctions normales des cellules et de l'organisme, elles sont probablement également impliquées dans certaines pathologies, telles la polyarthrite rhumatoïde, certains désordres cardiaques, pulmonaires et nerveux,... (pour une revue, voir Kaiser *et al.*, 1990).

Afin de mieux entrevoir les implications de la PLA₂ dans certains processus inflammatoires, nous avons choisi deux modèles cellulaires in vitro : les cellules synoviales et les fibroblastes de poumon en culture.

4. MODELES IN VITRO

Au cours de ce travail, nous avons envisagé une étude comparative des cellules synoviales et des fibroblastes de poumon. Comme nous l'avons vu avant, la PLA₂ semble jouer un rôle non négligeable dans les mécanismes d'activation cellulaire. D'autre part, l'IL-1 est un activateur important des cellules mésenchymateuses telles que les cellules synoviales et les fibroblastes, et qui comme nous l'avons vu plus haut, agit sur la cascade de l'acide arachidonique.

Les cellules synoviales humaines sont étudiées au laboratoire depuis quelques années, dans le cadre d'un modèle in vitro d'activation par l'IL-1. Différents aspects de l'activation par l'IL-1 ont déjà été abordés tels que la production de PGs, la production de certaines enzymes protéolytiques ou de radicaux libres, la prolifération cellulaire,... L'étude de ces différents aspects de l'activation de l'IL-1 devrait nous permettre dans des expériences futures de préciser si les mécanismes de transduction de l'IL-1 sont toujours les mêmes, quel que soit l'aspect de l'activation considéré.

Comme ce modèle d'activation des cellules synoviales est déjà bien décrit, nous avons voulu le confronter à un second modèle cellulaire. Notre choix s'est fixé sur une souche de fibroblastes de poumon très prolifique et disponible à des générations en culture réduites (générations 10-11), alors qu'elle peut aller au-delà de 80 générations en culture. En outre, contrairement aux cellules synoviales, l'activation des fibroblastes par l'IL-1 est beaucoup moins connue, en particulier en ce qui concerne la cascade arachidonique.

A plus long terme, l'étude de ces deux modèles d'activation cellulaire devrait permettre de mieux comprendre le rôle que jouent ces cellules dans certaines pathologies inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde affectant les articulations (Krane,

1986; Bunning *et al.*, 1986; Heino, 1986) et les problèmes de fibrose et inflammation dans le poumon (Elias *et al.*, 1990).

5. OBJECTIF

L'objectif de ce mémoire est de comparer les effets de l'IL1 sur les cellules synoviales et les fibroblastes de poumon en ce qui concerne la cascade de l'acide arachidonique et plus particulièrement l'enzyme située en amont de cette cascade, la PLA₂.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude quantitative permettant d'étudier la vitesse et l'ampleur de la réponse à l'IL1 pour ces deux types cellulaires. Dans ce but, les cellules ont été incubées en présence d'acide arachidonique radioactif; nous avons suivi au cours du temps la libération de radioactivité dans le surnageant des cellules.

Dans un second temps, par une analyse qualitative, nous avons essayé d'identifier les métabolites dérivés de l'acide arachidonique et d'évaluer leur importance, après stimulation des cellules par l'IL1.

Enfin, dans le but de mieux préciser l'importance relative de la PLA₂ par rapport aux autres enzymes de la cascade de l'acide arachidonique, il semblait indispensable de doser la PLA₂ directement sur les cellules. Nous avons donc essayé de mettre au point ce dosage.

L'aspect comparatif de ce travail constitue une approche originale. En effet, la mise en évidence de différences entre les deux types cellulaires devrait nous permettre à plus long terme, par des manipulations pharmacologiques des cellules, de mieux comprendre les étapes de la cascade arachidonique et leur régulation, dans différents types cellulaires.

II. MATERIELS ET METHODES

1. CULTURE DES CELLULES

1.1. CULTURE DES CELLULES SYNOVIALES

1.1.1. Matériels

- HBSS+AB : solution saline de Hanks (sans calcium et Mg) contenant de la pénicilline (200 U/ml), de la streptomycine (200 µg/ml) et de la fungizone (5 µg/ml). Ces antibiotiques proviennent de chez Gibco (Grande-Bretagne);

- Trypsine : solution stérile de trypsine à une concentration de 0,25 % dans une solution TRIS (Gibco, Grande-Bretagne)

- Collagénase bactérienne : Collagénase extraite de *Clostridium histolyticum* (C-6885, Sigma Chemical Co, USA) préparée à une concentration de 0,1 % dans de l'OPTI-MEM;

- OPTI-MEM : milieu minimum essentiel de Eagle (MEM), tamponné avec de l'HEPES et du bicarbonate de sodium (2,4 g/l) et enrichi en divers facteurs de croissance et oligo-éléments (Gibco, Grande-Bretagne). Avant son utilisation, le milieu est fraîchement enrichi de pyruvate (1 mM final), de L-glutamine (2 mM final) et de mercapto-éthanol (50 µM final). Le pyruvate et le mercapto-éthanol ont des propriétés anti-oxydantes.

- OPTI+SB : milieu OPTI-MEM stérile additionné de 10 % de sérum de veau foetal (Flow, Grande-Bretagne);

- BME+SB 10 % : milieu basal de Eagle (Gibco, Grande-Bretagne) additionné de 10 % de sérum de veau foetal;

- Trypsine+EDTA : solution stérile contenant 0,05 % de trypsine et 0,02 % d' EDTA dans une solution saline de Puck modifié (GIBCO, Grande-Bretagne)

- OPTI+DMSO 10 % : Diméthylsulfoxyde (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué à une concentration de 10 % dans de l'OPTI-MEM. Le DMSO a pour rôle d'empêcher la formation de trop gros cristaux d'eau dans les cellules lors de la congélation.

Les solutions de trypsine+EDTA, collagénase, antibiotiques et le sérum de veau foetal sont conservés à -20°C et tous les autres milieux à 4°C. Ils sont réchauffés à 37°C avant chaque utilisation.

1.1.2. Mise en culture des cellules synoviales

Lors d'une intervention chirurgicale, des fragments de membrane synoviale sont prélevés et directement placés dans un flacon stérile contenant de l' HBSS+AB. La mise en culture se réalise dans les deux à quatre heures qui suivent et requiert l'emploi d'un matériel stérile et d'une hotte à flux laminaire. Elle s'inspire de la méthode décrite par Dayer *et al.* (1976)

Après avoir effectué trois rinçages dans de l'HBSS+AB, les prélèvements sont découpés en morceaux les plus petits possibles puis placés à 37°C dans 3 ml de trypsine 0,25 % durant 30 à 40 minutes. Ensuite, on ajoute 10 ml de collagénase bactérienne pendant 4 à 6 heures à 37°C. Quand la digestion est terminée, les cellules sont prélevées et filtrées sur des filtres Nylax respectivement de 100 et 68 μm afin d'éliminer les agrégats cellulaires. Elles sont mises en présence de sérum de veau foetal qui va inhiber les enzymes digestives. Elles sont ensuite centrifugées durant 20 minutes à 1200 RPM (Centrifugeuse International, Beckman) et le culot est resuspendu dans de l'OPTI+SB. Les cellules sont placées dans des boîtes de culture de sorte que l'on obtienne une densité d'environ 40 000 cellules par cm^2

1.1.3. Repiquage des cellules synoviales

Lorsque les cellules arrivent à confluence, on procède à un repiquage en deux ou en quatre, c'est-à-dire que les cellules de la boîte mère sont respectivement réparties en deux boîtes filles avec une densité finale d'environ 20 000 cellules par cm^2 ou en quatre boîtes filles avec une densité d'environ 10 000 cellules par cm^2 .

Pour le repiquage, les cellules sont rincées avec du BME, ce qui permet d'éliminer les traces de sérum, celui-ci contenant des inhibiteurs de protéases. Ensuite, les cellules sont

trypsinisées pendant deux à quatre minutes avec 2 ml de trypsine+EDTA, l'EDTA chélate les ions calcium et accélère ainsi la trypsinisation. Puis, on décante la trypsine et on place les cellules à 37°C pour terminer leur détachement du support. On ajoute alors du BME+SB (le sérum permettant l'inhibition de la trypsine) et on resuspend les cellules à l'aide d'une pipette Pasteur. La suspension cellulaire recueillie est centrifugée à 1000 RPM durant 15 minutes (Hettich Universal, Tuttlingen, RFA) et le culot obtenu resuspendu dans de l' OPTI + SB 10 %. Les cellules sont alors transférées dans des boîtes de culture (Cel-Cult, Sterilin, Grande-Bretagne) et on ajoute du CO₂ pour ajuster le pH. Après quelques jours, il est utile de renouveler le milieu afin d'empêcher toute carence en éléments nutritifs.

1.1.4. Congélation et décongélation des cellules synoviales

1.1.4.1. Congélation.

Pour la congélation, les étapes de rinçage et de trypsinisation sont exactement les mêmes que pour le repiquage. Cependant, après la centrifugation, on resuspend le culot dans 0,4 ml d'OPTI+SB 40 %. Juste avant la congélation on ajoute 0,4 ml d'OPTI + DMSO 10 % aux cellules. Les cellules sont alors placées dans un régulateur de température où est insufflé de l'azote liquide sous pression. La descente de température se réalise progressivement (diminution d'un degré toutes les minutes) de sorte que tous les composants cellulaires restent intacts. Dès que les cellules ont atteints -100°C, elles sont stockées dans un réservoir d' azote liquide à -196°C.

1.1.4.2. Décongélation

Les cellules congelées sont plongées dans un bain à 40°C. Les cellules sont centrifugées(15 minutes à 1000 RPM, Hettich Universal), le culot est resuspendu dans de l'OPTI+SB 10% et la suspension cellulaire est transférée dans des boîtes de la culture.

1.2. CULTURE DES FIBROBLASTES PULMONAIRES

1.2.1. Matériels

Les fibroblastes de poumon proviennent d'explants de poumon, d'un foetus femelle (avortement thérapeutique) de 15 semaines. Ils sont fournis par le NIA Aging Cell Repository (Corriell Institute for Medical Research, N J, USA) à la dixième génération en culture

Pour le repiquage et la congélation des fibroblastes pulmonaires, on utilise le même matériel que pour les cellules synoviales sauf pour l'étape de trypsinisation où on utilise une solution de trypsine 0,25 % ne contenant pas d'EDTA (Gibco, Grande-Bretagne).

Nous avons également utilisé les fibroblastes de poumon foetal humain WI-38 pour mettre au point le test de cytotoxicité au MTT. Ces cellules proviennent de l'American Type Culture Collection (Rockville, U.S.A.) et sont cultivées comme décrit par Hayflick et Moorhead (1961).

1.2.2. Repiquage des fibroblastes pulmonaires

Les cellules confluentes sont repiquées en 2 ou 4 de la même façon que pour les cellules synoviales. Cependant, la densité cellulaire pour des cultures confluentes est de loin supérieure à celle des cellules synoviales. Il en va de même pour la densité cellulaire au moment des repiquages : lors d'un repiquage en deux, les cellules sont réparties de manière à obtenir environ 60 000 cellules par cm^2 , pour un repiquage en quatre, elle sera d'environ 30 000 cellules par cm^2 .

Les étapes de repiquage sont les mêmes que pour les cellules synoviales mais sans passer par l'étape de centrifugation étant donné l'absence d'EDTA dans la trypsine.

1.2.3. Congélation et décongélation des fibroblastes pulmonaires

Les deux étapes de rinçage et de trypsinisation sont semblables à celles du repiquage. Quant à la congélation et la décongélation proprement dites, on procède de la même façon que pour les cellules synoviales comme décrit au point 1.1.4., mais la concentration finale en DMSO est de 10%, comme pour les autres souches de fibroblastes cultivées au laboratoire.

1.2.4. Clonage des fibroblastes pulmonaires

Pour les expériences de clonage, les cellules sont repiquées comme décrit plus haut dans des boîtes multipuits à 6 cupules de 9,6 cm² chacune (Cel-Cult, Sterilin, Grande-Bretagne) à raison de 100 cellules par cupule. Le milieu de culture utilisé est l'OPTI+HLA 0.2 % (2 ml/cupule).

Le lendemain, nous décantons le milieu et nous ajoutons à chaque cupule soit 2 ml de BME+SB 10 %, soit 2 ml d'OPTI+SB10 %.

Après 10 jours de culture, les cellules sont fixées avec 200 µl de glutaraldéhyde 10 % puis colorées avec 1ml de cristal violet 0,1 % selon la méthode décrite au point 2.2.

2. COURBES DE CROISSANCE PAR QUANTIFICATION DES CELLULES : METHODE AU CRISTAL VIOLET

2.1. MATERIELS

- PBS : tampon phosphate 10 mM contenant du NaCl 0,9 % et à PH 7,4 ;
- Glutaraldéhyde 10 %: solution de glutaraldéhyde 50 % (Fluka Chemika-Biochemika, Buchs, Suisse) diluée 5 fois dans du PBS;
- Acide borique 200 mM : acide borique (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué dans de l'eau distillée et à PH 9;

- Cristal violet : cristal violet (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué à une concentration de 0,1 % dans l'acide borique 200 mM;
- Acide acétique 10 % : Acide acétique (Janssen Chimica, Belgique) dilué dans de l'eau distillée;
- OPTI + SB 10%;
- BME + SB 10 %.

2.2. METHODE

La quantification des cellules au cours du temps permet d'établir des courbes de croissance. Nous avons choisi pour quantifier les cellules, la méthode de KUENG *et al.* (1989) qui colore les cellules in situ après fixation à la glutaraldéhyde. Les cellules sont repiquées dans des plaques de 96 puits (Cel-Cult, Stérilin, Grand-Bretagne) à raison de 3 000 cellules par cupules dans 200 μ l d'OPTI+HLA 0,2 %. Le lendemain, nous décantons le milieu et nous ajoutons à chaque cupule 200 μ l d'OPTIMEM ou de BME additionnés de SB à la concentration voulue (10, 15 ou 20 %).

Après différents temps d'incubation, on fixe les cellules avec 20 μ l de glutaraldéhyde 10 % puis, après 30 minutes, on rince 3 fois la plaque avec de l'eau désionisée et on procède à la coloration des cellules par addition de 100 μ l de cristal violet. Après une légère agitation sur le plateau tournant durant 20 minutes, la plaque est lavée extensivement avec de l'eau désionisée puis séchée. Le colorant est resuspendu dans 100 μ l d'acide acétique 10 %. On lit l'absorbance à une longueur d'onde de 595 nm sur un lecteur multiplaque (Microplate reader, model 3550, BIO-RAD, Belgique).

3. TEST DE CYTOTOXICITE AU MTT

La méthode utilisée est celle décrite par Mosmann (1983) et elle permet de quantifier la toxicité de certaines molécules mises en présence de cellules en culture.

3.1. MATERIELS

- OPTI+HLA 0,2% : milieu de culture OPTI-MEM contenant 0,2% d'hydrolysate de lactalbumine (Gibco, Grande-Bretagne);

- Actinomycine D : on dilue dans l'eau désionisée la solution aqueuse de 100 μ M (0,5 mg/1 ml)(A 4262, Sigma Chemical CO., St. Louis, USA) de manière à obtenir une solution stock de 100 μ M (à 125 mg/ml). Celle-ci est conservée à 4°C.

- Molécules à tester : les molécules testées sont dans ce cas la nitrofurantoïne (N-7878, Sigma Chemical CO., St. Louis, USA) et l'acide aristolochique (A-5512, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). La nitrofurantoïne est d'abord diluée dans du diméthylformamide (DMF) (distillé sur ninhydrine), puis dans dans le milieu de culture. L'acide aristolochique est dilué dans un premier temps dans l'éthanol, puis dans le milieu de culture. Les concentrations maximales en DMF n'excèdent pas 0,15 M et n'affectent pas la viabilité cellulaire. Pour le test de cytotoxicité, nitrofurantoïne et acide aristolochique sont diluées dans l'OPTI+HLA 0,2% à une concentration deux fois supérieure à la concentration souhaitée;

- PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9 % et à pH 7,2;

- Colorant : MTT ou bromure de 3,(4,5-diméthyl-thiazoyl-2-yl) 2,5 diphényltétrazolium (M-2128, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) préparé en à une concentration de 5 mg/ml de PBS;

- Isopropanol acidifié : on dilue 300 fois de l'HCl concentré 12 N (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans l'isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne).

3.2. METHODE

Les cellules sont repiquées selon la méthode décrite aux points 1.1.3. et 1.2.2. dans de l'OPTI+HLA 0,2 % à raison de 200 000 à 300 000 cellules/ml. La suspension cellulaire est répartie à raison de 100 μ l par cupule (plaque 96 puits, Cel-Cult, Sterilin, Grande-Bretagne). On prévoit également des puits "contrôles" qui contiennent de l'OPTI+HLA 0,2 % durant tout le test et des puits "blancs" qui contiennent uniquement de l'OPTI+HLA 0,2 %,

sans cellules. Pour chaque échantillon, on réalise des quintuples et l'effet cytotoxique d'un agent peut éventuellement être distingué de l'effet inhibiteur sur la croissance en utilisant de l'actinomycine D qui inhibe la prolifération cellulaire. Les cellules sont alors cultivées dans de l'OPTI + HLA 0,2 % + actinomycine D (0,5 mg/ml).

Le lendemain, nous ajoutons 100 µl de la molécule à tester (deux fois concentrée) aux 100 µl de milieu déjà présents et 100 µl d'OPTI+HLA 0,2 % seul aux puits "blancs" et puits "contrôles"; cela permet d'éviter une perte de cellules suite à des rinçages successifs. Les cellules sont alors incubées 12 à 24 heures à 37°C puis on ajoute 20 µl de la solution de colorant MTT à chaque puits et on réincube les cellules 4 heures à 37°C. Durant ces 4 heures, les cellules métaboliquement actives vont incorporer et réduire le MTT (coloration jaune) en son dérivé formazan (cristaux de coloration mauve), insoluble en milieu aqueux. Une corrélation directe pourra ainsi être établie entre la viabilité cellulaire et la quantité de MTT réduit.

Après ces 4 heures d'incubation, on décante délicatement le surnageant pour enlever toute trace de colorant non réduit et on ajoute à chaque puits, 50 µl d'isopropanol-HCl afin de resolubiliser le colorant. La solubilisation est achevée par agitation sur un plateau tournant et une agitation au vortex. L'absorbance est lue à 595 nm sur le lecteur multi-plaque et le pourcentage de cytotoxicité est calculé par l'équation suivante :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = 1 - \frac{\text{D.O des cellules traitées} - \text{DO des "blancs"}}{\text{D.O des cellules "contrôles"} - \text{DO des "blancs"}} \times 100$$

4. TEST DE LIBERATION D'ACIDE ARACHIDONIQUE RADIOACTIF PREALABLEMENT INCORPORE PAR LES CELLULES

Le test de libération de l'acide arachidonique radioactif (AA*) préalablement incorporé permet une analyse quantitative indirecte de la stimulation de la phospholipase A₂ (PLA₂) des cellules par une molécule activatrice. Ce test peut être complété par une analyse à la fois quantitative et qualitative des dérivés de l'AA* formés via une chromatographie sur couche mince (voir point 5.).

4.1. MATERIELS

- OPTI+HLA 0,2 %;
- AA*: acide arachidonique tritié (NET-2982, activité spécifique : 180 Ci/mmol, NEN research products, Boston, USA); l'AA* est dissous dans 2,5 ml d'éthanol, ce qui correspondent à 0,25 mCi/ml;
- IL-1 β : interleukine-1 β recombinante humaine (Janssen Biochimica, Turhnout, Belgique) diluée dans de l'OPTI + SAB 1% (sérum albumine bovine, A-7030, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.), à raison de 1 unité par μ l, filtrée et stockée à -70°C;
- acide aristolochique (A-5512, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- Aqua-Luma : liquide scintillant (Lumac, Pays-Bas).

4.2. TEST DE LIBERATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE EN MICROPUIITS

La méthode utilisée est celle décrite par Godfrey *et al.* (1987). Les cellules sont trypsinisés et resuspendues dans un volume connu d'OPTI+HLA 0,2 % à raison de 150 000 cellules/ml. On ajoute à cette suspension cellulaire l'AA* à raison de 2,5 μ l/ml de suspension (soit 0,25 μ Ci/ml). On répartit les cellules (30 000 par puits) dans des

plaques à 96 puits (Cel-Cult, Sterilin, Grande-Bretagne) à raison de 200 µl par puits et on les laisse incorporer l'AA* durant 18 heures à 37°C.

Suite à cette incorporation, nous prélevons délicatement le milieu et effectuons un comptage pour estimer la quantité d'AA* non incorporé. Ensuite, les cupules sont rincées deux fois avec 200 µl d'OPTI+ HLA 0,2 % nous ajoutons alors les différents médiateurs aux concentrations voulues à raison de 200 µl par puits; dans les cupules "contrôles", nous n'ajoutons que de l'OPTI+HLA 0,2 %. Les molécules à tester sont ici l'IL-1β (20U/ml), l'acide aristolochique (10⁻⁵, 5 10⁻⁵ ou 10⁻⁴ M) ou une combinaison de ces deux molécules.

Afin d'estimer la quantité d'AA* incorporé par les cellules au temps zéro, on traite 2 cupules avec 100 µl de NaOH 0,5 N. Après 30 minutes à 37°C, celui-ci est neutralisé avec 100 µl de HCl 0,5 N, puis on prélève le tout auquel on ajoute 5 ml d'Aqua-Luma. Après 3, 6 et 24 heures d'incubation, on prélève 100 µl de surnageant dans chaque cupule sur lesquels on effectue un comptage après addition de 5 ml d'Aqua-Luma. Le pourcentage de relarguage est alors estimé par la formule suivante :

$$\text{Radioactivité (R*) relarguée (\%)} = \frac{\text{R* relarguée au temps t}}{\text{R* incorporée au temps 0}} \times 100$$

On peut également calculer un pourcentage de radioactivité relarguée par rapport au contrôle :

$$\text{Radioactivité (R*) relarguée (\%)} = \frac{\text{R* du test au temps t}}{\text{R* du contrôle au temps t}} \times 100$$

4.3. TEST DE LIBERATION D'ACIDE ARACHIDONIQUE EN MACROPUITS

Lorsqu'on réalise une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince des dérivés de l'AA* libérés suite à l'activation de la PLA₂, on peut également réaliser une analyse quantitative via le test de libération d'AA*. Pour réaliser ces deux étapes simultanément, les cellules sont trypsinisées, resuspendues à raison de 100 000

cellules/ml dans de l'OPTI+HLA 0,2 % additionné d'AA* (2,5 µl/ml) et cultivées dans des cupules de 2 cm² à raison de 1 ml de suspension/cupule. On les laisse alors incorporer l'AA* durant 18 heures à 37 °C.

L'incubation terminée, nous prélevons 100 µl du milieu de culture sur lesquels nous réalisons un comptage pour estimer la quantité d'AA* non incorporé. Après avoir rincé deux fois chaque cupule avec 1 ml d'OPTI+HLA 0,2 %, nous ajoutons 1 ml de médiateur à la concentration voulue; nous prévoyons deux cupules contrôles contenant de l'OPTI+HLA 0,2 % seul. On traite également deux cupules avec 500 µl de NaOH 0,5 N afin d'estimer la quantité de radioactivité incorporée par les cellules. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, on y ajoute 500 µl de HCl 0,5 N pour neutraliser puis on met à compter avec 4 ml d'Aqua-Luma.

Après 3, 6 et 24 heures d'incubation à 37°C, on prélève délicatement le surnageant dans lequel l'AA* et ses métabolites ont été peu à peu relargués. De ce volume on prélève 100 µl que l'on met à compter avec 5 ml d'Aqua-Luma. Ce comptage permet l'analyse **quantitative** : le pourcentage de relarguage est estimé grâce aux formules déjà décrites au point 4.2. Les 900 µl restant seront traités par la suite pour l'analyse **qualitative**, comme décrit au point 5.

5. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE OU TLC (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY)

5.1. MATERIELS

- Minicolonne d'extraction (C₂, Amersham, Belgique);
- Plaque de silice : (Silica gel 60, Merck, Darmstadt, Allemagne);
- PGE₂ (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) : solution stock de 1 mg/ml d'éthanol;
- 6-Kéto-PGF_{1α} (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) : solution stock de 0,5 mg/ml d'éthanol;
- PGF_{2α} (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) : solution stock de 1 mg/ml d'éthanol;

- 5-HETE (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) : solution stock de 80 mg/ml d'éthanol;
- LTB₄ : solution stock de 0,1 mg/ml de méthanol (fourni par Dr. J. Rokach, Merck Frosst, Canada);
- 12-HETE tritié (NET-712, activité spécifique de 178 Ci/mmol, NEN Products, Boston, USA);
- AA : solution stock d'acide arachidonique 33 mM dans du chloroforme (Janssen Chimica, Belgique)
- Aqua-Luma : liquide scintillant (LUMAC, Pays-Bas)
- Les différents autres produits utilisés sont de grade analytique et proviennent de chez Merck (Darmstadt, Allemagne) ou de chez Janssen Chimica (Belgique).

