Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

LICENCE EN ZOOLOGIE

Importance des radicaux libres dans l'activation des fibroblastes de poumon humain par l'interleukine-1

Renard, Patricia

Award date:
1992

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.

Download date: 04. May. 2026

011292

UNITE DE BIOCHIMIE CELLULAIRE

Année académique 1992-1993

Promoteur : Martine RAES

IMPORTANCE DES RADICAUX LIBRES DANS L'ACTIVATION DES FIBROBLASTES DE POUMON HUMAIN PAR L'INTERLEUKINE-1

Patricia
RENARD

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 081/72.44.20

IMPORTANCE DES RADICAUX LIBRES DANS L'ACTIVATION DES FIBROBLASTES DE POUMON PAR L'INTERLEUKINE 1.

Patricia RENARD

Résumé

Schreck et Baeuerle (1991) ont montré que des stress oxydants légers peuvent activer divers types cellulaires. Ils suggèrent que des cytokines comme l'IL-1 pourraient médier une partie de leurs effets en induisant la production de radicaux libres ; ceux-ci provoqueraient, directement ou non, l'activation d'un facteur de transcription, le NF-κB. Le but de ce travail consistait à confirmer cette hypothèse sur les fibroblastes de poumon.

Nous avons d'abord montré que ces cellules répondaient à l'IL-1, notamment par une libération d'IL-6 et une activation de la PLA_2. La secrétion d'IL-6 est totalement inhibée par le pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) et la N-acétylcystéine (NAC), contrairement à l'activation de la PLA_2. Comme ces antioxydants sont connus pour inhiber des mécanismes oxydatifs aboutissant à l'activation du facteur NF-κB, cela suggère que le gène de l'IL-6 dépend de ce facteur.

Nous avons ensuite recherché des conditions oxydantes capables de reproduire les effets observés avec l'IL-1, en utilisant diverses concentrations en H_2O_2 et de nitrofurantoïne. Les conditions expérimentales que nous avons utilisées n'ont pas provoqué de libération d'IL-6, mais bien une activation de la PLA_2. N'étant pas inhibée par le PDTC et le NAC, cette activation de la PLA_2 par l'H_2O_2 ne semble pas liée aux mécanismes oxydatifs qui provoquent l'activation du NF-κB.

Pour terminer, nous avons confirmé ces résultats grâce à la technique de l'EMSA, en vérifiant que l'IL-1 activait directement le NF-κB, mais que cette activation était inhibée par le PDTC et le NAC. L'hypothèse de Schreck et Baeuerle semble donc se vérifier sur les fibroblastes de poumon.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)
Décembre 1992
Promoteur : M. RAES

Je remercie le professeur Remacle de m'avoir accueillie chaleureusement au sein de son laboratoire et de m'avoir guidée par ses bons conseils.

Ma gratitude la plus profonde s'adresse à Martine Raes pour sa grande compétence, son écoute attentive, et surtout pour ses qualités humaines. Merci de m'avoir suivie, encouragée, et poussée toujours plus loin tout au long de cette année.

Un grand merci aussi à toute "l'équipe synoviale", Isabelle, Maggi et Barbara, avec qui j'ai partagé une ambiance de travail, des moments de joie et de déception, et aussi, il faut bien le dire, quelques paquets de chokotoffs...

Je ne risque pas non plus d'oublier Andrée et Edouard : j'ai beaucoup apprécié la franchise, la compétence et le sens de l'organisation d'Andrée, ainsi que la gentillesse, le dévouement et le professionnalisme d'Edouard.

Un clin d'oeil enfin à tous les membres du laboratoire qui ont contribué à créer l'ambiance très sympathique qui y a régné toute cette année. Un merci plus particulier à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail : Thierry, Isabelle, Sylviane, Marc, Doch, Nathalie, ...

Je remercie également C. Haegeman et N. Patestos du laboratoire du Professeur Fiers (RUG) avec qui ce fut un réel plaisir de collaborer. Les membres du laboratoire du Professeur Van Cutsem m'ont également beaucoup aidée dans l'apprentissage de la technique d'analyse d'images.

Une pensée toute particulière enfin est dédiée à mes parents, qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mes études, et plus particulièrement durant les moments difficiles...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. L'INTERLEUKINE -1 1

1.1. LES CYTOKINES 1
1.1.1. Définition 1
1.1.2. Le réseau cytokinique 2

1.2. L'INTERLEUKINE-1 : UNE CYTOKINE-CLE 3
1.2.1. Aspects biochimiques 3
1.2.2. Effets biologiques de l'IL-1 5
A. Effets locaux 5
B. Effets systémiques 8
1.2.3. Mécanismes d'action 10
A. Les récepteurs à l'IL-1 11
B. Les voies d'activation cellulaires 12

2. LES RADICAUX LIBRES. 18

2.1. GENERALITES 18
2.1.1. Définition 18
2.1.2. L'oxygène 18
2.1.3. Les produits de la réduction monovalente de l'O_2 19

2.2. ORIGINE DES DERIVES OXYGENES 21
2.2.1. Sources intracellulaires 21
2.2.2. Sources exogènes et extracellulaire 24

2.3. ROLES BIOLOGIQUES DES DERIVES OXYGENES 25
2.3.1. Peroxydation lipidique 25
2.3.2. L'oxydation des protéines 26
2.3.3. Altération de l'ADN 26
2.3.4. Rôles physiologiques des radicaux libres 26

2.4. DEFENSES DE L' ORGANISME CONTRE LES DERIVES OXYGENES 27

3. LES RADICAUX LIBRES, MESSAGERS SECONDAIRES INDUITS PAR L'IL-1 ? 30

3.1. QU'EST CE QUE LE FACTEUR NF-B 30
3.2. PAR QUELS MECANISMES MOLECULAIRES NF-κB EST-IL ACTIVE ? 32
3.3. QUEL EST LE ROLE DES RADICAUX LIBRES DANS L'ACTIVATION DU FACTEUR NF-κB ? 32

4. MODELE IN VITRO. 34

5. OBJECTIFS. 35

MATERIELS ET METHODES.

1. CULTURE DE CELLULES 36

1.1. MATERIELS 36
1.2. METHODE 37
1.2.1. Fibroblastes pulmonaires 37
A. Repiquage des fibroblastes pulmonaires 37
B. Congélation et décongélation des cellules 38
1.2.2. Chondrocytes 39
A. Mise en culture 39
B. Repiquage des chondrocytes 39

2. TESTS DE CYTOTOXICITE 41

2.1. METHODE AU MTT 42
2.1.1. Matériels 42
2.1.2. Méthode 42
2.2. COLORATION A L'ETHIDIUM BROMIDE 44
2.2.1. Matériels 44

2.2.2. Méthode 44
A. Coloration in situ 44
B. Coloration de cellules en suspension 45

2.3. RELEASE D'ADENINE TRITIEE 45
2.3.1. Matériels 45
2.3.2. Méthode 46

3. DOSAGES DE CYTOKINES 48

3.1. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE -6 48
3.1.1 Matériels 48
3.1.2 Méthode 48
A. Culture de cellules 48
B. Principe du dosage 49
C. Mode opératoire 50
3.2. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE-1ß 50
3.2.1. Matériels 50
3.2.2. Méthode 51
A. Culture de cellules 52
B. Principe du dosage 51
C. Mode opératoire 52

4. TEST DE LIBERATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE RADIOACTIF PREALABLEMENT INCORPORE 53

4.1. MATERIELS 53
4.2. METHODE 54

5. DOSAGE DU CALCIUM LIBRE INTRACELLULAIRE 56

5.1. PRINCIPE DU DOSAGE 56
5.1.1 Matériels 56
5.1.2. Méthode 57
A. Cellules fixées 57
B.Cellules en suspension 59

5.2. ANALYSES D'IMAGES 59
5.2.1. Matériels 59
5.2.2. Méthode 60

6. EMSA 62

6.1. MATERIELS 62
6.2. METHODE 64
6.2.1. Culture de cellules et extraction des protéines 64
6.2.2. Réaction de liaison entre la sonde et les protéines 65
6.2.3. Electrophorèse et révélation des gels 65
6.2.4 Quantification 66

RESULTATS ET DISCUSSION

1. ACTION DE L'IL-1 SUR LES DIFFERENTS TEMOINS DE L'ACTIVATION CELLULAIRE . 67
1.1. EFFETS DE L'IL-1 SUR L'EVOLUTION DE LA CONCENTRATION CALCIQUE DANS LE CYTOSOL 67
1.1.1. Analyses spectrofluorométriques 67
A.Cellules fixées 67
B. Cellules en suspension 68
1.1.2. Imagerie de fluorescence 69
1.2. EFFETS DE L'IL-1 SUR L'ACTIVATION DE LA PLA_2 70
1.3. EFFETS DE L'IL-1 SUR LA PRODUCTION D'IL-6 71

2. EFFETS D'ANTIOXYDANT SUR LES REPONSES CELLULAIRES INDUITES PAR L'IL-1 72
2.1. EFFETS DU PDTC ET DU NAC SUR L'ACTIVATION DE LA PLA_2 72
2.2. EFFETS DES ANTIOXYDANTS SUR LA LIBERATION D'IL-6 INDUITE PAR L'IL-1

73

3. RECHERCHE DE CONDITIONS OXYDANTES REPRODUISANT LES EFFETS OBSERVES AVEC L'IL-1 77

3.1. L'H_2O_2 77

3.1.1. Effets de l'H_2O_2 sur la libération de l'acide arachidonique 78

3.1.2. Effets de l'H_2O_2 sur la libération d'IL-6 79

3.2. LA NITROFURANTOINE 80

4. APPROCHE DIRECTE DE L'ACTIVATION DU NF-KB PAR LA TECHNIQUE DE L'EMSA. 81

I. INTRODUCTION

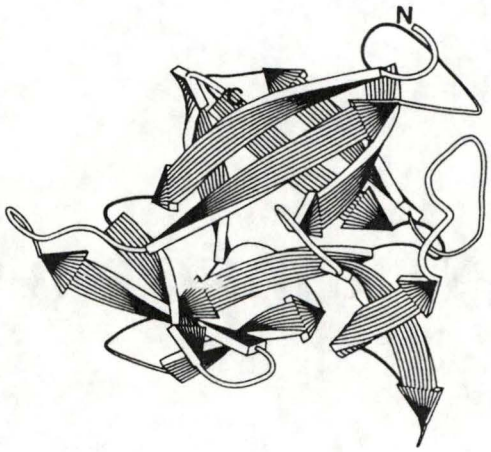


Fig. I-1 : Structure schématique de l'IL-1β.

Les flèches représentent les liens β ; le N et le C indiquent les extrémités carboxy- et amino-terminales. (D'après Priestle et al., 1990).

1. L'INTERLEUKINE-1

1.1. LES CYTOKINES

1.1.1. DEFINITION

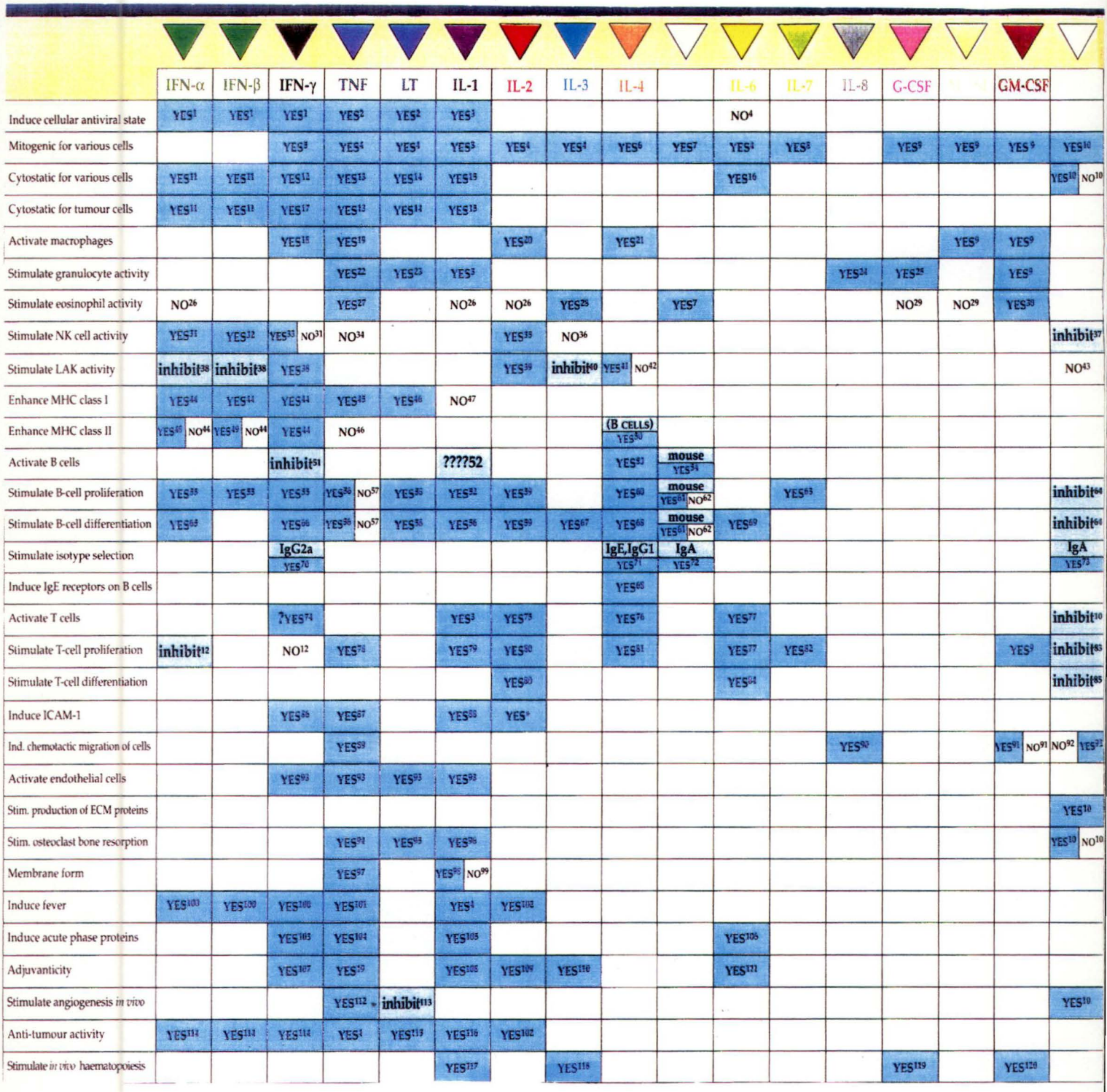
La plupart des cytokines sont des glycoprotéines d'un poids moléculaire variant de 15 à 25 kDa, de structure non immunoglobulinique. L'interleukine-1 ß (IL-1ß), par exemple, a la forme d'un tétrahèdre composé de 6 paires de brins ß anti-parallèles (Kelso, 1990) (fig. I.1.).

Ces médiateurs, produits in vitro et in vivo, agissent à de faibles concentrations (de l'ordre de 10 picomolaire), ce qui explique que le nombre de récepteurs cytokiniques soit largement inférieur au nombre de récepteurs hormonaux. Les récepteurs cytokiniques sont bien sûr inductibles et modulables.

La plupart des cytokines sont synthétisées de novo en réponse à un stimulus particulier, sauf quelques exceptions comme l'interleukine 6 (IL-6) et le Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) présents de façon constitutive dans le sérum (Kelso, 1990). Des mRNA codant pour l'IL-1, l'IL-6 et le Tumor Necrosis Factor α (TNFα) ont été détectés également dans des tissus sains (Tovey et al, 1988).

En général, la majorité des cytokines agissent localement, de façon autocrine ou paracrine, et se caractérisent par une production limitée dans le temps après l'induction. Ceci s'explique par la rapide dégradation de leur mRNA, vraisemblablement due à des séquences riches en -AU dans la région 3' non traduite des mRNA. De plus, la production de lymphoknes (cytokines produites par des lymphocytes) peut être localisée à un seul pôle de la cellule productrice et dirigée vers une cible précise.

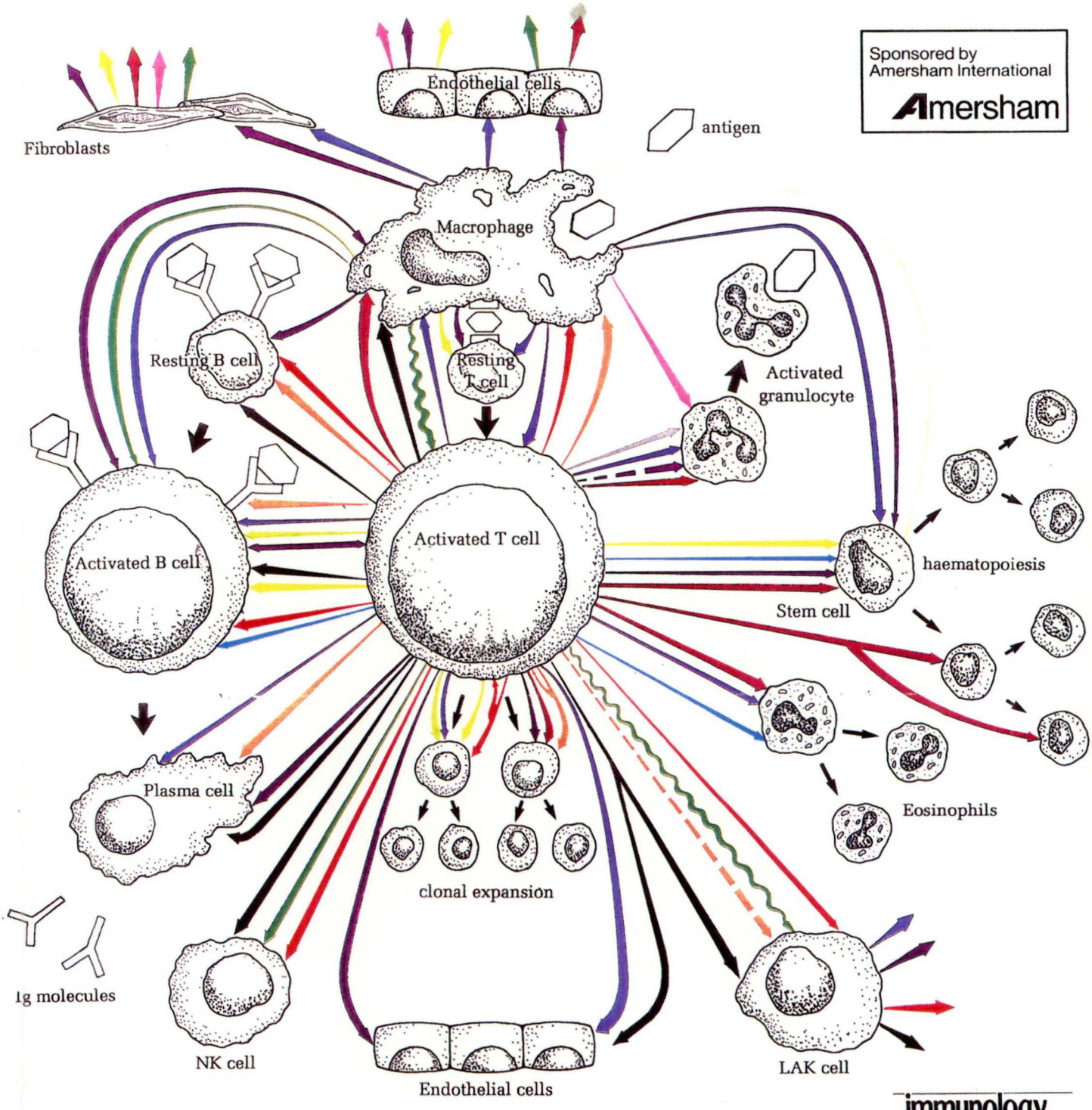
Cependant, certaines cytokines peuvent aussi manifester des effets systémiques qui les rapprochent de facteurs endocriniens. Nous avons déjà parlé de l'IL-6 et du M-CSF qui se trouvent de façon constitutive dans le sérum, mais dans certains cas pathologiques, on détecte dans les fluides biologiques plusieurs autres cytokines comme l'IL-6 et le M-CSF, et aussi le Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) et le TNFα.