5.2. EXTRACTION DES DERIVES DE L'AA*

On extrait d'abord les dérivés de l'AA* à partir des 900 µl de surnageant obtenus au point précédent (4.3.). Pour réaliser cette extraction, on utilise des colonnes C₂ de type hydrophobe. Celles-ci sont fixées sur un appareil relié à une pompe à vide permettant l'aspiration plus rapide des différents liquides déposés et sont conditionnées successivement avec 2,5 ml de méthanol et 2,5 ml d'eau désionisée. Les surnageants, préalablement acidifiés avec 0,25 µl d'HCl 1N sont alors déposés sur les colonnes et on laisse les dérivés de l'AA* présents dans le surnageant s'adsorber lentement. Ensuite, on rince successivement les colonnes avec 5 ml d'eau, 5 ml d'éthanol 10 % et 5 ml d'hexane en veillant à ce qu'elles ne sèchent pas. On élue alors lentement les dérivés de l'AA* à l'aide de 5 ml de méthyl formiate, on évapore sous azote et on resuspend les échantillons dans 100 µl de CHCl₃/MeOH (3/1, V/V). Les échantillons sont éventuellement congelés à -70°C

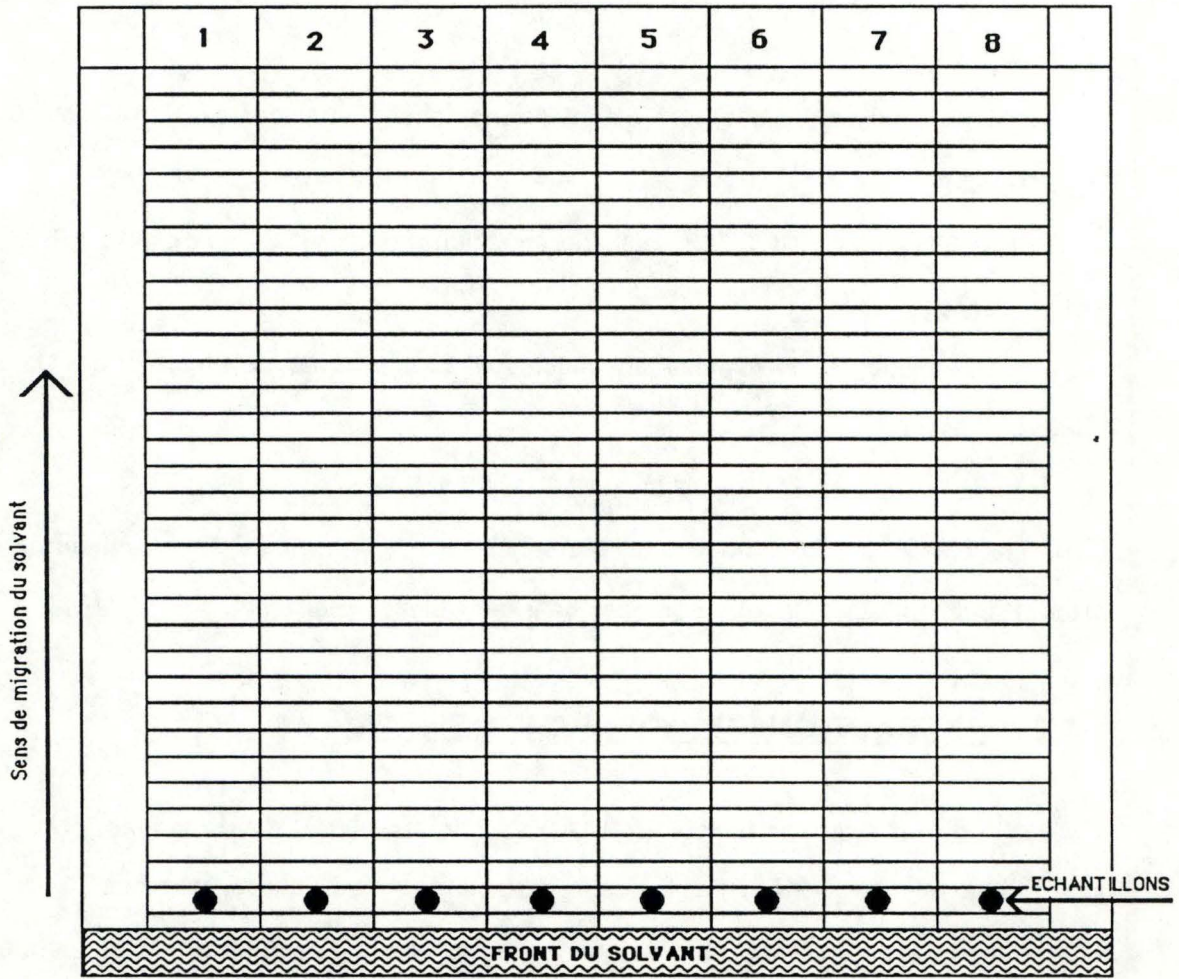


FIG. II-1 : Représentation d'une plaque de silice où sont représentés l'emplacement des échantillons et le sens de migration du solvant. Chaque échantillon va migrer selon son hydrophobicité.

5.3. CHROMATOGRAPHIE PROPREMENT DITE

Le principe de cette chromatographie est basé sur l'hydrophobicité des molécules : un solvant hydrophobe progresse sur une plaque de silice et entraîne les molécules plus ou moins loin selon leur degré d'hydrophobicité. La plaque de silice servant de support à la migration des molécules est divisée en 8 colonnes de 2 cm de large et 16 cm de haut, elles-mêmes divisées en 32 rectangles (Fig.II-1) Chaque échantillon est déposé à la base d'une colonne. Le solvant est composé d'acétate d'éthyle, d'isooctane, d'acide acétique et d'eau (11/5/2/10, V/V); après agitation, il se partage en une phase aqueuse et une phase organique. Cette dernière est récupérée et déposée dans une cuve de verre (voir schéma ci-dessous).

La plaque de silice est alors placée verticalement dans ce même récipient en veillant bien à ce que le solvant se trouve à au moins 0,5 cm en dessous de la ligne de dépôt des échantillons. Dès que la migration du solvant est terminée, on place la plaque sous une hotte et on laisse évaporer. Chaque rectangle est gratté et placé dans une fiole contenant 5 ml d'Aqua-Luma que l'on met à compter.

Les valeurs obtenues permettent de tracer un profil général de la migration. Afin de déterminer à quelle molécule correspondent les divers pics du profil, on prévoit des standards. Ceux-ci sont déposés de la même façon sur la plaque de silice à raison de :

- 10 μ l de PGE₂;
- 10 μ l de PGF₂ α ;
- 2 μ l d'AA;
- 32,3 μ l de 5-HETE;
- 50 μ l de LTB₄;
- 2 μ l de 12-HETE.

Après la migration des standards et l'évaporation du solvant, on révèle l'endroit de la migration des différents standards par une coloration à l'iode durant environ 2 heures.

6. DOSAGE DE LA PHOSPHOLIPASE A₂

Le dosage de la PLA₂ a été mis au point par la combinaison des méthodes décrites par Katsumata *et al.* (1986), Clarck *et al.* (1986) et Gilman *et al.* (1990)..

6.1. MATERIELS

- PBS;
- Tampon C : tampon glycine 0,2 M additionné de CaCl₂ 2 mM, de Sérum Albumine Bovine ou SAB à une concentration de 0,1 mg/ml (A-4503, Sigma Chemical Co., St Louis, USA) et à pH 9,0;
- Tampon de réaction D : Tampon glycine 0,1 M contenant du CaCl₂ 1 mM et à pH 9,0;
- Tampon de neutralisation N : tampon glycine 0,4 M contenant de CaCl₂ 4 mM et à pH 9,0;
- Solution de Triton X100 : Triton dilué dans de l'eau distillée à une concentration de 5 % et additionné d'EDTA 200 mM;
- Solution d'hexane acidifié : hexane contenant de l'acide acétique à 0,1 %;
- Substrat froid : L-3-Phosphatidylcholine, dipalmitoyl (P-6267, Sigma Chemical Co, St Louis, USA) est dissous dans un mélange éthanol/toluène (1:1, V/V) à une concentration de 1 mM et se conserve à - 20°C;
- Substrat radioactif : L-3-Phosphatidylcholine,1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]- palmitoyl (FA, 601, 10 µCi/400 µl d'éthanol/toluène (1:1, V/V), Amersham, Belgique);
- Solution de substrat pour le dosage de la PLA₂ : pour 10 tests, on évapore 500 µl de substrat froid sous azote puis, on le resolubilise dans un même volume d'éthanol 80 % contenant du déoxycholate 25 mM. On ajoute à ce volume 10 µl de substrat radioactif préalablement évaporé sous azote. La solution est donc à une concentration de 1 mM en L-3-Phosphatidylcholine, dipalmitoyl, avec une radioactivité de 0,5 µCi/ml;
- PLA₂ purifiée de *Naja mocambique mocambique* (P-7778, 1450 U/ml, Sigma Chemical Co. USA) : elle est diluée dans du tampon C de façon à obtenir une concentration

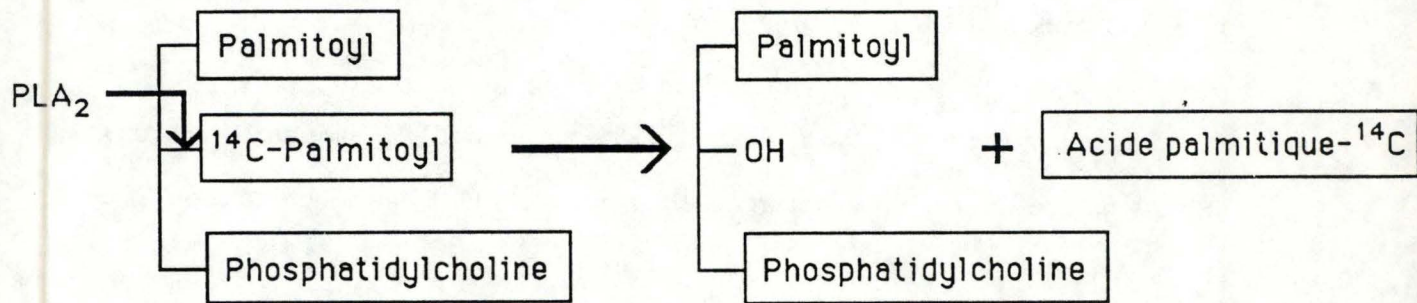


FIG. II-2 : Représentation schématique de l'hydrolyse de la L-3-phosphatidylcholine,1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]palmitoyl.

finale de 0,02 U/ml (soit 0,001 U/50 μ l). Selon Sigma, l'unité correspond à l'hydrolyse de 1 μ mole de phospholipide par minute à pH 8.9, 25 °C et en utilisant la L- α -phosphatidylcholine de soja;

- Quinacrine (22,299-2, Janssen Chimica, Belgique) : la solution stock est préparée dans de l'eau bidistillée à une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M

- EDTA (8418, Merck, Allemagne) : la solution stock est diluée dans l'eau.

- Aqua-Luma (Lumac, Pays-Bas);

- Les autres réactifs sont de grade analytique et proviennent des firmes Merck (Darmstadt, Allemagne) et Janssen Chimica (Belgique).

6.2. DOSAGE DE LA PLA₂ PURIFIEE

Le principe de la réaction est représenté dans la figure II.2 : le substrat phospholipidique, la phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]palmitoyl est hydrolysée par la PLA₂ et devient un lysophospholipide, après libération de l'acide palmitique.

L'activité de la PLA₂ sera donc estimée, en quantifiant l'acide palmitique radioactif libéré. Cette quantification suppose que l'acide palmitique soit séparé du substrat radioactif. Nous avons choisi la méthode de Katsumata *et al.* (1986) qui fait appel à une simple extraction dans l'hexane, en présence de triton.

Pratiquement, l'enzyme purifiée est diluée dans le tampon C et le mélange réactionnel réalisé comme indiqué dans la table II-1. Dans les tubes "blancs", l'enzyme est remplacée par le tampon C. La réaction est démarrée par l'addition de substrat. Après différents temps d'incubation (2.5, 5, 7.5, 10, 15 et 20 minutes), elle est arrêtée par l'addition du triton 5% + EDTA 200 μ M.

L'acide palmitique libéré à partir du substrat, est alors extrait par l'addition de 0,3 g de Na₂SO₄ et de 6 ml d'hexane acétifié. Ensuite, chaque tube est vortexé durant 15 secondes, ce qui permet l'obtention de 2 phases : une phase aqueuse contenant le substrat non hydrolysé et une phase organique dans laquelle se trouve l'acide palmitique radioactif (Fig. II-3).

	SOLUTIONS	TESTS	BLANCS
1	Enzyme diluée dans le Tp C	50 μ l	- - -
2	TpC	- - -	50 μ l
3	Tp D	400 μ l	400 μ l
4	Solution de substrat radioactive (1 mM)	50 μ l	50 μ l
		INCUBER à 37 °C	
5	Triton 5 % + EDTA 200 mM	100 μ l	100 μ l

Table II-1 : Composition du mélange réactionnel pour le dosage de la PLA₂ purifiée.

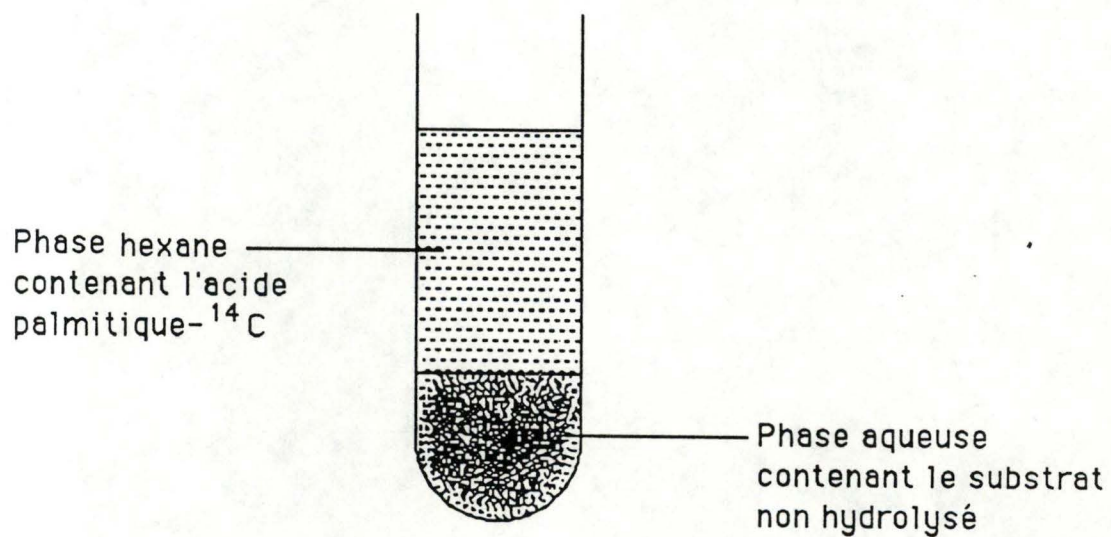


FIG. II-3. : Séparation de l'acide palmitique marqué et du substrat non hydrolysé après l'hydrolyse par la PLA2. Cette séparation se fait dans l'hexane : la phase aqueuse contient le substrat non hydrolysé et la phase hexane l'acide palmitique marqué.

L'extraction terminée, nous prélevons de chaque tube 2 fois 1 ml de la phase organique que l'on met à compter après addition de 4 ml d'Aqua-Luma. Ce comptage nous permettra de déterminer l'activité de l'enzyme.

6.3. DOSAGE DE LA PLA₂ CELLULAIRE

Tout d'abord, il est important de remarquer que dans ce travail, nous n'avons considéré que l'enzyme intracellulaire. Il existe également une PLA₂ extracellulaire libérée dans le surnageant; celle-ci n'a pas été étudiée.

D'autre part, dans un premier temps, nous avons essayé de doser la PLA₂ cellulaire en suivant le même protocole que celui utilisé pour la PLA₂ purifiée de *Naja mocambique mocambique*. N'obtenant aucune activité enzymatique, nous nous sommes référés à la littérature. D'après divers auteurs, il semble qu'une étape d'acidification en présence d'H₂SO₄ soit nécessaire avant de procéder au dosage proprement dit de la PLA₂ cellulaire, pour éliminer des inhibiteurs endogènes de la PLA₂.

6.3.1. Stimulation et récupération des cellules

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de 75 cm² selon la méthode décrite aux points 1.1.3. et 1.2.2. Lorsque les cellules sont à confluence, le milieu de culture (OPTI+SB 10 %) est remplacé par 8 ml d'OPTI + HLA 0,2 % pour les contrôles et par 8 ml d'OPTI + HLA 0,2 % contenant de l'IL-1 β à raison de 20 U/ml pour les cellules stimulées. Après 12 heures d'incubation à 37°C, nous récoltons les cellules comme suit : le surnageant est ôté, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS puis raclées dans 10 ml de PBS. La suspension obtenue est centrifugée 15 minutes à 1000 RPM (Hettich Universal, Tuttlingen, RFA) et le culot est resuspendu soit dans le tampon C (6.3.2), soit dans le H₂SO₄ (6.3.3).

	SOLUTIONS	TESTS	BLANCS
1	Extrait acide de la PLA ₂ cellulaire	25 µl	- - -
2	H ₂ SO ₄ 0.18 N	- - -	25 µl
3	Tp N	25 µl	25 µl
3	Tp D	400 µl	400 µl
4	Solution de substrat radioactive (1 mM)	50 µl	50 µl
		INCUBER à 37 °C	
5	Triton 5 % + EDTA 200 mM	100 µl	100 µl

Table II-2 : Composition du mélange réactionnel pour le dosage de la PLA₂ cellulaire, avec étape d'acidification.

6.3.2. Extraction et dosage de la PLA₂ sans étape d'acidification

Le culot de cellules est resuspendu dans 300 µl de tampon C et conservé à 4°C. La suspension cellulaire est ensuite soniquée 4 fois 15 secondes (Sonicateur MSE, Analis, Namur). Le sonicat est utilisé comme tel ou dilué au maximum 2 fois dans le tampon C. Pour doser la PLA₂ cellulaire, on prend 50 µl de sonicat et l'on complète le mélange réactionnel, comme indiqué dans la table II.1 pour l'enzyme purifiée. L'enzyme est incubée de 1 à 3 heures et la réaction est arrêtée avec le triton 5% + EDTA 200 mM.

L'extraction de l'acide palmitique libéré se fait comme décrit précédemment au paragraphe 6.2.

6.3.3. Extraction et dosage de la PLA₂ avec étape d'acidification

Pour réaliser l'étape supplémentaire d'acidification, nous avons modifié notre protocole expérimental selon la méthode de Gilman et Chang (1990).

Le culot de cellules est resuspendu dans 300 µl de H₂SO₄ 0,18 N et conservé à 4°C. La suspension cellulaire est ensuite soniquée 4 fois 15 secondes. On laisse reposer cette solution 1 heure à 4°C, laissant agir le H₂SO₄. Celui-ci aurait pour rôle, selon les données de la littérature, de permettre la floculation des inhibiteurs endogènes de PLA₂. La solution est alors centrifugée 15 minutes à la centrifugeuse de table (Janetski TH12, Bruxelles). Le surnageant contient la PLA₂ alors que le culot contient les inhibiteurs floculés. On prélève délicatement le surnageant, que l'on garde à 4°C jusqu'au moment du dosage.

Quant au dosage de la PLA₂ cellulaire, il se fait comme indiqué précédemment mais en ajoutant une étape de neutralisation nécessaire pour éviter la précipitation en milieu acide des phospholipides présents dans la solution substrat (table II-2). Après une légère agitation, la réaction est démarrée avec 50 µl de solution substrat. Les tubes sont alors incubés à 37°C durant différents temps. Les étapes suivantes c'est-à-dire l'arrêt de la

réaction et l'extraction du produit de réaction sont similaires à celles décrites au point 6.2. pour le dosage de la PLA₂ de *Naja mocambique mocambique*.

Dans les expériences où le sonicat a été traité avec de l'EDTA ou de la quinacrine, nous avons procédé comme suit : l'EDTA de même que la quinacrine sont dilués dans de l'eau bidistillée à une concentration 2,5 fois supérieure à celle finale souhaitée. Lors du dosage, 200 µl de cette solution sont ajoutés à 200 µl de tampon cellulaire. Ce volume est complété par 25 µl d'enzyme, 25 µl de tampon neutralisant et la réaction est initiée par l'ajout des 50 µl de substrat.

III. RESULTATS et DISCUSSION

Lors du processus inflammatoire, différents médiateurs sont mis en jeu, dont l'interleukine-1. Cette cytokine stimule entre autres, la cascade de l'acide arachidonique (AA). Deux enzymes sont principalement impliquées : la phospholipase A₂ (PLA₂) qui libère l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires et la cyclooxygénase, l'enzyme synthétisant les prostaglandines (PGs). Quant aux lipoxigénases, synthétisant les leucotriènes (LTs) et les acides hydroxy-éicosatétraoïques (HETEs), leur rôle reste incertain, du moins dans les cellules mésenchymateuses, telles les cellules synoviales ou les fibroblastes.

Dans ce travail, c'est sur la PLA₂ que nous nous sommes concentrés. Dans un premier temps, nous essaierons de déterminer les effets de l'IL-1 β sur l'enzyme, par une approche indirecte : après incorporation d'AA radioactif dans les cellules, nous analyserons les surnageants des cellules stimulées ou non; cette analyse sera quantitative, en mesurant la radioactivité relarguée, mais aussi qualitative, par chromatographie sur couche mince de ces surnageants. Nous testerons également un inhibiteur de la PLA₂, l'acide aristolochique. Dans un second temps, nous essaierons de mettre au point un dosage direct de la PLA₂, ce qui devrait nous permettre de mieux préciser les effets de l'IL-1 et de tester des inhibiteurs potentiels de l'enzyme.

1. MISE EN CULTURE DES CELLULES

Nous avons choisi comme modèles d'étude, les cellules synoviales déjà bien étudiées au laboratoire ainsi qu'une souche de fibroblastes pulmonaires. Cette étude comparative devrait nous permettre de souligner d'éventuelles différences entre ces deux types cellulaires et de ce fait, de mieux comprendre certains aspects de la stimulation de la cascade arachidonique par l'IL-1. En outre, l'activation in vitro de ces cellules par l'IL-1 peut apporter certaines informations sur les pathologies inflammatoires, telles que la

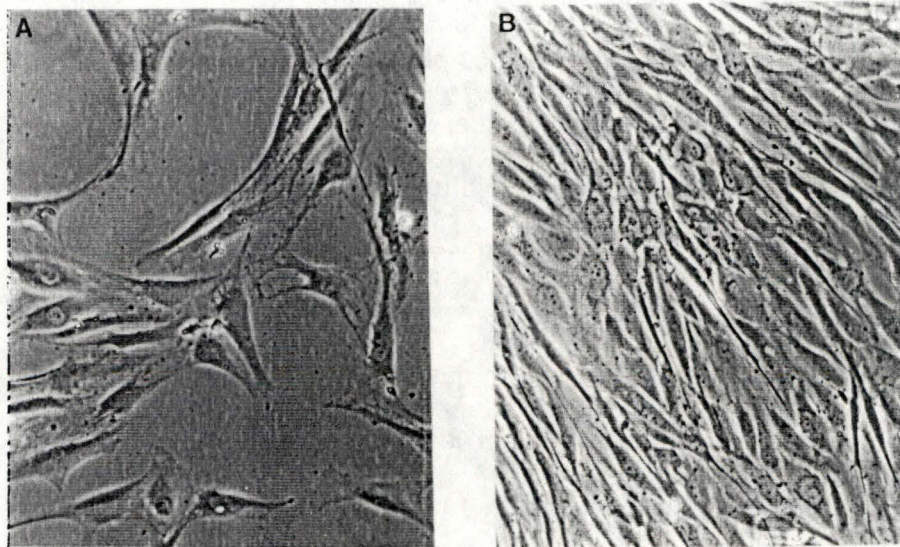


FIG. III-1 : Cellules synoviales en culture de la souche 11F70 en cinquième génération.
Monocouche de cellules non confluentes (A) et confluentes (B), 144 X.

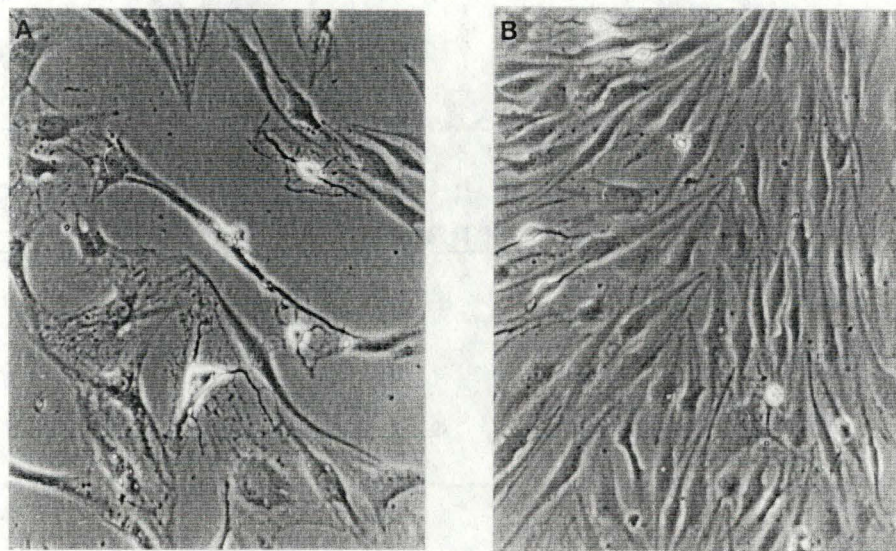


FIG. III-2 : Cellules synoviales en culture de la souche 10M47 en septième génération. Les cellules non confluentes (A) et confluentes (B) ont été traitées 12 heures avec de l'IL-1 β 20 U/ml , 144 X.

Nom de la souche	Age du donneur (années)	Sexe du donneur
11F70	70	Féminin
10M47	40	Masculin
23M58	58	Masculin

Table III-1. Caractéristiques principales des souches de cellules synoviales utilisées dans ce travail.

polyarthrite rhumatoïde au niveau des articulations ou certains désordres inflammatoires affectant le poumon.

1.1. LES CELLULES SYNOVIALES

Les cellules synoviales proviennent de fragments de membranes synoviales prélevés lors d'une intervention chirurgicale. Après digestion enzymatique, les cellules sont mises en culture. On obtient ainsi une primoculture qui se compose de deux types de cellules bien caractérisées:

- Les cellules macrophagiques ou de type A, ayant des propriétés phagocytaires (Revell, 1989). Elles ont un taux de prolifération très faible et disparaissent après quelques générations.

- Les cellules fibroblastiques ou de type B, caractérisées par une forme allongée et un réticulum endoplasmique abondant. Elles ont une capacité proliférative élevée et sont prédominantes après quelques générations (Revell, 1989).