	IFN-α	IFN-β	IFN-γ	TNF	LT	IL-1	IL-2	IL-3	IL-4		IL-6	IL-7	IL-8	G-CSF		GM-CSF	
Induce cellular antiviral state	YES[1]	YES[1]	YES[1]	YES[2]	YES[2]	YES[3]					NO[4]						
Mitogenic for various cells			YES[8]	YES[4]	YES[4]	YES[3]	YES[4]	YES[4]	YES[6]	YES[7]	YES[3]	YES[8]		YES[9]	YES[9]	YES[9]	YES[10]
Cytostatic for various cells	YES[11]	YES[11]	YES[12]	YES[13]	YES[14]	YES[15]					YES[16]						YES[10] NO[10]
Cytostatic for tumour cells	YES[11]	YES[11]	YES[17]	YES[13]	YES[14]	YES[15]											
Activate macrophages			YES[18]	YES[19]			YES[20]		YES[21]						YES[9]	YES[9]	
Stimulate granulocyte activity				YES[22]	YES[23]	YES[3]							YES[24]	YES[25]		YES[9]	
Stimulate eosinophil activity	NO[26]			YES[27]		NO[26]	NO[26]	YES[28]		YES[7]				NO[29]	NO[29]	YES[30]	
Stimulate NK cell activity	YES[31]	YES[32]	YES[33] NO[31]	NO[34]			YES[35]	NO[36]									inhibit[37]
Stimulate LAK activity	inhibit[38]	inhibit[38]	YES[38]				YES[39]	inhibit[40]	YES[41] NO[42]								NO[43]
Enhance MHC class I	YES[44]	YES[44]	YES[44]	YES[45]	YES[46]	NO[47]											
Enhance MHC class II	YES[48] NO[44]	YES[49] NO[44]	YES[44]	NO[46]					(B CELLS) YES[50]								
Activate B cells			inhibit[51]			???52			YES[53]	mouse YES[54]							
Stimulate B-cell proliferation	YES[55]	YES[55]	YES[55]	YES[56] NO[57]	YES[55]	YES[52]	YES[59]		YES[60]	mouse YES[61] NO[62]		YES[63]					inhibit[64]
Stimulate B-cell differentiation	YES[65]		YES[66]	YES[56] NO[57]	YES[55]	YES[56]	YES[59]	YES[67]	YES[68]	mouse YES[61] NO[62]	YES[69]						inhibit[64]
Stimulate isotype selection			IgG2a YES[70]						IgE,IgG1 YES[71]	IgA YES[72]							IgA YES[72]
Induce IgE receptors on B cells									YES[68]								
Activate T cells			?YES[74]			YES[3]	YES[73]		YES[76]		YES[77]						inhibit[10]
Stimulate T-cell proliferation	inhibit[12]		NO[12]	YES[78]		YES[79]	YES[80]		YES[81]		YES[77]	YES[82]				YES[9]	inhibit[83]
Stimulate T-cell differentiation							YES[80]				YES[84]						inhibit[85]
Induce ICAM-1			YES[86]	YES[87]		YES[88]	YES*										
Ind. chemotactic migration of cells				YES[89]									YES[90]			YES[91] NO[91]	NO[92] YES[92]
Activate endothelial cells			YES[93]	YES[93]	YES[93]	YES[93]											
Stim. production of ECM proteins																	YES[10]
Stim. osteoclast bone resorption				YES[94]	YES[95]	YES[96]											YES[10] NO[10]
Membrane form				YES[97]		YES[98] NO[99]											
Induce fever	YES[100]	YES[100]	YES[100]	YES[101]		YES[4]	YES[102]										
Induce acute phase proteins			YES[103]	YES[104]		YES[105]					YES[106]						
Adjuvanticity			YES[107]	YES[19]		YES[108]	YES[109]	YES[110]			YES[111]						
Stimulate angiogenesis *in vivo*				YES[112]	inhibit[113]												YES[10]
Anti-tumour activity	YES[114]	YES[114]	YES[114]	YES[4]	YES[115]	YES[116]	YES[102]										
Stimulate *in vivo* haematopoiesis						YES[117]		YES[118]						YES[119]		YES[120]	

Fig. I-2 : Complexité du réseau cytokinique. (D'après Balkwill, 1992).

Sponsored by
Amersham International
Amersham



immunology today
September 1989

Guide to Figure and Table

straight arrows ——→ stimulatory wavy arrows ~~~→ inhibitory dashed arrows - - -→ contentious

Les cytokines, en général, jouent un rôle capital dans tous les systèmes biologiques : non seulement elles entrent en jeu dans toutes les étapes du fonctionnement du système immunitaire, mais encore elles influencent également la croissance et la différenciation de nombreux types cellulaires en dehors du système immunitaire. De plus, les cytokines constitueraient un mode de communication entre le système immunitaire d'une part et les systèmes hormonaux et endocriniens d'autre part.

1.1.2. LE RESEAU CYTOKINIQUE

L'ensemble des cytokines constitue un réseau de médiateurs extrêmement complexe (fig I.2), dont l'enchevêtrement n'a pu encore être totalement éclairci pour plusieurs raisons :

- La pléiotropie caractérise les cytokines, ce qui signifie qu'une seule cytokine peut manifester différents effets biologiques. L'IL-1 dont nous parlerons au point 1.2. constitue un exemple parfait de médiateur pléiotrope.

- Les cytokines sont redondantes, c'est-à-dire que plusieurs cytokines différentes peuvent exercer des fonctions semblables.

- Une même cellule peut synthétiser plusieurs cytokines différentes en même temps.

-L'effet de plusieurs cytokines représente rarement la somme des effets de chacune d'elles : il existe des synergies et des antagonismes entre certaines cytokines. De plus, des effets amplificateurs surviennent grâce à des cascades cytokiniques où certaines cytokines peuvent en induire d'autres (Kelso, 1989).

- Les effets biologiques d'une cytokine dépendent à la fois du type cellulaire sur lequel elle agit et de l'état de différenciation de la cellule cible.

L'intense complexité de ce réseau cytokinique a longtemps empêché l'interprétation claire de différents phénomènes. Ce n'est que grâce à des outils biologiques récents comme les cytokines recombinantes et d'anticorps monoclonaux que le problème s'est partiellement éclairci.

Name	Synonym
IL-1	Lymphocyte activating factor (LAF)
	Thymocyte activating factor (TAF)
	B-cell activating factor (BAF)
	Endogenous pyrogen (EP)
	Leucocyte endogenous mediator (LEM)
	Proteolysis inducing factor (PIF)
	Catabolin
	Mononuclear cell factors (MCF)
IL-2	T-cell-derived growth factor (TCGF)
	T-cell maturation/stimulating factor (TMF/TSF)
	Killer helper factor (KHF)
	T-cell replacing factor (TRF)
IL-3	Mast cell growth factor (MCGF)
	P-cell stimulating factor (PSF)
	Burst-promoting activity (BPA)
	Haemopoietic colony growth factor (HCGF)
	Erythroid colony stimulating factor (ECSF)
	Megakaryocyte colony stimulating factor (Meg-CSF)
	Eosinophil colony stimulating factor (Eo-CSF)
	Multiple colony stimulating factor (Multi-CSF)
IL-4	B-cell growth factor-1 (BCGF-1)
	B-cell stimulatory factor-1 (BSF-1)
	B-cell stimulatory factor-p1 (BSF-p1)
	B-cell differentiation factor-γ (BCDF-γ)
	Macrophage fusion factor (MFF)
	Macrophage activating factor (MAF)
	IgG1-inducing factor (IIF)
IL-5	T-cell replacing factor (TRF)
	B-cell growth factor-II (BCGF-II)
	Eosinophil differentiation factor (EDF)
	Killer helper factor (KHF)
	IgA-enhancing factor (IgA-EF)
	Eosinophil colony stimulating factor (Eo-CSF)
	IL-4
IL-6	Interferon-β2 (IFN-β2)
	B-cell differentiation factor (BCDF)
	Hybridoma/plasmacytoma-1 (HP-1)
	Plasmacytoma growth factor (PCT-GF)
	Hybridoma growth factor (HGF)
	B-cell stimulatory factor-2 (BSF-2)
	26kDa protein
	Hybridoma/plasmacytoma growth factor (H/PGF)
	B-cell stimulatory factor-p2 (BSF-p2)
IFN-γ	Macrophage-activating factor (MAF)
	Migration inhibitory factor (MIF)
	T-cell replacing factor (TRF)

IFN, interferon; IL, interleukin.

Fig. I-3 : Liste des anciens noms attribués aux différentes interleukines et à l'interféron γ. (D'après Klein, 1990).

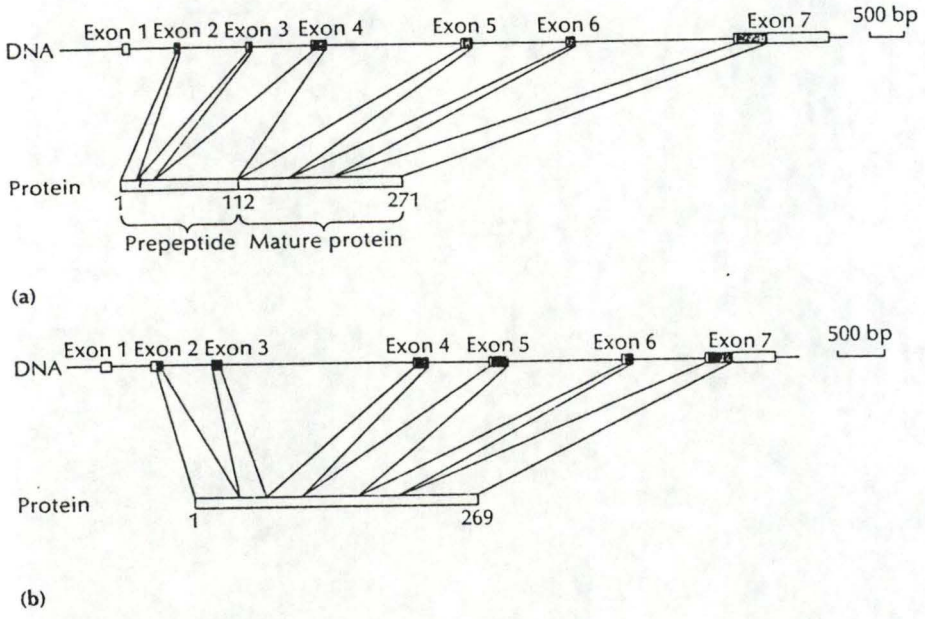


Fig. I-4 : Organisation des gènes humains codant pour l'IL-1α (a) et l'IL-1β (b). (D'après Klein, 1990).

Parmi cet éventail de cytokines, nous avons choisi de nous intéresser à un médiateur central : l'interleukine-1.

1.2. L'INTERLEUKINE-1 : UNE CYTOKINE-CLEF

Depuis de nombreuses années déjà, l'IL-1 a été identifiée sous différentes dénominations relatives à quelques-unes de ses fonctions. Par exemple, on mit en évidence, dès 1940, le "pyrogène endogène" présent dans des exsudats inflammatoires qui, lorsqu'ils étaient injectés à des animaux, provoquaient l'apparition de fièvre. Par la suite fut découvert le "médiateur endogène leucocytaire" capable d'augmenter la synthèse de protéines hépatiques, ainsi que le "leucocyte activating factor" (1972), co-activateur de lymphocytes T activés. Plus tard, il est apparu que toutes ces activités biologiques et encore bien d'autres étaient le fruit d'une seule cytokine : l'IL-1 (fig. I.3.).

Ce très bref aperçu historique de la découverte de l'IL-1 nous donne déjà un avant-goût de la grande pléiotropie de cette cytokine qui, d'après O'Neill (1992) constitue "le plus puissant et le plus multifonctionnel activateur cellulaire décrit en biologie cellulaire jusqu'à nos jours". En effet, au cours d'une réaction inflammatoire locale, l'IL-1 est un médiateur-clef qui affecte presque toutes les cellules en présence. D'un point de vue systémique, l'IL-1 affecte presque tous les tissus et entraîne même des conséquences comportementales.

Après l'étude des caractéristiques biochimiques de l'IL-1, nous aborderons les fonctions biologiques, locales et systémiques, de la cytokine. Nous parlerons enfin de l'aspect moléculaire de l'activation cellulaire par cette cytokine.

1.2.1. ASPECTS BIOCHIMIQUES

L'IL-1 se présente sous deux formes de même poids moléculaire : l'IL-1α (forme acide, point isoélectrique = 5) et l'IL-1ß (neutre, point isoélectrique = 7). Ces deux molécules se lient au même récepteur cellulaire et remplissent les mêmes fonctions biologiques, mais elles diffèrent au niveau de leur structure primaire : leur séquence en acides aminés présente seulement de 23 à 33 % d'homologie (Ulrich, 1990). Les gènes de l'IL-1 α et de l'IL-1 ß, de structure semblable (fig. I.4.), sont situés sur le chromosome 2 chez la souris comme chez l'homme (Kelso, 1989).

L'IL-1 est d'abord synthétisée sous forme d'un précurseur de 31 kDa qui peut être processé dans le cytoplasme en un polypeptide de 22 kDa. On retrouve ces deux molécules dans le cytoplasme et la forme de 22 kDa peut également s'associer à la membrane plasmique pour constituer l'"IL-1 liée à la membrane", forme biologiquement active principale responsable des effets autocrines et paracrines de l'IL-1. Il semblerait que la majorité de l'"IL-1 liée à la membrane" se compose d'IL-1α, tandis que la plupart des molécules d'IL-1ß seraient maturées en un peptide de 17,5 kDa destiné à remplir les fonctions systémiques imputées à l'IL-1 ß (Dinarello et al, 1989). Ceci expliquerait que l'IL-1 ß domine dans la circulation et les liquides biologiques (liquide cérébrospinal, liquide synovial, sérum).

La maturation et la secrétion de l'IL-1 posent question depuis longtemps, et le problème n'est pas encore totalement élucidé, pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, la séquence peptidique de l'IL-1 ne contient pas de séquence signal hydrophobe classique dictant la secrétion de la protéine.

Ensuite, on détecte le précurseur intact dans le surnageant de macrophages activés, la source principale d'IL-1, ce qui laisse à penser que le processing de la molécule n'est pas nécessaire à sa secrétion.

De plus, étant donné que le peptide mature de 17,5 kDa ne se trouve pas dans le cytoplasme, il est probable que la maturation finale du peptide se déroule pendant ou après la secrétion (Mizel, 1989).

Beuscher et al (1990) suggère que lorsque les macrophages sont suffisamment activés, ils secrètent non seulement le précurseur de l'IL-1ß, mais aussi les enzymes protéolytiques permettant sa maturation. Notons que cette protéolyse engendre aussi des fragments peptidiques de plus petite taille et dotés de la même activité biologique que la molécule de 17,5 kDa (Dinarello et al, 1989).

L'IL-1 induit sa propre synthèse chez les cellules qu'elle active (Shindler et al, 1990),ainsi que l' augmentation de l'expression de son propre récepteur (Akahoshi et al, 1988), ce qui contribue à amplifier les effets induits par la cytokine.

Les monocytes et macrophages activés représentent la principale source d'IL-1, bien que de nombreuses autres cellules soient capables d'en synthétiser. Les monocytes et macrophages sont quantitativement de meilleurs producteurs d'IL-1 car ils possèdent la plus

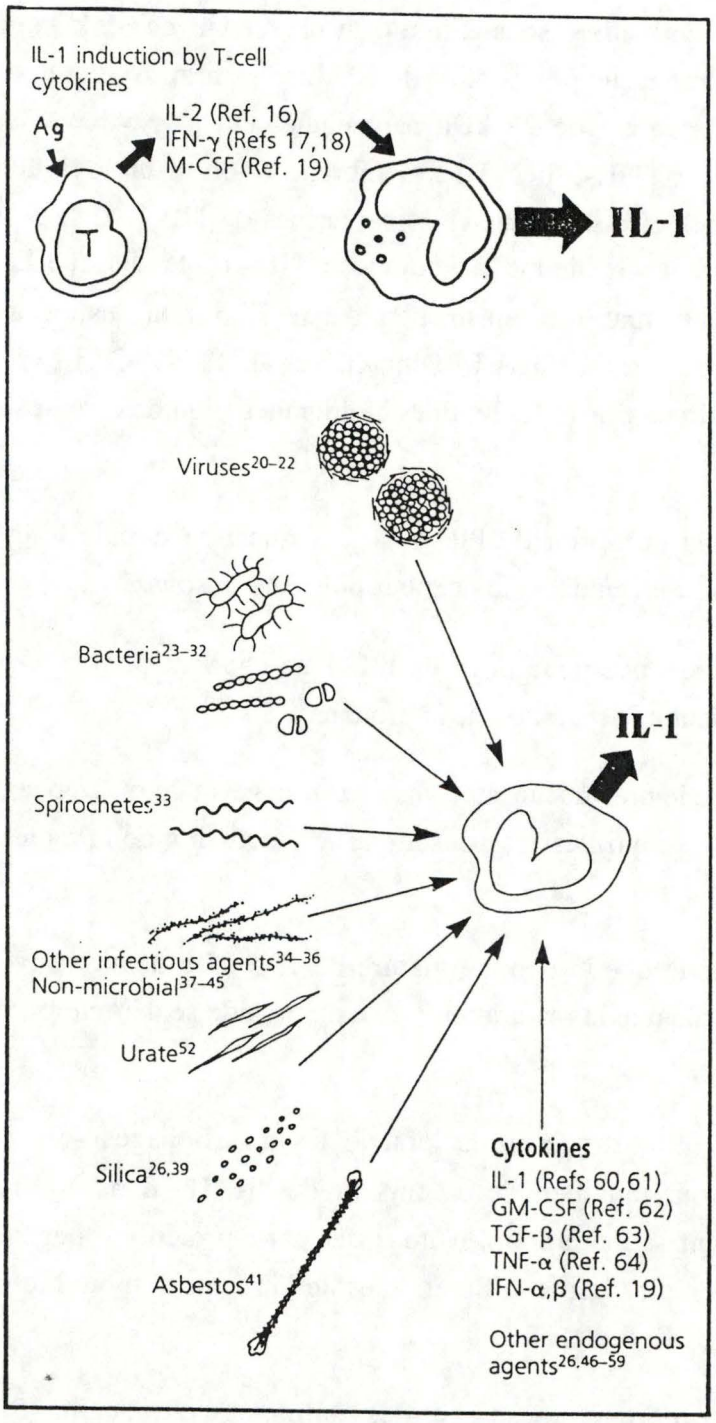


Fig. I-5 : Divers stimuli peuvent induire la synthèse d'IL-1 par plusieurs types cellulaires (modifié d'après di Giovane et Duff, 1990).

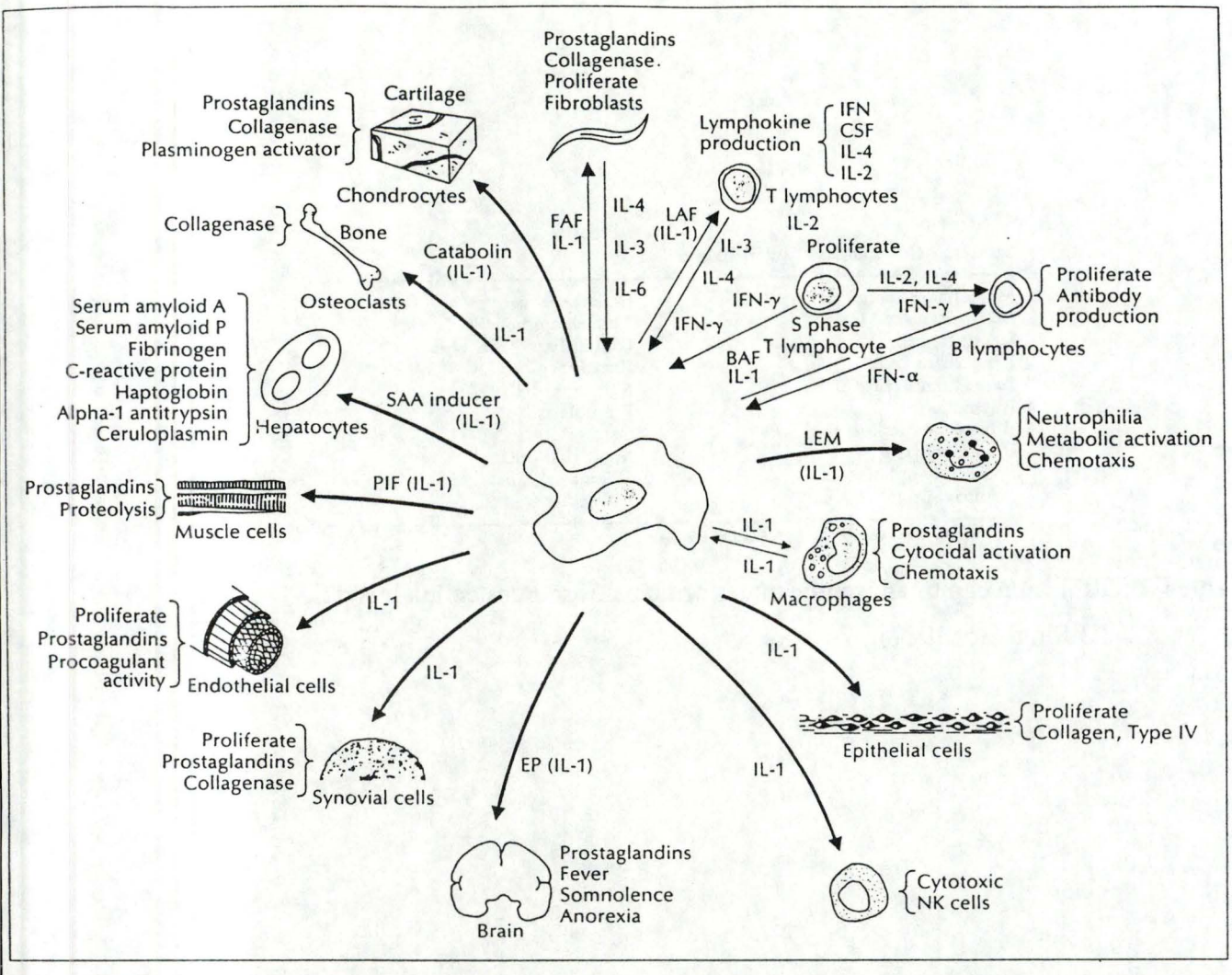


Fig. I-6 : Effets de l'IL-1 sur différents types cellulaires. (Klein, 1990).

Table 2 Cell sources of interleukin α and β

Macrophage/monocyte*	Endothelial cells
Macrophage cell lines	Corneal epithelial cells
Dendritic cells	Gingival epithelial cells
Langerhans cells	Keratinocytes
Large granular lymphocytes	Mesangial cells
B lymphocyte*	Fibroblasts
B lymphocytic lines*	Osteoblasts
B lymphoblasts	Microglial cells
Some T lymphocytes*	Glioma cell lines
Neutrophils	Astrocytes

*Presently known sources of TNF and lymphotoxin

Table I-1 : Tableau récapitulatif reprenant les principales sources cellulaires d'IL-1 α et β. (Billingham, 1987).

grande capacité de processer le précurseur polypeptidique de l'IL-1, probablement grâce à leur secrétion importante d'élastase et de sérine protéases (Dinarello et Savage, 1988).

De nombreuses autres cellules peuvent produire de l'IL-1 (table I.1) à condition qu'elles reçoivent un stimulus adéquat . Les lipopolysaccharides bactériens (LPS), par exemple, stimulent la production d'IL-1 chez la plupart de ces cellules. Les macrophages et monocytes eux, répondent aussi à bien d'autres stimuli comme les complexes immuns, les lymphocytes T activés et leurs produits (IL-6, TNF, ...), le PMA (phorbol myristate acetate), les RNA double brin, les levures, les cristaux d'urate, ... (fig. I.5.).

La réponse suit rapidement l'activation cellulaire : dans des monocytes activés par des LPS, la présence d'IL-1 apparaît à l'intérieur de la cellule dans les 30 minutes qui suivent le stimulus, et dans le milieu extérieur dans les 60 minutes (Klein, 1990).

1.2.2. EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-1

L'IL-1 affecte de nombreux types cellulaires (fig I.6.). Ses actions peuvent se manifester de façon autocrine ou paracrine dans le cas d'inflammations locales, ou bien de manière systémique lors d'infections généralisées. Nous envisagerons successivement ces deux types d'action.

A. EFFETS LOCAUX

A.1. L'IL-1 induit la production d'autres cytokines

L'IL-1 stimule la synthèse de plusieurs cytokines comme l'IL-1 par les lymphocytes B et les macrophages / monocytes, l'IL-2 par les lymphocytes T, l'IL-4 par les lymphocytes T activés, l'IL-6 par les thymocytes, les chondrocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales, l'IL-8 par les fibroblastes et les cellules endothéliales, le TNF par les fibroblastes, le Granulocytes and Macrophages Colony Stimulating Factor (GM-CSF) par les lymphocytes T activés, le G-CSF et le M-CSF par les cellules endothéliales, et de façon indirecte l'IL-3 par les lymphocytes T activés (Platanias et Vogelzang, 1990 ; Thiele et Lipsky, 1989 ; Van Damme, 1990). Cette énumération de cytokines produites par différents types cellulaires n'est d'ailleurs pas exhaustive.

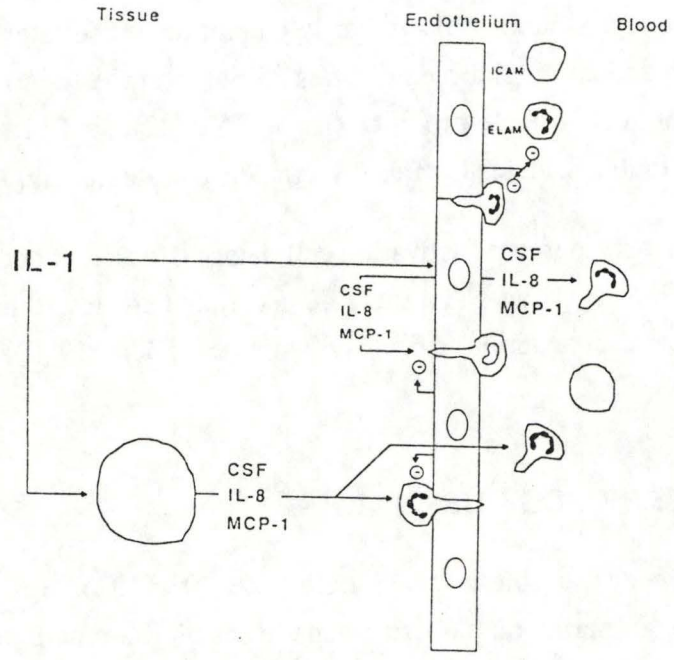


Fig. I-7 : Interactions entre les cytokines et l'endothélium dans la régulation de l'infiltration des leucocytes. L'IL-1 n'est pas directement chémotactique, mais elle induit l'expression d'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) et la production de facteur chémotactiques par les cellules endothéliales. (Thiele et Lipsky, 1989).

Cette caractéristique que possède l'IL-1 de provoquer la synthèse d'autres cytokines a souvent brouillé les pistes, et il s'est avéré que certains effets que l'on attribuait à la première des interleukines étaient médiés par une de ces cytokines secondaires.

A.2. L'IL-1 affecte la paroi vasculaire

L'IL-1 est responsable de toute une série d'événements cellulaires et biochimiques qui entraînent la vasodilation des vaisseaux sanguins, la formation de caillots et l'infiltration cellulaire. Globalement, l'IL-1 contribue à contenir l'infection localisée.

La vasodilatation

La phospholipase A_2 (PLA_2), une enzyme membranaire responsable de la transformation de l'acide arachidonique en médiateurs de l'inflammation comme les prostaglandines (PGs), les leucotriènes et le platelet activating factor (PAF), répond à la stimulation cellulaire par l'IL-1. L'activation de la PLA_2 des cellules endothéliales par l'IL-1 entraîne la dilatation des vaisseaux. En effet, la PLA_2 activée libère des substances vasodilatatrices comme la prostaglandine E_1 (PGE_1), la prostaglandine E_2 (PGE_2) et le PAF, qui a aussi la propriété de perméabiliser la membrane.

De plus, l'IL-1 active aussi les mastocytes qui libèrent toute une série de médiateurs de l'inflammation dont des vasodilatateurs (histamine, sérotonine, PAF, PGs, ...).

L'adhésion et l'infiltration des leucocytes

L'augmentation de flux sanguin provoquée par la vasodilatation permet d'amener les cellules effectrices sur le site inflammatoire.

L'IL-1 augmente l'expression de molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule). L'ICAM-1 facilite l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium vasculaire, étape préliminaire à la migration des globules blancs dans le tissu extravasculaire (Dinarello, 1988) (fig I.7.).

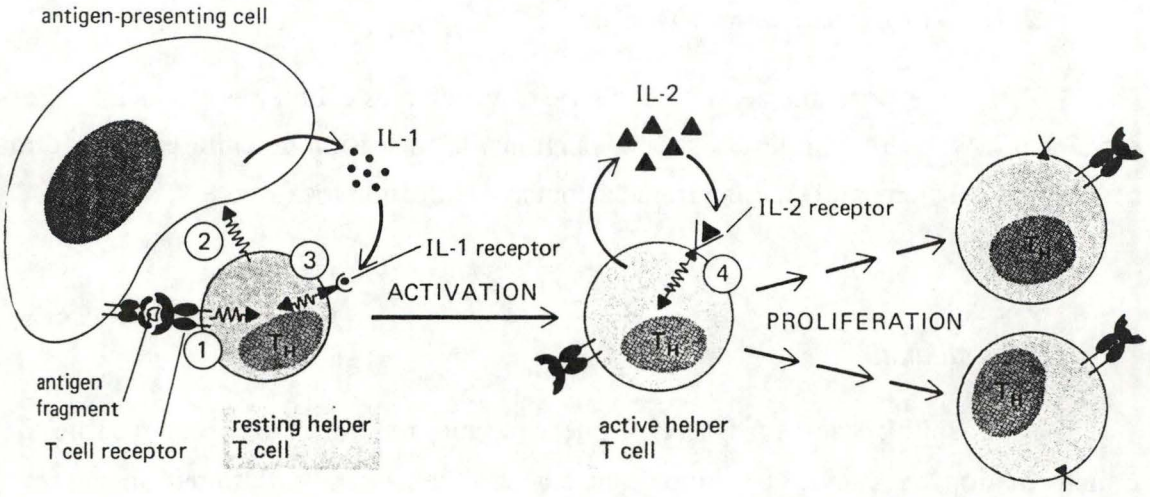


Fig. I-8 : Séquence des signaux menant à la prolifération des lymphocytes T.

Signal 1 : la liaison du lymphocyte T à l'antigène porté par une cellule présentatrice de l'antigène active la voie des phospholipides inositol.

Signal 2 : le signal 1 entraîne la stimulation de la cellule présentatrice de l'antigène par le lymphocyte T, suivant un mécanisme inconnu.

Signal 3 : en réponse, la cellule présentatrice secrète des interleukines, dont l'IL-1, qui contribuent à activer le lymphocyte. Le lymphocyte T produit des récepteurs de l'IL-2 et synthétise de l'IL-2.

Signal 4 : la liaison de l'IL-2 à son récepteur stimule la croissance et la division cellulaire.

(D'après Alberts, 1989).

En outre, l'IL-1 constitue un facteur chémotactique pour certains leucocytes et induit la synthèse d'autres facteurs chémotactiques par différents types cellulaires (fig I.7). Par exemple, l'IL-1 provoque la synthèse de PAF et d'IL-6, tous deux chémotactiques, par les cellules endothéliales.

La coagulation

L'IL-1 entraîne une augmentation des propriétés coagulantes de l'endothélium par la production accrue du facteur tissulaire de la voie extrinsèque de la coagulation. Ceci aboutit à la transformation de prothrombine en thrombine qui décompose le fibrinogène en fibrine.

Remarquons que la thrombine est elle-même un inducteur de la synthèse de l'IL-1, ce qui engendre un mécanisme d'auto-amplification.

Cette activité coagulante de l'IL-1 est renforcée par deux substances, elles-mêmes produites par l'endothélium activé par l'IL-1 : tout d'abord le PAF, facteur agrégateur de plaquettes et activateur de la synthèse de thromboxane, et ensuite l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, qui bloque la transformation de plasminogène en plasmine et donc la protéolyse de la fibrine (Dinarello et al 1989).

A.3. L'IL-1 affecte les cellules immunocompétentes

L'IL-1 et le TNF sont par excellence des cytokines redondantes qui agissent en synergie (Dinarello et al, 1987). Cependant, la principale différence entre ces deux médiateurs réside dans la propriété que possède l'IL-1 d'activer les lymphocytes directement et indirectement. L'IL-1 sert de messager entre la défense immunitaire non spécifique et les effecteurs de la réponse immunitaire spécifique : les lymphocytes T et B (Gualde, 1986). L'IL-1 module également l'activité des cellules Natural Killer (cellules NK).

L'IL-1 peut être considérée comme un co-facteur essentiel de l'activation des lymphocytes T (fig I.8.). En effet, l'activation de ceux-ci nécessite deux signaux complémentaires : le premier est fourni par la reconnaissance entre le TCR (T Cell Receptor) et l'antigène présenté par une molécule d'histocompatibilité de classe II située à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène. Le second signal provient de l'IL-1

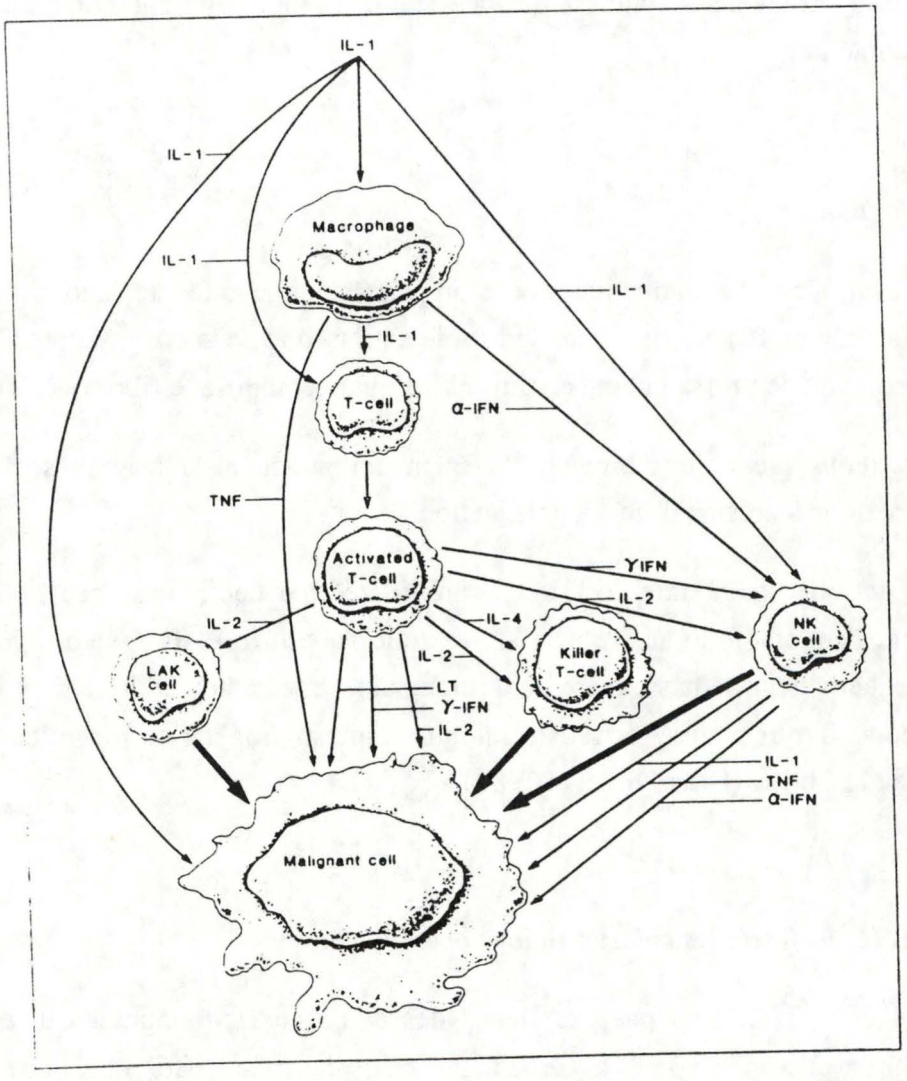


Fig. I-9 : Actions anti-tumorales de l'IL-1. (D'après Platanias et Vogelzang, 1990).

Central nervous system	Metabolic
Fever	Hypozincemia, hypoferremia
Brain PGE-2 synthesis	Decreased cytochrome P450 enzyme
Increased ACTH	Increased acute phase proteins
Increased corticosteroid	Decreased albumin synthesis
Increased slow wave sleep	Increased survival rate in mice
Decreased appetite	Increased bacterial clearance
	Increased (high dose decreased) insulin
	Lipoprotein lipase inhibition
	Increased sodium excretion
Hematologic	**Vascular wall**
Neutrophilia	Increased leukocyte adherence
Lymphopenia	Increased PGI and PGE synthesis
Neutrophil TbxA generation	Increased platelet-activating factor
Tumor necrosis	Increased procoagulant activity
Bone marrow release	Increased plasminogen activator
Inhibitor	
	Hypotension
	Decreased systemic vascular resistance
	Decreased central venous pressure
	Increased cardiac output
	Increased heart rate
	Decreased blood pH (lactic acidosis)

Table I-2 : Effets systématiques de l'IL-1. (Dinarello, 1989).

synthétisée par ces cellules présentatrices de l'antigène ou par les macrophages présents dans le tissu enflammé.

L'IL-1 affecte également les lymphocytes B, provoquant leur activation, leur croissance et leur différenciation. Notons que l'IL-1 agit de concert avec l'IL-5 et l'IL-6 pour induire la différenciation, ainsi qu'avec l'IL-4 en ce qui concerne la prolifération et l'activation des cellules B (Platanias et Vogelzang, 1990).

L'IL-1 possède des propriétés anti-tumorales probablement médiées par trois mécanismes différents (fig I.9.). Le premier consiste en un effet cytotoxique direct de l'IL-1 observé sur des cellules malignes. Le deuxième mécanisme implique l'activation de cellules du système immunitaire, les cellules NK, qui se lient aux cellules tumorales et provoquent leur lyse. On a montré à ce sujet que des synergies existent entre l'IL-1 d'une part, et l'IL-2, l'interféron α (IFNα) et l'interféron γ (IFNγ) d'autre part. Le dernier mécanisme est lié à une autre cytokine tumoricide : le TNF (Tumor Necrosis Factor). L'IL-1 induit la synthèse de TNF par les monocytes, et le TNF induit la synthèse d'IL-1 par les fibroblastes humains. Ces deux cytokines montrent des effets anti-tumoraux additifs in vitro (Platanias et Vogelzang, 1990).

B. EFFETS SYSTEMIQUES

Outre ses effets locaux, l'IL-1 libérée lors d'une inflammation affecte aussi des organes cibles tels que le système nerveux central (hypothalamus, hypophyse), certaines glandes endocrines, le foie et la moëlle osseuse (Table I.2.).

B.1. La fièvre

L'effet pyrogène de l'IL-1 est médié par la synthèse de PGs, dont la PGE_2, par les cellules du centre régulateur de l'hypothalamus antérieur.

L'augmentation de la température corporelle constitue une aide pour le système immunitaire : la fièvre augmente l'activité et la prolifération des lymphocytes T et B, ainsi que la phagocytose et les mécanismes oxydatifs des polymorphonucléaires. De plus, l'hyperthermie a tendance à réduire le taux de réplication des virus et bactéries (Dinarello et Savage, 1988).

B.2. Altérations comportementales

Parallèlement à l'apparition de la fièvre se manifestent une tendance accrue au sommeil (Larrick et Kunkel, 1988), ainsi qu'une activité réduite souvent accompagnée d'une diminution de la prise d'aliments. Ces manifestations comportementales concourrent à réserver l'énergie de l'individu malade pour combattre l'infection.

B.3. Action de l'IL-1 sur le système neuroendocrinien

L'IL-1 provoque la libération de "corticotropin releasing factor" (CRF) par l'hypothalamus, ainsi que la libération par les cellules de l'hypophyse de l'"hormone corticotrope" (ACTH), de l'hormone lutéinisante (LH), de l'hormone de croissance (GH), de la thyréostimuline (TSH) (Larrick et al, 1988) ainsi que de la somatostatine (Dinarello, 1989).

En plus du taux sérique élevé d'ACTH qu'elle provoque, l'IL-1, stimule directement les glandes surrénales pour induire la production de stéroïdes (Larrick et Kunkel, 1988 ; Dinarello, 1988).

L'IL-1 affecte également les cellules endocrines du pancréas en stimulant, à faible concentration, la synthèse d'insuline, et en provoquant, à forte concentration, la mort d'une partie des cellules pancréatiques ß (Platanias et Vogelzang 1990).

B.4. Modifications métaboliques

La "phase protéique aiguë" constitue une réponse plasmatique du foie suite à des infections aiguës, des réactions inflammatoires, ou des états pathologiques divers (infarctus, injections de LPS, maladies auto-immunes, ...). La phase protéique aiguë consiste en une forte augmentation de tout un groupe de protéines plasmatiques dont la protéine C-réactive (CRP), capable de reconnaître des composants présents sur de nombreuses bactéries, champignons et parasites, et même des phospholipides d'origine membranaire. La fixation de CRP sur son ligand lui confère des propriétés analogues à celles des anticorps : agglutination des ligands, activation de la voie classique du complément et opsonisation des proies. La CRP copie l'action des anticorps, mais elle est plus précoce qu'eux et indépendante de tout contrôle immunitaire.

Sous l'influence de l'IL-1, le foie augmente également la synthèse de protéines du complément dont la protéine C3 (Larrick et Kunkel, 1988). Parallèlement, il y a une diminution de la production d'albumine, de l'activité du cytochrome P450 (Platanias et Vogelzang, 1989), ainsi que de la synthèse de transferrine, ce qui entraîne une diminution du taux de zinc et de fer dans le sérum (Larrick et Kunkel, 1988).

B.5. Effets hématologiques de l'IL-1.

La phase aiguë s'accompagne fréquemment d'une neutrophilie prononcée résultant d'une libération accrue de PMN immatures dans la circulation sanguine.

L'amplification de la réponse immunitaire nécessite une production soutenue de cellules immunitaires dans la moëlle osseuse. L'IL-1, auparavant appelée hématopoïétine-1, régule l'hématopoïèse de manière directe et indirecte. En effet, l'IL-1 agit directement sur les cellules souches de la moëlle en renforçant l'action de facteurs de croissance comme l'IL-3, le GM-CSF, ou le G-CSF. L'IL-1 seule n'a cependant pas d'effet sur les cellules de la moëlle osseuse. D'un autre côté, l'IL-1 induit la production de GM-CSF, de G-CSF et de M-CSF par les cellules endothéliales ; elle provoque la synthèse de GM-CSF et d'IL-6 par les fibroblastes, et enfin, l'IL-1 stimule les lymphocytes T et les monocytes / macrophages à produire du GM-CSF (Platanias et Vogelzang, 1989).

1.2.3. MECANISMES D'ACTION

Le fonctionnement correct d'une cellule dépend notamment de sa capacité à communiquer avec son environnement : un stimulus extérieur comme l'IL-1 doit interagir avec des récepteurs membranaires eux-mêmes inducteurs de messagers secondaires qui, finalement, affectent des facteurs de transcription. Ceux-ci activent ou répriment l'expression de certains gènes.

Nous nous sommes intéressés aux récepteurs membranaires à l'IL-1, ainsi qu'aux messagers secondaires induits qui, paradoxalement, restent mal connus dans le cas de cette cytokine fort étudiée.

A. LES RECEPTEURS A L'IL-1

Le premier type de récepteur à l'IL-1 identifié sur les lymphocytes T murins et humains présente un poids moléculaire de 80 kDa environ. Il reconnaît à la fois l'IL-1α et l'IL-1ß. Si ce récepteur de 80 kDa subit un traitement par des glycanases, sa taille se réduit à 64,6 kDa. Les variations de poids moléculaire rapportées par les différents auteurs pourraient donc s'expliquer par des degrés différents de glycosylation. Certains auteurs pensent même que la glycosylation du récepteur de 80 kDa peut jouer un rôle dans l'affinité du récepteur (Dinarello et al, 1989).

Ce récepteur de 80 kDa (récepteur de type I) est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Il se compose de 4 sections : une séquence signal de 19 acides aminés, une portion extracellulaire de 319 acides aminés formée de deux feuillets ß liés par un pont disulfure, un segment hydrophobe transmembranaire de 21 acides aminés, et enfin une portion cytoplasmique de 219 acides aminés. Cette dernière ne présente aucune caractéristique commune avec des récepteurs à activité protéine kinase intrinsèque tels que le récepteur à PDGF. Par contre, une séquence Lys-Lys-Ser-Arg-Arg constituerait un site de phosphorylation possible poour la protéine kinase C (PKC) qui pourrait réguler l'activité du récepteur. Gallis et al (1989) ainsi que Munoz et al (1991) ont effectivement observé une phosphorylation du récepteur après sa liaison à l'IL-1.

Depuis sa découverte, le récepteur de type I a été identifié entre autres chez les fibroblastes murins, les cellules synoviales, les lymphocytes T, les kératinocytes et les cellules épithéliales.

Le nombre de récepteurs varierait de 100 à 4000 par cellule selon le type cellulaire étudié (Dinarello, 1988). Ces récepteurs présentent une haute affinité pour l'IL-1, mais celle-ci semble plus prononcée pour l'IL-1ß, du moins en ce qui concerne certains types cellulaires. Chin et al (1988) ont montré que sur les récepteurs de cellules synoviales, l'IL-1ß se lie avec un Kd de 4 pM, pour un Kd de 66 pM avec l'IL-1α. Malgré cette affinité 15 fois plus grande pour l'IL-1ß, la réponse biologique (l'augmentation de production de PGE_2) n'est que 3 fois plus grande avec l'IL-1ß par rapport à l'IL-1α (Dinarello et al, 1989).