Il existerait en outre un troisième type cellulaire, les cellules dites dendritiques. Mais d'après Hendler *et al.* (1985) et Goto *et al.* (1987), cellules dendritiques et fibroblastiques feraient partie d'une même population de cellules, qui en fonction des conditions de culture , adopteraient plutôt l'une ou l'autre forme.

Dans ce mémoire, nous avons utilisé 3 souches de cellules synoviales (Table III-1). Comme le montre le Fig. III-1, les cultures , qu'elles soient non confluentes (A) ou confluentes (B), sont principalement constituées de cellules fibroblastiques, bien qu'il apparaisse quelques cellules dendritiques. Leur nombre varie en fonction des souches. De même, après stimulation des cellules à l'IL-1 β , la proportion des cellules dendritiques tend à augmenter (Fig. III-2), ce qui est en accord avec les données de la littérature (.Goto *et al.*, 1987)

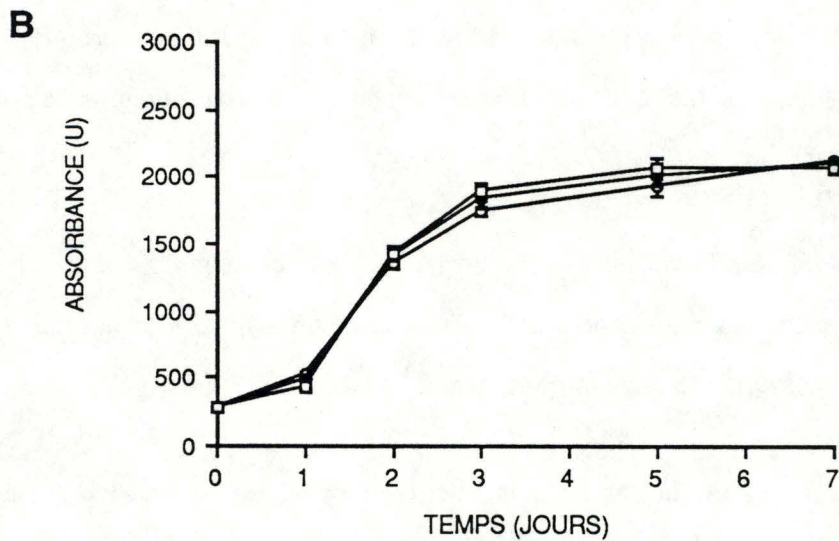
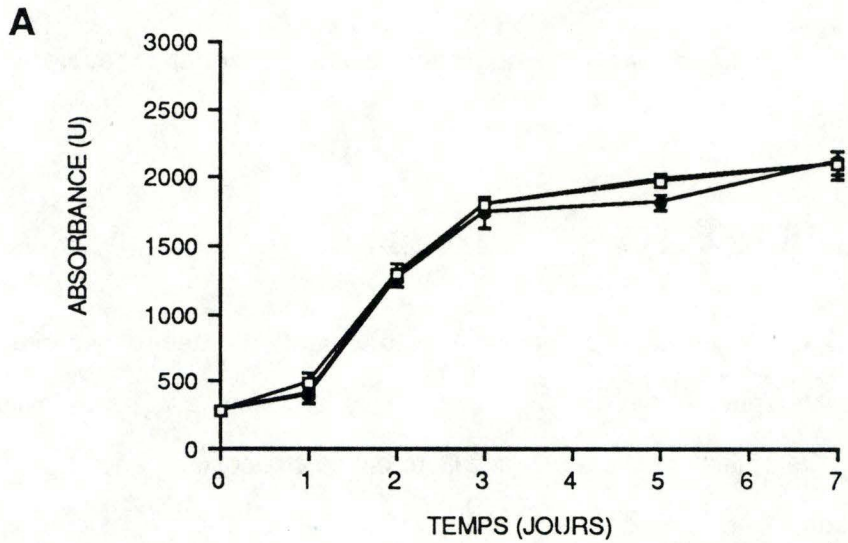


FIG. III-3 : Effet comparatif du milieu de culture sur la croissance des fibroblastes pulmonaires en dixième génération. Les cellules ont été cultivées dans du BME (A) ou de l'OPTI-MEM (B) additionnés de sérum bovin foetal 10 (O), 15 (●) ou 20 (□) %. Les cellules sont fixées et colorées comme décrit dans les Matériels et Méthodes. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance en fonction du temps. Chaque point représente la moyenne de 6 cupules \pm 1 écart-type.

1.2. LES FIBROBLASTES PULMONAIRES

Les fibroblastes pulmonaires proviennent de la NIA Aging Cell Repository (Camden, N.J., U.S.A.) et nous ont été fournis à la 11ème génération en culture. Cette souche de fibroblastes présente plusieurs avantages :

- elle se caractérise par un potentiel prolifératif in vitro très élevé qui dépasserait les 80 générations en culture;
- dès réception de ces cellules , elles ont été repiquées et plusieurs échantillons ont été congelés dans l'azote liquide; par rapport aux cellules synoviales ne se posent donc plus ni le problème d'approvisionnement, ni celui de l'hétérogénéité de souche en fonction des donneurs;
- enfin, signalons que nous disposons également d'une souche de fibroblastes de peau provenant du même foetus, bien que ces cellules n'aient pas été utilisées dans le cadre de ce travail.

Dans un premier temps, nous avons cultivé les fibroblastes de poumon dans le milieu de culture conseillé par le NIA Aging Cell Repository, soit du BME (Basal Medium of Eagle) en présence de sérum de veau foetal à 20 % (SB 20 %).

Etant donné que les cellules synoviales sont cultivées dans l'OPTI-MEM + SB 10 % et vu que nous souhaitons entreprendre un travail comparatif entre cellules synoviales et pulmonaires, nous avons voulu vérifier s'il était possible de cultiver ces dernières dans l'OPTI-MEM + SB 10 % également. Dans ce but, nous avons réalisé 2 types d' expériences :

- primo, nous avons réalisé des courbes de croissance pour les fibroblastes de poumon dans les 2 milieux de culture (BME et OPTI-MEM), et en présence de sérum de veau foetal à 10, 15 et 20 % (Fig. III-3). Si l'on compare le BME (A) et l'OPTI-MEM (B), on n'observe pas de différence significative dans la croissance cellulaire; dans les conditions de repiquage utilisées, les cellules se multiplient pour atteindre un plateau au bout de 3 à 4

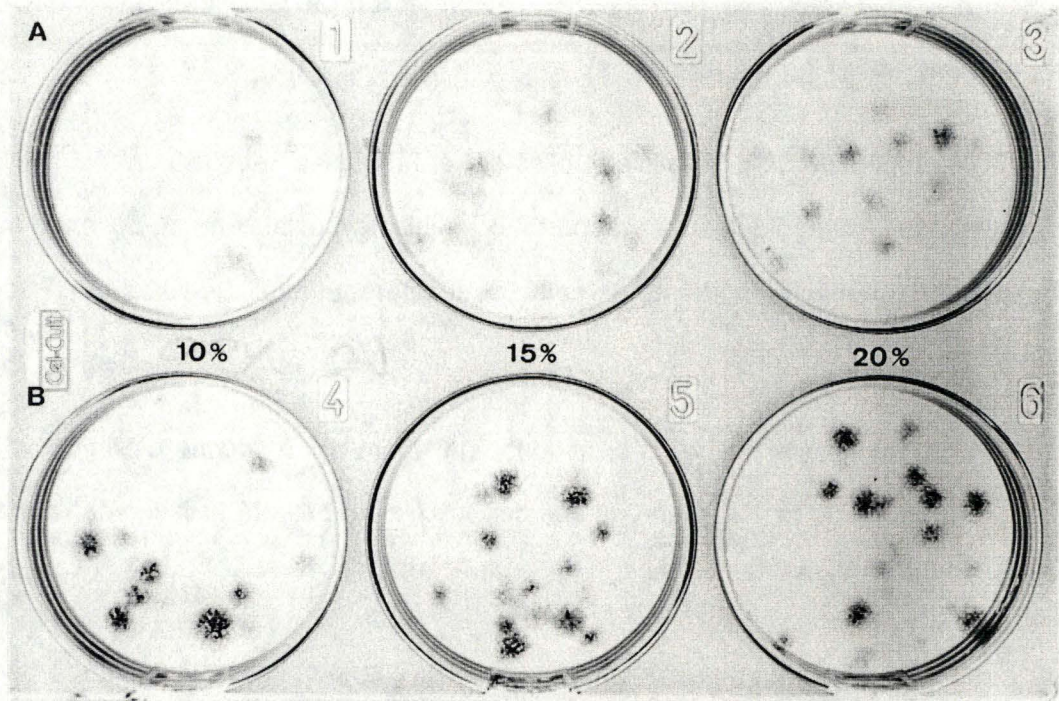


FIG. III-4 : Clones de fibroblastes pulmonaires obtenues à partir d'une culture à la treizième génération. Les clones ont été cultivés dans du BME (A) ou de l'OPTI-MEM (B). Trois concentrations de sérum bovin ont été testées (10, 15 et 20 %), 1 X.

jours et arrivent aux mêmes densités de saturation dans les 2 milieux. En outre, on n'observe pas de différence nette entre les différentes concentrations en sérum, bien qu'à 10 %, la croissance soit légèrement ralentie par rapport aux concentrations supérieures. Le nombre de cellules à confluence au 7^{ème} jour est cependant comparable pour tous les milieux et concentrations en sérum testés.

- secundo, nous avons réalisé une expérience de clonage cellulaire en utilisant les mêmes combinaisons de milieux (BME et OPTI-MEM) et de concentrations en sérum (10, 15 et 20 %). Après 10 jours, les cellules sont fixées et colorées (Fig. III-4). Le nombre et la taille des clones s'avèrent supérieurs dans l'OPTI-MEM. Ces résultats montrent que dans des conditions de croissance suboptimale et à plus long terme, l'OPTI-MEM assure une meilleure croissance des fibroblastes de poumon. Pour la suite des expériences, les cellules synoviales et pulmonaires seront donc cultivées dans l'OPTI-MEM + SB 10 %.

La Fig. III-5 révèle l'aspect des fibroblastes de poumon cultivés dans ce milieu dans des cultures non confluentes (A) et confluentes (B). Contrairement aux cellules synoviales, l'IL-1 β affecte peu leur morphologie (Fig. III-6).

2. MESURE DE LA CYTOTOXICITE CELLULAIRE

Avant d'aborder les effets de l'IL-1 β sur le métabolisme de l'acide arachidonique, nous avons mis au point au laboratoire un test de cytotoxicité. En effet, comme nous envisageons l'utilisation d'inhibiteurs de la PLA₂, tels l'acide aristolochique, il nous a semblé indispensable d'établir si cette molécule n'était pas toxique dans les deux modèles de cellules utilisés.

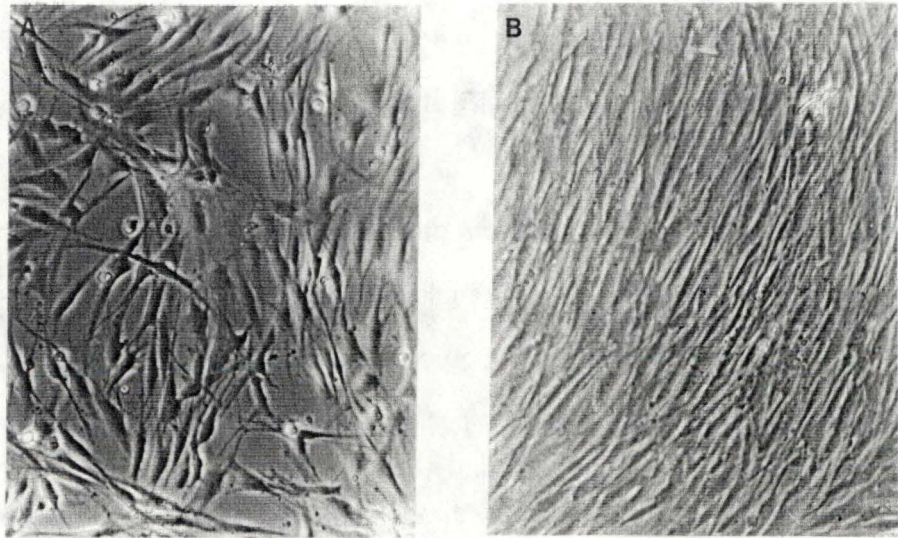


FIG. III-5 : Fibroblastes pulmonaires en dix-septième génération. Monocouche de cellules non confluentes (A) et confluentes (B), 144 X.

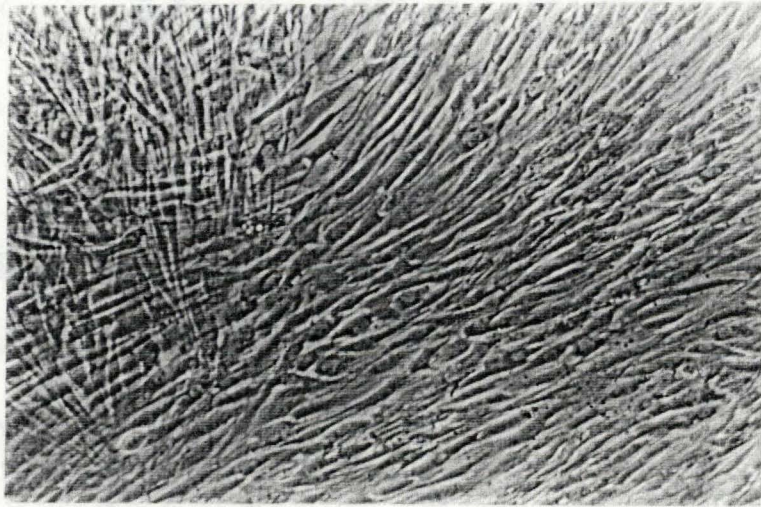


FIG. III-6 : Fibroblastes pulmonaires en vingt-deuxième génération stimulées 12 heures avec de l'IL-1 β 20 U/ml, 144 X.

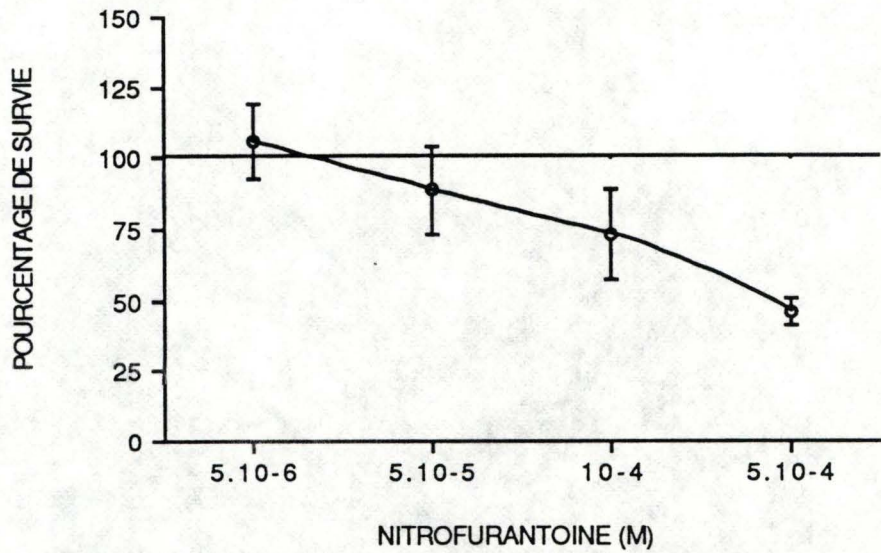


FIG. III-7 : Effet de différentes concentrations de nitrofurantoïne sur la survie des fibroblastes WI-38 en trente-huitième génération. Les cellules ont été mises en présence de la nitrofurantoïne pendant 24 heures. Les résultats représentent le pourcentage de survie en fonction de la concentration en nitrofurantoïne et le contrôle est fixé à 100% (—). Chaque point représente la moyenne de 5 cupules ± 2 écarts types.

2.1. MISE AU POINT DU TEST DE CYTOTOXICITE

Pour déterminer la cytotoxicité d'une molécule, il existe de nombreuses méthodes.

Une première approche consiste à marquer préalablement les cellules - par exemple avec du chrome 51 ou de l'adénine tritiée -, puis à traiter les cellules avec la molécule à tester, et enfin à suivre le relargage de la radioactivité dans le surnageant; au plus les cellules ont été lésées, au plus la radioactivité qui s'en échappera sera élevée (Andreoli *et al.*, 1985). Ces méthodes sont sensibles, mais elles sont coûteuses et impliquent la manipulation d'isotopes parfois dangereux.

Une seconde approche consiste à traiter les cellules avec la molécule à tester et ensuite à révéler par colorimétrie les cellules restées vivantes (Givens *et al.*; 1990) : par exemple à l'aide du Rouge neutre concentré sélectivement dans les lysosomes des cellules vivantes ou avec certains colorants de tétrazolium, tels le MTT; ce dernier est converti en cristaux de formazan insolubles et colorés, par les mitochondries des cellules vivantes. C'est cette dernière méthode développée par Mosmann (1983) que nous avons choisie.

Pour mettre au point cette méthode, nous avons utilisé un modèle de toxicité cellulaire déjà appliqué au laboratoire, la toxicité de la nitrofurantoïne sur des fibroblastes de poumon WI-38 (Michiels et Remacle, 1988). Ces cellules ont été traitées avec de la nitrofurantoïne $5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} et $5 \cdot 10^{-4}$ M. Les résultats obtenus (Fig.III-7) nous montrent que la nitrofurantoïne n'a un effet clairement toxique qu'à partir d'une concentration de 10^{-4} M où l'on a 73,1 % de survie par rapport au contrôle. Cet effet s'accroît au delà de cette concentration et le pourcentage de survie tombe à 45,8 % pour une concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M en nitrofurantoïne. Ces données sont conformes à celles de Michiels et Remacle (1988).

La Fig. III-8 montre la coloration des cellules au MTT. Les cellules-contrôles ainsi que les cellules traitées avec de la nitrofurantoïne à $5 \cdot 10^{-5}$ M sont toutes colorées; par contre en présence de nitrofurantoïne $5 \cdot 10^{-4}$ M, la morphologie des cellules est altérée et de nombreuses cellules ne sont pas colorées.

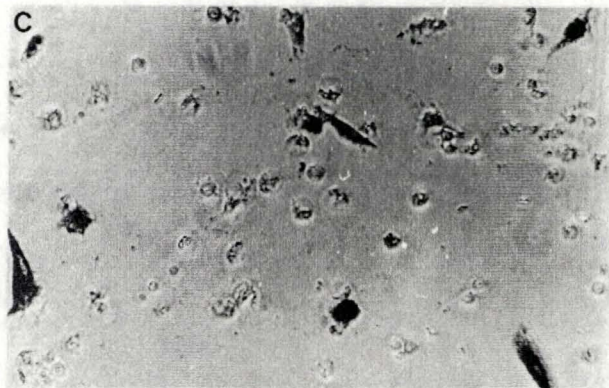


FIG. III-8 : Fibroblastes WI-38 en trente-huitième génération cultivés 24 heures en présence d'OPTI-MEM seul (contrôle) (A) ou additionné de nitrofurantoin 5 10^{-5} M (B) ou 5 10^{-4} M (C), 144 X.

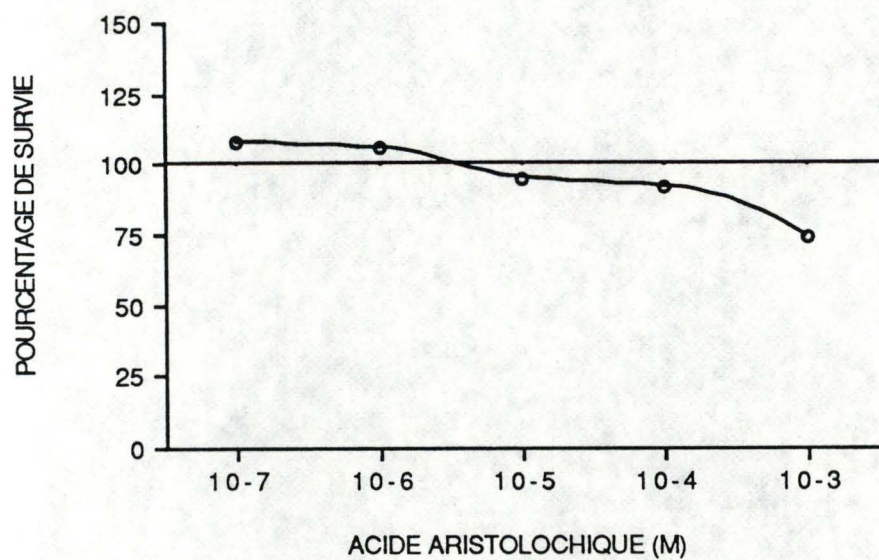


FIG. III-9 : Effet de l'acide aristolochnque à différentes concentrations sur la survie de cellules synoviales de la souche 11F70 en quatorzième génération. Les cellules ont été mises en présence de l'acide aristolochnque pendant 24 heures. Les résultats expriment le pourcentage de survie en fonction de la concentration en acide aristolochnque et le contrôle est fixé à 100 % (—). Chaque point représente la moyenne de 5 cupules.

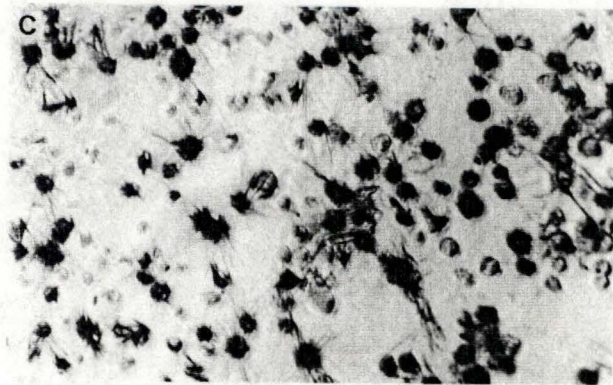
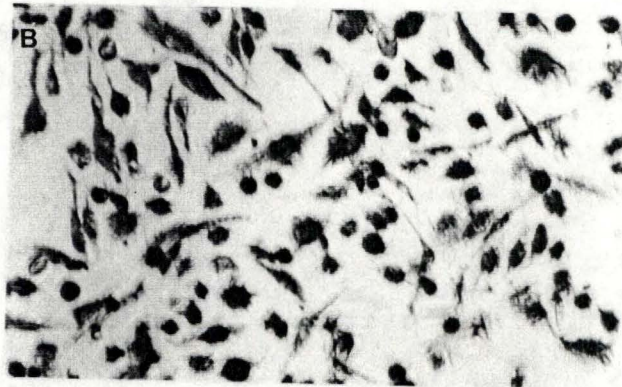
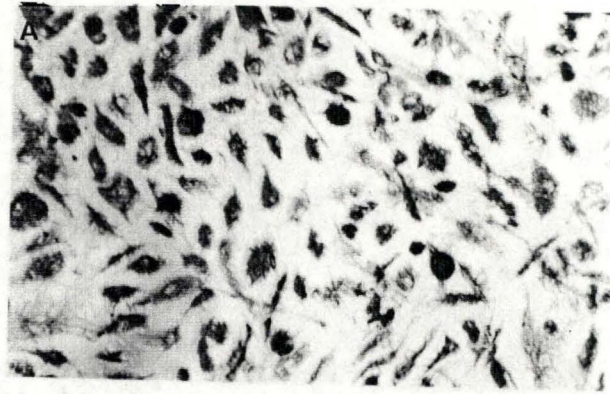


FIG. III-10 : Cellules synoviales de la souche 11F70 en seizième génération cultivées 24 heures en présence d'OPTI-MEM seul (contrôle) (A) ou additionné d'acide aristoloïque 10^{-4} M (B) ou 10^{-3} M (C), 144 X.

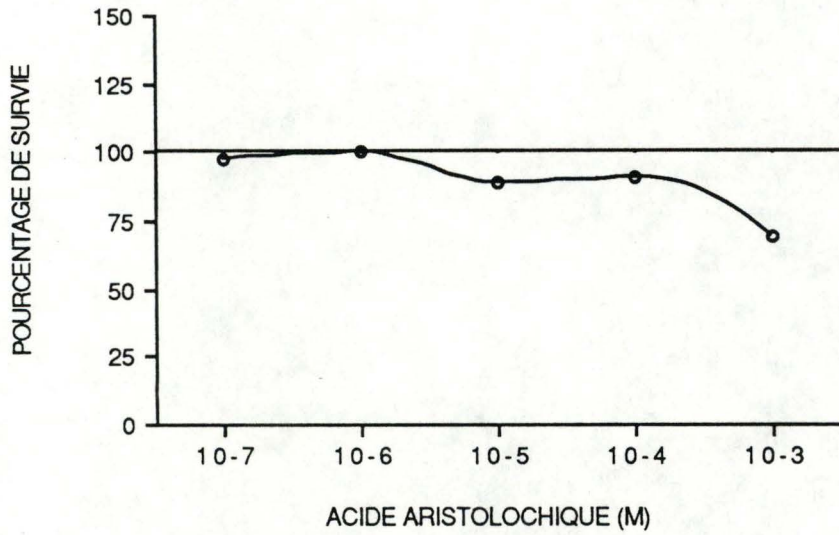


FIG. III-11 : Effet de l'acide aristolochique à différentes concentrations pendant 24 heures sur la survie de fibroblastes pulmonaires en vingt-deuxième génération. Les résultats expriment le pourcentage de survie en fonction de la concentration en acide aristolochique et le contrôle est fixé à 100 % (—). Chaque point représente la moyenne de 5 cupules.

2.2. CYTOTOXICITE DE L'ACIDE ARISTOLOCHIQUE

2.2.1. Les cellules synoviales

En prévision des tests ultérieurs, nous avons testé l'effet cytotoxique éventuel de l'acide aristoloche sur une large gamme de concentrations allant de 10^{-7} M à 10^{-3} M. Nous diluons l'acide aristoloche dans l'éthanol qui par la suite est dilué dans le milieu OPTI-MEM+HLA 0,2%. La concentration finale en éthanol n'excède pas 2% pour la concentration la plus forte en acide aristoloche et en général inférieure à 0,5 % pour les autres concentrations.