La quantité d'IL-1 nécessaire à l'activation cellulaire est très faible, puisque d'après Chin et al (1987), une occupation de 11 % des sites disponibles par l'IL-1ß ou de 15 % par l'IL-1α provoque une augmentation de 50 % de la secrétion de PGE_2 par des fibroblastes de poumon humain MRC-5.

Un deuxième type de récepteur à l'IL-1, le récepteur de type II, a été décrit par Bomstyck et al (1989) qui a comparé les récepteurs à l'IL-1 de lignées lymphoïdes T et B. Les récepteurs de 87 kDa des cellules B n'étaient pas reconnus par les anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs de 66 kDa des cellules T. De plus, les domaines cytoplasmiques des deux types de récepteurs semblent différents. Le récepteur de type II (de 66 kDa) montre une plus faible affinité pour l'IL-1 que le récepteur de type I (de 80 kDa). Le récepteur de type II est surtout caractéristique des lymphocytes B.

B. LES VOIES D'ACTIVATION CELLULAIRES

Quand les récepteurs à l'IL-1 ont capté leur ligand, il faut répercuter du signal vers l'intérieur de la cellule. Cela s'effectue par l'intermédiaire de protéines membranaires et d'enzymes capables d'amplifier le signal, pour finalement aboutir à la génération de messagers secondaires. Leur diffusion permet la propagation de l'information dans toute la cellule (Berridge, 1985).

Le nombre de messagers secondaires reconnus est très limité, ce qui signifie que, malgré la multiplicité des stimuli et des réponses cellulaires, les voies de transduction que le signal peut emprunter sont universelles. Actuellement, trois grandes voies d'activation cellulaire sont reconnues : celle du calcium cytosolique, la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), et celle des inositols phosphate. Nous parlerons aussi de la cascade de l'acide arachidonique qui joue un rôle important dans l'activation cellulaire.

B.1. La voie du calcium

Le calcium, un messager ionique quasi universel, est impliqué dans de très nombreux processus cellulaires comme la contraction musculaire, la sécrétion de certaines hormones (aldostérone (Rasmussen, 1989), adrénaline (Berridge, 1985), ...), la sécrétion d'enzymes digestives et de neurotransmetteurs, mais aussi dans le transport d'eau et d'ions à travers la paroi intestinale ainsi que dans le métabolisme hépatique du glycogène (Rasmussen, 1989).

Le calcium cytoplasmique peut provenir de deux origines différentes : soit du milieu extérieur, soit des réservoirs calciques comme le réticulum sarcoplasmique dans les cellules musculaires et les calciosomes dans les autres cellules. Dans les cellules au repos, la concentration en calcium cytosolique est très basse (environ 10^{-7} M soit 10000 fois moins

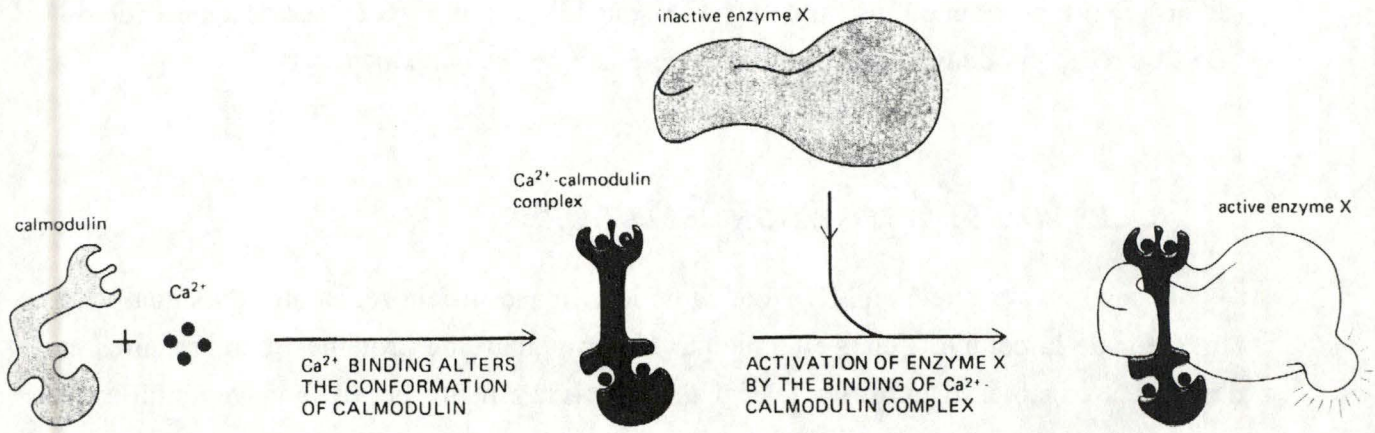


Fig. I-10 : Une augmentation du calcium cytosolique provoque indirectement l'activation d'enzymes en modifiant la conformation de molécules de calmoduline. (D'après Alberts et al., 1989).

que dans le milieu extérieur). Cette faible concentration cytosolique en calcium peut être attribuée à la faible perméabilité de la membrane plasmique ainsi qu'à l'existence de pompes ioniques transmembranaires qui refoulent le calcium intracellulaire vers l'extérieur. Les cellules sont très sensibles à de faibles variations en calcium, justement parce que la concentration en calcium intracellulaire est très faible. Ces modifications peuvent être occasionnées par une stimulation hormonale, ou par un neurotransmetteur qui provoque l'ouverture des canaux calciques de la membrane plasmique, ou une libération de calcium par les résevoirs intracellulaires (réticulum sarcoplasmique et calciosomes) (Rasmussen, 1989).

L'accroissement du taux calcique dans le cytoplasme entraîne la fixation d'ions calcium à des protéines cytosoliques comme la calmoduline. Les complexes protéines-calcium activés peuvent interagir avec d'autres composants cytoplasmiques (fig I.10.). Le complexe calmoduline-calcium, par exemple, régule l'activité de l'adénylate cyclase, de la phosphodiestérase, et des pompes calciques ATPasiques de la membrane plasmique.

Cette voie d'activation est-elle liée à l'IL-1 ? Plusieurs auteurs ont montré un rapport direct entre la stimulation de cellules par l'IL-1 et le niveau de calcium intracellulaire qui augmentait (Corkey et al, 1991). P. Bouchelouche et al (1988) a mis en évidence une augmentation de calcium cytosolique consécutive à une stimulation par l'IL-1 de fibroblastes de peau humains. L'influx de calcium est d'origine extracellulaire uniquement, par opposition à des fibroblastes murins chez lesquels l'IL-1 provoque un apport de calcium provenant à la fois du milieu extérieur et des sources intracellulaires. Les cellules synoviales humaines répondent également à une stimulation par l'IL-1 en augmentant leur taux de calcium intracellulaire (Knott, 1992).

Le calcium est un activateur central, à tel point que Rink et Merrit (1990) considère qu'un des rôles-clefs des autres messagers secondaires consiste à moduler les flux calciques. En effet, l'AMPc commande le débit des ions calcium à travers la membrane plasmique, tandis que le calcium, par l'intermédiaire de la calmoduline, régule les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'AMPc (Rasmussen, 1989). Par exemple, l'adrénaline, par l'intermédiaire de l'AMPc, ajuste la concentration calcique intracellulaire qui module l'intensité de la contraction cardiaque (Berridge, 1985). Quant à la voie des inositides, nous verrons plus tard qu'elle est également directement liée à celle du calcium.

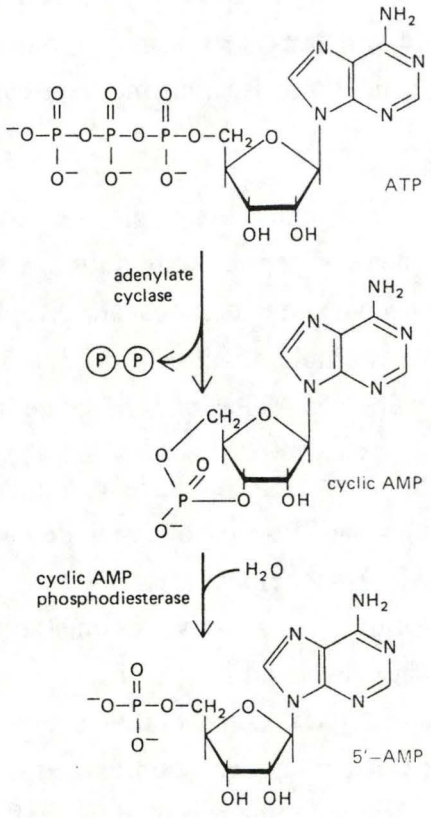


Fig. I-11 : La synthèse et la dégradation de l'AMPc. (D'après Alberts et al., 1989).

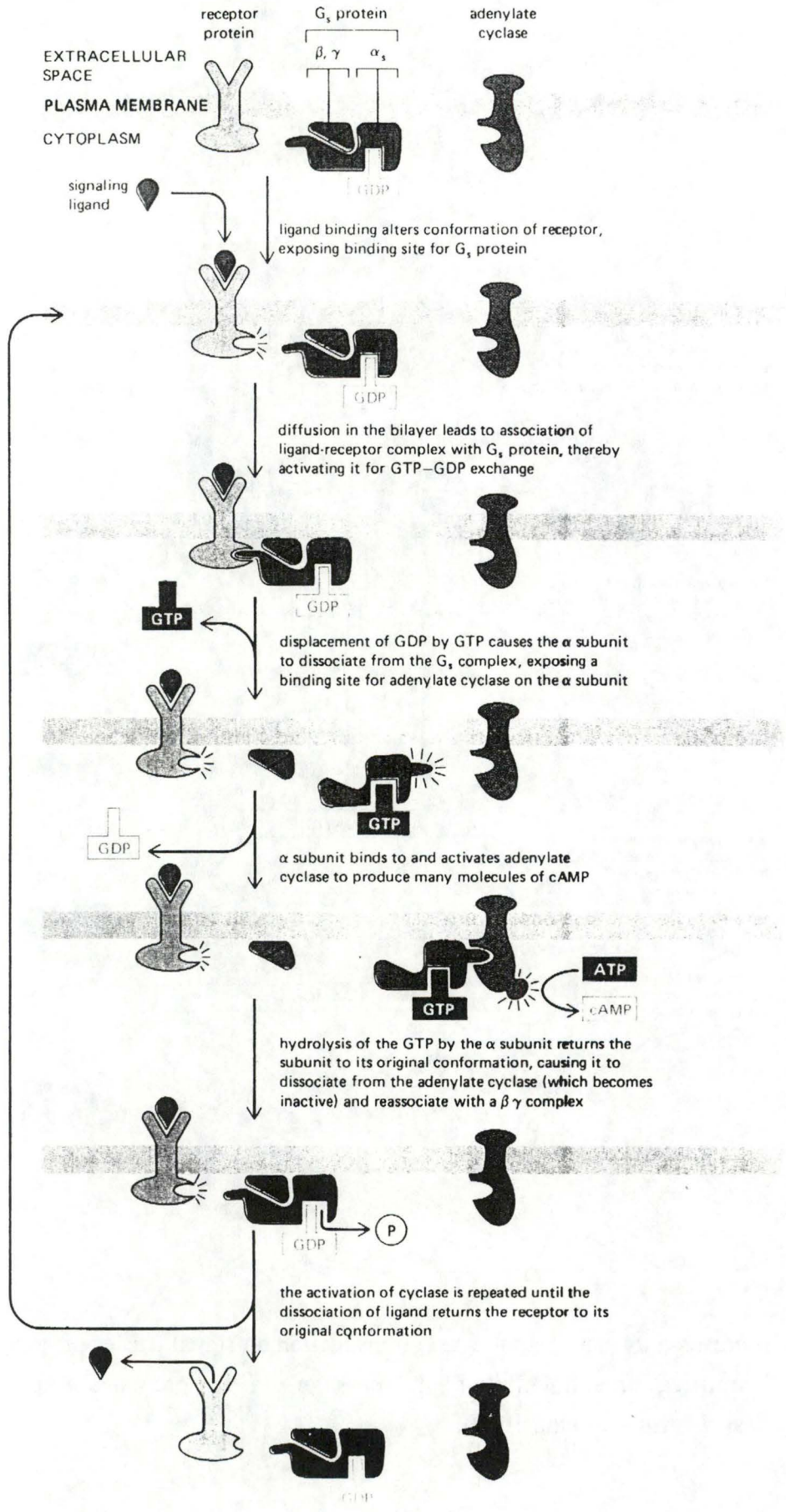


Fig. I-12 : Modèle décrivant la transduction du signal via les protéines G. (D'après Alberts et al., 1989).

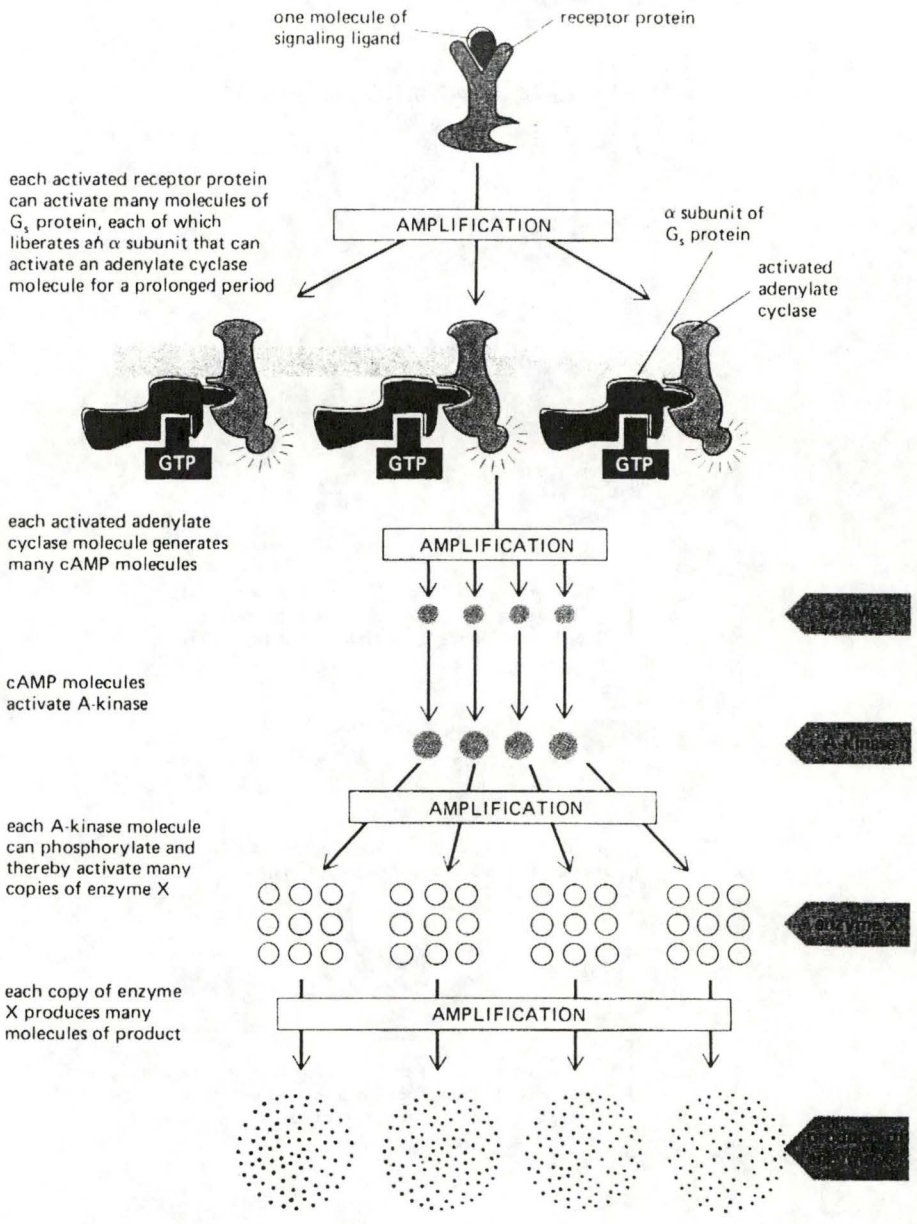


Fig. I-13 : Représentation schématique de la transduction du signal par les protéines G et de l'amplification intracellulaire du message via des enzymes amplificatrices. (D'après Alberts et al., 1989).

B.2. La voie de l'AMPc.

On estime que la concentration en AMPc à l'intérieur d'une cellule au repos est de l'ordre du micromolaire. Suite à une stimulation, par exemple la liaison d'une hormone sur son récepteur, cette concentration peut changer très rapidement : le taux d'AMPc intracellulaire peut devenir 5 fois plus élevé ou plus faible que la normale en quelques secondes. Toute modification de la concentration intracellulaire en AMPc est rapidement contre balancée soit par l'activation de l'adénylate cyclase, responsable de la synthèse d'AMPc à partir de l'ATP, soit par la phosphodiestérase qui hydrolyse l'AMPc en adénosine 5'-monophosphate (Fig I.11.).

Dans les cellules animales, le couplage entre le récepteur membranaire qui a capté son ligand et l'adénylate cyclase s'effectue par le biais de protéines G (G pour GTP-binding regulatory protein). La formation du complexe récepteur-ligand entraîne une modification structurelle de la portion cytoplasmique du récepteur. Cette modification permet à une protéine G de se lier au récepteur et d'accrocher une molécule de GTP. Celle-ci provoque la dissociation de la sous-unité α de la protéine Gs, sous-unité catalytique capable d'activer l'adénylate cyclase. L'activation de la protéine G, qui est aussi une GTPase, persiste jusqu'à l'hydrolyse du GTP qu'elle a capté. (Fig. I.12.).

Parmi les protéines G impliquées dans l'activation cellulaire, on distingue les protéines G stimulatrices (Gs) des protéines G inhibitrices (Gi). Les protéines Gi, dotées d'une sous-unité α différente de celle des protéines Gs, inhibent l'adénylate cyclase grâce à leur sous-unité Giα , mais aussi de manière indirecte, via leur sous-unité G$\beta\gamma$ qui se lie à des sous-unités Gsα libres. Une même molécule stimulatrice peut provoquer soit l'accroissement, soit la diminution du taux d'AMPc selon qu'elle se lie à un récepteur susceptible de se lier à une protéine Gi ou Gs (c'est le cas de l'adrénaline qui peut se lier à des récepteurs ß adrénergiques, activateurs, ou à des récepteurs α2 adrénergiques, inhibiteurs) (Alberts et al, 1989).

La nécessité de protéines intermédiaires entre le récepteur et le générateur du messager secondaire présente deux avantages : le premier réside dans la possibilité d'amplifier le signal extérieur (un seul complexe récepteur-ligand peut activer plusieurs protéines G qui activent elles-mêmes plusieurs adénylates cyclase) (fig I.13). La possibilité d'exercer des processus de régulation sur ces protéines constitue le second avantage. La figure I.14. montre les différents niveaux d'action de la forskoline, de la caféine, de la théophylline, des toxines pertussique et de cholérique (Berridge, 1985).

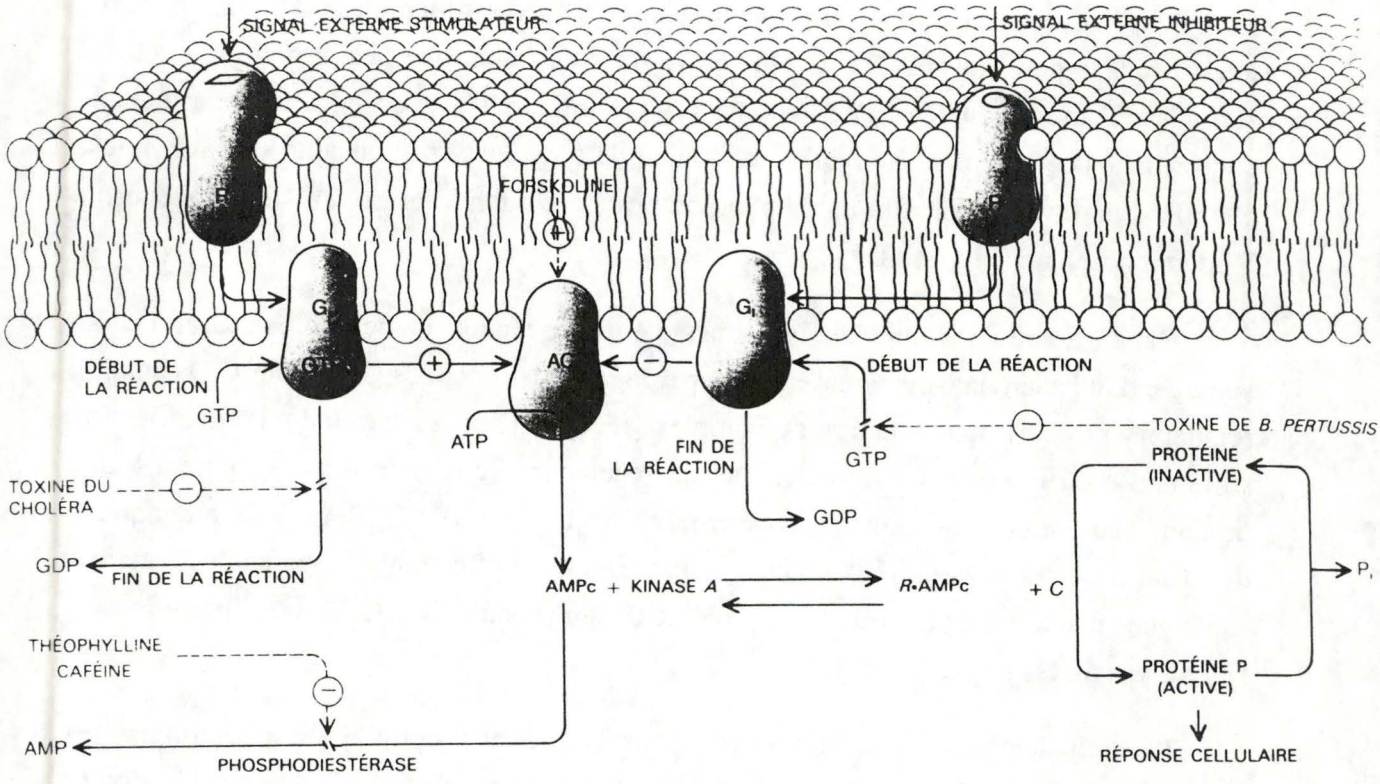


Fig. I-14 : Transmission du signal externe par voie de l'AMPc. Les signaux provenant des récepteurs stimulateurs (Rs) ou inhibiteurs (Ri) convergent vers l'adénylate cyclase qui transforme l'ATP en AMPc. Les protéines G, qui assurent ce couplage, sont activées par le GTP (début de la réaction) et réactivées lorsque le GTP est hydrolysé en GDP (fin de la réaction). Quant à l'AMPc, il se lie à la sous-unité de régulation (Rs) de sa protéine kinase dont il libère la sous-unité catalytique (c), qui peut alors phosphoryler des protéines responsables d'une réponse cellulaire donnée. (D'après Berridge, 1985).