L'effet cytotoxique de l'acide aristoloche indique un effet à partir d'une concentration de 10^{-3} M avec 74 % de survie par rapport au contrôle (Fig III-9) et cet effet n'est pas dû à l'éthanol car nos contrôles en présence de 0,2, 0,5 et 2 % d'éthanol sans acide aristoloche se superposent au contrôle sans éthanol.

L'observation de cellules colorées au MTT (Fig. III-10) confirme les résultats obtenus : ce n'est que pour les cellules traitées avec de l'acide aristoloche 10^{-3} M que l'on voit clairement apparaître des cellules non colorées.

Il s'agit donc d'une molécule relativement peu toxique pour les cellules synoviales.

2.2.2. Les fibroblastes pulmonaires

Le même test a été réalisé sur les fibroblastes pulmonaires. Les résultats (Fig.III-11) montrent un pourcentage de survie maximum pour les deux concentrations les plus faibles alors que les concentrations 10^{-5} et 10^{-4} M donnent des pourcentages de survie de l'ordre de 90 %. Cependant, une concentration de 10^{-3} M en acide aristoloche conduit à 69 % de survie ; cette concentration ne sera donc pas utilisée dans les tests ultérieurs. Les fibroblastes de poumon semblent légèrement plus sensibles à l'acide aristoloche que les cellules synoviales.

3. ACTIVATION PAR L'IL-1 DU METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE : ETUDE COMPARATIVE SUR LES CELLULES SYNOVIALES ET LES FIBROBLASTES PULMONAIRES EN CULTURE

Le rôle de l'IL-1 dans les désordres immuno-inflammatoires au niveau des tissus articulaires a été largement démontré (Gilman, 1987).

Plusieurs études ont démontré que la stimulation par l'IL-1 β des cellules synoviales entraîne une forte augmentation de l'activité de la PLA₂ extracellulaire et intracellulaire (Gilman *et al*, 1990) qui s'accompagne d'une libération accrue d'acide arachidonique dans le milieu extracellulaire.

Afin de comparer l'augmentation de production de la PLA₂ sur les deux types de cellules stimulées, nous avons d'abord envisagé une approche indirecte faisant appel à 2 types de tests :

- Le premier consiste en une mesure quantitative de la radioactivité libérée par les cellules, après incorporation préalable d'AA radioactif par les cellules.

- Le second test complète le premier, par une analyse qualitative des surnageants radioactifs dans les cellules stimulées ou non. Cette analyse est réalisée grâce à une chromatographie sur couche mince..

Afin de compléter cette étude et de vérifier si la PLA₂ était bien impliquée , nous avons choisi comme outil l'acide aristolochique, inhibiteur de la PLA₂ (Rosenthal *et al.*, 1989).

3.1. ANALYSE QUANTITATIVE

Les cellules synoviales et les fibroblastes pulmonaires ont été préincubés 18 heures en présence d'AA radioactif puis stimulés avec IL-1 β (10 et 20 U/ml). On détermine ensuite après des temps croissants (3, 6, et 24 h), la radioactivité libérée dans le milieu de culture.

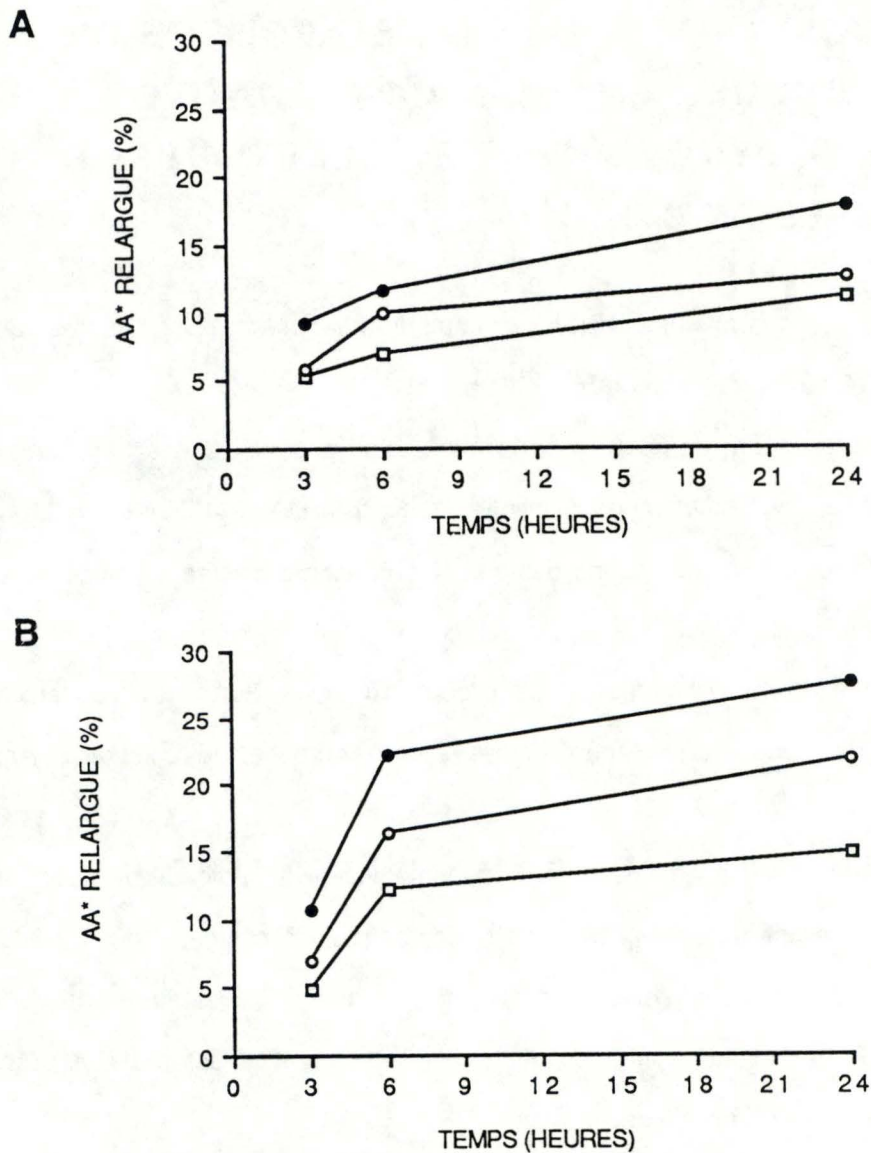


FIG. III-12 : Effet de l'IL-1 β sur la libération d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les cellules synoviales de la souche 23M58 en cinquième génération (A) et les fibroblastes pulmonaires en quinzième génération (B). Les cellules sont cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (contrôle, □) ou additionné d'IL-1 β à 10 (○) ou 20 (●) U/ml. Les résultats sont exprimés au cours du temps en pourcentage d'AA* relargué par rapport à la radioactivité incorporée par les cellules. Chaque point correspond à la moyenne de trois cupules.

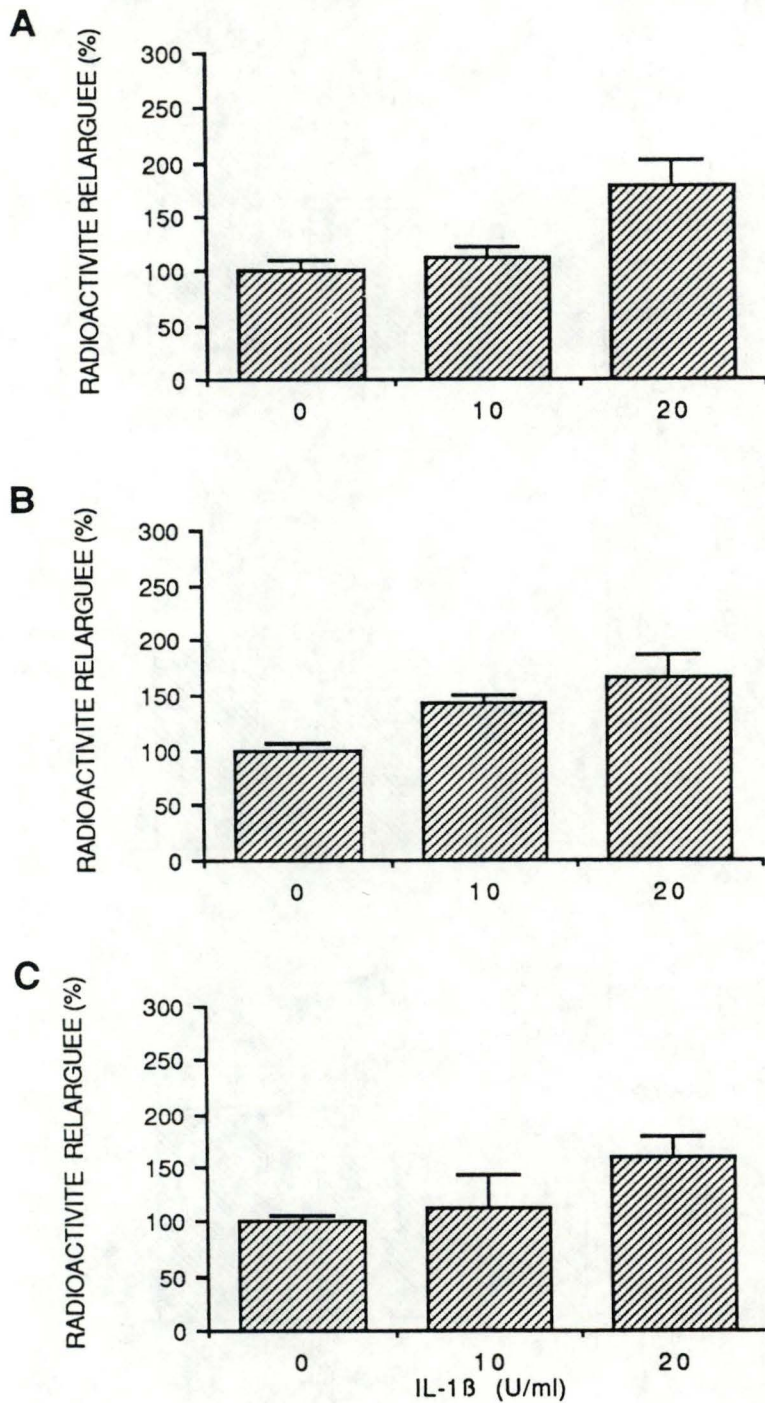


FIG. III-13 : Effet de l'IL-1 β sur la libération d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les cellules synoviales de la souche 23M58 en cinquième génération. Les cellules ont été cultivées pendant 3 (A), 6 (B) ou 24 (C) heures en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul ou additionné de 10 ou 20 U d'IL-1 β /ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée par rapport au contrôle posé comme égal à 100 %. Chaque colonne correspond à la moyenne de trois cupules \pm 1 écart-type.

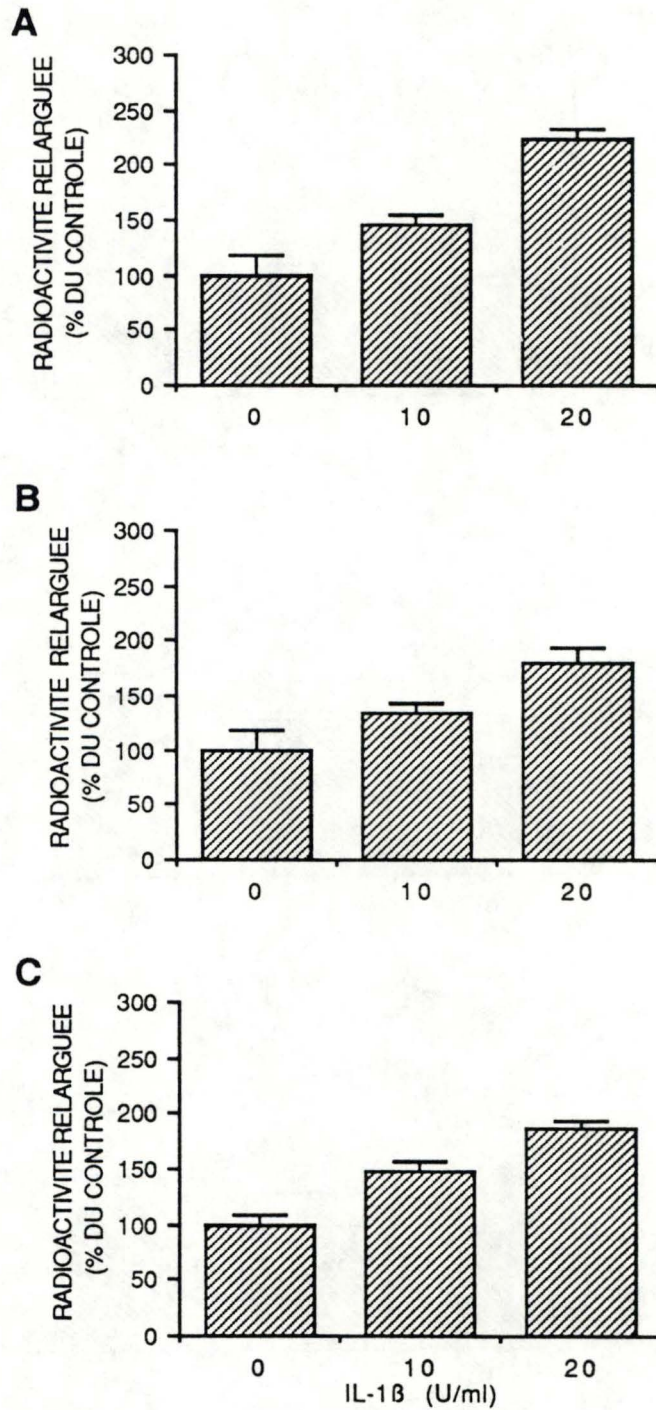


FIG. III-14 : Effet de l'IL-1 β sur la libération d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les fibroblastes pulmonaires en dix-septième génération. Les cellules ont été cultivées pendant 3 (A), 6 (B) ou 24 (C) heures en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul ou additionné de 10 ou 20 U d'IL-1 β /ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée par rapport au contrôle posé comme égal à 100 %. Chaque colonne correspond à la moyenne de trois cupules \pm 1 écart-type.

Les résultats obtenus ont été exprimés en % de radioactivité libérée par rapport à la radioactivité incorporée au temps zéro; ils montrent un effet stimulateur de l'IL-1 sur les 2 types cellulaires et cet effet est dose-dépendent (Fig. III-12). L'allure des courbes au cours du temps révèle cependant des différences entre les 2 types cellulaires. Les cellules synoviales (Fig. III-12 A) libèrent la radioactivité de manière continue sur la période de 24 heures étudiée; par contre, dans les fibroblastes de poumon (Fig. III-12 B) cette libération se déroule principalement entre 0 et 6 heures. Cette différence s'observe également en ce qui concerne le relargage spontané dans les cellules-contrôles non stimulées. Enfin, dans les fibroblastes de poumon, la réponse semble plus forte : après 24 heures de traitement à l'IL-1 β à 20 U/ml, la radioactivité libérée atteint 27 % dans les fibroblastes de poumon et 18 % dans les cellules synoviales.

Une autre manière d'exprimer les résultats est d'exprimer le % de radioactivité libérée par rapport au contrôle posé égal à 100%. Ces résultats sont donnés respectivement aux Figs. III-13 et 14 pour les cellules synoviales et les fibroblastes de poumon. Ils confirment l'effet dose-dépendant de l'IL-1 β .

En ce qui concerne les cellules synoviales, l'effet de stimulation par l'IL-1 β est maximal entre 3 et 6 h. avec un maximum de stimulation au temps 6 h pour l'IL-1 à 10 U/ml (142,5 %) et un maximum au temps 3 h pour l'IL-1 à 20 U/ml (177,7 %). A 20 U/ml, cet effet de stimulation se maintient au cours du temps et reste supérieur à 150 % après 24 heures.

Les fibroblastes pulmonaires montrent un effet de stimulation très rapide : c'est au temps 3 h que l'effet de stimulation par rapport au contrôle est le plus important; nous observons 220 % de libération par rapport au contrôle pour l'IL-1 β à 20 U/ml et 140 % pour l'IL-1 à 10 U/ml. Cet effet se maintient au cours du temps à 10 U/ml; à 20 U/ml, il tend à diminuer et passe respectivement à 183 et 186 % après 6 et 24 h.

Si l'on compare les 2 types cellulaires, on peut résumer les principales différences comme suit :

- les fibroblastes de poumon répondent plus rapidement à l'IL-1 β , sur la période 0 à 6 heures, tandis que la réponse des cellules synoviales est plus progressive au cours du

temps, ce qui est une caractéristique générale pour toutes les cellules synoviales étudiées au laboratoire (Lecomte, 1988; Burton, 1990).

- les fibroblastes pulmonaires s'avèrent également plus sensibles à l'IL-1 β , car l'effet de stimulation à 10 U/ml est nettement plus marqué que pour les cellules synoviales
- leur réponse semble également plus intense, en tout les cas par rapport à la souche de cellules synoviales étudiée dans ce cas. Mais il faut souligner que certaines souches de cellules synoviales stimulées par l'IL-1 libèrent plus de radioactivité que d'autres.

Mais le dosage que nous avons utilisé ici n'est une mesure indirecte de l'activité de la PLA₂; en outre, il ne fournit aucune information sur la nature des molécules radioactives relarguées par les cellules. Une grande partie de cette radioactivité correspond à l'AA libéré par la PLA₂, mais une partie de cet AA radioactif a été incorporé dans une série de métabolites dérivés de l'AA. C'est pour identifier ces principaux métabolites que nous avons opté pour une analyse plus qualitative, par chromatographie sur couche mince.

3.2. ANALYSE QUALITATIVE : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (TLC)

Les cellules sont repiquées, incubées 18 heures en présence d'AA radioactif et ensuite mises en présence d'IL-1 β , comme pour l'analyse quantitative. La technique de TLC étant relativement lourde, nous nous sommes limités à une seule concentration en IL-1 β . Nous avons choisi la concentration de 20 U/ml suite aux résultats obtenus au point 3.1.. Comme pour le test de libération d'AA, nous choisissons les temps de stimulation de 3, 6 et 24 heures. Pour chaque traitement (réalisé en double), les surnageants sont prélevés, extraits comme décrits dans les Matériels et Méthodes, puis chromatographiés sur couche mince. Dans cette analyse, nous pourrions donc comparer dans les 2 types cellulaires, les principaux métabolites dérivés de l'AA ainsi que leur importance relative, et ce au cours du temps. Vu la lourdeur de la technique, les premières expériences prévues sur les cellules synoviales, ont été réalisées en collaboration avec I. Knott.

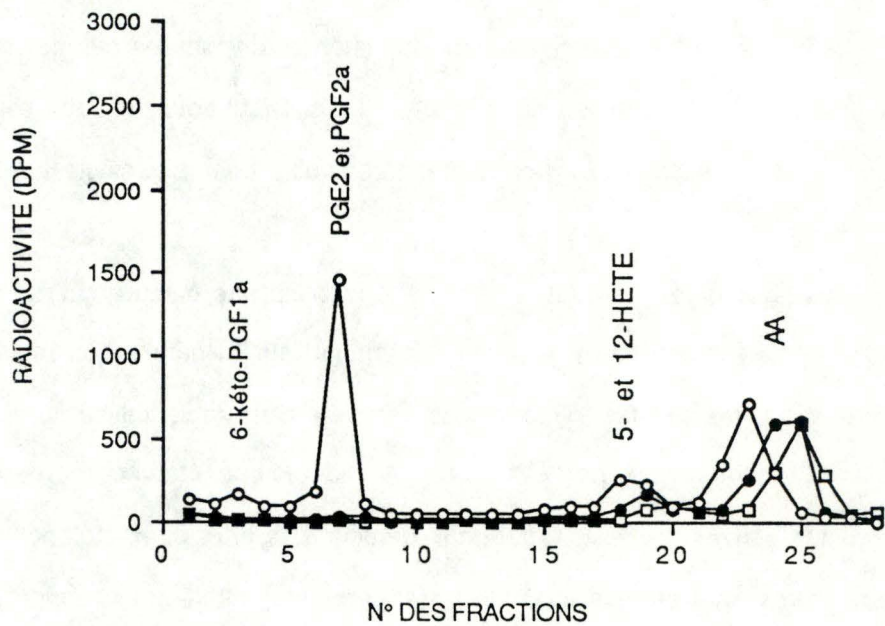


FIG. III-15 : Profils de migration après chromatographie sur couche mince d'échantillons obtenus à partir de cellules synoviales de la souche 10M47 en quatorzième génération. Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % additionné d'IL-1 β 20U/ml pendant 3 (□), 6 (●) et 24 (○) heures et les trois profils ont été superposés. Les résultats montrent la radioactivité (dpm) en fonction de la fraction. L'endroit de la migration des standards est indiqué sur la figure et chaque point représente la moyenne de deux échantillons. Le pic d'AA au temps 24 heures est légèrement décalé étant donné le fait que les échantillons 24 heures ont été déposés sur une plaque de silice différente de celle des échantillons 3 et 6 heures. La migration ne s'est pas réalisée exactement de la même façon sur les deux plaques.

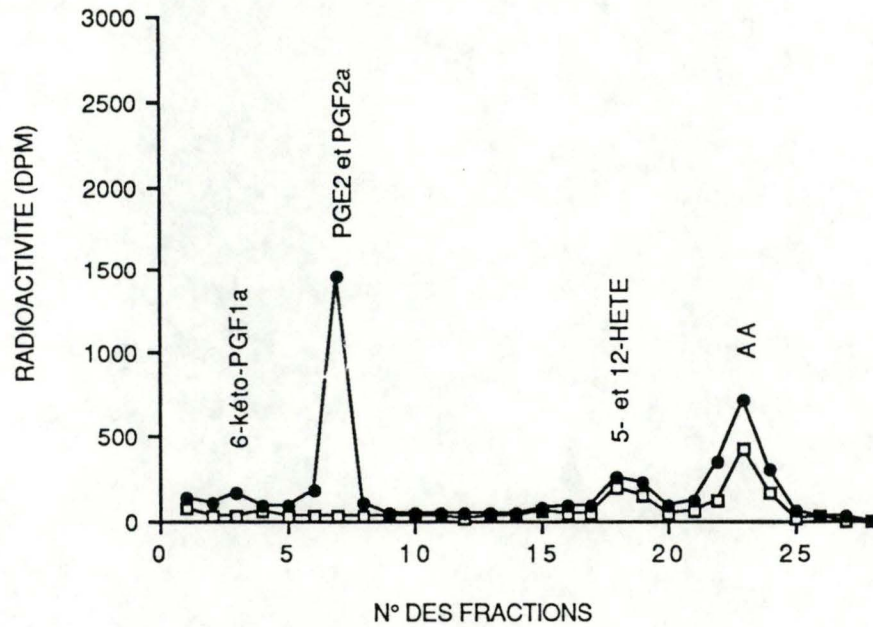


FIG. III-16 : Profil de migration après chromatographie sur couche mince d'échantillons obtenus à partir de cellules synoviales de la souche 10M47 en quatorzième génération. Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (□) ou additionné d'IL-1 β 20U/ml (●) pendant 24 heures. Les résultats montrent la radioactivité (dpm) en fonction de la fraction. L'endroit de la migration des standards est indiqué sur la figure et chaque point représente la moyenne de deux échantillons.

3.2.1. Les cellules synoviales

Les résultats obtenus révèlent qu'après 3 heures, nous avons un pic correspondant à de l'AA produit par les cellules stimulées (Fig. III-15). Les courbes correspondant aux contrôles ne sont pas représentées sur cette figure, par souci de clarté, mais elles sont toujours nettement en-deçà des cellules stimulées, comme le montre la Fig. III-16 pour le temps 24 heures.

Après 6 heures de stimulation, deux pics sont mis en évidence : le pic correspondant à l'AA et un second pic plus réduit, correspondant à du 5-HETE. L'augmentation du pic d'AA est relativement faible; on peut supposer qu'une partie de l'AA libéré a été transformé en 5-HETE, par la voie de la 5-lipoxygénase. Nous n'observons pas à ce moment de pics correspondant aux PGs ou au LTB₄.

Après 24 heures de stimulation, quatre pics sont présents : les pics d'AA et de 5-HETE qui ont encore augmenté, le pic le plus important, correspondant à la PGE₂, et enfin un petit pic de 6-kéto-PGF_{1α}. Mais comme le montre la Fig. III-16, le pic de 5-HETE, contrairement aux autres pics ne semble pas dépendre de l'action de l'IL-1β.

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Chang *et al* (1986) indiquant un décalage de minimum 6 heures entre la stimulation par l'IL-1 et le début de la production de PGE₂.