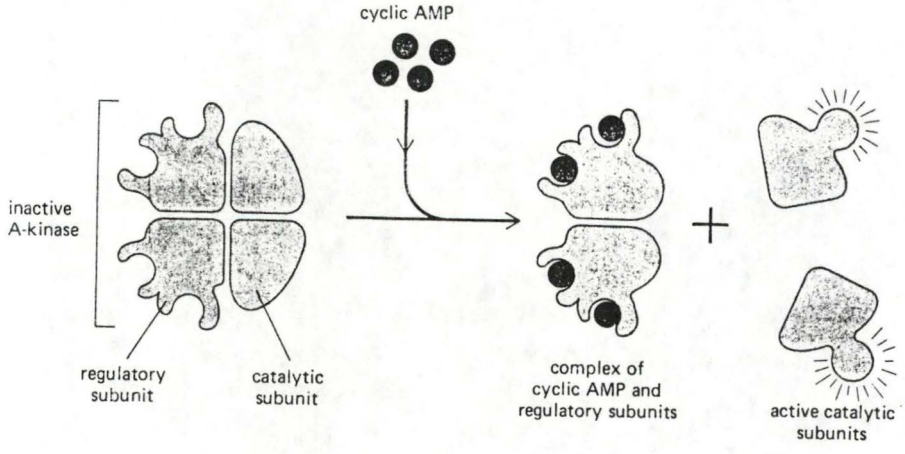


Fig. I-15 : L'activation des PKA.

La liaison de l'AMPc aux sous-unités régulatrices des PKA provoquent un changement de conformation des sous-unités régulatrices qui se dissocient du complexe protéique, libérant ainsi les sous-unités catalytiques. (Alberts et al., 1989).

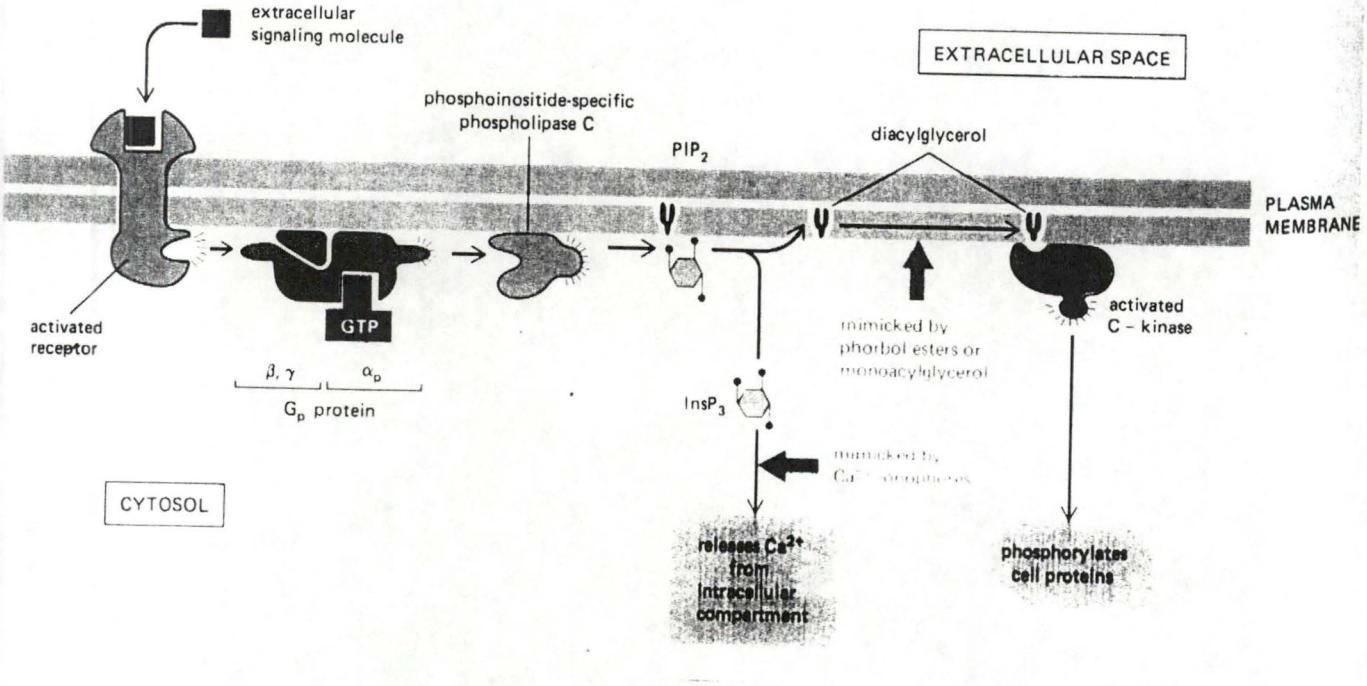


Fig. I-16 : la phospholipase C clive le PIP2 en IP3 et en DAG. (D'après Alberts et al., 1989).

L'AMPc exerce ses effets sur des protéines kinases AMPc-dépendantes (PKA). Ces PKA contiennent toutes une sous-unité régulatrice sur laquelle se lie l'AMPc, libérant ainsi la sous-unité catalytique qui peut alors phosphoryler d'autres protéines (fig I.15.).

D'après la littérature, l'AMPc semble jouer un rôle dans l'activation cellulaire par l'IL-1. Cette cytokine provoque chez une lignée cellulaire pré-B une activation de l'adénylate cyclase, qui semble liée à une protéine G sensible à la toxine de Pertussis (Chedid et al, 1989). Certains auteurs marquent cependant leur désaccord quant à cette affirmation (Saklatvala et al, 1990 ; O'Neill, 1992). Munoz (1991) relate une activation de la PKA consécutive à l'addition d'IL-1 dans le milieu de culture. Zhang et al (1988) ont mis en évidence un lien entre le pic d'AMPc observé chez des fibroblastes humains après une stimulation par l'IL-1 et l'augmentation du taux de mRNA d'IL-6 consécutif à cette stimulation.

B.3. La voie des inositols phosphate

Pour un certain nombre de signaux moléculaires extracellulaires, la liaison du médiateur sur son récepteur peut activer une phospholipase C (PLC). Celles-ci se caractérisent par leur action lytique exercée au niveau du phosphate voisin de la tête polaire des phospholipides. Certaines PLC sont spécifiques du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP_2), et leur action sur ce phospholipide entraîne la formation de diacylglycérol (DAG) d'une part, et d'inositol triphosphate d'autre part (IP_3) (Fig 1.16.).

Plus de 40 hormones, facteurs de croissance ou autres provoquent la lyse du PIP_2 par la PLC spécifique des phosphoinositides. Il semblerait que cette voie d'activation soit médiée par l'intermédiaire d'une protéine G non encore identifiée (Gp) suivant le même type de schéma que les protéines Gi et Gs qui modulent l'activité de l'adénylate cyclase (Pelech et Vange, 1989 ; Downes et al, 1990).

Les deux molécules issues du clivage du PIP_2 par la PLC, l'IP_3 et le DAG, prennent part à l'activation cellulaire (fig I.17.). Les molécules solubles d'IP_3 se fixent sur leurs récepteurs protéiques localisés sur la surface cytoplasmique des réservoirs calciques intracellulaires. L'activation de ces récepteurs provoque l'ouverture de canaux calciques voisins, ce qui entraîne un déversement d'ions calcium dans le cytoplasme. Le taux cytosolique de calcium diminue ensuite grâce à l'action des pompes calciques membranaires, et à la déphosphorylation de l'IP_3 par une phosphatase spécifique (Alberts et

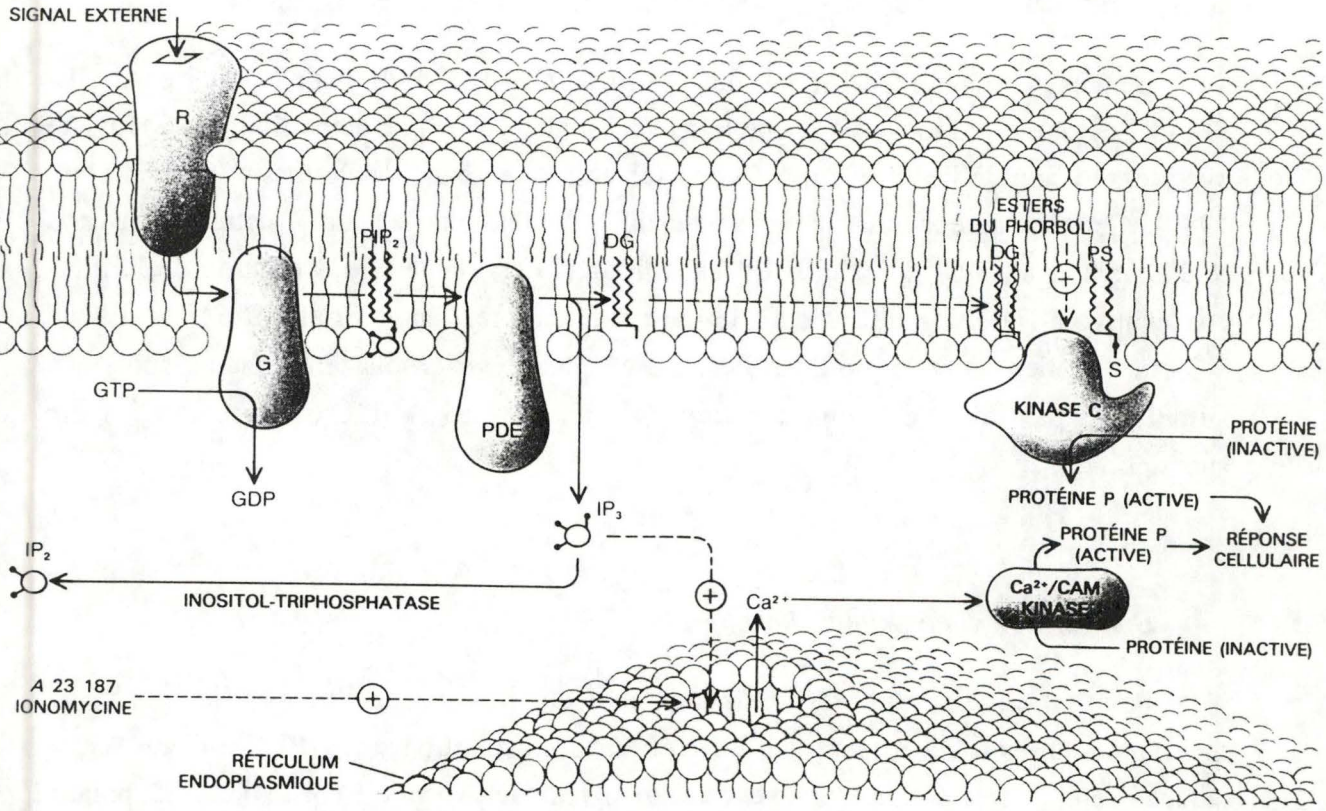


Fig. I-17 : Transmission d'un signal externe par l'intermédiaire de la voie des inositols phosphates. Le messager externe se lie à des récepteurs (R) qui transmettent l'information par l'intermédiaire d'une protéine G (G) pour activer la phospholipase C ou la phosphodiestérase (PDE). La phospholipase C scinde le PIP_2 en deux messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate ou IP_3. Ce dernier est hydrosoluble et diffuse dans le cytoplasme où il libère les ions calcium stockés dans le réticulum endoplasmique ; les ions calcium libérés stimulent alors une série de réponses cellulaires. De son côté, le DAG reste dans la membrane où il active une protéine kinase C (PKC). Un phospholipide de la membrane, la phosphatidylsérine (PS), est un cofacteur . La PKC phosphoryle alors certaines protéines qui, rendues actives, peuvent initier certaines fonctions cellulaires. (D'après Berridge, 1985).

al , 1988).

Quant au DAG, son caractère hydrophobe lui permet de rester dans la membrane où il peut, en association avec une phosphatidylsérine, fixer la protéine kinase C (PKC) dans la membrane plasmique. La PKC se trouve dans le cytosol sous une forme inactive, mais sa liaison avec les phospholipides membranaires multiplie par 100 sa sensibilité aux ions calcium, dont le taux cytosolique a été élevé sous l'action de l'IP_3. La PKC membranaire, liée au DAG et à la phosphatidylsérine, peut donc, en présence de calcium, exercer son activité de kinase sur des résidus sérine et thréonine de protéines cibles, et les activer (Rasmussen, 1989). La PKC restera active tant qu'elle sera en présence de DAG, mais celui-ci est rapidement phosphorylé ou clivé.

Parmi les protéines cibles de la PKC se trouvent des kinases qui pourront elles-mêmes phosphoryler d'autres protéines éventuellement situées dans d'autres domaines subcellulaires. Cette "cascade de kinases" assure une amplification du signal très importante (Rasmussen, 1989) (fig I.17.).

En ce qui concerne l'IL-1, plusieurs auteurs ont montré une augmentation du taux de DAG suite à une stimulation par cette cytokine (Rosoff et al, 1988 ; Dinarello et al, 1990 ; O'Neill, 1992). D'autres ont rapporté une activation simultanée de la PKC et de l'adénylate cyclase dans les cellules Th2 (Munoz et al, 1991) ; ils suggèrent que l'activation de l'adénylate cyclase est médiée par les récepteurs de 80 kDa, tandis que d'autres récepteurs influenceraient la PKC. Signalons que Saklatava et al (1990) et O'Neill (1992) décrivent une sérine kinase induite par l'IL-1, différente de la PKA et de la PKC. Il s'agirait d'une kinase phosphorylant, entre autres, la HSP 27 ("heat shock protein", 27 kDa) et le récepteur à EGF.

B.4. La cascade de l'acide arachidonique

La phospholipase A_2 (PLA_2), enzyme cytosolique ou membranaire, clive les phospholipides membranaires en libérant l'acide gras situé en position 2-acyl sur les phospholipides. Les deux molécules issues de ce clivage jouent un rôle important dans le métabolisme cellulaire.

D'une part, un important pourcentage des acides gras libérés est constitué d'acide arachidonique, incorporé préférentiellement en position 2-acyl par les acyl-transférases.

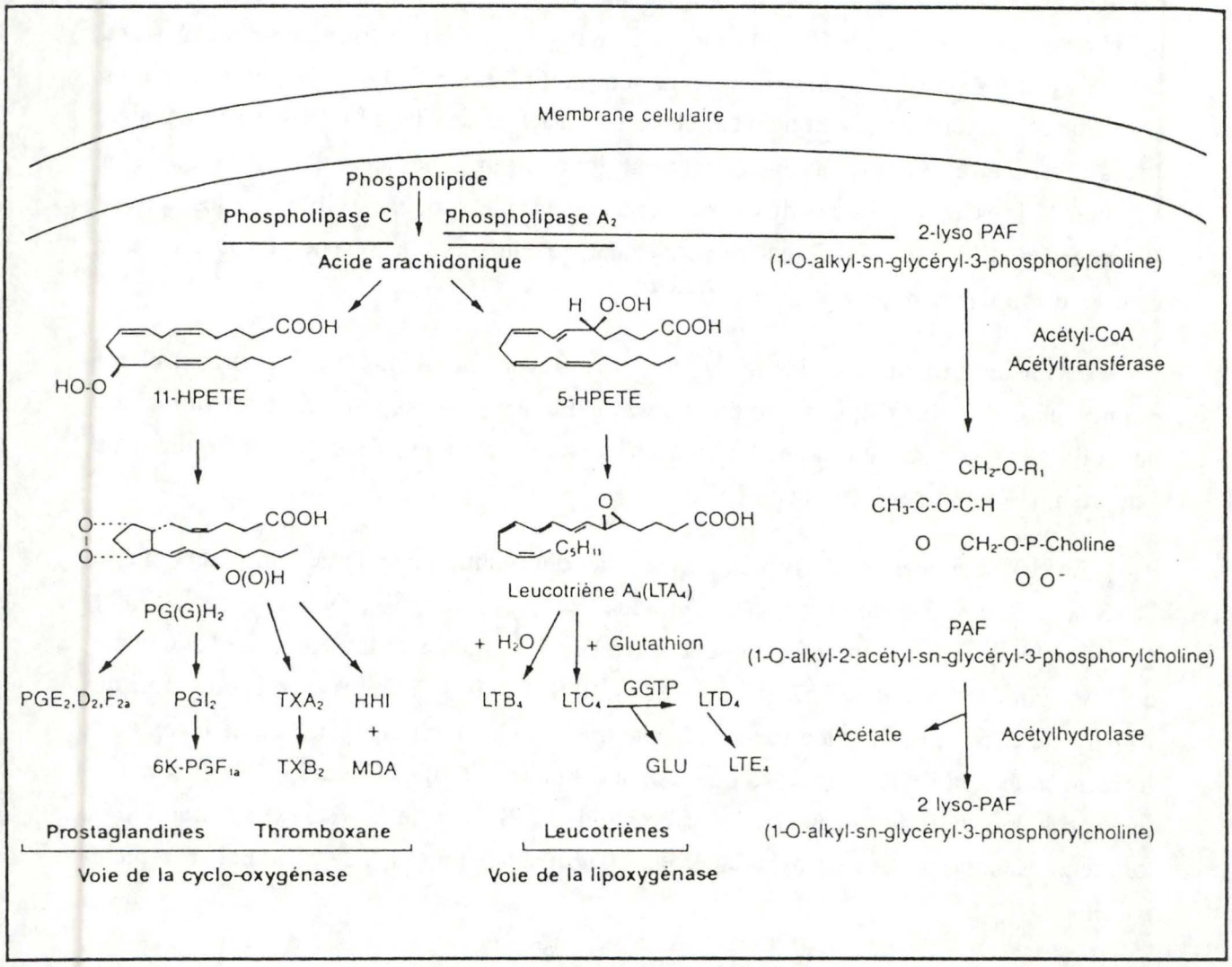


Fig. I-18 : Voie de biosynthèse des médiateurs lipidiques de l'inflammation. (Dodet, 1989).

L'acide arachidonique peut être métabolisé en prostaglandines et thromboxane par la voie enzymatique de la cyclooxygénase, ou bien par la voie lipoxygénasique qui aboutit aux leucotriènes et aux acides monohydroxyéïcosatétraénoïque (HETEs) (fig I.18.). Les molécules qui découlent de ces deux voies enzymatiques complexes sont des médiateurs très importants, mais nous ne nous étendrons pas sur ce sujet dans le cadre de ce travail. Notons simplement que les dérivés de l'acide arachidonique sont surtout connus en tant que médiateurs de l'inflammation, mais que certains d'entre eux peuvent également médier d'autres effets comme la régulation de la synthèse d'autres cytokines ou le contrôle de la prolifératon cellulaire : l'IL-1 induit sa propre secrétion, mais celle-ci est inhibée par la PGE_2 (Schindler et al, 1990) ; le LTB4 exerce une action pro-prolifération sur les cellules musculaires lisses des artères de rat (Palmberg et al, 1991) et sur les cellules symoviales humaines (Andreasen et al, 1990).

D'autre part, si la PLA_2 agit sur un lipide particulier appelé O-alkyl-phosphatidyl-choline, le clivage de l'acide arachidonique (ou d'un autre acide gras) en position 2-acyl laisse place à un 1-O-alkyl-2-lyso-glycéro-3-phosphocholine ou lyso-PAF. Cette molécule toxique est acétylée par une acétyl-transférase pour donner le 1-O-alkyl-2-acétyl-glycéro-3-phosphocholine ou PAF. Celui-ci est également un médiateur important de l'inflammation dont nous avons déjà parlé précedemment.

La PLA_2 présente une activité constitutive, mais celle-ci peut augmenter fortement sous l'action de molécules stimulatrices comme l'IL-1 ou le TNF (Schalwijk et al, 1991 ; Burch et al, 1989).

Malgré les nombreuses divergences entre les modes d'activation cellulaire par l'IL-1 proposés par les différents auteurs, tous s'accordent à penser que l'IL-1 est capable de générer de multiples messagers secondaires. Les voies de transduction du signal préférentiellement empruntées semblent différer suivant le type cellulaire et suivant le type de récepteurs majoritairement exprimés à la surface cellulaire.

Nous voyons donc que malgré une littérature abondante, aucun schéma clair de transduction du "signal IL-1" n'a pu être dégagé. C'est dans ce contexte diffus que nous nous sommes intéressé à une toute nouvelle hypothèse de transduction du signal selon laquelle les radicaux libres pourraient servir de messagers secondaires, pour l'IL-1, mais également pour d'autres cytokines comme le TNF.

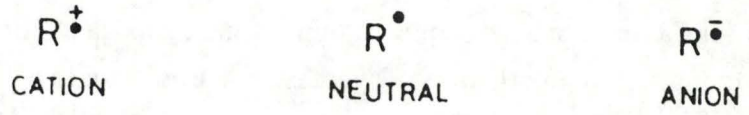


Fig. I-19 : Représentation conventionnelle des radicaux libres. (D'après Roberfroid et al., 1987).

2. LES RADICAUX LIBRES

2.1. GENERALITES

2.1.1. DEFINITION

Les radicaux libres sont, par définition, des molécules chimiques dotées d'un ou deux électrons non appariés. Ils peuvent porter une charge positive ou négative, ou bien rester neutres (fig. I.19). Par exemple, le radical superoxyde ($O_2^{\circ(-)}$) est un radical anionique, tandis que le radical hydroxyle (OH°) reste neutre.