3.2.2. Fibroblastes pulmonaires

Nous avons réalisé les mêmes expériences sur les fibroblastes de poumon. Cette analyse par chromatographie sur couche mince appliquée sur les fibroblastes pulmonaires est intéressante à plusieurs égards :

- en premier lieu, il n'existe aucune donnée sur le métabolisme de l'acide arachidonique dans cette souche de cellules, en présence ou non d'IL-1; de plus, les souches de fibroblastes ont été de manière générale, peu étudiées dans ce domaine particulier;

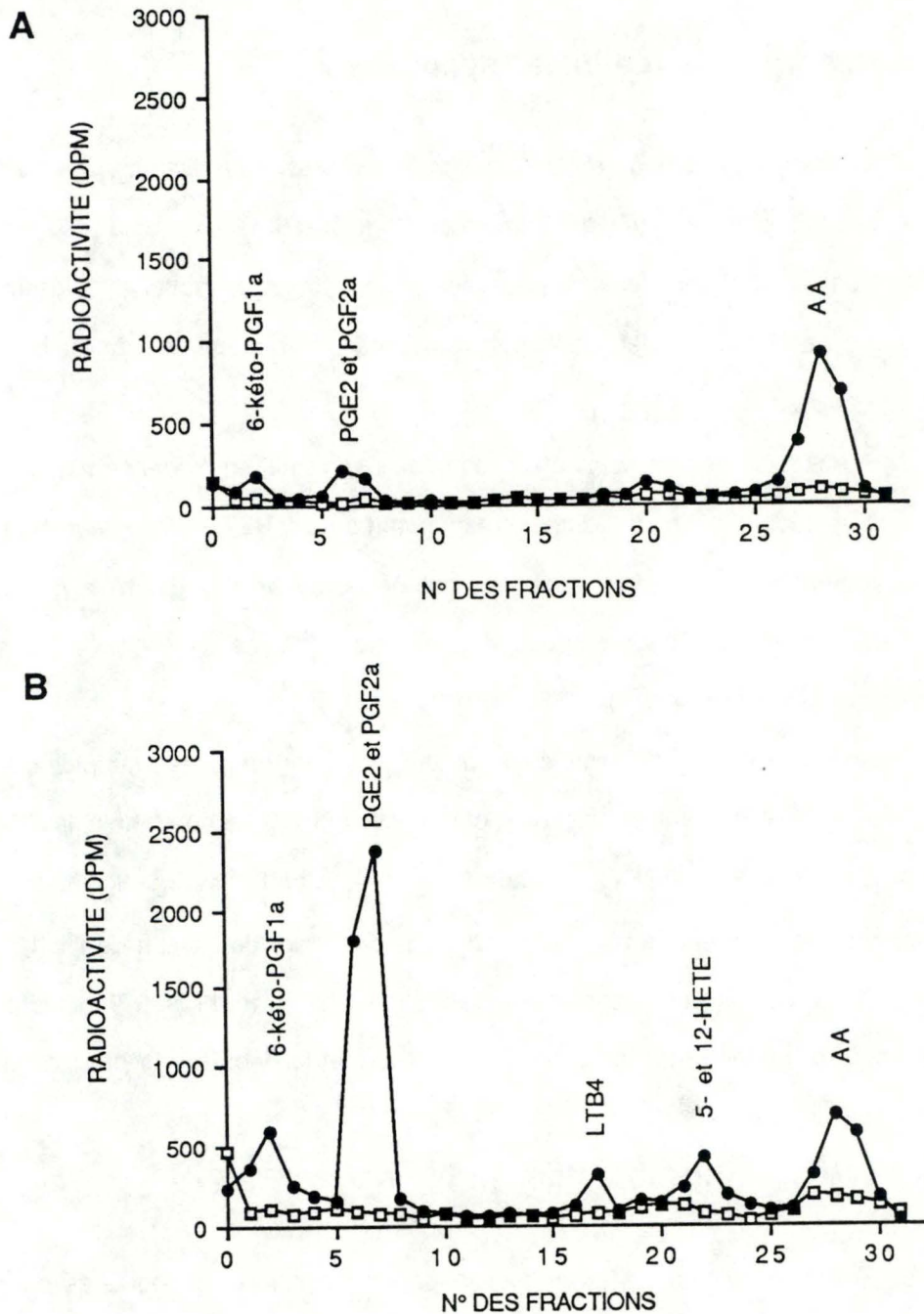


FIG. III-17 : Profil de migration après chromatographie sur couche mince d'échantillons obtenus à partir de fibroblastes pulmonaires en dix-septième génération. Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (□) ou additionné d'IL-1 β 20U/ml (●) pendant 6 (A) et 24 (B) heures. Les deux profils ont été superposés. Les résultats montrent la radioactivité (dpm) en fonction de la fraction. L'endroit de la migration des standards est indiqué sur la figure et chaque point représente la moyenne de deux échantillons.

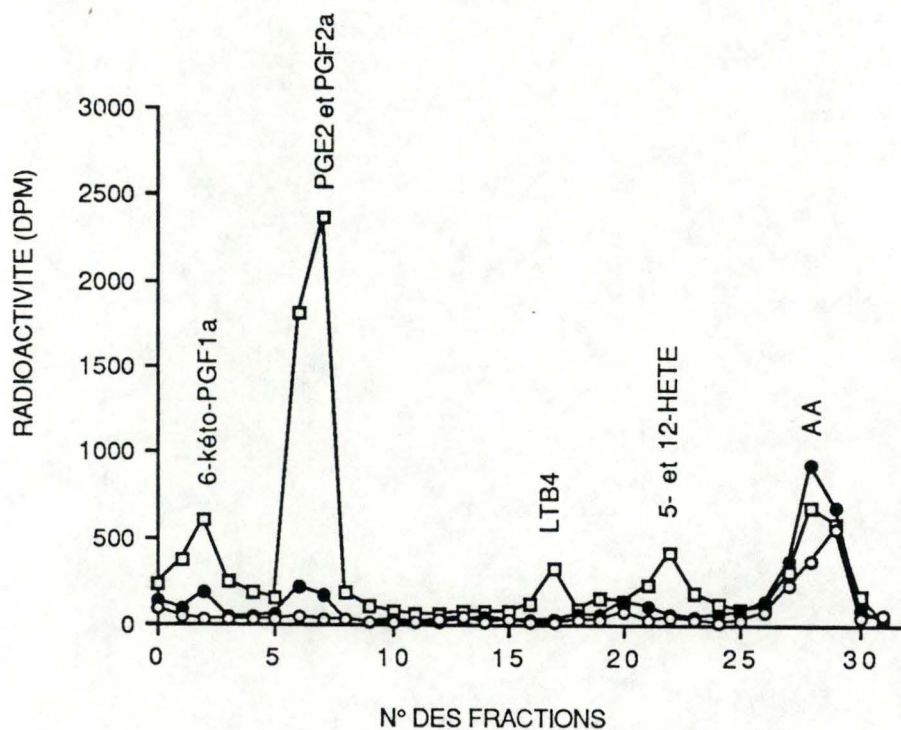


FIG. III-18 : Profil de migration après chromatographie sur couche mince d'échantillons obtenus à partir de fibroblastes pulmonaires en dix-septième génération. Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % additionné d'IL-1 β 20U/ml pendant 3 (○), 6 (●) et 24 (□) heures. Les trois profils ont été superposés. Les résultats montrent la radioactivité (dpm) en fonction de la fraction. L'endroit de la migration des standards est indiqué sur la figure et chaque point représente la moyenne de deux échantillons.

- en second lieu, cette analyse qualitative permettra de déceler plus en détails les différences éventuelles dans leur métabolisme de l'acide arachidonique, par rapport aux cellules synoviales.

Les résultats obtenus après 3 heures de stimulation à l'IL-1 β (Fig. III-18) montrent un seul pic d'AA qui semble légèrement plus élevé pour les cellules synoviales stimulées par l'IL-1.

Après 6 heures, des différences plus nettes apparaissent : alors que le contrôle montre un faible relargage spontané d'AA et de PGs, on observe 4 pics nets pour le test de stimulation à l'IL-1 (Fig. III-17A); ceux-ci correspondent :

- au pic d'AA, déjà présent au temps 3 heures
- un pic correspondant à de la 6-kéto-PGF $_{1\alpha}$
- un pic de PGF $_{2\alpha}$ et PGE $_2$ confondues
- un pic de 5- HETE

Ici, contrairement aux cellules synoviales, l'apparition de 5-HETEs, est induite par l'IL-1 β .

Après 24 heures (Fig. III-17 B), le profil du contrôle n'a pas changé, avec toujours un petit un pic d'AA. Mais le profil de stimulation par l'IL-1 diffère de celui obtenu au temps 6 heures : d'une part, par la présence d'un nouveau pic correspondant à la production de LTB $_4$; d'autre part, par l'importance du pic de prostaglandines (PGF $_{2\alpha}$ et PGE $_2$). Les pics de 6-kéto-PGF $_{1\alpha}$ et de 5-HETEs croissent également après 24 heures. Seul le pic d'AA diminue légèrement par rapport au temps 6 heures, probablement à cause de sa métabolisation en de nombreux dérivés, non seulement de la voie de la cyclooxygénase, mais aussi de la voie de la lipoxygénase.

3.2.3. Discussion

En comparant les résultats obtenus pour les fibroblastes pulmonaires et les cellules synoviales, nous voyons donc que la radioactivité relarguée au cours du temps se réalise plus ou moins de la même façon pour les deux types cellulaires, mais nous constatons que l'IL-1 β

induit des profils de métabolites dérivés de l'AA qui ne se sont pas entièrement identiques. La cinétique d'apparition de ces métabolites n'est pas non plus tout à fait similaire à l'autre. En effet, au temps 6 heures, les fibroblastes pulmonaires produisent en plus de l'AA des PGs (PGE_2 et 6-kéto-PGF $_{1\alpha}$) de même que du 5-HETE. Par contre, au même moment, pour les cellules synoviales, nous n'avons pas de production de PGs mais uniquement la présence d'AA et du 5-HETE; mais ce dernier n'est pas induit par l'IL-1 β chez les cellules synoviales. Ces résultats de l'analyse qualitative sont également conformes à l'analyse quantitative car ils suggèrent une réponse plus rapide des fibroblastes.

Au temps 24 heures, l'allure des courbes se rejoint pour les deux types cellulaires. Une seule différence subsiste alors, mais elle est importante : les fibroblastes pulmonaires produisent du LTB $_4$ contrairement aux cellules synoviales, en réponse à l'IL-1 β . Le pic des PGs semble également plus important à 24 heures, chez les fibroblastes.

Cette expérience nous aura donc permis de mettre en évidence certaines différences tant dans les patterns de métabolites produits, que dans les cinétiques de production au niveau des 2 types cellulaires étudiés, après stimulation à l'IL-1. Ces résultats sur la production des PGs sont conformes aux données de la littérature en ce qui concerne les cellules synoviales (Godfrey *et al.*, 1988a,1988b) et les chondrocytes (Chang *et al.*, 1986; Kerr *et al.*, 1989). Par contre, les données sur les fibroblastes sont plus fragmentaires. L'IL-1 stimule bien la production de PGs dans diverses souches de fibroblastes humains en culture (Dukovich *et al.*, 1986; Bhatnagar *et al.*, 1986; Mauviel *et al.*, 1988). Mais la plupart des auteurs ne dosent que la PGE_2 , par radio-immunoessai. Au laboratoire, nous disposons de la technique performante du GC-MS (chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse) qui permet l'analyse simultanée des différentes PGs. Cette analyse a déjà été réalisée de manière systématique sur les cellules synoviales et les chondrocytes humains en culture (I. Knott, Travail de doctorat) et est actuellement en cours pour les fibroblastes de poumon et de peau (M. Burton, Travail de Doctorat), ce qui devrait compléter nos résultats de manière à la fois qualitative et quantitative..

Les dérivés lipoxygénasiques, quant à eux, ont été beaucoup moins étudiés dans les cellules mésenchymateuses. Mayer *et al.* (1984) ont analysé ces composés dans des

fibroblastes humains de peau, pré-incubés en présence d'acide arachidonique radioactif et stimulés par l'ionophore du calcium A23187 (60 min à 37 °C). Dans ces conditions, les cellules produisent surtout des PGs, mais également des HETEs, le 15-HETE étant le plus abondant. Varani *et al.* (1986) ont cultivé des fibroblastes MRC-5 sur différents substrats (collagène, DEAE dextran, verre, ...) et étudié l'effet de ces substrats sur le métabolisme de l'acide arachidonique; de nouveau, les PGs dominent, quel que soit le substrat, mais sur verre, ils décèlent de faibles quantités de LTB₄ et LTC₄, ce qui suggère l'existence de 5-lipoxygénases dans ces cellules. Les HETEs n'ont pas été dosés dans cette étude. Nos expériences sur les fibroblastes de poumon tendent à confirmer la présence de lipoxygénases dans les cellules synoviales et les fibroblastes de poumon, bien que seuls ces derniers produisent du LTB₄; en outre, ces lipoxygénases seraient influencées par l'IL-1, du moins dans les fibroblastes de poumon. Il reste néanmoins plusieurs points qui mériteraient d'être vérifiés et confirmés. Il faudrait recommencer les expériences, mais en présence d'inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase. Nous disposons également de techniques de HPLC pour doser les dérivés lipoxygénasiques, tel le LTB₄ (Remy, 1990). La mise au point du dosage des HETEs par le GC-MS est en cours. Ces techniques complémentaires devraient nous permettre de confirmer de manière définitive nos résultats sur les dérivés lipoxygénasiques.

Pour préciser le rôle de la PLA₂ dans ces phénomènes, nous avons refait ces expériences en présence d'acide aristolochique, un inhibiteur de la PLA₂.

3.3. EFFETS DE L'ACIDE ARISTOLOCHIQUE

Suite à l'effet de l'IL-1 sur la libération d'acide arachidonique et de ses métabolites sur les 2 types cellulaires, nous nous sommes intéressés à un inhibiteur de la PLA₂ pour mieux mettre en évidence le rôle de cette enzyme dans les phénomènes étudiés. L'idéal aurait été de tester cet inhibiteur en analyses quantitative et qualitative, mais cette dernière pour des raisons de temps n'a pu être réalisée.

Il existe de nombreux inhibiteurs de la PLA₂, mais leur spécificité est généralement limitée ou reste souvent à établir (Marshall et Chang , 1990 ; Béréziat *et al*, 1990). Par exemple, le bromure de bromophénacyl est fréquemment utilisé comme inhibiteur de PLA₂; il forme un lien covalent avec un résidu histidine situé à proximité du site de liaison de l'enzyme avec le calcium. Mais vu les propriétés alkylantes de cette molécule, elle peut interagir avec les groupes thiols ou amines d'autres protéines. D'autres inhibiteurs activent la PLA₂, mais aussi la PLC.

Nous avons choisi l'acide aristolochique (acide 8-méthoxy-6-nitrophénanthro (3,4-*d*)-1,3-dioxole-5-carboxylique. C'est une molécule encore peu étudiée, extraite de variétés d' aristoloches, et qui inhibe tant les PLA₂ de venins de serpent que plusieurs PLA₂ humaines, dont la PLA₂ présente dans les liquides synoviaux (pour une revue, voir Rosenthal *et al.*, 1989). Cette molécule semble interagir avec des domaines de l'enzyme autres que le site actif. Rosenthal *et al.* (1989) ont montré que l'acide aristolochique inhibait de manière dose-dépendente le relargage d'AA dans des PMNs humains stimulés à l'ionophore A23187. Sa spécificité n'est pas encore parfaitement connue, mais ne semble pas absolue non plus (Rosenthal *et al.*, 1989).

3.3.1. Cellules synoviales

Les cellules ont donc été préalablement incubées en présence d'AA pendant 18 heures, puis traitées comme suit :

- dans du milieu seul (contrôles)
- avec de l'IL-1 β à 20 U/ml
- avec de l'acide aristolochique seul à 10^{-5} , 5×10^{-5} et 10^{-4} M
- avec de l'IL-1 β à 20 U/ml combiné aux différentes concentrations en acide aristolochique.

Comme précédemment dans le Paragraphe 3.1, nous avons exprimé les résultats de 2 manières différentes.: dans la Fig. III-19, nous avons suivi la radioactivité relarguée au cours du temps, exprimée en % de la radioactivité incorporée dans les cellules; dans la Fig.

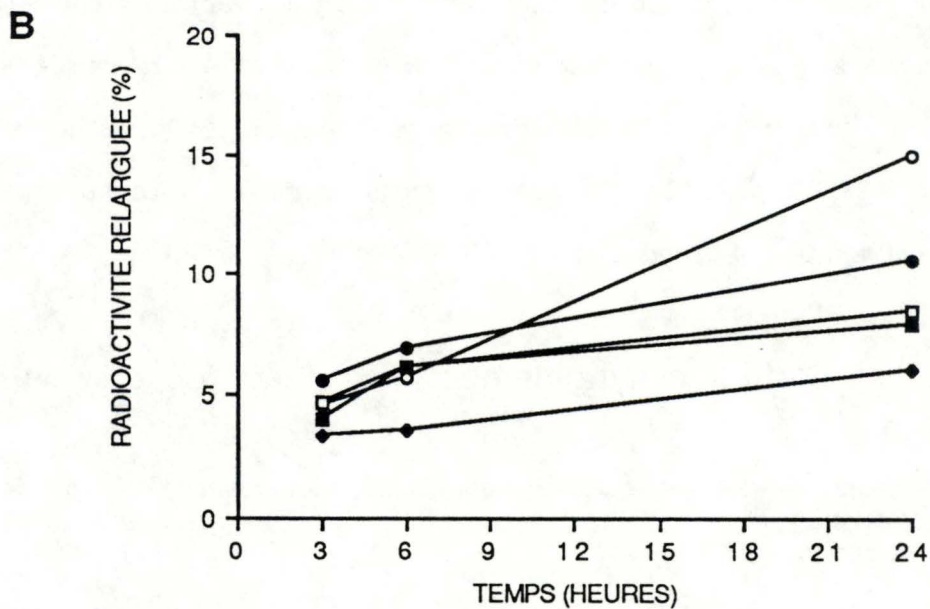
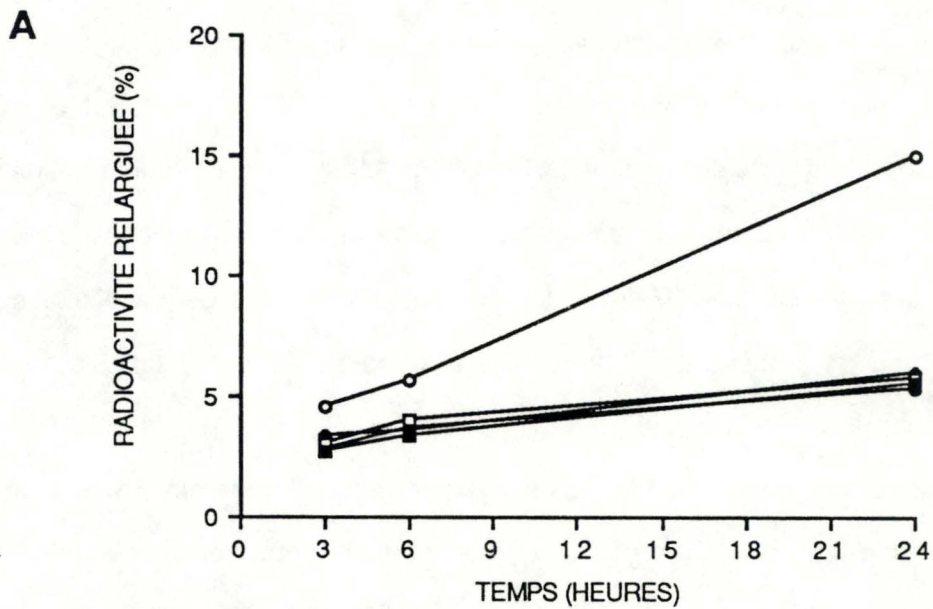


FIG. III-19 : Effet de l'acide aristolochique sur le relargage d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les cellules synoviales de la souche 23M58 en cinquième génération. En A, les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (contrôle, ◆) ou additionnés d'IL-1 β 20 U/ml (○) ou d'acide aristolochique seul à une concentration de 10⁻⁵ (●), 5.10⁻⁵ (□) ou 10⁻⁴ (■) M et en B, en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (contrôle, ◆) ou additionnés d'IL-1 β 20 U/ml (○) ou d'IL-1 β 20 U/ml et d'acide aristolochique à une concentration de 10⁻⁵ (●), 5.10⁻⁵ (□) ou 10⁻⁴ (■) M. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée comme dans la figure III-12 en fonction du temps d'incubation et chaque point représente la moyenne de trois cupules.

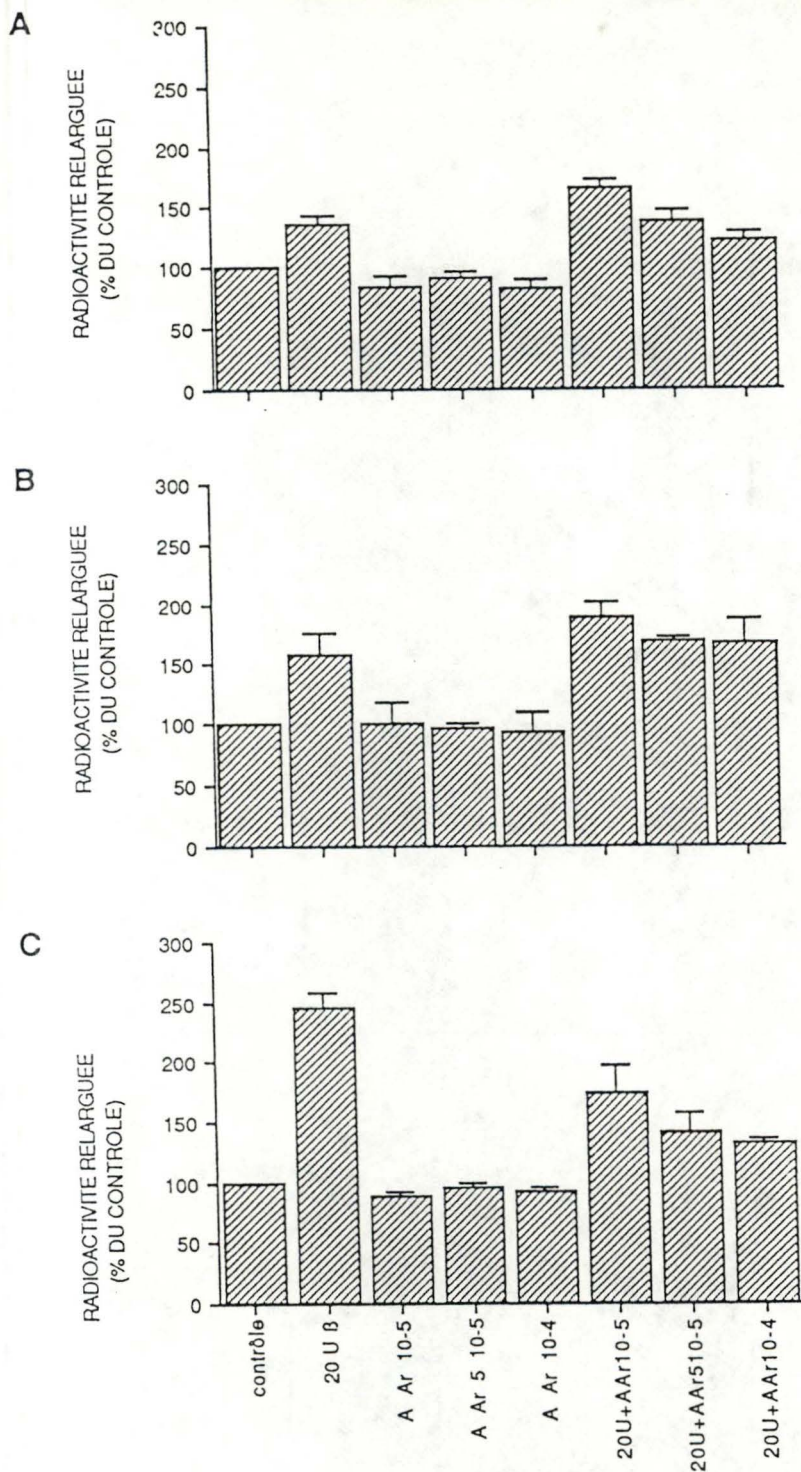


FIG. III-20 : Effet de l'acide aristolochique sur le relargage d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les cellules synoviales de la souche 23M58 en cinquième génération. Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (contrôle) ou additionné d'IL-1 β 20 U/ml, d'acide aristolochique (AAr) à une concentration de 10⁻⁵, 5.10⁻⁵ ou 10⁻⁴ M ou d'IL-1 β 20 U/ml et d'acide aristolochique à une concentration de 10⁻⁵, 5.10⁻⁵ ou 10⁻⁴ M pendant 3 (A), 6 (B) et 24 (C) heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée par rapport au contrôle porté arbitrairement à 100 %. Chaque colonne représente la moyenne de trois cupules \pm 1 écart-type.

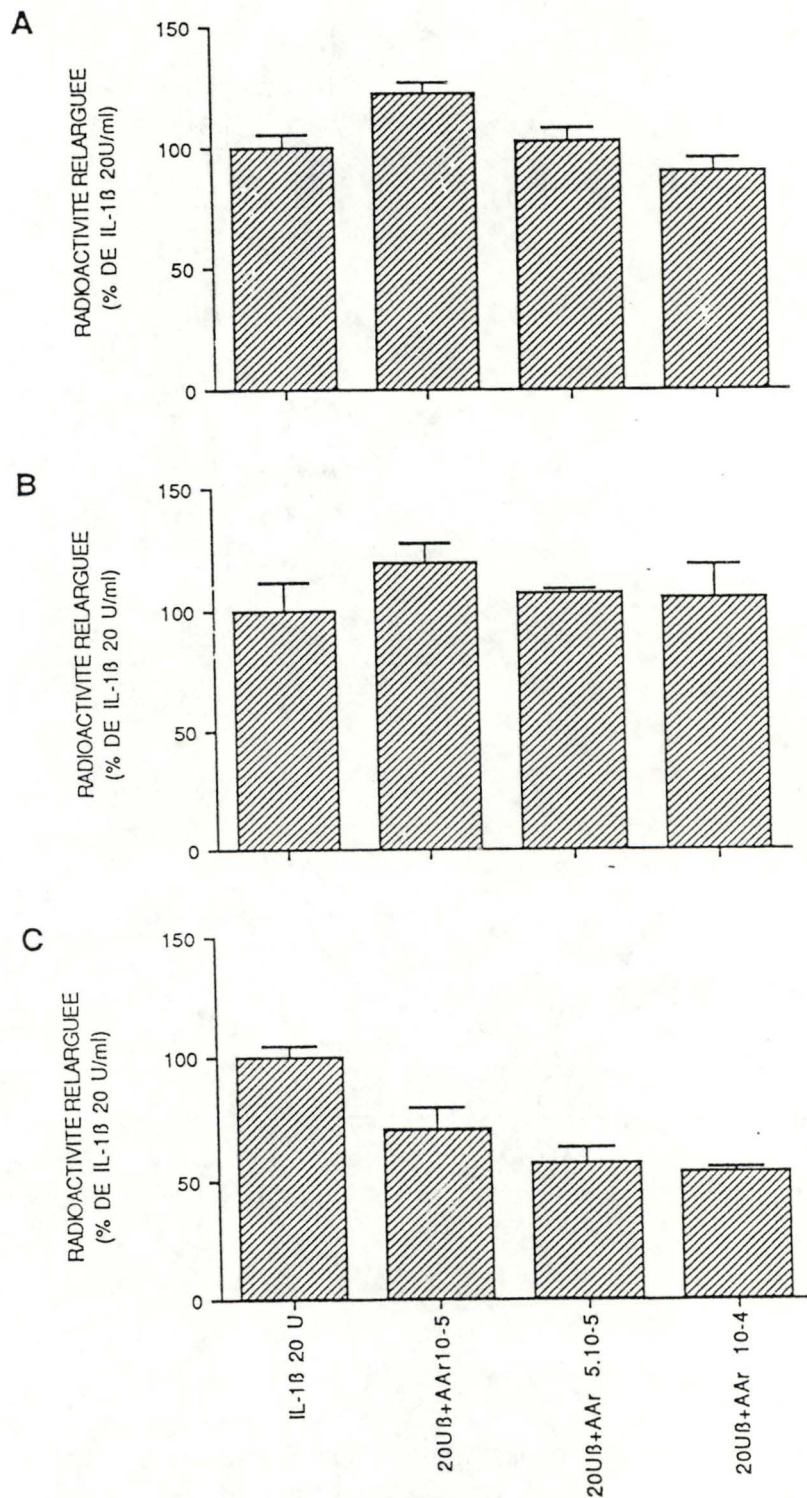


FIG. III-21 : Effet de l'acide aristolochique sur le relargage d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé, pour des cellules synoviales (souche 23M58 en cinquième génération) stimulées par l'IL-1 β (20 U/ml). Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % additionné d'IL-1 β 20 U/ml ou d'IL-1 β 20 U/ml et d'acide aristolochique à une concentration de 10^{-5} , 5.10^{-5} ou 10^{-4} M pendant 3 (A), 6 (B) et 24 (C) heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée par rapport à la radioactivité relarguée par les cellules en présence d'IL-1 β seule et posée comme égale à 100 %. Chaque colonne représente la moyenne de trois cupules \pm 1 écart-type.