C'est la présence d'un électron célibataire qui confère aux radicaux libres leur grande réactivité. Toutefois, celle-ci varie selon les espèces chimiques, la température, la concentration des radicaux et même suivant la nature du solvant. A température physiologique, la plupart des radicaux sont tellement réactifs que leur concentration normale est très basse (10^{-4} à 10^{-9} M) (Roberfroid, 1987). Le radical hydroxyle (HO°), par exemple, est tellement énergétique qu'il réagit très rapidement, ce qui justifie sa demi-vie très courte.

2.1.2. L'OXYGENE

L'oxygène moléculaire (O_2) peut être considéré comme un "biradical" résultant de l'association de deux radicaux libres (Roberfroid, 1987).

Dans son état fondamental, la molécule d'oxygène, ou O_2 triplet, possède 2 électrons non appariés, de spins parallèles et localisés dans des orbitales P^* anti-liantes différentes. Cette particularité confère à l'O_2 une inertie importante du point de vue cinétique, bien que la molécule soit thermodynamiquement reconnue comme un agent oxydant puissant (grâce à son potentiel rédox élevé). En effet, pour oxyder une espèce chimique, l'O_2 triplet devrait accepter une molécule avec une paire d'électrons de spins parallèles, ou alors un des électrons de l'O_2 devrait subir une inversion de spin au moment de la réaction. A 37°C, la probabilité de ces deux événements est extrêmement faible. C'est pourquoi, en l'absence de catalyseur, enzymatique par exemple, une oxydation spontanée de 2 électrons ne s'effectue pas parce qu'elle demande une trop haute énergie (Byczowski et Gessner, 1988).

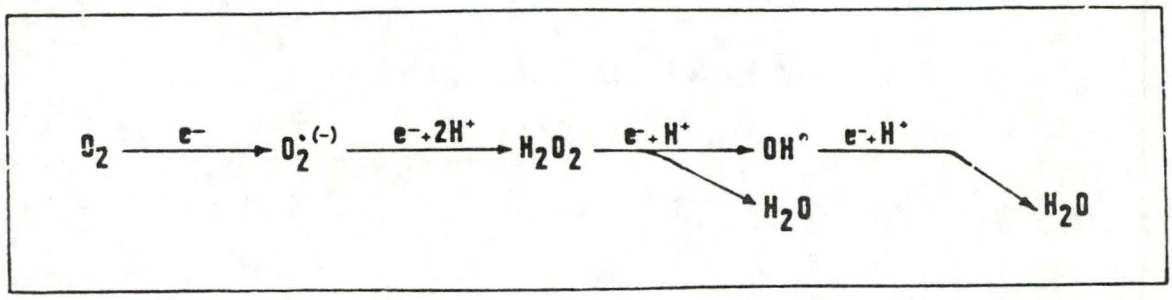


Fig. I-20 : Voie de réduction monovalente de l'oxygène. (Basaga, 1989).

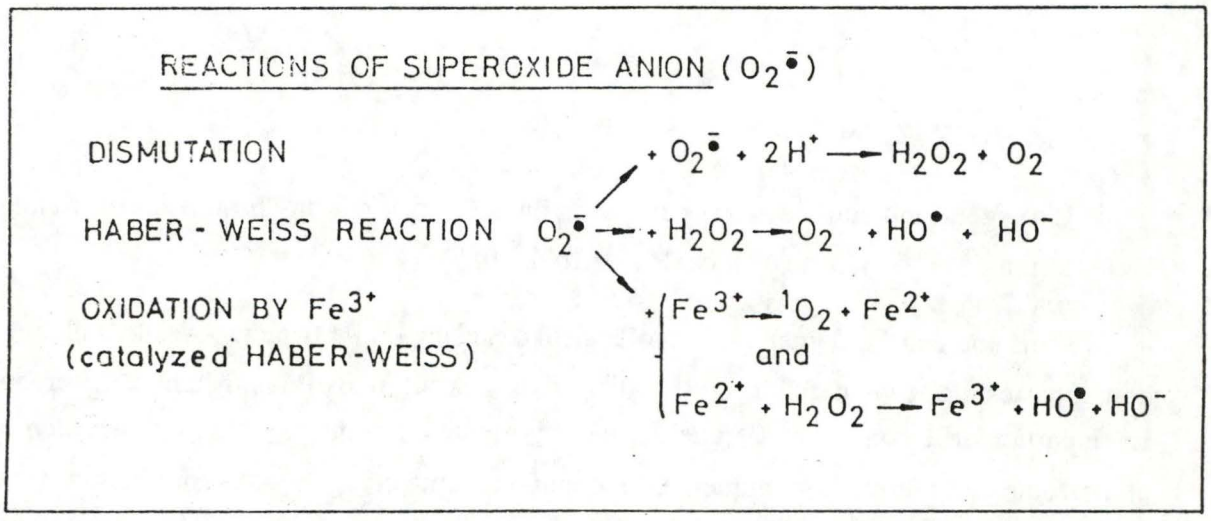


Fig. I-21 : Réactions auxquelles participent les $O_2^{\bullet(-)}$. (Basaga, 1989).

On peut contourner le problème de l'inertie de l'O_2 soit en inversant le spin d'un des électrons non appariés par une excitation (c'est la formation de l'0_2 singulet), soit en additionnant un électron à la fois sur la molécule d'0_2 (c'est la réduction monovalente de l'0_2).

L'0_2 singulet est une forme activée de l'0_2 triplet qui se forme par inversion de spin d'un des électrons non appariés de l'orbitale 2 P* de l'0_2 triplet. (Roberfroid et al., 1987) L'0_2 singulet, une espèce chimique beaucoup plus réactionnelle que l'0_2 triplet, puisqu'il peut accepter une paire "normale" d'électrons de spins opposés.

Le transfert d'électrons un à un sur l'0_2 constitue la voie de la réduction monovalente de l'0_2, au cours de laquelle diverses espèces radicalaires sont générées : le radical anionique superoxyde ($0_2^{\circ(-)}$), le peroxyde d'hydrogène (H_20_2), et le radical hydroxyle ($H0^{\circ}$) (fig.I.20).

Remarque : le peroxyde d'hydrogène ne correspond pas strictement à la définition que nous avons donnée des radicaux libres, mais nous l'y assimilerons, pour une question de facilité de langage.

2.1.3. LES PRODUITS DE LA REDUCTION MONOVALENTE DE L'O_2

A.L'ANION SUPEROXYDE ($0_2^{\circ(-)}$)

La réduction univalente de l'0_2 triplet génère l'$0_2^{\circ(-)}$, espèce chimique instable en milieu aqueux dont la réactivité dépasse celle de l'0_2.

La forme protonée du radical superoxyde, $H0_2^{\circ}$, est un agent réducteur et un agent oxydant beaucoup plus puissant que l'$0_2^{\circ(-)}$ lui-même.

La dismutation des $0_2^{\circ(-)}$ en milieu aqueux est une réaction fréquente, spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), qui génère de l'H_20_2. L'$0_2^{\circ(-)}$ peut également réagir avec l'H_20_2 pour former le radical hydroxyle (fig. I.21).

Les $0_2^{\circ(-)}$ ne peuvent traverser les membranes que par des canaux anioniques, mais les $H0_2^{\circ}$, non chargés, pourraient pénétrer dans les cellules assez facilement (Halliwell et al., 1989).

B. LE PEROXYDE D'HYDROGENE (H_2O_2)

L'H_2O_2 est généré par la réduction divalente directe de l'O_2 triplet et par la réaction de dismutation de l'$O_2^{\circ(-)}$, spontanée ou catalysée par diverses enzymes dont la superoxyde dismutase (SOD). L'H_2O_2, agent oxydant médiocre par rapport au radical $O_2^{\circ(-)}$, est un des dérivés oxygénés les plus stables (Roberfroid et al, 1987). Il diffuse facilement à travers les membranes biologiques (Shreck et al, 1991).

C. LE RADICAL HYDROXYLE (HO°)

Le réactif de Fenton (1896), composé de sels métalliques et d'H_2O_2, doit sa grande réactivité aux radicaux hydroxyles (HO°) générés lors de la décomposition de l'H_2O_2 catalysée par les ions métalliques (dont le Fer surtout). Les radicaux $O_2^{\circ(-)}$ peuvent participer à cette réaction en réduisant le fer.

$$Fe^{3+} + O_2^{\circ(-)} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\circ} + {}^{-}OH$$

$$O_2^{\circ(-)} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Fer}} HO^{\circ} + {}^{-}OH + O_2$$

Le radical $^{\circ}OH$ peut aussi provenir de la lyse de molécules d'eau par des radiations ionisantes (rayons X, rayons γ, UV).

Le radical hydroxyle est le plus puissant oxydant connu. Il est très instable et très réactionnel, à tel point que le site de formation des $^{\circ}OH$ se confond avec le site réactionnel. A cause de sa demi-vie très réduite, il est souvent très difficile à détecter, surtout dans les fluides biologiques (Lunec, 1990).

Sources	Agents	Références
Autoxydations	Hydroquinones Leucoflavines Catécholamines	Mc Cord 1970.
	Thiols	Misra 1974.
	Colorants réduits	Mc Cord 1970; Nishikimi 1972 Balny 1974.
	Ferredoxines	Orme - Johnson 1969; Misra 1971.
	Hémoprotéines	Misra 1972; Wallace 1974.
	Hématoporphyrines	Buettner 1980.
Catalytiques	NADPH cytochrome P-450 réductase	Bösterling 1981.
	Xanthine oxydase	Mc Cord 1968, 1969 a; Fridovich 1970.
	Aldéhyde oxydase	Rajagopalan 1962, 1964.
	Dihydro-orotic déshydrogénases	Aleman 1967.
	Flavoprotéines déshydrogénases	Massey 1969.
	NADH déshydrogénase mitochondriale de bœuf .	Turrens 1980.
Catalytiques (inhibées par la superoxyde dismutase)	Tryptophane dioxygénase intestinale	Hirata 1971.
	Hydroxylase microsomale de foie	Strobel 1971.
	Hydroxylases solubles d'*Aspergillus niger*	Kumar 1972.
	Galactose oxydase de *Dactylium dendroïdes*	Hamilton 1973.
Productions par les organites	Leukocytes pendant la phagocytose	Babior 1973, Salin 1975.
	Chloroplastes illuminés	Epel 1973, Asada 1974.
	Microsomes de foie	Aust 1972.
	Mitochondries (+ production de $OH^{\cdot}$)	Cadenas 1977, Nohl 1978, Nohl et al. 1981.
	Noyaux hépatiques d'hamster	Patton 1980.
	Hépatomes de Morris	Bize 1980.

Table I-3 : Tableau récapitulatif des principales sources intracellulaires de radicaux libres.

2.2. ORIGINE DES DERIVES OXYGENES

Les rayon γ, les rayons X, les UV et quelques polluants environnementaux peuvent initier des réactions radicalaires au cours desquelles se produit la fission homolytique d'un lien covalent entre 2 atomes A et B appartenant à la molécule AB. Pourtant, la source majeure d'espèces radicalaires *in vivo* réside dans les transferts univalents d'électrons et les réactions biochimiques d'oxydo-réduction impliquant l'0_2 (Lunec, 1990).

2.2.1. SOURCES INTRACELLULAIRES

A. AUTOOXYDATION DE MOLECULES ORGANIQUES

Une large gamme de molécules peuvent produire des radicaux libres parce qu'elles subissent des réactions d'oxydo-réduction impliquant le transfert d'un seul électron dans un milieu aqueux neutre.Ces molécules comprennent des constituants cellulaires normaux (thiols, hydroquinones, flavines, ...) et des xénobiotiques (médicaments, polluants,...) (table I.3).

L'$O_2^{\circ(-)}$ est le premier radical formé au cours de la réduction de l'O_2. Des réactions de dismutation et d'Haber-Weiss (fig. I.21.) consomment des $O_2^{\circ(-)}$ pour former de l'H_2O_2 et des OH° (Roberfroid, 1987).

B. METAUX DE TRANSITION

Certains composants métalliques essentiels de notre alimentation existent sous plusieurs états d'oxydation différents et peuvent catalyser des réactions de stress oxydatifs (Saltman, 1989). Le fer et le cuivre, par exemple, catalysent le clivage de l'H_2O_2 et des peroxydes organiques, entraînant ainsi de manière directe la formation des radicaux $^{\circ}OH$ suivant la réaction de Fenton (décrite au point 2.1.3.). De plus, les complexes comprenant du fer sont particulièrement efficaces dans l'initiation de peroxydation lipidique (Roberfroid, 1987). Les métaux participent encore à d'autres types de réactions générant ou transformant des radicaux libres (Byczkowski and Gessner, 1988). Cette contribution de certains métaux aux réactions radicalaires justifie l'utilisation d'agents chélateurs comme molécules antioxydantes. Dans le cas de la peroxydation lipidique par exemple, les agents

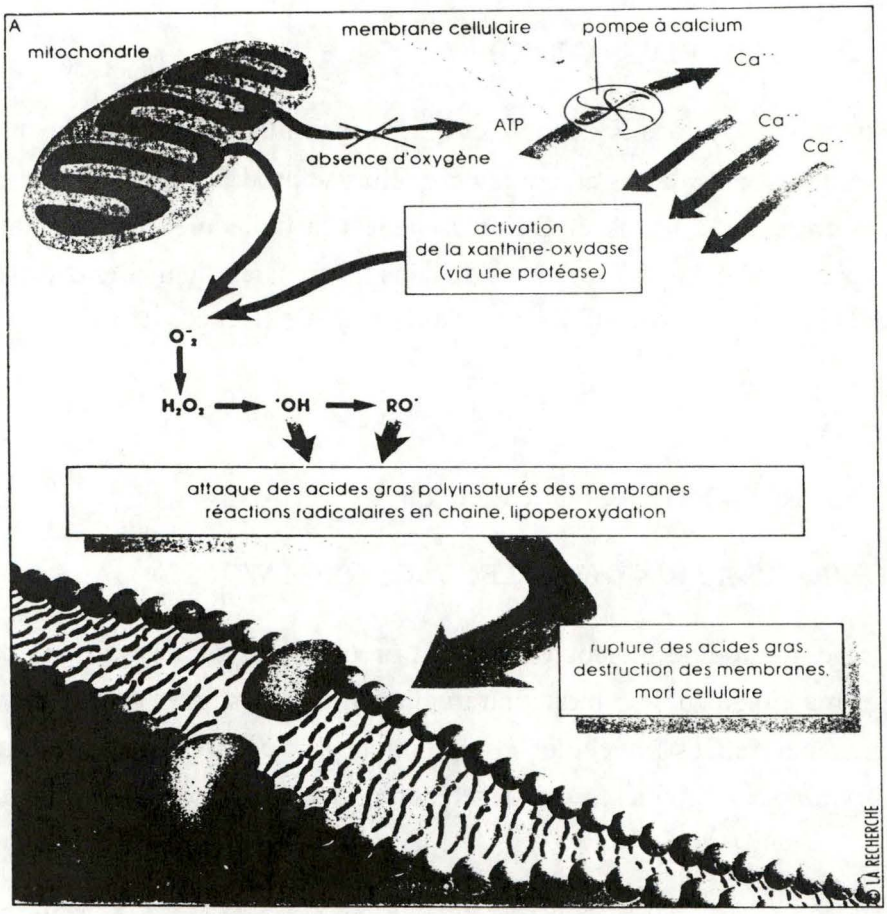


Fig. I-22 : Schéma montrant les effets d'une privation en O_2 sur le système xanthine déshydrogénase. En absence d'oxygène, la chaîne respiratoire est arrêtée. Sans ATP, les pompes calciques de la membrane plasmique ne fonctionnent plus. Le calcium pénètre dans les cellules et active des protéases qui, à leur tour, activent la xanthine oxydase. Celle-ci produit des radicaux libres qui altèrent entre autres les membranes cellulaires. (D'après Deby, 1991).

chélateurs agissent à la fois au niveau de l'étape d'initiation (en empêchant la perte d'un $^{\circ}H$) et au niveau du processus de propagation qui implique le clivage des peroxydes lipidiques catalysé par des métaux (Roberfroid, 1987).

C. PROCESSUS CATALYTIQUES

De nombreuses enzymes oxydo-réductrices produisent des radicaux libres (surtout des $O_2^{\circ(-)}$ au sein de leur site catalytique au cours du transfert d'un électron. Ces radicaux peuvent diffuser du site catalytique vers le milieu cellulaire avant que l'oxydation ou la réduction catalysée ne se termine. La table I.3. reprend ces différentes enzymes.

Par exemple, au cours de la dioxydation de l'acide arachidonique par la voie cyclooxygénasique et de la monoxydation de l'acide arachidonique par la lipoxygénase, des intermédiaires radicalaires sont générés (Lunec, 1990).

La xanthine oxydase constitue un cas particulier d'enzyme productrice de radicaux libres. Cette enzyme mitochondriale se présente normalement sous la forme d'une déshydrogénase (X.D.) à NAD^+. Elle réduit le NAD^+ en NADH , et ne transfère donc pas ses électrons à l'O_2, ce qui explique que la xanthine déshydrogénase ne génère pas d'intermédiaires radicalaires. Elle catalyse la réaction suivante :

$$\text{xanthine} + H_2O + NAD^+ \xrightarrow{\text{X.D.}} \text{acide urique} + NADH + H^+.$$

Dans un tissu sain, environ 10 % de cette enzyme subit une protéolyse partielle ou une oxydation de certains groupements thiols. Une modification du pH ou du calcium intracellulaire augmente la protéolyse de la X.D. par l'intermédiaire de protéases calcium ou pH dépendantes (Emerit et al, 1990) (fig I.22.).

Ces altérations provoquent la conversion de la forme déhydrogénase en oxydase (X.O.) : l'oxygène devient alors accepteur d'électrons à la place du NAD^+.

$$\text{xanthine} + H_2O + 2O_2 \xrightarrow{\text{X.O.}} \text{acide urique} + 2O_2^{\circ(-)} + 2H^+.$$

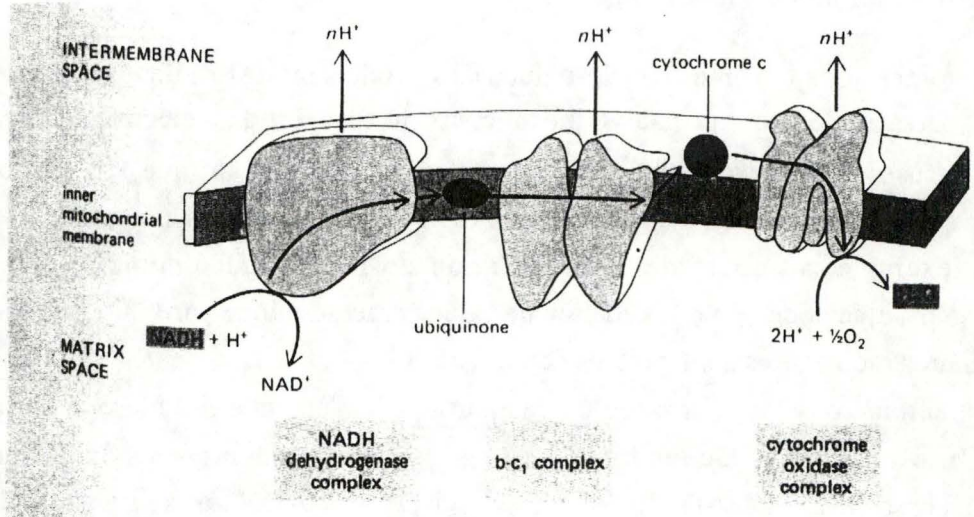


Fig. I-23 : Flux des électrons à travers les transporteurs de la chaîne respiratoire. (D'après Alberts et al., 1989).

D. PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES AU NIVEAU DES ORGANITES

Que la mitochondrie représente l'organite le plus important en matière de production de radicaux libres ne surprend pas si l'on sait qu'elle est le siège de la respiration cellulaire, et par conséquent de nombreuses oxydations. Au cours de la chaîne respiratoire, 2 électrons sont retirés au NADH par la NADH déshydrogénase ; ils transitent à travers la chaîne de transporteurs d'électrons (flavoprotéine, coenzyme Q, cytochrome b, cytochrome c, cytochrome a + a3) pour être finalement cédés à l'O_2 alors réduit en H_2O. Les sites de production des radicaux libres ont été localisés au niveau de l'ubiquinone et de la flavoprotéine de la NADH déshydrogénase (fig I.23). Environ 1 à 4 % de la quantité totale d'O_2 utilisés par la mitochondrie seraient utilisés pour produire des $O_2^{\circ(-)}$ puis des H_2O_2. De plus, 20 % de ces $O_2^{\circ(-)}$ échapperaient à la superoxide dismutase en étant expulsés hors de la mitochondrie par des canaux anioniques. Les H_2O_2 formés peuvent également atteindre le cytosol en diffusant à travers les membranes mitochondriales.

La production des radicaux libres par la mitochondrie peut augmenter fortement dans certaines conditions physiologiques, comme les phénomènes d'ischémie reperfusion. L'ischémie, qui se définit comme une interruption du flux sanguin, provoque les mêmes réactions cellulaires qu'une hypoxie (baisse de pression artérielle au niveau des tissus), c'est-à-dire un découplage de la phosphorylation oxydative et une activation de X.D. en X.O. Nous avons déjà abordé le phénomène de la transformation de X.D. en X.O., mais le découplage des mitochondries provoque aussi une surproduction de radicaux libres. En effet, en absence d'O_2, la chaîne de transporteurs d'électrons s'arrête, ainsi que la phosphorylation de l'ADP en ATP. Lors de la phase de reperfusion, le système des cytochromes ne fonctionne pas instantanément. L'oxygène est alors réduit, non plus par le cytochrome a + a_3, mais, au début de la chaîne de transporteurs, en $O_2^{\circ(-)}$ (Deby, 1991).

La membrane du réticulum endoplasmique constitue également un site de production d'$O_2^{\circ(-)}$ générés au cours du fonctionnement des cytochromes b5 et P450. Ces cytochromes participent à la détoxification des xénobiotiques liposolubles et des dérivés métaboliques nuisibles. Pour ce faire, ils utilisent des électrons captés à partir du NADPH (ou facultativement du NADH) grâce auxquels les cytochromes P450 et b5 pourront transformer des composés non polaires en dérivés hydroxylés. Ceux-ci, hydrosolubles, seront alors éliminés par la voie urinaire. C'est au cours de ces transferts d'électrons que des radicaux superoxydes sont également produits (Byczkowski et Gessner, 1988).