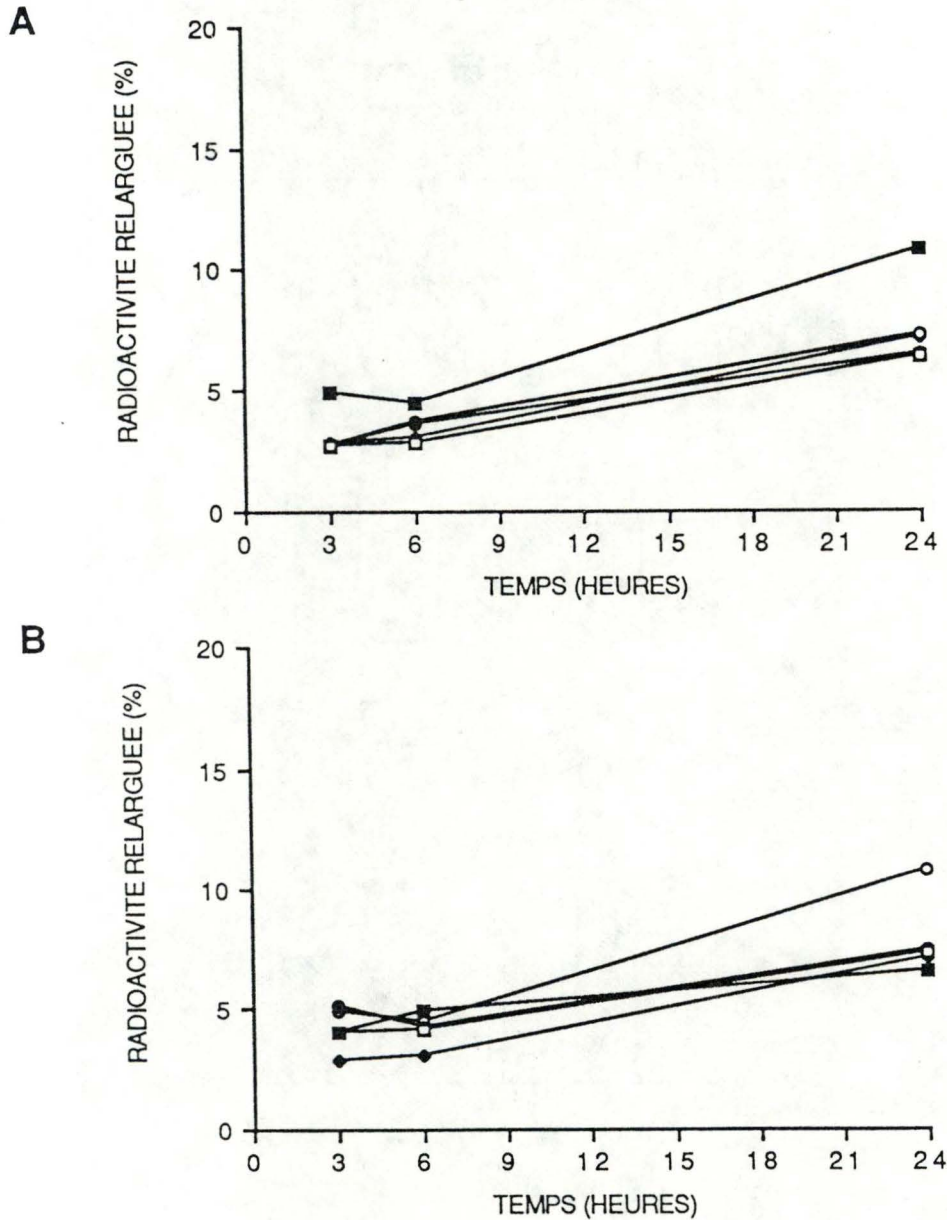


FIG. III-22 : Effet de l'acide aristolochique sur le relargage d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les fibroblastes pulmonaires en vingt-deuxième génération. En A, les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (contrôle, ◆) ou additionné d'IL-1 β 20 U/ml (○) ou d'acide aristolochique à une concentration de 10^{-5} (●), $5 \cdot 10^{-5}$ (□) ou 10^{-4} (■) M et en B, en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (contrôle, ◆) ou additionné d'IL-1 β 20 U/ml (○) ou d'IL-1 β 20 U/ml et d'acide aristolochique à une concentration de 10^{-5} (●), $5 \cdot 10^{-5}$ (□) ou 10^{-4} (■) M. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée comme dans la figure III-12 en fonction du temps d'incubation et chaque point représente la moyenne de trois cupules.

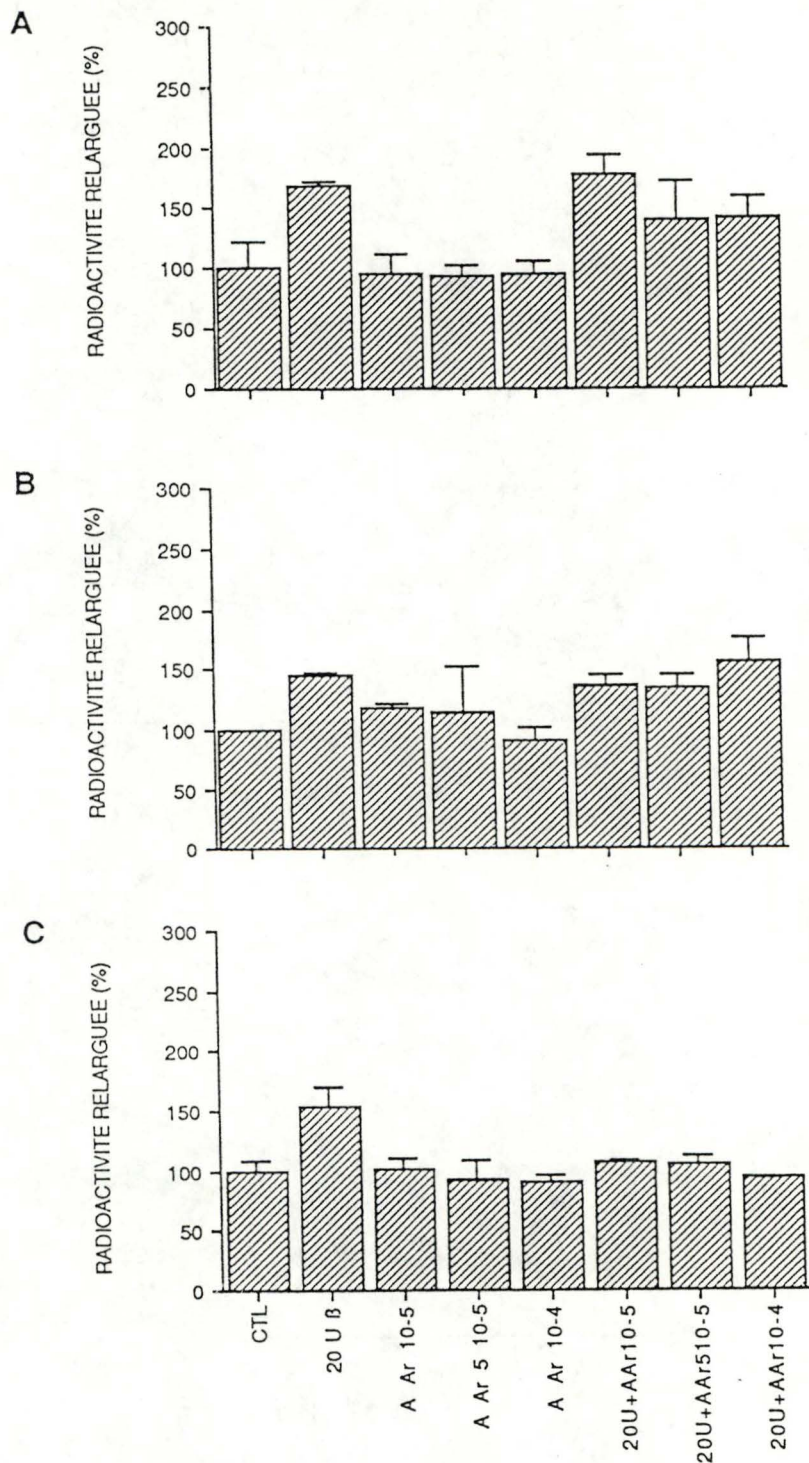


FIG. III-23 : Effet de l'acide aristolochique sur le relargage d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les fibroblastes pulmonaires en vingt-deuxième génération. Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (contrôle) ou additionné d'IL-1 β 20 U/ml, d'acide aristolochique (AAr) seul à une concentration de 10⁻⁵, 5.10⁻⁵ ou 10⁻⁴ M ou d'IL-1 β 20 U/ml et d'acide aristolochique à une concentration de 10⁻⁵, 5.10⁻⁵ ou 10⁻⁴ M pendant 3 (A), 6 (B) et 24 (C) heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée par rapport au contrôle porté arbitrairement à 100 %. Chaque colonne représente la moyenne de trois cupules \pm 1 écart-type.

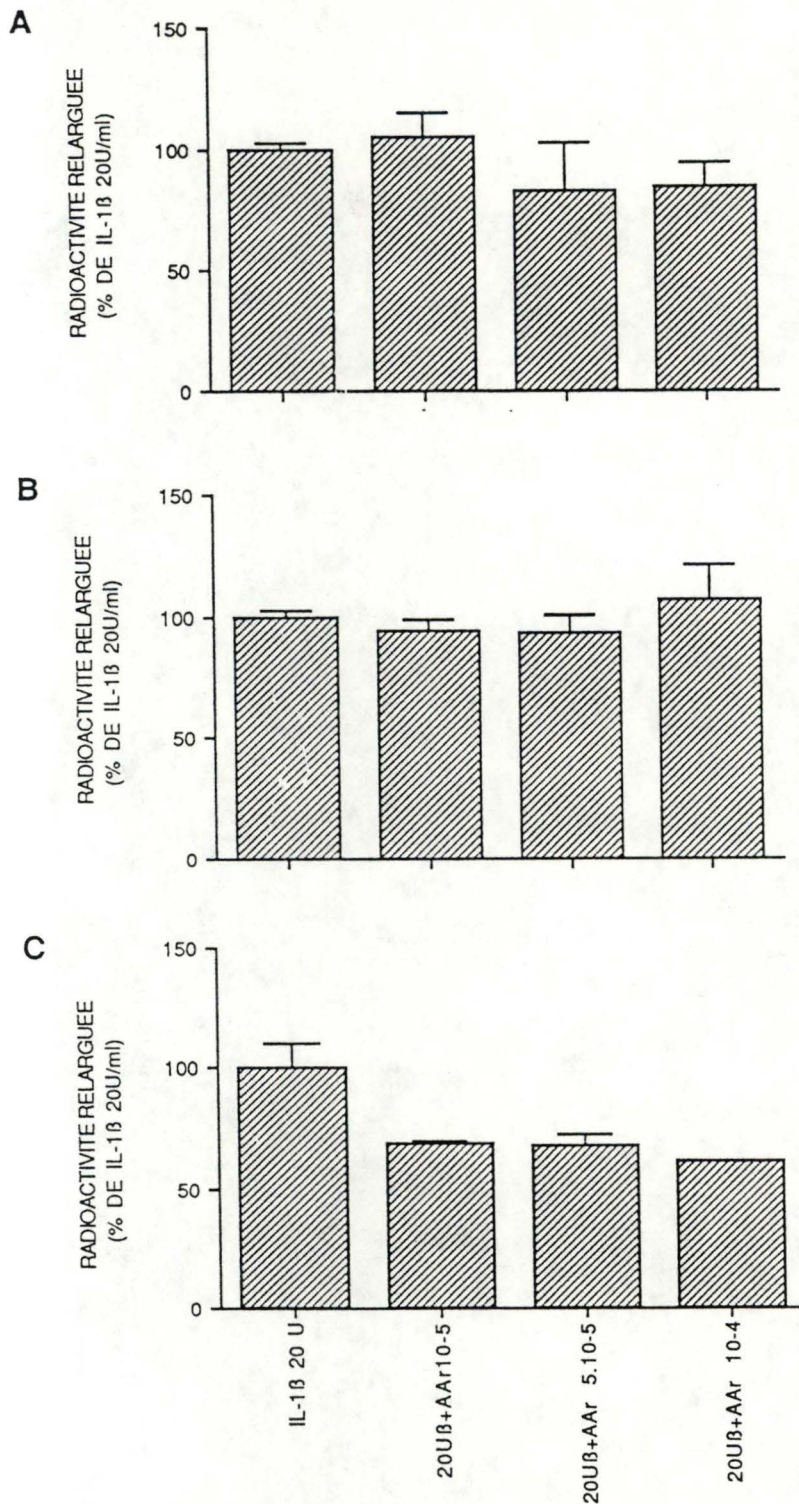


FIG. III-24 : Effet de l'acide aristolochique sur le relargage d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les fibroblastes pulmonaires en vingt-deuxième génération stimulés par de l'IL-1 β (20 U/ml). Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % additionné d'IL-1 β 20 U/ml ou d'IL-1 β 20 U/ml et d'acide aristolochique à une concentration de 10⁻⁵, 5.10⁻⁵ ou 10⁻⁴ M pendant 3 (A), 6 (B) et 24 (C) heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée par rapport à la radioactivité relarguée par les cellules en présence d'IL-1 β seule et posée comme égale à 100 %. Chaque colonne représente la moyenne de trois cupules \pm 1 écart-type.

III-20, chaque traitement est exprimé en % par rapport au contrôle, porté arbitrairement à 100 %.

On constate d'abord que les cellules traitées à l'acide aristolochique seul, quelle que soit la concentration, sont proches des cellules-contrôles, et ce tout au long de l'expérience (Fig. III-19A et 20). Mais l'action de l'acide aristolochique combinée à la stimulation à l'IL-1 β est étonnante. Comme le montre la Fig. III-19B, le relargage de radioactivité par ces cellules est toujours supérieur par rapport aux cellules-contrôles, quel que soit le temps. Ceci apparaît également clairement, quand on exprime les résultats en % par rapport au contrôle (Fig. III-20). Enfin, pour mieux déterminer l'effet inhibiteur de l'acide aristolochique sur les cellules traitées à l'IL-1 β , nous avons calculé pour les 3 temps, les % de relargage par rapport aux cellules traitées avec l'IL-1 β seul. Les résultats de ces calculs sont donnés à la Fig. III-21 : on n'observe aucune inhibition après 3 (A) et 6 (B) heures de stimulation. Au contraire, à 10^{-5} M, l'acide aristolochique accentue même légèrement les effets de l'IL-1 β . Par contre après 24 heures, on constate un effet inhibiteur net de l'ordre de 31 % à 10^{-5} M, 43 % à 5×10^{-5} M et 47 % à 10^{-4} M.

3.3.2. Les fibroblastes pulmonaires

Les fibroblastes montrent des résultats globalement similaires. Ils sont exprimés de la même manière que pour les cellules synoviales et repris dans les Figs. III-22, 23 et 24. L'acide aristolochique seul n'a pas d'effet. Combiné à l'IL-1 β , il n'exerce un effet inhibiteur qu'après 24 heures (Fig. III-24) qui va de 31 % (10^{-5} M) à 39 % (10^{-4} M). Mais il n'accroît jamais les effets de l'IL-1 β , comme observé pour les cellules synoviales aux temps courts.

Pour faciliter la comparaison et souligner les différences entre les 2 types cellulaires, nous avons intégré les Fig. III-21 et 24 en une seule, la Fig. III-25.

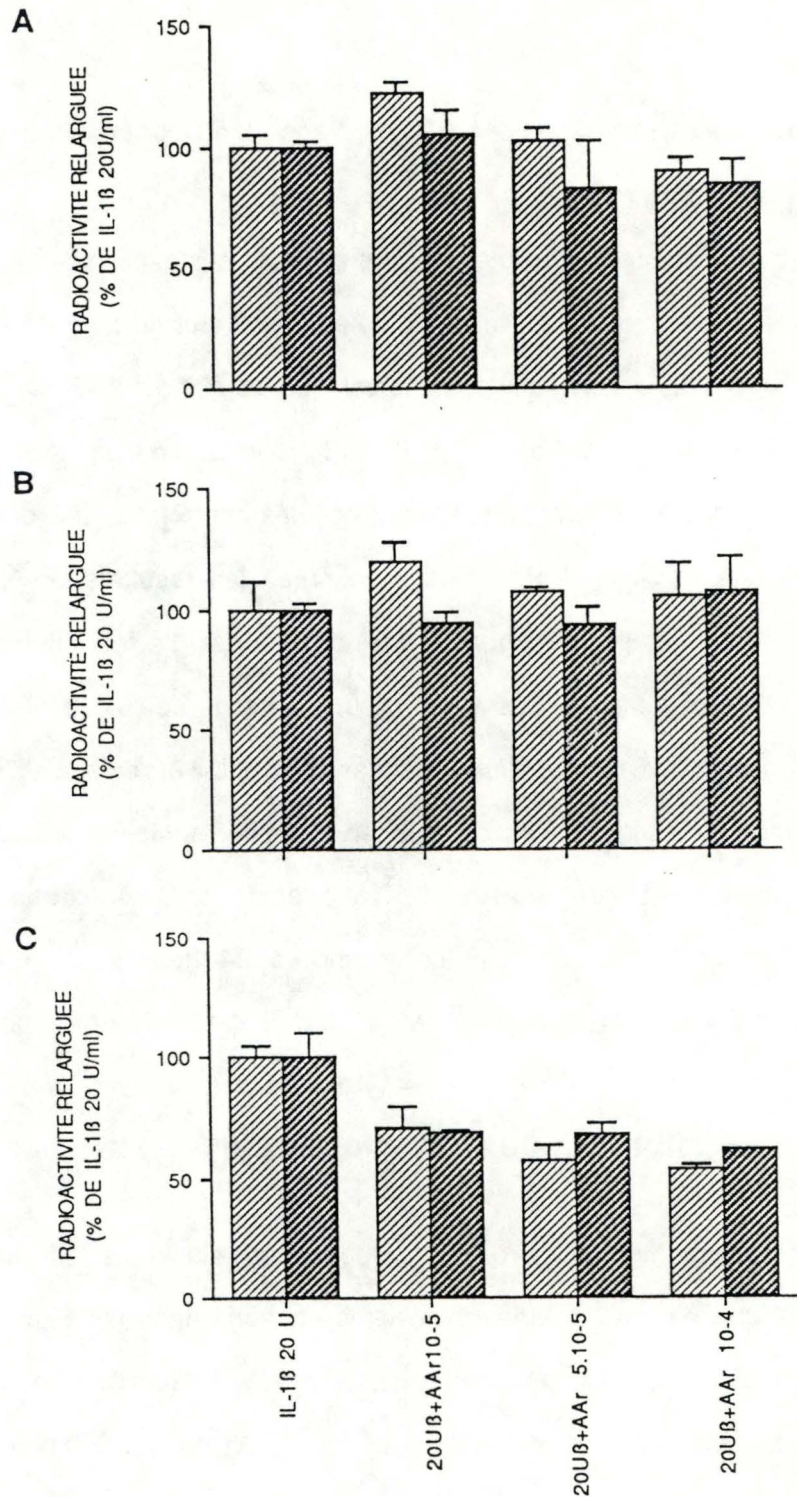


FIG. III-25 : Effet de l'acide aristolochique sur le relarguage d'acide arachidonique stimulé par l'IL-1 β sur des cellules synoviales de la souche 23M58 en cinquième génération (en clair) et des fibroblastes pulmonaires en vingt-deuxième génération (en foncé). Les résultats obtenus aux figures III-21 et III-24 ont été rassemblés pour pouvoir mieux comparer les différences entre les deux types cellulaires.

3.3.3. Discussion

L'interprétation de ces résultats est difficile, bien que l'on observe un effet inhibiteur de l'acide aristolochique aux temps longs. Il est clair que différentes expériences complémentaires s'imposent :

- primo, il faudra tester l'effet de l'acide aristolochique sur le relargage de radioactivité, en analyse quantitative par TLC, ce qui devrait nous permettre de voir dans quelle mesure les différents pics de TLC (AA, PGs, HETEs,...) sont plus ou moins affectés par l'acide aristolochique, et ce au cours du temps et pour les deux types cellulaires. Par après, il faudra évaluer également l'effet de l'acide aristolochique directement sur la production des dérivés lipoxgénasiques et cyclooxygénasiques, dosés par les techniques de HPLC et GC-MS.

- secundo, il existe également d'autres inhibiteurs de PLA₂, plus prometteurs. C'est le cas de manoalide, extrait d'une éponge marine (voir par exemple, Lister *et al.*, 1989; Marshall et Chang, 1990). Mais ce composé inhibe l'hydrolyse par la PLA₂ des phosphatidylcholines et non celle des phosphatidyléthanolamines. Certains analogues non métabolisables de l'acide arachidonique sont également à l'étude (Lister *et al.*, 1989). Mais, il est indispensable d'évaluer préalablement la toxicité de ces composés, car le monoalide s'est révélé relativement toxique pour certaines lignées cellulaires.

3.3.4. Conclusion

L'analyse tant quantitative que qualitative de l'acide arachidonique et de ses métabolites libérés après stimulation des cellules à l'IL-1 β , même complétée par l'utilisation d'un inhibiteur de la PLA₂, ne constitue qu'une approche indirecte pour étudier le rôle de la PLA₂ dans l'activation cellulaire. Pour approfondir ce travail, il nous a semblé indispensable de disposer d'un dosage direct de l'enzyme. Nous avons donc essayé de mettre au point un tel dosage.

4. MISE AU POINT DU DOSAGE DE LA PLA₂

Pour doser directement la PLA₂, deux types de procédures pouvaient être envisagées :

- soit l'utilisation d'un substrat, reproduisant l'environnement naturel de l'enzyme, tel des membranes de bactéries marquées (Meyer *et al.*, 1989) ou plus récemment de levures marquées (Harris et Franson, 1991); celles-ci libèrent après action de l'enzyme, des acides gras radioactifs ;

- soit l'utilisation de phospholipides préalablement marqués, en présence de détergents.

Nous avons choisi la deuxième méthode pour des questions de facilité. En plus, étant donné l'importance des cultures cellulaires au laboratoire, nous avons préféré ne pas cultiver des bactéries ou levures en ces mêmes lieux.

Notre choix de substrat radioactif s'est dirigé vers la phosphatidyl choline dipalmitoyl marquée au C¹⁴ en position 2.

Le dosage de la PLA₂ fut inspiré par la méthode décrite par Clark *et al.*(1986) qui dosent l'enzyme sur des cellules musculaires lisses murines ainsi que sur des cellules endothéliales bovines, mais nous avons modifié leur méthode selon Katsumata *et al.*(1986) en ce qui concerne l'étape de séparation de l'acide palmitique, produit de la réaction, du substrat non hydrolysé.

Ce dosage fut dans un premier temps mis au point sur l'enzyme PLA₂ purifiée de serpent (*Naja mocambique mocambique*) et dans un deuxième temps appliqué à la PLA₂ fraîchement extraite des cellules.

Tout d'abord, il nous fallait déterminer la concentration en substrat à utiliser afin de se situer dans une zone convenable par rapport au Km de l'enzyme; nous avons consulté différents articles. Lister *et al.* (1988) proposent un Km de 1 μ M pour la PLA₂ purifiée ou cellulaire. D'autres comme Katsumata *et al.* (1986) et Clark *et al.*(1986) définissent un Km de 141 μ M, 43 et 62 μ M respectivement pour la PLA₂ extraite du venin de *Crotalus admenteus*, de cellules musculaires lisses de souris et de cellules endothéliales bovines. Le

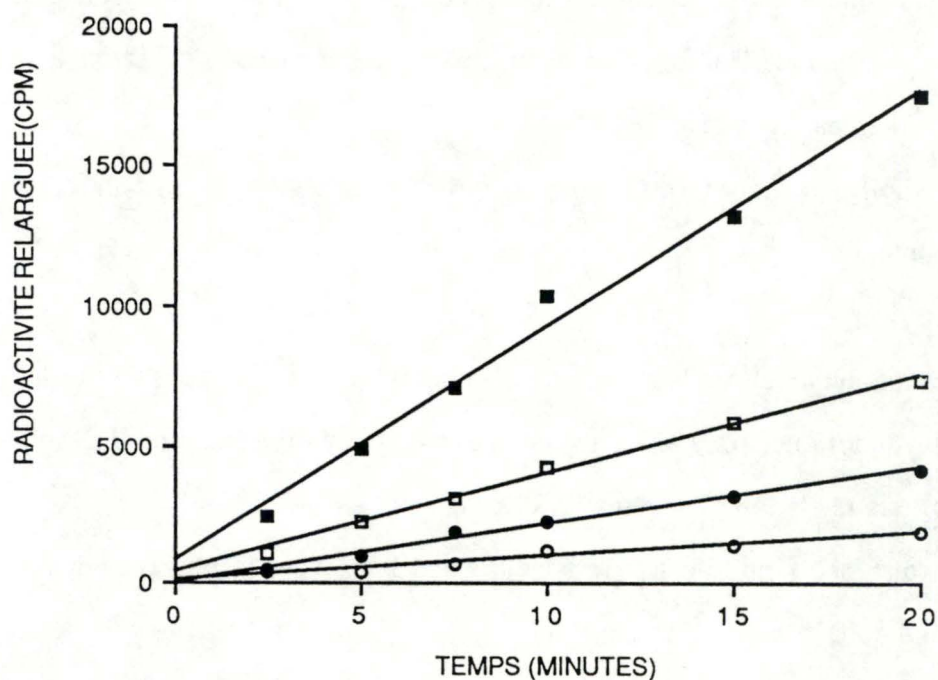


FIG. III-26 : Dosage direct de la PLA₂ de *Naja mocambique mocambique*. Les résultats représentent la radioactivité relarguée correspondant à l'acide palmitique marqué, en fonction du temps pour 4 concentrations de PLA₂ : 12,5 (○), 25 (●), 50 (□) et 100 (■) x 10⁻⁵ U / 500 μl. Chaque point représente la moyenne de 2 échantillons.

Km varie donc en fonction des auteurs, selon le procédé de purification de l'enzyme, le type cellulaire mais probablement aussi l'espèce animale utilisée. Etant donné l'hétérogénéité des valeurs, nous avons décidé de travailler à une concentration finale en substrat égale à 100 μ M. Il s'agissait de prendre une concentration assez élevée en substrat afin que celui-ci ne devienne pas limitante. Cette valeur est du même ordre de grandeur de celle décrite par Katsumata *et al.*(1986).

4.1. DOSAGE DE L'ENZYME PURIFIEE

L'enzyme présente dans le milieu réactionnel hydrolyse le substrat radioactif, la phosphatidyl choline 1-palmitoyl,-2-[1-¹⁴C]palmitoyl, libérant ainsi le lysophospholipide correspondant et l'acide palmitique marqué. Cette libération de l'acide palmitique radioactif est suivie au cours du temps (Fig. III-26). Les 4 concentrations utilisées sont :

- 0,000125 U/50 μ l de tampon cellulaire C
- 0,00025 U/50 μ l de tampon C
- 0,0005 U/50 μ l de tampon C
- 0,001 U/50 μ l de tampon C

La Fig.III-26 met en évidence une relation parfaitement linéaire au cours du temps, et ce pour les différentes concentrations de l'enzyme. Nous obtenons pour la concentration la plus élevée 30 % d'hydrolyse du substrat après 20 min. A 0,00005 U/50 μ l, on passe à 12,4 % d'hydrolyse.

Pour les deux concentrations les plus basses, on passe à 7,0 % (0,000025 U/ 50 μ l) et à 3,0 % d'hydrolyse (0,0000125 U/50 μ l).

L'activité de la PLA₂ de *Naja* est donc directement proportionnelle à la concentration en enzyme et varie linéairement au cours du temps, même à de faibles concentrations en enzyme. Si l'on compare par rapport aux travaux déjà effectués au laboratoire (Remy, 1990), nous descendons très bas dans les concentrations en enzyme,tout en gardant une bonne reproductibilité.

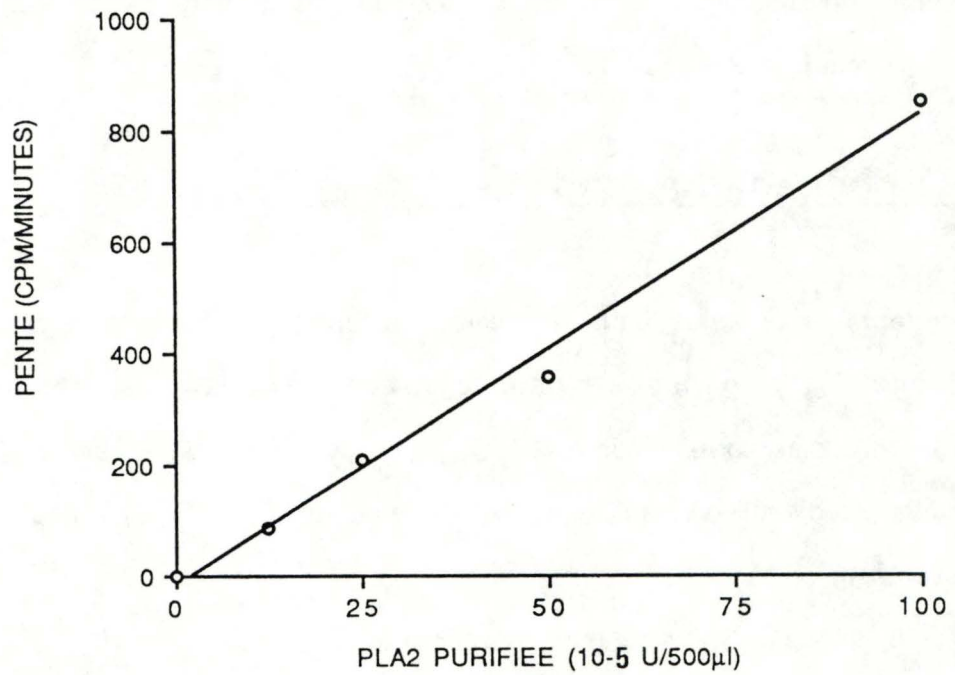


FIG. III-27 : Dosage direct de la PLA₂ de *Naja mocambique mocambique*. A partir des résultats obtenus à la figure III-26, on a calculé pour chaque concentration de PLA₂ la pente correspondante . Les pentes (cpm/minute) ont été exprimées en fonction de la concentration en PLA₂.

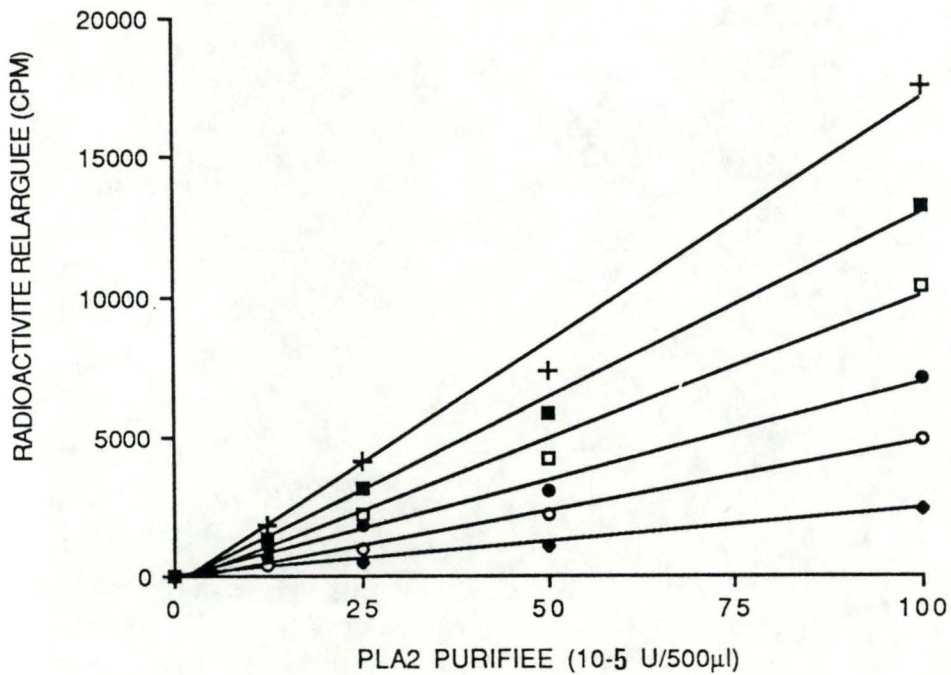


FIG. III-28 : Dosage direct de la PLA₂ de *Naja mocambique mocambique*. Les résultats représentent la radioactivité relarguée (cpm) en fonction de la concentration en PLA₂ pour 2,5 (◆), 5 (○), 7,5 (●), 10 (□), 15 (■) et 20 (+) minutes d'incubation à 37°C. Chaque point représente la moyenne de 2 échantillons.

Un autre moyen de représenter les résultats est d'exprimer chaque pente (obtenue dans le graphe précédent) en fonction de la concentration en enzyme. On aboutit bien à une relation linéaire (Fig. III-27).

Dans la Fig. III-28, les cpm sont exprimés en fonction de la concentration et ce pour les différents temps d'incubation utilisés. Nous voyons ici aussi que l'hydrolyse est directement proportionnelle à la concentration enzymatique de la PLA₂ de *Naja*. Cette relation est linéaire pour tous les temps d'incubation testés, de 2,5 min à 20 min.

Etant donné le choix relativement arbitraire de la concentration en substrat pour le dosage, nous avons testé une autre concentration en substrat qui était 40µM finale. Les résultats obtenus (non montrés) n'indiquent pas de différence significative.

4.2. DOSAGE DE L'ENZYME CELLULAIRE

Dans un premier temps, nous avons utilisé la même méthode que celle décrite pour le dosage de PLA₂ de *Naja*. Nous avons stimulé des cellules synoviales avec de l'IL-1β pendant 12 à 14 heures. Avant le dosage proprement dit, la PLA₂ cellulaire est extraite dans du tampon cellulaire (voir Matériels et Méthodes- 6.3.2.). Ce même tampon est également utilisé pour les dilutions de l'enzyme. Cette procédure adaptée selon la méthode décrite par Clarck et al. (1986) ne nous a pas permis de détecter une activité hydrolytique de l'enzyme dans les cellules synoviales.

Nous avons alors extrait l'enzyme selon la méthode décrite par Gilman et Chang (1990). L'extraction de l'enzyme a lieu dans un milieu fortement acide en présence de H₂SO₄ 0,18 M. Celui-ci est nécessaire à la floculation d'inhibiteurs endogènes présents lors de l'extraction de l'enzyme et susceptibles de l'inhiber. Rosenthal et al. (1989) avaient déjà utilisé l'acide sulfurique comme milieu d'extraction de PLA₂ de neutrophiles.

Grâce à cette méthode d'extraction, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois une activité hydrolytique qui semblait correspondre à de la PLA₂ cellulaire.

Pour continuer à mettre au point le dosage de la PLA₂ cellulaire, nous avons travaillé et sur les cellules synoviales et sur les fibroblastes de poumon. Mais ces expériences

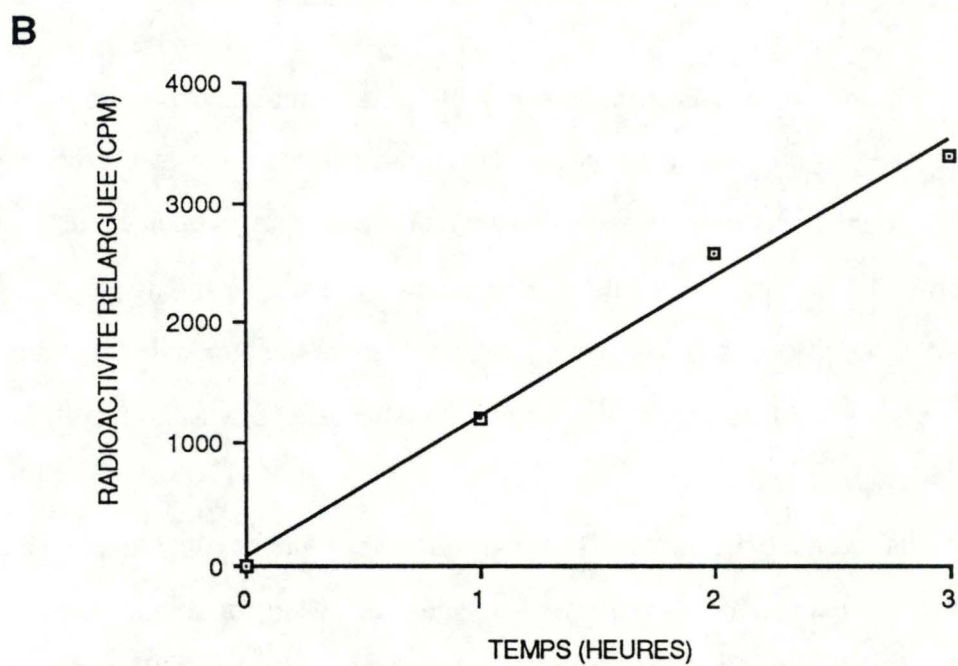
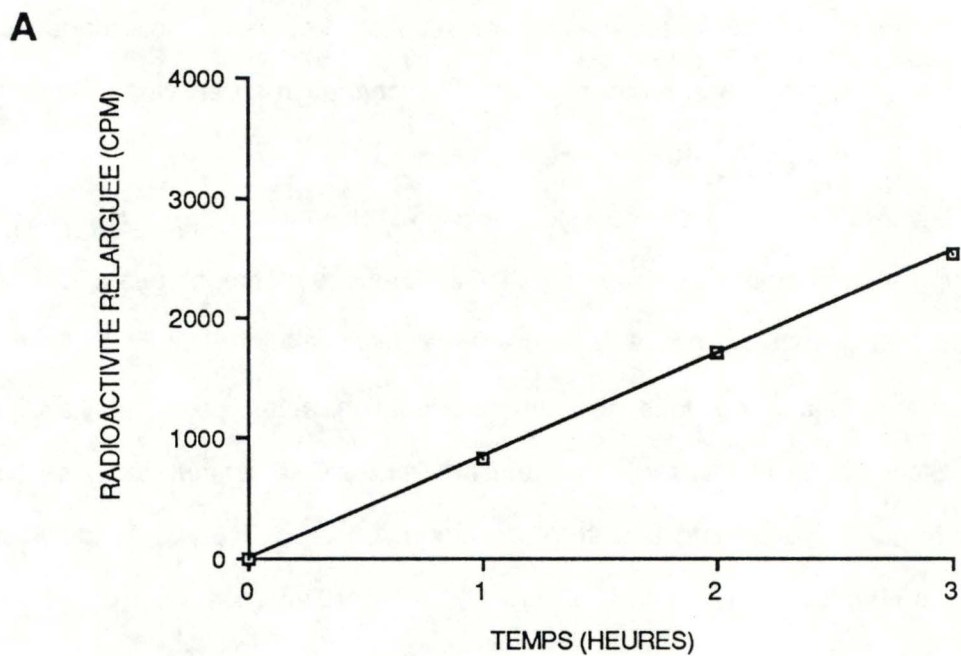


FIG. III-29 : Dosage de la PLA₂ cellulaire extraite de cellules synoviales de la souche 10M47 en huitième génération (A) et de fibroblastes pulmonaires en treizième génération (B). Les résultats expriment la radioactivité relarguée (cpm) en fonction du temps d'incubation à 37°C et chaque point représente la moyenne de 2 échantillons.

Temps d'incubation (heures)	Cellules synoviales (%)	Cellules pulmonaires (%)
1	1.3	3.4
2	2.8	7.3
3	4.0	9.7

Table III-2. Pourcentages d'hydrolyse du substrat, obtenus après différents temps d'incubation, pour les cellules synoviales et fibroblastes de poumon. Ces pourcentages ont été calculés à partir des données de la Fig. III-29.

consommant énormément de cellules, nous avons surtout utilisé les fibroblastes pulmonaires dont le potentiel prolifératif et la vitesse de croissance étaient de loin supérieures.

Pour doser la PLA₂ cellulaire, les cellules sont stimulées avec de l'IL-1 β à une concentration de 20 U/ml pendant 12 à 14 heures. Les cellules sont ensuite récupérées et l'enzyme extrait, comme décrit dans les Matériels et Méthodes (6.3.3.). L'activité enzymatique est mesurée après 1, 2 et 3 heures d'incubation. Nous observons une augmentation linéaire au cours du temps, ce qui suggère une hydrolyse constante du substrat radioactif, avec accumulation d'acide palmitique (Fig. III-29), et ce pour les cellules synoviales et les fibroblastes pulmonaires. Les % d'hydrolyse du substrat ont été calculés; ils sont repris pour les différents temps d'incubation et pour les 2 types cellulaires dans la Table III-2. On peut donc déceler une activité de type PLA₂ sur les cellules synoviales et les fibroblastes. De plus, l'enzyme apparaît stable au cours de la réaction et son activité évolue linéairement au cours du temps entre 0 et 3 heures.

4.2.1. Approche quantitative

Après la mise en évidence d'une relation linéaire au cours du temps, il restait à étudier l'effet des dilutions successives sur l'activité enzymatique. Des fibroblastes de poumon provenant de 2 boîtes de culture T75, ce qui correspond à plus ou moins 1,5 à 1,8 X 10⁶ cellules, ont été traités comme décrit plus haut. Après récolte des cellules et extraction de l'enzyme, celle-ci a été diluée 2, 3, 4, 6 et 8. fois Comme la réaction enzymatique s'est toujours avérée stable sur une durée de 3 heures, la réaction d'hydrolyse s'est déroulée pendant 3 heures pour chacune des dilutions.

Les résultats obtenus (Fig. III-30) indiquent une relation linéaire en fonction des dilutions. Mais l'activité enzymatique n'est pas directement proportionnelle à la dilution. Ainsi, le passage d'une dilution 2 x à une dilution 4 x ne diminue pas l'activité enzymatique de moitié (contrairement aux observations obtenues pour la PLA₂ de *Naja*). En d'autres termes, plus on dilue l'enzyme, plus on a de l'activité proportionnellement.

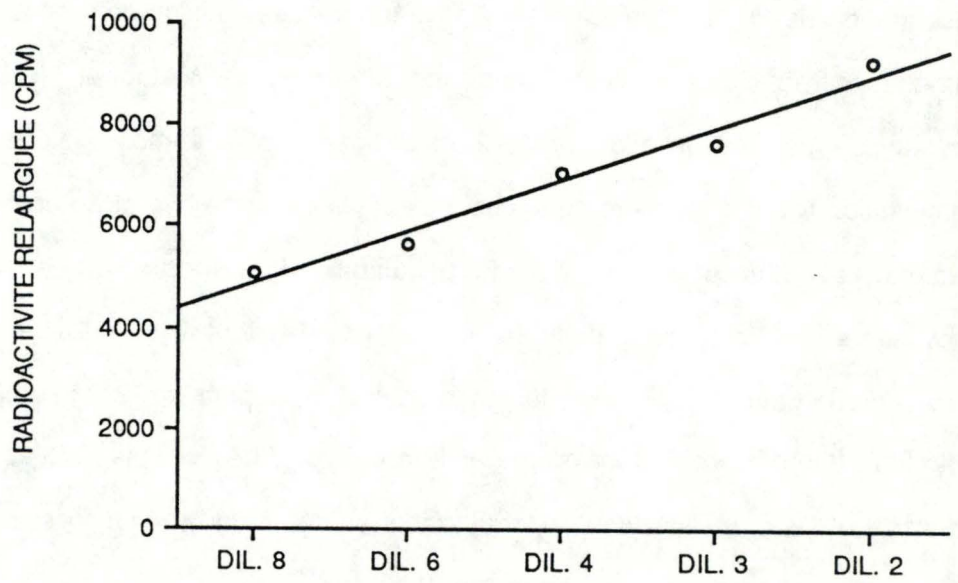


FIG. III-30 : Dosage de la PLA₂ cellulaire extraite de fibroblastes pulmonaires en vingt-troisième génération. Les résultats expriment la radioactivité relarguée en fonction de la dilution de l'échantillon. Chaque point représente la moyenne de 2 échantillons.

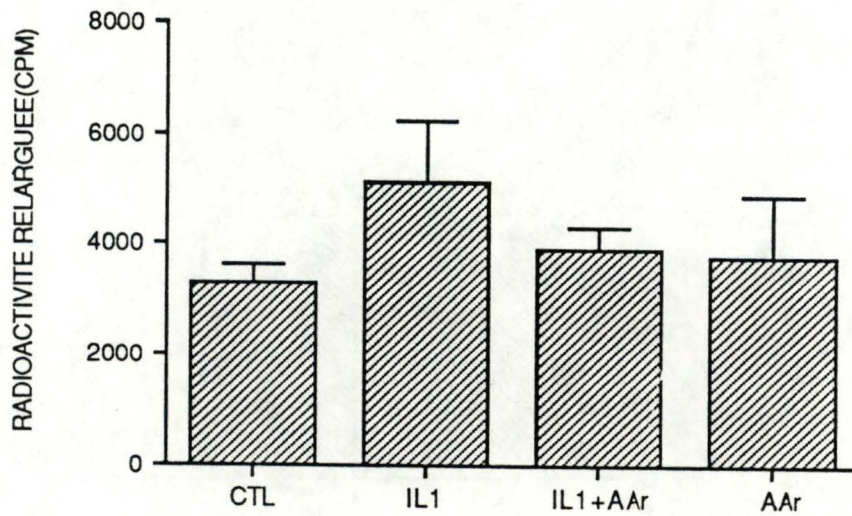


FIG. III-31 : Dosage de la PLA₂ cellulaire extraite de fibroblastes pulmonaires en dix-septième génération. Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0,2 % seul (contrôle) ou additionné d'IL-1 β 20 U/ml, d'acide aristolochique 10⁻⁵M ou d'IL-1 β 20 U/ml et d'acide aristolochique 10⁻⁵M pendant 3 heures. Les résultats représentent la radioactivité relarguée en fonction du traitement et chaque colonne représente la moyenne de 3 échantillons \pm 1 écart-type.

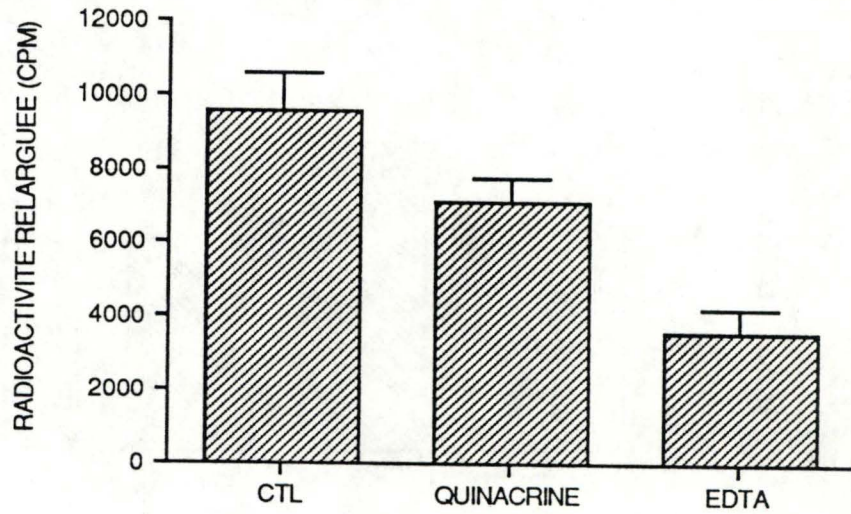


FIG. III-32 : Effet de la quinacrine (10^{-4} M) et de l'EDTA (7,5 mM) sur l'activité hydrolytique de la PLA₂ cellulaire extraite à partir de fibroblastes pulmonaires en dix-neuvième génération. Les résultats sont exprimés en radioactivité relarguée (cpm) en fonction du traitement et représentent la moyenne de 3 échantillons \pm 1 écart-type.

Nous n'avons pu au terme de ce travail, résoudre ce problème, mais une des hypothèses les plus plausibles pour expliquer la Fig.III-30, est la suivante : il se pourrait que dans nos conditions expérimentales, nous ne parvenions pas à neutraliser complètement les inhibiteurs endogènes de la PLA₂. Par conséquent, en diluant l'enzyme, nous diluons également ces inhibiteurs. Il est clair également que les procédures d'homogénéisation des cellules et d'extraction de l'enzyme devraient être réétudiées systématiquement.

4.2.2. Approche qualitative

Bien que nous ne soyons pas arrivés à un dosage quantitatif, nous avons cependant voulu tester dans des expériences très préliminaires, certaines molécules reconnues pour interférer avec l'enzyme. Il s'agit d'une part de l'acide aristolochique testé sur les cellules, et d'autre part de l'EDTA et de la quinacrine, testées sur l'enzyme extrait.

Pour tester l'acide aristolochique, 4 boîtes de cellules (T75) sont traitées comme suit pendant 12 heures, avant l'extraction de l'enzyme. La première boîte sert de contrôle et contient de l'OPTI + HLA 0,2 %. La seconde est stimulée avec de l'IL-1 β à raison de 20 U/ml. La troisième est stimulée avec de l'IL-1 en présence d'acide aristolochique à une concentration de 10⁻⁵ M. La quatrième contient l'acide aristolochique seul (10⁻⁵ M). Après extraction de l'enzyme, la réaction d'hydrolyse a lieu durant 3 heures.

Après dosage (Fig. III-31), nous observons les résultats suivants : l'activité hydrolytique est clairement supérieure dans les cellules traitées à l'IL-1, par rapport aux cellules-contrôles. L'acide aristolochique seul n'affecte guère cette activité, quand on l'a comparé au contrôle. Enfin, on peut mettre en évidence un effet inhibiteur de l'acide aristolochique sur les fibroblastes de poumons traités à l'IL-1. Ceci rejoint les observations décrites par Rosenthal et al. (1989) bien qu'ils aient obtenu une inhibition plus forte pour la même concentration.