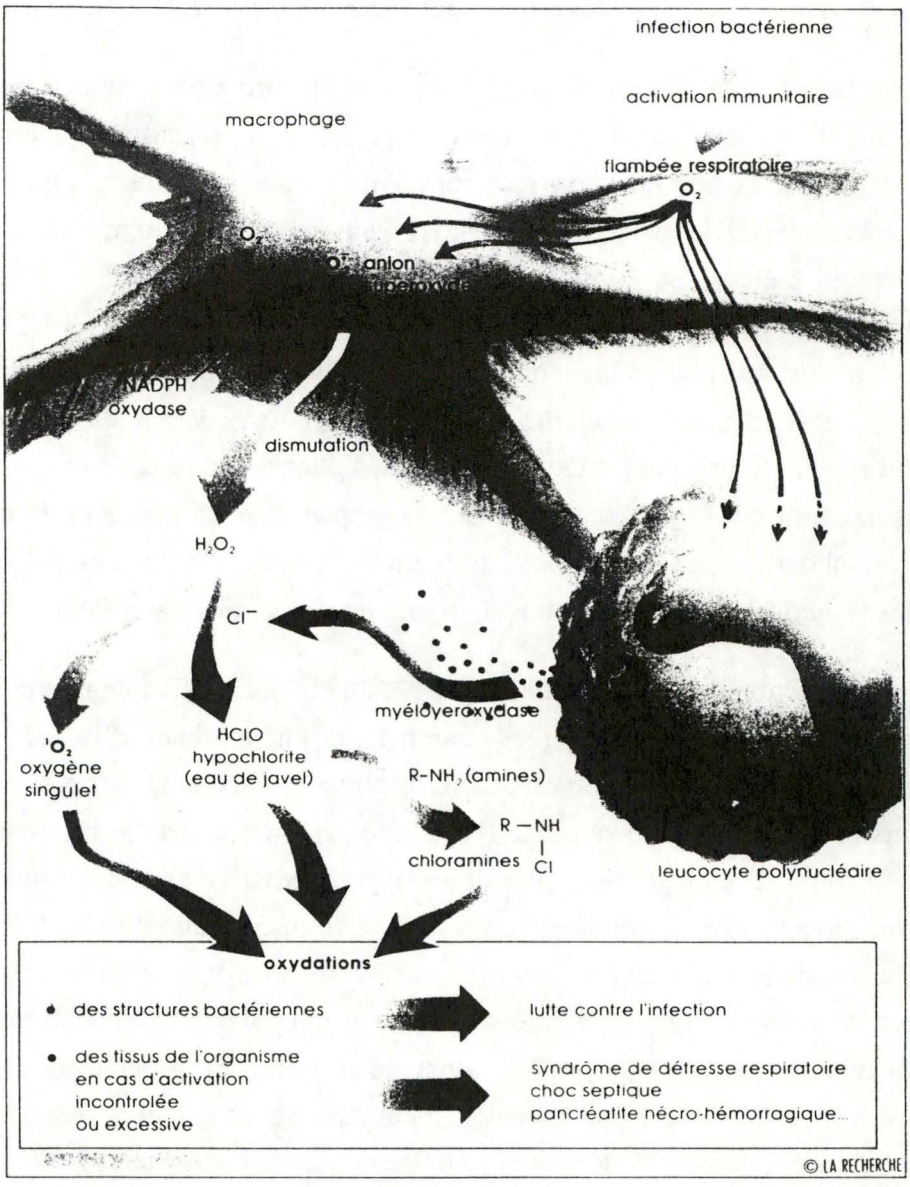


Fig. I-24 : Schéma illustrant la flambée respiratoire déclenchée chez un macrophage suite à une infection bactérienne. La flambée respiratoire provoque l'apparition de radicaux libres dans le milieu. (Deby, 1991).

Les peroxysomes portent ce nom en raison des fortes concentrations en oxydases (urate oxydase et D-amino acid oxydase) qu'ils contiennent. Ces enzymes retirent 2 atomes d'hydrogène à des substrats organiques (R) :

$$RH_2 + O_2 \longrightarrow R + H_2O_2$$

Les H_2O_2 générés au cours de ces réactions d'oxydation sont utilisés par la catalase pour oxyder toute une série de substrats comme les phénols, les éthanols,....Seulement quelques pourcents d'H_2O_2 échappent à la catalase et diffusent dans le cytoplasme.

La production de radicaux libres dans les organites végétaux (chloroplastes, thyllacoïdes) n'entre pas dans le cadre du travail.

2.2.2. SOURCES EXOGENES ET EXTRACELLULAIRES

A. L'IRRADIATION

L'exposition de cellules à des ultra-violets ou à des radiations ionisantes comme les rayons X et les rayons γ provoque la formation de radicaux libres. Les radiations transfèrent leur énergie aux constituants cellulaires et surtout à l'eau. La fission homolytique de l'eau induite par des rayons X ou γ provoque l'apparition de radicaux $^{\circ}OH$, $O_2^{\circ(-)}$ et aussi d'H_2O_2 (Roberfroid, 1987). D'autres part, plusieurs pigments biologiques (chlorophylle, flavines, porphyrines, ...) produisent des O_2 singulets lorsqu'ils sont illuminés (Byzckowski et Gessner, 1988).

B. LES PHAGOCYTES ACTIVES

Lorsqu'ils sont activés, les neutrophiles (PMN), macrophages / monocytes et les éosinophiles augmentent leur consommation d'O_2. Cette "flambée respiratoire" ("oxydative burst") est due à une transformation massive d'O_2 en $O_2^{\circ(-)}$ par une enzyme membranaire, la NADPH oxydase. Celle-ci catalyse la réduction d'O_2 en transférant des électrons provenant du NADPH. Le shunt des hexoses monophosphate permet de régénérer le NADPH à partir du $NADP^+$. Etant donné que la NADPH oxydase est localisée à la surface

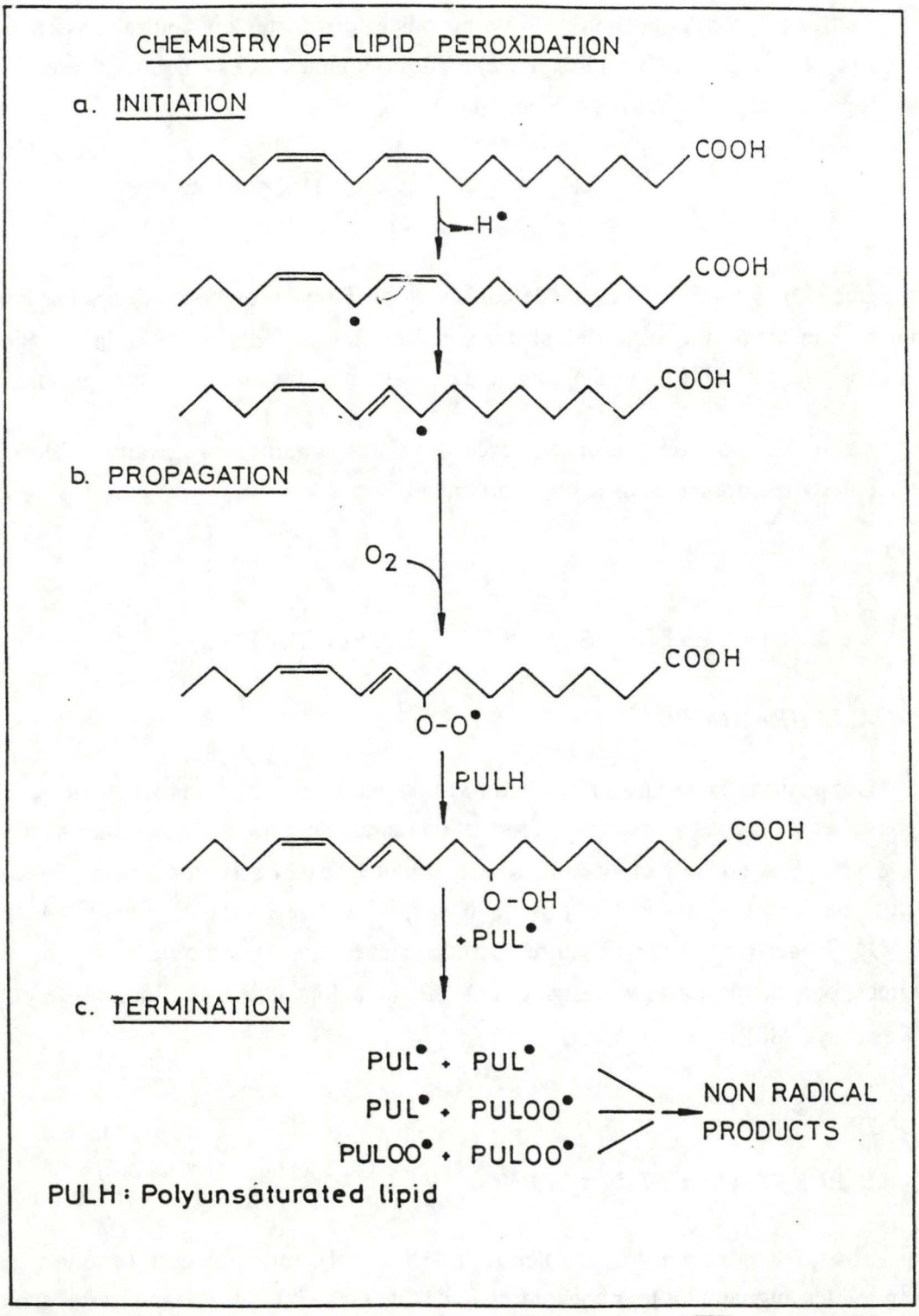


Fig. I-25 : Mécanisme radicalaire de la peroxydation lipidique.

cellulaire, l'$O2^{\circ(-)}$, produit sans formation d'une vacuole, aboutit dans le milieu extracellulaire (fig. I.24.).

Au cours d'une inflammation, la flambée respiratoire des phagocytes activés permet donc la libération de divers radicaux libres destinés en premier lieu à lutter contre les agents bactériens (Lunec, 1990).

2.3. ROLES BIOLOGIQUES DES DERIVES OXYGENES

Le but de cette introduction sur les radicaux libres étant simplement de souligner leur importance, nous n'aborderons que brièvement quelques points qui nous paraissent importants.

Les dérivés oxygénés, comme nous l'avons vu, sont des espèces chimiques très réactives capables de causer le retrait d'un H°, une scission d'un lien covalent, et des réactions de polymérisation. Les acides gras polyinsaturés, les protéines et le DNA sont tous susceptibles de subir les attaques des radicaux, surtout d'HO°.

2.3.1. PEROXYDATION LIPIDIQUE

Les acides gras polyinsaturés possèdent des doubles liaisons C=C particulièrement sensibles aux OH° qui leur enlèvent un H° (Fig I.25.). Ceci provoque un réarrangement intramoléculaire formant un deuxième conjugué radicalaire plus stable. Une molécule d'O_2 réagit très rapidement avec ce radical lipidique pour former un peroxyde radicalaire (étape de propagation). La réaction peut se terminer par exemple en prenant un H° à une autre molécule ou à un autre carbone de la même molécule, comme dans le cas de la dioxygénisation de l'acide arachidonique (fig. I.26.).

La présence d'acides gras à courte chaîne comprenant des groupements R-OOH, R-CHO et R-OH déstabilise les membranes et modifie leur perméabilité ainsi que leur fluidité. De plus, ceci peut empêcher la membrane plasmique de maintenir ces gradients ioniques, en provoquant éventuellement un influx de calcium. Cet influx peut encore aggraver la situation en activant, entre autres, les protéases responsables de l'activation de la X.D. en X.O.

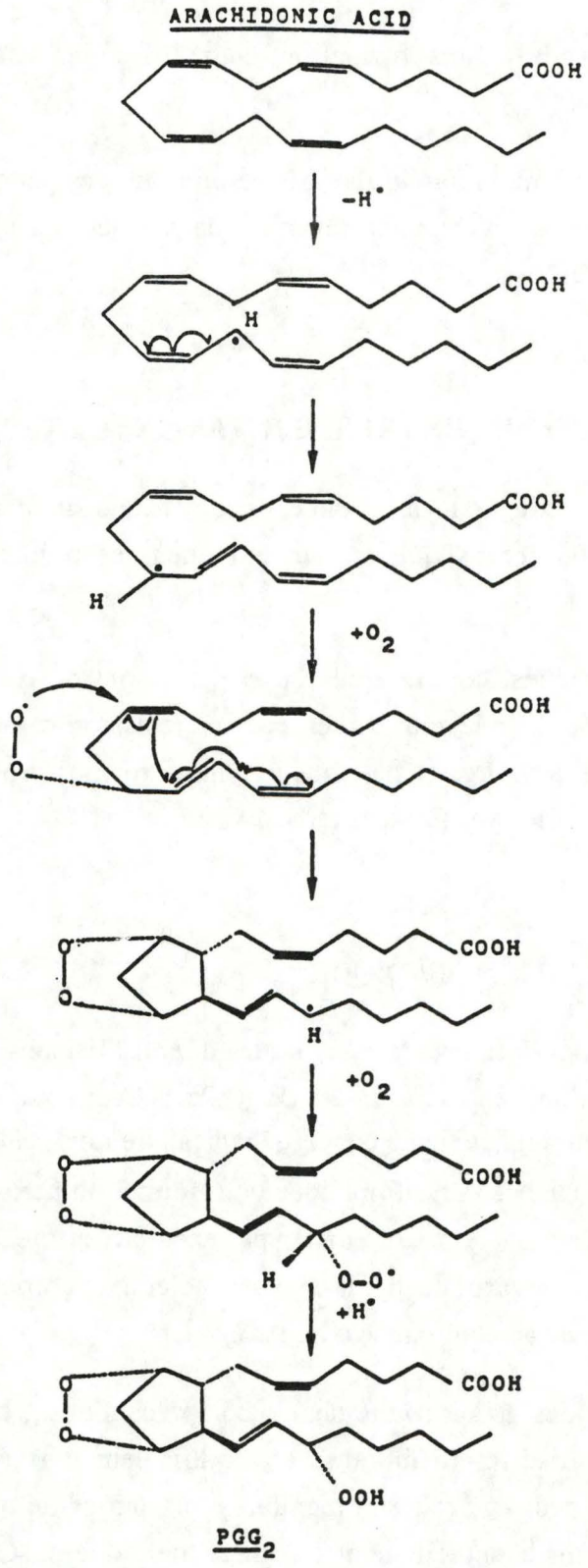


Fig. I-26 : Réaction radicalaire se déroulant au cours de la dioxydation de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase.

2.3.2. L'OXYDATION DES PROTEINES

Les radicaux libres attaquent préférentiellement les acides aminés aromatiques, la cystéine, les ponts disulfures et, dans une moindre mesure, les résidus proline. Ces altérations peuvent avoir des conséquences importantes pour l'intégrité conformationnelle de diverses protéines dont les IgG, l'albumine et le collagène. Des protéines oxydées ont effectivement été détectées dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, maladie inflammatoire où le liquide synovial est particulièrement enrichi en cellules inflammatoires activées (Lunec, 1990).

2.3.3. ALTERATIONS DE L'ADN.

Les radicaux libres provoquent des cassures de brin et des modifications de l'ADN. Les °OH sont les principaux responsables de l'attaque des groupes méthyl de la thymidine et de modifications dans les bases de l'ADN. Ces modifications stimulent les mécanismes de réparation, provoquant parfois l'apparition de mutations de l'ADN.

2.3.4. ROLES PHYSIOLOGIQUES DES RADICAUX LIBRES

Ces effets des radicaux libres sur les molécules biologiques justifient leur toxicité dans les cas de fortes concentrations puisqu'ils affectent presque tous les composants cellulaires. Leur action sur les constituants lipidiques surtout provoque de graves perturbations des membranes, entraînant des modifications des enzymes membranaires comme les pompes ioniques, ou même une lyse cellulaire que nous avons observée in vitro à forte concentration en H_2O_2. C'est pourquoi les radicaux libres sont souvent accusés de provoquer une grande partie des dommages tissulaires occasionnés lors d'ischémie-reperfusion (au niveau, du coeur, du cerveau, des reins, du pancréas, des muscles squelettiques, de la peau, ...), ou lors d'inflammations aigues (Byczkowsky et Gessner, 1988).

Au cours de l'inflammation, l'effet cytologique des radicaux libres, principalement dû à la flambée respiratoire, se manifeste d'autant plus sévèrement que l'augmentation de la concentration radicalaire est localisée. Byczkowski et Gessner (1988) présentent des preuves de l'implication des dérivés oxygénés dans le développement d'inflammations chroniques et de phénomènes auto-immuns. En effet, on détecte dans les lipides synoviaux

de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde des produits de peroxydation lipidique et d'oxydation protéique.

N'oublions pas cependant que l'organisme tire profit de ces propriétés cytologiques des radicaux libres quand elles affectent des bactéries ou d'autres organismes pathogènes.

Les dérivés oxygénés jouent encore d'autres rôles positivement importants, notamment au niveau du cytochrome P450, de la chaîne de transporteurs d'électrons, du fonctionnement des peroxysomes, ...

Certains auteurs considèrent trois grands niveaux d'action des radicaux libres, correspondant à trois registres de concentrations. Tout d'abord, les concentrations élevées en radicaux libres se caractérisent par une importante toxicité des radicaux, utilisée contre les agents pathogènes dans le cadre de l'inflammation. Ensuite, une production temporaire accrue de radicaux libres peut jouer un rôle d'activateur cellulaire. Nous développerons ce point dans le paragraphe 2.5. Enfin, les dérivés oxygénés semblent jouer un rôle à long terme dans le processus de vieillisement cellulaire (Remacle et al., à paraître).

Au vu et au su de tous les effets biologiques causés par les radicaux libres, nous comprenons facilement que la nécessité s'imposait pour les cellules de posséder des systèmes de défense destinés à se protéger des effets néfastes des radicaux.

En outre, les radicaux libres sont des produits normaux du métabolisme cellulaire qui subissent, comme il se doit, des contrôles négatifs.

2.4. DEFENSES DE L'ORGANISME CONTRE LES DERIVES OXYGENES

Tout comme les dérivés oxygénés, les systèmes de défense de l'organisme présentent un caractère ubiquiste. Ils se répartissent dans tout l'organisme, avec cependant une préférence marquée pour les types cellulaires hautement différenciés où ils sont plus abondants.

Les systèmes de protection naturels contre les dérivés oxygénés comprennent des petites molécules comme la vitamine E et la vitamine C, le glutathion, le ß carotène, l'acide urique et la transferrine, mais aussi des défenses enzymatiques dont la glutathion peroxydase (GPX), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase.

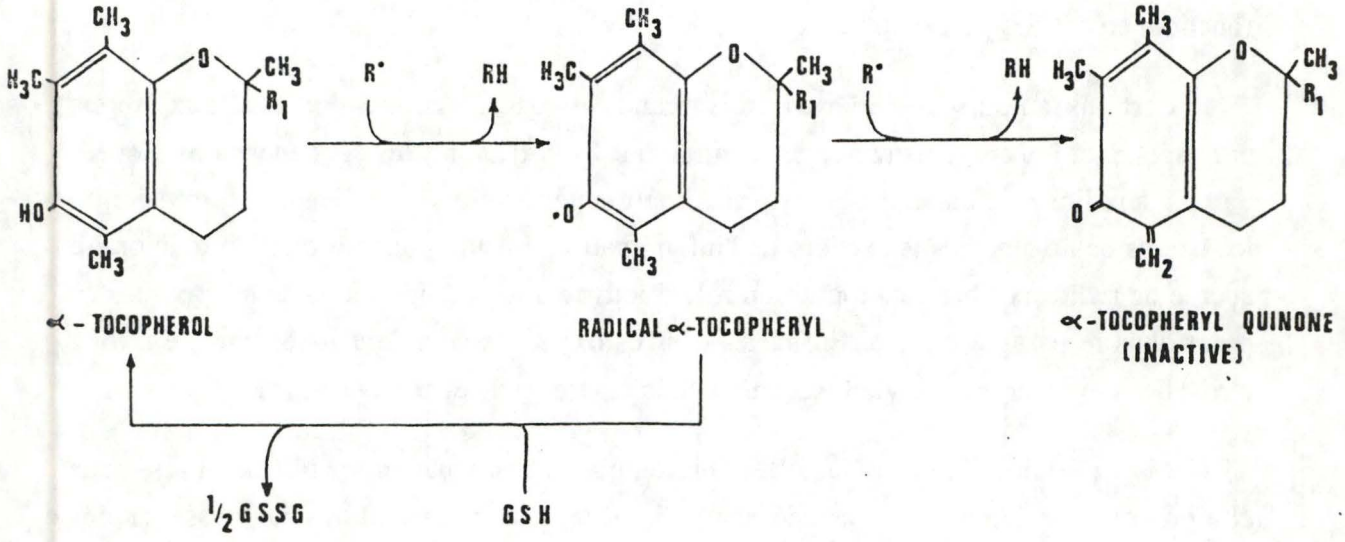


Fig. I-27 : Réaction radicalaire de l'oxydation de l'α-tocophérol en α-tocophéryl quinone active. Le radical α-tocophéryl peut être réduit en α-tocophérol avec oxydation de glutathion.

Le système de protection cellulaire contre les dérivés oxygénés comporte de nombreux acteurs interagissant souvent de façon complexe. Nous nous contenterons d'aborder brièvement, à titre d'exemple, deux composants de ce système : la vitamine E comme représentant des défenses non-enzymatiques et la GpPX en tant que protection enzymatique contre les dérivés oxygénés.

La vitamine E

La vitamine E, ou α-tocophérol, est une molécule liposoluble. Hautement hydrophobe, la vitamine E se trouve dans les membranes biologiques et dans les lipoprotéines du sang.

Elle agit en cédant successivement 2 H° à une molécule radicalaire (fig.I.27). La transformation en α-tocophéryl quinone, produit très stable, permet donc l'élimination de 2 molécules radicalaires.