L'EDTA et la quinacrine, par contre ont été testés sur l'enzyme extrait. L'EDTA est un chélateur des ions calcium et la PLA₂, enzyme calcium-dépendante, a besoin de calcium pour être active. Si elle en est privée, nous devrions observer une diminution d'activité de la

PLA₂ (Gilman et Chang, 1990). La quinacrine (encore appelée mépacrine) est connue comme inhibiteur de la PLA₂ affectant le caractère hydrolytique de l'enzyme (Gilman et Chang, 1990; Blackwell, 1977).

Des cellules ont donc été traitées avec l'IL-1 β , puis récoltées et l'activité PLA₂ a été extraite comme décrit précédemment. L'EDTA (7,5 mM final) et la quinacrine (10⁻⁴ M final) ont été rajoutés dans le mélange réactionnel pour le dosage et incubés pendant 3 heures. Après extraction de l'acide palmitique radioactif, on estime la radioactivité libérée. La Fig.III-32 montre une inhibition partielle de l'activité de la PLA₂ par ces deux molécules. Après 3 heures d'incubation, on observe une inhibition plus forte en présence d'EDTA qu'en présence de quinacrine.

N'étant pas arrivé au bout de la mise au point du dosage de la PLA₂, nous devons rester prudents dans l'interprétation de ces résultats préliminaires, mais ils semblent néanmoins encourageants. L'effet relativement peu important de la quinacrine semble a priori étonnant. Mais Lister et al.(1989), testant ce composé sur de la PLA₂ extraite à partir d'une lignée de cellules macrophagiques, arrivent à 20 % seulement d'inhibition pour une concentration en quinacrine de 800 μ M.

IV DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE.

Tout au long de ce travail, nous avons étudié certains aspects de l'activation cellulaire chez les cellules synoviales et les fibroblastes pulmonaires. Nous nous sommes principalement intéressés à l'effet de l'interleukine-1 β (IL-1 β) sur la cascade de l'acide arachidonique et par ce biais, à l'influence qu'elle pouvait avoir sur la première enzyme de cette cascade : la phospholipase A2 (PLA₂).

Nous pouvons résumer nos résultats comme suit :

Dans un premier temps, nous constatons une réponse à l'IL-1 β pour les deux types cellulaires. La vitesse et l'intensité de la réponse sont cependant plus élevées pour les fibroblastes pulmonaires. Ceux-ci semblent également plus sensibles : pour une même concentration en IL-1 β , leur réponse s'avère plus forte que pour les cellules synoviales. Cette première étape ne nous informe cependant pas sur le lieu d'action de l'IL-1 β . A quel niveau de la cascade serait-elle susceptible d'agir, s'agit-il principalement d'une augmentation de production d'acide arachidonique par l'action sur la PLA₂, l'IL-1 β interfère-t-elle également avec d'autres enzymes de la cascade?

C'est face à ces questions que nous avons envisagé l'étude non seulement de l'acide arachidonique, mais également de ses métabolites qui en dérivent suite à une stimulation par l'IL-1 β .

Nous avons donc comparé la production d'acide arachidonique (AA), des prostaglandines (PGs), des leucotriènes et des HETEs dans les deux types cellulaires, après stimulation avec l'IL-1 β .

Les cellules synoviales montrent bien une libération importante d'AA dès les trois premières heures de stimulation par l'IL-1 β . Après 6h de stimulation, cette libération augmente et on décèle un début de production de PGs. Ce qui confirme bien les résultats obtenus par Chang *et al.* (1986) où la production de PGs n'est observée que 6h après la

stimulation à l'IL-1 β . Après 24h, la quantité d'AA relarguée n'augmente que faiblement mais on observe alors une production intense de PGs.

Les fibroblastes pulmonaires répondent quelque peu différemment. Après trois heures de stimulation, dans les différentes conditions, on observe une quantité d'AA relarguée plus élevée que pour les cellules synoviales. Après 6h, on voit apparaître une production de 5-HETEs et de PGs en plus de celle

de l'AA. Après 24h, alors que la production d'AA et d'HETE stagne, on observe une libération massive de PGs, plus marquée chez les cellules synoviales, mais les fibroblastes libèrent également un métabolite inattendu : le LTB₄. Après ces résultats, il était déjà possible d'émettre quelques hypothèses mais une étape supplémentaire dans les démarches a été envisagée : celle testant l'influence d'un inhibiteur de la PLA₂ (Rosenthal et al., 1989) sur le relarguage d'AA stimulé par l'IL-1.

Nous avons donc dans un troisième temps étudié l'effet de l'acide aristolochique sur les cellules et nous n'observons une inhibition que pour les cellules traitées pendant 24 heures avec cet inhibiteur. Cette inhibition était plus ou moins de même ordre sur les deux types de cellules.

Ces trois étapes envisagées jusqu'à présent ne permettent encore qu'une évaluation indirecte de l'activité de l'enzyme. C'est pourquoi nous avons voulu mettre au point un dosage direct de la PLA₂. Après la mise au point du dosage sur la PLA₂ de *Naja*, nous l'avons appliqué aux extraits cellulaires des cellules synoviales et des fibroblastes pulmonaires.

Les deux types cellulaires montrent une activité de PLA₂ après stimulation durant 12 heures par l'IL-1. Mais nous avons rencontré des problèmes pour quantifier l'enzyme extrait à partir de cellules : plus la PLA₂ cellulaire est diluée, plus son activité augmente proportionnellement. Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'inhibiteurs endogènes, empêchant une activité partielle de l'enzyme et qui ne sont pas complètement neutralisés, malgré le traitement au H₂SO₄.

Malgré cette constatation, nous avons voulu tester des molécules, telles que l'EDTA et la quinacrine sur l'extrait cellulaire, ces molécules étant reconnues pour leur action inhibitrice sur la PLA₂. Nous observons effectivement un effet inhibiteur, bien que l'effet de la quinacrine soit faible.

Nous avons également testé l'acide aristolochique sur les cellules. Cette expérience permet également d'observer une diminution dans l'activité de l'enzyme sur les cellules stimulées. La constatation principale de ce dosage était l'augmentation de l'activité de la PLA₂ suite à une stimulation durant 12 heures par l'IL1. Cette activité pouvait être réduite en présence d'inhibiteurs de la PLA₂. Ces dernières observations clôturaient alors le travail entrepris. Dès lors, le regroupement des résultats obtenus pour les deux types cellulaires permettait d'émettre différentes hypothèses celles-ci peuvent s'organiser comme suit :

Suite à une stimulation cellulaire par l'IL-1, celle-ci se fixe sur les récepteurs et envoie son message par des voies encore peu connues actuellement. La PLA₂ membranaire se voit activée et décroche donc plus facilement l'AA des membranes. Ceci correspond bien aux résultats obtenu après 3 heures de stimulation par l'IL-1 β où l'on observe une libération accrue d'AA pour les 2 types cellulaires. Cet AA doit être métabolisé soit par la voie de la cycloxygénase (qui donne les PGs) soit par la voie des lipoxygénases (qui donnent les LTs et les HETE).

Il semble que la voie choisie soit directement dépendante du type cellulaire. Ainsi, pour les cellules synoviales stimulées, l'absence de production de LTs et d'HETEs semble indiquer une "préférence" pour la voie de la cycloxygénase; ceci n'excluant cependant pas l'activité enzymatique de la voie de la lipoxygénase à un taux plus bas lors de la métabolisation de l'AA.

Les fibroblastes pulmonaires stimulés, par contre, indiquent un engagement plus rapide et simultané dans les deux voies. La présence de PGs et d'HETEs soutient cette hypothèse.

Après 24h de stimulation, une production intense de PGs (et principalement de PGE₂ et PGF₂ α) dans les 2 types cellulaires impliquerait une forte activité de la cycloxygénase. Ceci laisserait sous-entendre une deuxième hypothèse selon laquelle la cycloxygénase pourrait, suite à une stimulation par l'IL-1, voir son activité augmenter de façon à produire plus de PGs. Cependant, cette activité serait décalée dans le temps par rapport à celle de la PLA₂. Ceci expliquerait entre autres la production élevée d'AA dans les premiers temps de stimulation par l'IL-1. Celui-ci continuerait à être produit mais une partie serait alors métabolisée par la cycloxygénase, plus tardivement activée. Une synthèse de novo de cette enzyme pourrait même être envisagée.

Si l'on s'en réfère à la littérature, on remarque que 2 types d'idées sont énoncées : Gilman(1987) montre que l'activation de la PLA₂ par l'IL-1 sur les chondrocytes résulterait en une libération d'AA à partir des phospholipides et considère la PLA₂ comme étant la principale enzyme limitante pour la synthèse des prostaglandines

A l'opposé, d'après O'Neill et ses collaborateurs la PLA₂ ne serait pas la seule enzyme limitante dans la production de PGs mais c'est la cycloxygénase qui serait le principal facteur limitant(O'Neill et al., 1986).

A partir de cette hypothèse générale, les cellules synoviales et les fibroblastes pulmonaires pourraient être différenciés dans la façon dont l'IL-1 active la PLA₂ et peut être la cycloxygénase, et la lipoxygénase.

En conclusion, ce travail s'inscrit dans une recherche plus globale du laboratoire, qui a pour but de mieux discriminer les effets respectifs de l'IL-1 sur la PLA₂, la cycloxygénase, mais aussi la lipoxygénase, en soulignant les différences éventuelles entre les deux modèles cellulaires utilisés. Ces différences devront être analysées plus en détail pour en évaluer la signification physiologique.

Mais nos résultats montrant la stimulation par l'IL-1 de LTB₄ et de 5-HETE dans les fibroblastes, méritent d'être soulignés et approfondis dans des expériences futures. Des dosages directs de PGs, LTs et HETEs par les techniques mises au point au laboratoire devraient compléter ce travail. L'utilisation d'autres inhibiteurs de la PLA₂, tels que le

manoalide ou certains analogues non métabolisables de l'AA, mais aussi d'inhibiteurs de la cycloxygénase et de la lipoxygénase, devraient également apporter quelques éclaircissements. Mais la mise au point définitive d'un dosage quantitatif de la PLA₂ reste impérative.

A plus long terme, ce travail de caractérisation de la cascade de l'AA, conjointement avec les autres travaux du laboratoire, abordant les différentes facettes de l'activation par l'IL-1, devrait nous permettre de mieux comprendre certaines dérégulations dans le comportement cellulaire, lors de certaines pathologies inflammatoires chroniques; qu'il s'agisse des cellules synoviales dans les articulations touchées par la polyarthrite rhumatoïde ou qu'il s'agisse des fibroblastes dans le poumon inflammé ou en fibrose.

V. BIBLIOGRAPHIE.

- ANDREOLI, S.P., BAEHNER, R.L. and BERGSTEIN, J.M. (1985). *In vitro* detection of endothelial cell damage using 2-deoxy-D-³H-glucose : comparison with chromium 51, ³H-leucine, ³H-adenine and lactate dehydrogenase. *J. Lab. Clin. Med.*, **106**, 253-261.
- BEREZIAT, G., ETIENNE, J., KOKKINIDIS, M., OLIVIER, J.L. and PERNAS, P. (1990). New trends in mammalian non-pancreatic phospholipase A₂ research. *J. Lipid mediators*, **2**, 159-172.
- BERRIDGE, M. (1985). Les molécules de la communication dans la cellule. *Pour la Science*, **98**, 134-138.
- BHATNAGAR, R., PENFORMIS, H., MAUVIEL, A., LOYAU, G., SAKLATVALA, J. and PUJOL, J.-P. (1986). Interleukin-1 inhibits the synthesis of collagen by fibroblasts. *Biochem. Int.*, **13**, 709-720.
- BILLINGHAM, M.E.J. (1987). Cytokines as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.*, **43**, 350-370.
- BLACKWELL, G.J., DUNCOMBE, W.G., FLOWER, R.J., PARSONS, M.F. and VANE, J.R. (1977). The distribution and metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets during aggregation and its modification by drugs. *J. Pharmacol.*, **59**, 353-366.
- BRAIN, S.D., and WILLIAMS, T.J. (1990). Leukotrienes and inflammation. *Pharmac. Ther.*, **46**, 57-66.
- BUNNING, R.A.D., RICHARDSON, H.J., CRAWFORD, A., SKJODT, H., HUGHES, D., EVANS D.B., GOWEN, M., DOBSON, P.R.M., BROWN, B.L. and RUSSEL, R.G.G. (1986). The effect of interleukin-1 on connective tissue metabolism and its relevance to arthritis. *Agents and Actions*, **Suppl. 18**, 131-152.
- BURMESTER, G.R., DIMITRIU-BONA, A., WATERS, S.J. and WINCHESTER, R.J. (1983). Identification of three major synovial lining cell populations by monoclonal antibodies directed to Ia antigens and antigens associated with monocytes/macrophages and fibroblasts. *Scand. J. Immunol.*, **17**, 69-82.

- BURTON, M. (1990). Régulation de la croissance des cellules synoviales humaines en culture. Etude des mécanismes d'action de l'IL-1. Mémoire de licence, FUNDP.
- CHANG, J., GILMAN, S.C. and LEWIS, A.J. (1986). Interleukin 1 activates phospholipase A₂ in rabbit chondrocytes : a possible signal for IL 1 action. *J. Immunol.*, **136**, 1283-1287.
- CHANG, J., MUSSER, J.H. and MCGREGOR, H. (1989). Phospholipase A₂ : function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 2429-2436.
- CLARCK, M.A., LITTLEJOHN, D., CONWAY, T.M., MONG, S., STEINER, S. and CROOKE, S.T. (1986). Leukotriene D₄ treatment of bovine aortic endothelial cells and murine smooth muscle cells in culture results in an increase in phospholipase A₂ activity. *J. Biol. Chem.*, **261**, 10713-10718.
- CRASTES de PAULET, A. (1983). Les grandes voies métaboliques de l'acide arachidonique. In : "Biochimie de l'inflammation", (Eds., BLOTMAN F., CRASTES de PAULET A., SIMON L.), Masson eds. PARIS, 1-43.
- DAYER, J.M., GOLDRING, S.M., RUSSEL, R.G.G. and ROBINSON, D.R. (1976). Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 945-949.
- DINARELLO, C.A. (1988a). Biology of interleukin-1. *FASEB J.*, **2**, 108-115.
- DINARELLO, C.A. (1988b). Cytokines : Interleukin-1 and tumor necrosis factor (cachectin). In : "Inflammation basic principles and clinical correlates." (GALLIN, I.M., GOLDSTEIN, I.M., and SNYDERMAN, R.), Raven Press eds., New York, 195-208.
- DINARELLO, C.A., BURTON, D.C., IKEJIMA, T., PUREN, A.J., SAVAGE, N. and ROSOFF, P.M. (1990). Interleukin-1 receptors and biological responses. *Yale J. Biol. Med.*, **63**, 87-93.
- DUKOVICH, M., SEVERIN, J.M., WHITE, S.J., YAMAZAKI, S. and MIZEL, S.B. (1986). Stimulation of fibroblast proliferation and prostaglandin production by purified recombinant murine interleukin 1. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **38**, 381-389.

- ELIAS, J.A. and FREUDLICH, B. (1990). Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest.*, **97**, 1439-1445.
- EXTON, J.H. (1988). Mechanisms of action of calcium mobilizing agonists : some variations on a young theme. *FASEB J.*, **2**, 2670-2676
- FAIN, J.H., WALLACE, M.A. and WOJCIKIEWICZ, R.J.H. (1988). Evidence for involvement of guanine nucleotide binding regulatory proteins in the activation of phospholipases by hormones. *FASEB J.*, **2**, 2569-2574.
- GHIARA, P., SCAPIGLIATI, G., CENSINI S., BARTALINI, M., BOSSU, P., ARMELLINI, D., NUTI, S., VOLPINI, G., DALLAI, R., BORASCHI, D. and TAGLIABUE, A (1990). IL-1 receptor subtypes possess distinct binding properties for IL-1 α and IL-1 β . In : "Cytokines and lipocortins in inflammation and differentiation", *Progress in Clinical and Biological Research*, **349**, (Eds. Melli, M. and Parente, L.), Wiley-Liss, New-york, 271-284.
- GILMAN, S.C. (1987). Activation of articular chondrocytes by recombinant human cytokines. *J. Rheumatol.*, **14**, 1002-1007.
- GILMAN, S.C. and CHANG, J. (1990). Characterisation of interleukin-1 induced rabbit chondrocyte phospholipase A₂. *J. Rheumatol.*, **17**, 1392-1396.
- GILMAN, S.C., CHANG, J., ZEIGLER, P.R., UHL, J. and MOCHAN, E. (1988). Interleukin-1 activates phospholipase A₂ in human synovial cells. *Arthr. Rheum.*, **31**, 126-130.
- GIOVINE, F.S., and DUFF, G.W. (1990). Interleukin 1 : the first interleukin *Immunol. Today*, **11**, 13-20.
- GIVENS, K.T., KITADA, S., CHEN, A.K., ROTHSCILLER, J. and LEE, D.A. (1990). Proliferation of human ocular fibroblasts : an assessment of *in vitro* colorimetric assays. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **31**, 1856-1862.
- GODFREY, R.W., JOHNSON, W.J. and HOFFSTEIN, S.T. (1988a) Interleukin-1 stimulation of phospholipase activity in rat synovial fibroblasts. *Arthr. Rheum.*, **31**, 1421-1428.
- GODFREY, R.W., JOHNSON, W.J., NEWMAN, T. and HOFFSTEIN, S.T. (1988b). Interleukin-1 and tumor necrosis factor are not synergistic for human synovial fibroblasts PLA₂ activation and PGE₂ production. *Prostaglandins*, **35**, 107-114.

- GODFREY, R.W., JOHNSON, W.J. and HOFFSTEIN, S.T. (1987). Recombinant tumor necrosis factor and interleukin-1 both stimulate human synovial cell arachidonic acid release and phospholipid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **142**, 235-241.
- GONZALEZ-BURITICA, H., SMITH, D.M. and TURNER, R.A. (1989). Characterization of soluble and cell associated phospholipase A₂ from rheumatoid synovial fluid. *Ann. Rheum. Dis.*, **48**, 557-564.
- GOTO, M., SASANO, M., YAMANAKA, H., MIYASAKA, N., KAMATANI, N., INOUE, K., NISHIOKA, K. and MIYAMOTO, T. (1987). Spontaneous production of interleukin-1-like factor by cloned rheumatoid synovial cells in long term culture. *J. Clin. Invest.*, **80**, 786-796.
- GUALDE, N. (1986). La réaction inflammatoire : une défense agressive. *La recherche*, **177**, 623-633.
- HARRIS, L.K. and FRANSON, R.C. (1991). [1-¹⁴C] Oleate-labeled autoclaved yeast : a membranous substrate for measuring phospholipase A₂ activity in vitro. *Anal. Biochem.*, **193**, 191-196.
- HASSID, A. (1982). Regulation of prostaglandin biosynthesis in cultured cells. *Am. J. Physiol.*, **243**, C205-C211.
- HAYFLICK, L. and MOORHEAD, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid, cell strains. *Exp. Cell. Res.*, **25**, 585-621.
- HEINO, J. (1986). Connective tissue components in synovial fibroblast cultures exposed to interleukin-1 and prostaglandin E₂. *Virchows. Archiv. (Cell pathol.)*, **50**, 313-320.
- HENDLER, P.L., LAVOIE, P.E., WERB, Z., CHAN, J. and SEAMAN, W.E. (1985). Human synovial dendritic cells : direct observation of transition to fibroblasts. *J. Rheumatol.*, **12**, 660-664.
- JOHNSON, L.K., FRANK, S., VADES, P., PRUZANSKI, W., LUSIS, A.J. and SEIHAMER, J.J. (1990) Localisation and evolution of two human phospholipase A₂ genes and two related genetic elements. In "Phospholipase A₂ , Role and function in inflammation", (Eds. Wong Y.K. and Dennis, E.A.), *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. **275**, Plenum Press, New York, 17-34.

- KAISER, E., CHIBA, P. and ZAKI, K. (1990). Phospholipases in biology and medicine. *Clin. Biochem.*, **23**, 349-370.
- KATSUMATA, M., GUPTA, C. and GOLDMAN, A.S. (1986). A rapid assay for activity of phospholipase A₂ using radioactive substrate. *Anal. Biochem.*, **154**, 676-681.
- KERR, J.S., STEVENS, T.M., DAVIS, G.L., MCLAUGHLIN, J.A. and HARRIS, R. (1989). Effects of recombinant interleukin-1 beta on phospholipase A₂ activity, phospholipase A₂ mRNA levels, and eicosanoid formation in rabbit chondrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **165**, 1079-1084.
- KOPICKY-BURD, J.A., KAGEY-SOBOTKA, A., PETERS, S.P., DVORAK, A.M., LENNOX, D.W., LICHTENSTEIN, L.M., WIGLEY, F.M. (1988). Characterisation of human synovial mast cells, *J. Rheumatol.*, **15**, 1326-1333.
- KRAMER, R.M., JOHANSEN, B., HESSION, C. and PEPINSKY, R.B. (1990). Structure and properties of a secretable phospholipase A₂ from human platelets. In "Phospholipase A₂, Role and function in inflammation", (Eds. Wong Y.K. and Dennis, E.A.), *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. **275**, Plenum Press, New York, 169-182.
- KRANE, S.M., (1981). Aspects of the cell biology of the rheumatoid synovial lesion. *Ann. Rheum. Dis*, **40**, 433-448.
- KUENG, W., SILBER, E. and EPPENBERGER, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.*, **182**, 16-19.
- LECOMTE V. (1988). Mise en culture de cellules synoviales. Etude préliminaire de leur activation par l'interleukine 1 β . Mémoire de licence, FUNDP.
- LISTER, M.D., DEEMS, R.A., WATANABE, Y., ULEVICH, R.J. and DENNIS, E.A. (1988). Kinetic analysis of the Ca²⁺-dependent, membrane-bound, macrophage phospholipase A₂ and the effects of arachidonic acid. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7506-7513.
- LISTER, M.D., GLASER, K.B., ULEVITCH, R.J. and DENNIS, E.A. (1989). Inhibition studies on the membrane-associated phospholipase A₂ in vitro and prostaglandin E₂ production in vivo of the macrophage-like P388D₁ cell. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8520-8528.

- MARSHALL, L.A. and CHANG, J.Y. (1990). Pharmacological control of phospholipase A₂ activity in vitro and in vivo. In "Phospholipase A₂, Role and function in inflammation", (Eds. Wong Y.K. and Dennis, E.A.) Advances in experimental medicine and biology, **275**, Plenum Press, New York, 169-182.
- MAUVIEL, A., TEMINE, N., CHARRON, D., LOYAU, G. and PUJOL, J.-P. (1988). Interleukin-1 α and β induce interleukin-1 β gene expression in human dermal fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Comm., **156**, 1209-1214.
- MAYER, B., RAUTER, L., ZENZMAYER, E., GLISPACH, H. and ESTERBAUER, H. (1984). Characterisation of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cultured skin fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta, **795**, 151-161.
- MEYER, T., WICHERT, P. V. and WEINS, D. (1989). A rapid phospholipase A₂ bioassay using ¹⁴C-oleate-labelled *E. Coli* bacterias. Klin Wochenschr., **67**, 133-118.
- MICHIELS, C. and REMACLE, J. (1988). Quantitative study of natural antioxidant systems for cellular nitrofurantoin toxicity. Biochim. Biophys. Acta, **967**, 341-347.
- MIZEL, S.T., O'NEILL, L.A.J., BIRD, T.A. and SAKLATVALA, J. (1990). Cyclic AMP and interleukin 1 signal transduction. Immunol. Today, **11**, 390-394.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth., **65**, 55-63.
- O'NEILL, L.A.J., BARRETT, M.L. and LEWIS, G.P. (1987). Induction of cyclo-oxygenase by interleukin-1 in rheumatoid synovial cells. FEBS Lett., **212**, 35-39.
- POSTLETHWAITE, A.E., RAGHOW, R., STRICKLIN, G.P., POPPLETON, H., SEYER, J.M. and KANG, A.H. (1988). Modulation of fibroblast functions by interleukin-1 : increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 α and β . J. Cell Biol., **106**, 311-318.
- RAFTER, G.W. (1988). Interleukin 1 and rheumatoid arthritis. Med. Hypotheses, **27**, 221-224.

- RASSMUSSEN, H. (1989). Les ions calcium messagers intracellulaires. *Pour la science*, **146**, 86-92.
- REMY, E. (1990). Importance du PAF et des leucotriènes dans la médiation et la régulation des fonctions cellulaires des polymorphonucléaires neutrophiles. Thèse de doctorat, FUNDP.
- REVELL, P.A. (1989). Synovial lining cells. *Rheumatol. Int.*, **9**, 49-51.
- RILLEMA, J.A. (1989). Possible role of phospholipase C in the regulation of cell division in normal and neoplastic cells. *Med. Hypotheses*, **29**, 1-4.
- RINK, T.J. and MERRITT, J.E. (1990). Calcium signalling. *Curr. Opinion Cell Biol.*, **2**, 198-205.
- ROSENTHAL, M.D., VISHWANATH, B.C. and FRANSON, R.C. (1989). Effects of aristolochic acid on phospholipase A₂ activity and arachidonate metabolism of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta*, **1001**, 1-8.
- SAKLATVALA, J., BIRD, T.A., KAUR, P. and O'NEILL, L.A.J. (1990). IL-1 signal transduction : evidence of activation of G protein and protein kinase. In : "Cytokines and lipocortins in inflammation and differentiation, Progress in clinical and biological research", Vol. **349**, (Eds. Melli, M. and Parente, L.), 285-295.
- TAYLOR, S.S., BUBIS, J., TONER-WEBB, J., SARASWAT, L.D., FIRST, E.A., BUECHLER, J.H., KNIGHTON, D.R., SOWADSKI, J., (1988). cAMP-dependent protein kinase : prototype for a family of enzymes. *FASEB J.*, **2**, 2677-2685.
- VARANI, J., HASDAY, J.D., SITRIN, R.G., BRUBAKER, P.G. and HILLEGAS, W.A. (1986). Proteolytic enzymes and arachidonic acid metabolites produced by MRC-5 cells on various microcarrier substrates. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **22**, 575-582.
- WAHL, S.M. (1985). The role of lymphokines and monokines in fibrosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **460**, 225-231.