La vitamine E intervient surtout comme protecteur des membranes biologiques où elle limite le phénomène de peroxydation lipidique. Elle se comporte effectivement comme terminateur des réactions de peroxydation en neutralisant les radicaux peroxydes (Cotgreave, 1988).

$$ROO° + \text{vit E} \longrightarrow ROOH + \text{vit E}°$$

Le radical tocophéryl peut être réduit par du glutathion (GSH) pour régénérer de l'α-tocophérol.

Le glutathion et la GPX

Le glutathion est un tripeptide (le glutamyl-cystéinyl-glycine) présent dans les cellules pro- et eucaryotes à fortes concentrations (2 à 10 mM), mais aussi dans les fluides biologiques. Il constitue une protection antioxydante par différents mécanismes. Il peut réagir directement avec des radicaux libres $O_2^{\circ(-)}$, °OH et RO° par un processus de transfert radicalaire le transforme en GS° puis GSSG (Cotgreave, 1988). Mais surtout il peut réduire les hydroperoxydes (dont l'H_2O_2) suivant la réaction suivante :

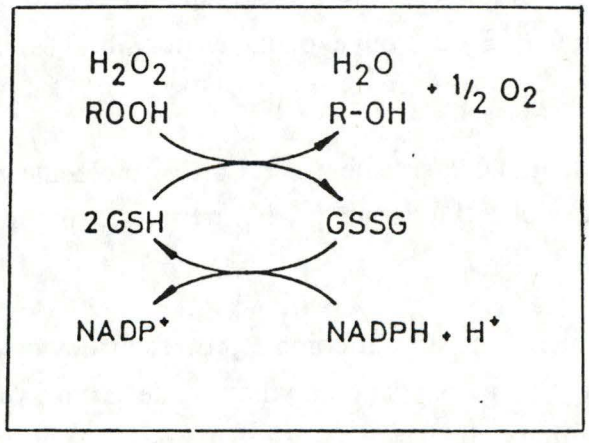


Fig. I-28 : Réaction d'oxydation du glutathion (catalysée par la GPX), et régénération du glutathion réduit par une NADPH reductase.

$$ROO^{\circ} + GSH \xrightarrow{GPX} 1/2\ GSSG + ROOH$$

Cette réaction est catalysée par la GPX, une enzyme à sélénium (Se-GPX) localisée dans les mitochondries, le cytoplasme de la plupart des cellules de mammifères et dans les fluides extracellulaires . La régénération du glutathion est assurée par une glutathion réductase qui oxyde le NADPH (fig.I.28.). Par son action sur les peroxydes, la GPX protège les membranes de la déstabilisation provoquée par les peroxydations lipidiques.

En conclusion, nous voyons qu'il existe dans les cellules au repos un équilibre entre les espèces radicalaires et les antioxydants, enzymatiques ou non. Plusieurs auteurs ont montré qu'une activation cellulaire de cellules mésangiales et de fibroblastes par l'IL-1α et le TNFα (Meier et al., 1989; Radeck, 1990) peut entraîner une rupture de cette "balance radicalaire" qui penche alors en faveur d'un excès de radicaux libres. Schreck et Baeuerle (1990), entre autres, ont proposé que cette augmentation fugitive de la concentration intracellulaire en radicaux pouvait jouer un rôle de second messager.

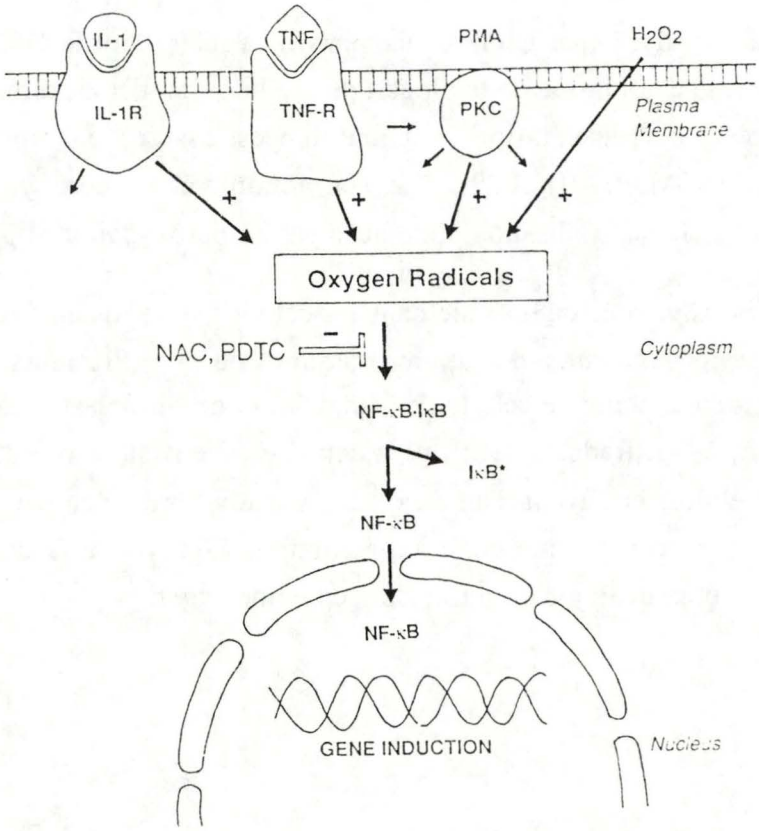


Fig. I-29 : Modèle d'activation cellulaire attribuant aux radicaux libres le rôle de messagers secondaires dans l'activation par l'IL-1, le TNF et le PMA. (D'après Schreck et Baeuerle, 1990).

Abbreviations used are: HIV-1, human immuno deficiency virus; SV 40, Simian Virus 40; Ig, immunoglobulin; IL-2, interleukin-2; MHC, major histocompatibility complex; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony stimulating factor; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; TNF-α, tumor necrosis factor-α. The κB motifs are arranged such that the more highly conserved half site A is on the left. For that purpose, some κB motifs are shown as they are found on the lower strand (indicated by *). If a gene has more than one motif, the κB sites are designated a, b and c. All motifs are shown in a decameric frame. Multiple decameric frames, indicated by Δ, are given for sites that are undeca- or dodecameric. A consensus motif is shown on the bottom of the panel. R, purines; Y, pyrimidines; N, any nucleotide. The bases shown in brackets are not strictly conserved. +, Schreck, R. and Baeuerle, P., unpublished data.

	Target gene	κB motif	Reference
Viruses	HIV-1	a G G G A C T T T C C	98
		b G G G A C T T T C C	
	cytomegalovirus	a G G G A C T T T C C	117
		b G G G A C T T T C C	
		c G G G G A T T T C C	
	adenovirus	a G G G A C T T T C C	146
		b G G G A A G T A C C	
	SV 40	G G G A C T T T C C	67, 89
Immuno-receptors	Ig κ light chain (mouse)	G G G A C T T T C C	74, 121
	T cell receptor β	G G G A G A T T C C	64
	IL-2 receptor α-chain (human)	G G G A A T C T C C	10, 80
		*Δ G G G A G A T T C C	
	MHC Class I (H-2K^b)	a G G G G A T T C C C	8, 60
		Δ G G G A T T C C C C	
		* G G G G A A T C C C	
		*Δ G G G A A T C C C C	
		b G G G G A A G C C C	
	β_2-microglobulin	G G G A C T T T C C	60
		*Δ G G G A A A G T C C	
	invariant chain Ii	G G G A A T T T C C	101
Cytokines	β-interferon	G G G A A A T T C C	39, 56, 77, 144
	GM-CSF	G G G A A C T A C C	119
	G-CSF	* G G G G A A T C T C	99
	interleukin-6	G G G A T T T T C C	83, 127
	interleukin-2	G G G A T T T C A C	58
	TNF-α	a G G G G C T T T C C	20, 123
		*Δ G G G A A A G C C C	
		b G G G A A T T C A C	
	lymphotoxin (TNF-β)	G G G G G C T T C C	95
		Δ G G G G C T T C C C	
		* G G G A A G C C C C	
		*Δ G G G G A A G C C C	
	proenkephalin	G G G A C G T C C C	108
		Δ G G G G A C G T C C	
	angiotensinogen	G G G A T T T C C C	111, 112
		* G G G A A A T C C C	
Others	serum amyloid A precursor	G G G A C T T T C C	30
	vimentin	* G G G G C T T T C C	85
	interferon regulatory factor-1	G G G G A A T C C C	+
		* G G G A T T C C C C	
	c-myc	* G G G A A A A C C C	
		*Δ G G G G A A A A C C	27
	consensus	G G G R N N(Y Y C)C	
	half site	A | B	

Table I-4 : Gènes cibles du facteur NF-κB et leurs motifs de liaison. (D'après Baeuerle, 1992).

3. LES RADICAUX LIBRES, MESSAGERS SECONDAIRES INDUITS PAR L'IL-1 ?

Les radicaux oxygénés remplissent les critères caractérisant les messagers intracellulaires :

- de petite taille, ils diffusent rapidement,
- ils sont présents constitutivement dans tous les types cellulaires,
- ils peuvent être synthétisés en réponse à un ligand extracellulaire et détruits rapidement grâce à une régulation cellulaire précise et rapide.

D'après une hypothèse émise par Schreck et Baeuerle (1990), la liaison de cytokines comme le TNF et l'IL-1 à leurs récepteurs respectifs provoquerait un accroissement du taux intracellulaire de dérivés oxygénés, lesquels activeraient un facteur de transcription appelé NF-κB. Celui-ci perdant sa sous-unité inhibitrice migrerait vers le noyau où il induirait la transcription de toute une série de gènes. Un argument clef en faveur de cette hypothèse réside dans l'inhibition de cette voie d'activation par certains anti-oxydants, comme nous le verrons dans la suite (fig I.29.).

Si cette idée paraît attirante, plusieurs étapes du processus restent toutefois obscures : comment la liaison des cytokines à leurs récepteurs induit-elle l'augmentation du niveau des radicaux libres dans la cellule ? De quels dérivés oxygénés s'agit-il ? Par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) le facteur NF-κB est-il activé ? Et enfin, comment ce facteur provoque-t-il l'induction des gènes ?

Plusieurs auteurs ont fourni des éléments de réponses à quelques-unes de ces questions ; nous allons essayer de résumer cette situation.

3.1. QU'EST-CE QUE LE FACTEUR NF-κB?

Le NF-κB a d'abord été caractérisé comme facteur de transcription se liant au motif κB localisé dans le "enhancer" du gène de la chaîne légère κ des immunoglobulines. Par la suite, on a montré qu'il était impliqué dans la régulation de plusieurs autres gènes cellulaires et viraux (table I.4) (Blank et al, 1992).

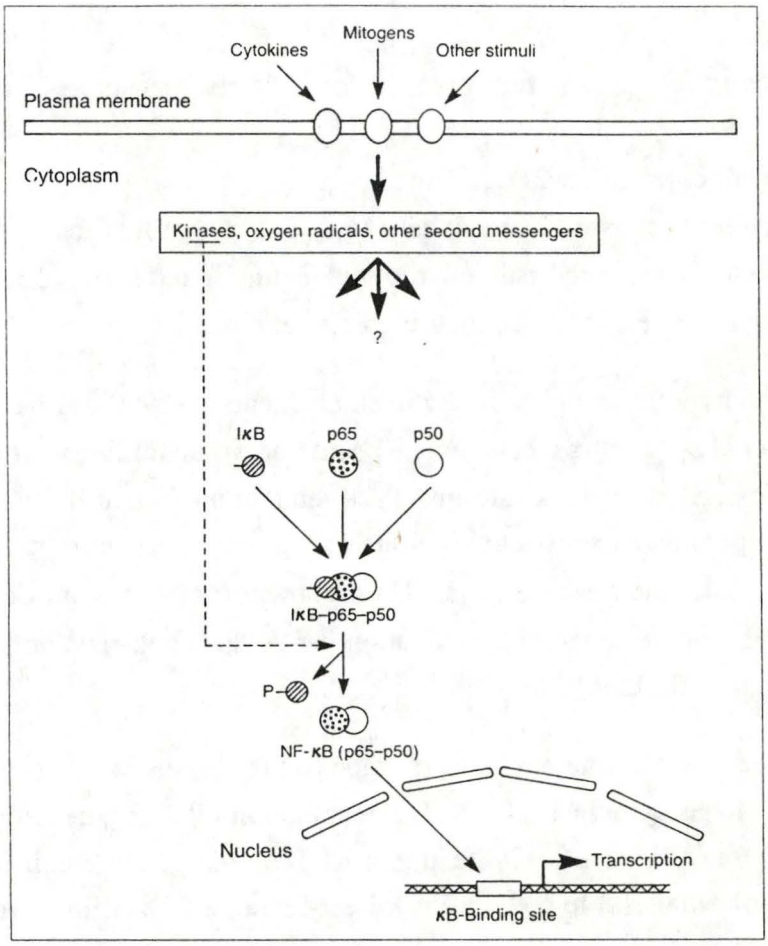


Fig. I-30 : Représentation schématique de l'activation du NF-κB. (Schéma simplifié d'après Blank et al., 1992).

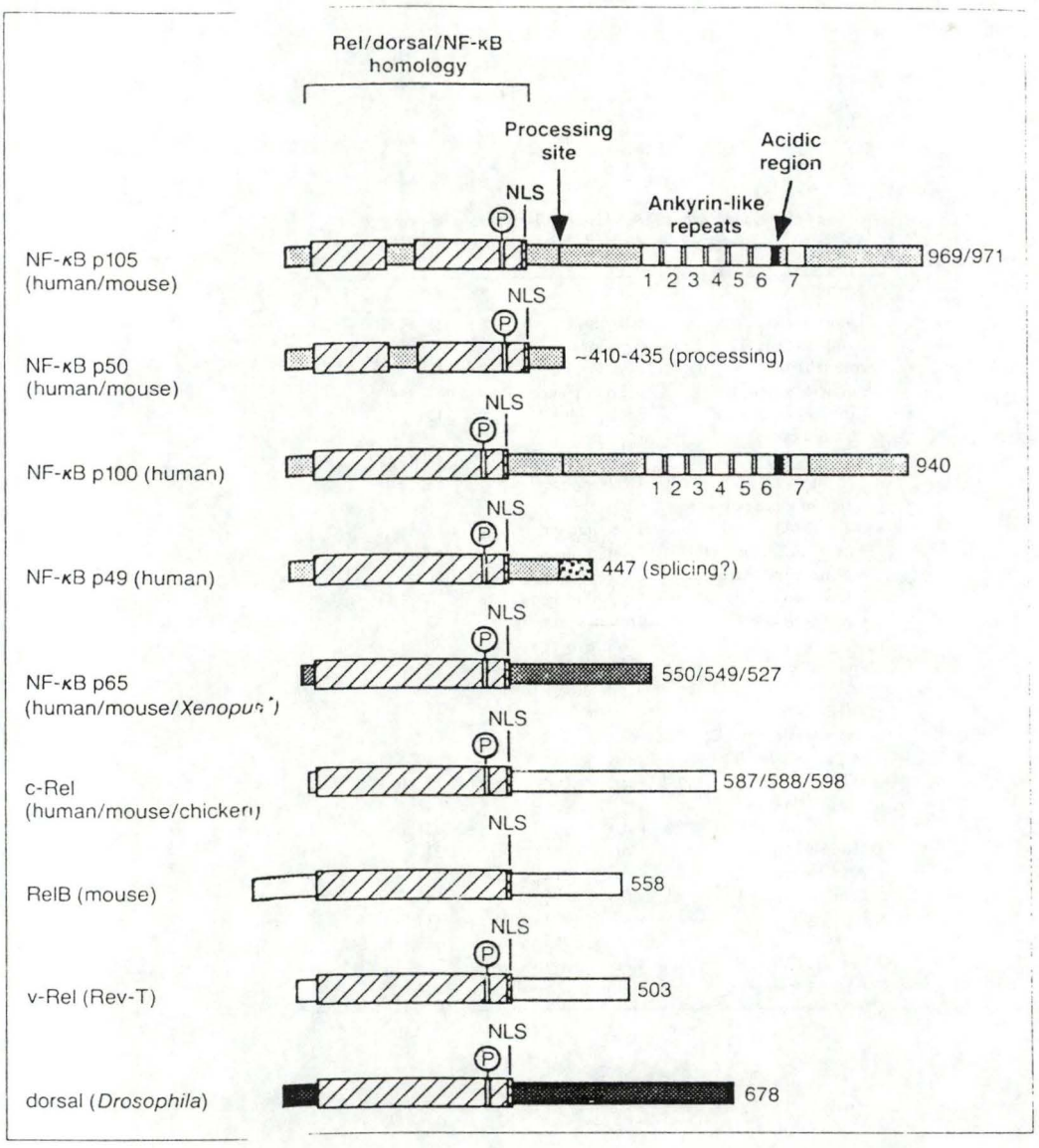


Fig. I-31 : Famille des protéines Rel/dorsal. (D'après Volker, 1992).

Abbreviations used are: PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PDB, phorbol-12, 13-dibutyrate; HTLV-I, human T leukemia virus type I.

Agent	Class	Reference
Tumornekrosisfactor-α	cytokine	25, 87, 100
Lymphotoxin (TNF-β)	cytokine	57, 95
Interleukin-1	cytokine	100
Poly(rI)-poly(rC)	double-stranded RNA	77, 144
Lipopolysaccharide	bacterial lipid	122
Phorbol esters (PMA, PDB)	T cell mitogen	51, 122
Lectins	T cell mitogen	12, 98
Calcium ionophores (+ PMA)	T cell mitogen	12, 98
Anti-CD28, anti-CD3	T cell mitogen	137
4-Nitroquinolineoxide	DNA-damaging	132
Ultraviolet light	DNA-damaging	132, 133
Cycloheximide	protein synthesis inhibitor	122
Anisomycin	protein synthesis inhibitor	122
Theileria parva	parasite	63
Cytomegalovirus (CMV)	virus	117
Hepatitis virus B (HBV)	virus	139, 140
HTLV-I	virus	10, 80
Herpes simplex virus type 1	virus	47
Human herpes virus-6	virus	31
Adenovirus	virus	128
Sendaivirus	virus	56, 77
iel (CMV)	viral transactivator	117
X (HBV)	viral transactivator	129, 139, 140
tax (HTLV-I)	viral transactivator	10, 80
E1A (Adenovirus)	viral transactivator	128

Table I-5 : Agents activateurs du facteur NF-κB. (D'après Baeuerle, 1990).

Dans le cytoplasme, le NF-κB comprend 3 sous-unités : p50, p65, et IκB. La sous-unité p50 est responsable de la liaison du facteur à l'ADN. Quant à p65, elle sert de récepteur à la troisième sous-unité, inhibitrice celle-là, IκB. Celle-ci retient le NF-κB dans le cytoplasme, inhibe sa liaison à l'ADN, et couple indirectement l'activation du facteur de transcription aux signaux extracellulaires (Urban et Baeuerle, 1990) (fig.I.30.).

La plupart des gènes cibles du NF-κB sont des gènes viraux (dont un du HIV-1), des gènes codant pour des récepteurs immuns ou pour des cytokines (dont l'IL-6) (table I.5.). Une caractéristique commune de toutes ces protéines réside dans leur implication dans les processus immédiats de la réponse immune, de l'infection et de l'inflammation.

Il est apparu récemment que les sous-unités p50 et p65 appartiennent à une famille de facteurs comprenant le produit du proto-oncogène c-Rel (dont le rôle physiologique n'est pas connu) et la protéine dorsale, impliquée dans la formation de la polarité de l'embryon de drosophile. Toutes ces protéines reconnaissent la séquence consensus à laquelle adhère la NF-κB. Les protéines de la famille nommée "Rel/dorsal" possèdent une région homologue de 300 acides aminés du côté amino terminal de la molécule (fig. I.31.) ; cette région contient un domaine codant pour la liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation et un site potentiel de phosphorylation par des PKA (Blank et al., 1992).

Au sein de cette famille existent différentes possibilités de dimérisation in vitro, entre p50 et p65 bien sûr, mais aussi entre p50 et c-Rel, ou p65 et c-Rel par exemple. Cette capacité de réaliser des hétérodimères d'affinités différentes pour les différentes cibles permettrait à la cellule de spécialiser les réponses fournies à différentes activations (Blank et al., 1992).

L'hétérodimère p50-p65 se lie avec une haute affinité ($K_d = 9.10^{-13}$ M) au motif κB 5'-GGGACTTTCC-3'. Des agents chélateurs comme l'EDTA diminuent fortement la liaison du NF-κB au DNA, suggérant l'importance du Zn^{++} pour la liaison. Toutefois, le domaine de liaison au DNA de p50 ne comporte pas de motif "doigt de zinc". L'influence positive de cations métalliques et de polyamines serait due à la capacité qu'ont ces agents de promouvoir et de stabiliser la courbure du DNA.

3.2. PAR QUELS MECANISMES MOLECULAIRES LE NF-κB EST-IL ACTIVE?

Contrairement à beaucoup d'autres facteurs de transcription, le NF-κB ne réside pas dans le noyau mais bien dans le cytoplasme, sous forme inactivée. L'IκB est responsable de cette localisation inhabituelle et de l'inactivation du facteur transcriptionnel. Les ligands qui activent le NF-κB provoquent en réalité l'inactivation de l'IκB, qui se dissocie des deux autres sous-unités, leur permettant ainsi de pénétrer dans le noyau et de jouer leur rôle de facteur de transcription (fig. I.30.).

Les mécanismes d'inactivation d'IκB ne sont pas encore clairs. In vitro, cette sous-unité peut être inactivée et donc libérée du NF-κB par traitement avec des PKC, des PKA ou des protéines kinases régulées par des groupes hémiques.

Toutefois, il n'existe pas encore de preuves d'une phosphorylation directe de l'IκB par ces protéines kinases. Le fait que le NF-κB réponde à des protéines kinases différentes pourrait signifier que celui-ci peut intégrer l'information de différentes voies de transduction (Jackson, 1992). Ceci justifierait l'activation de ce facteur par des molécules comme le PMA (phorbol myristate acétate), le TNF et l'IL-1 dont les voies de transduction du signal, bien que très peu connues pour les deux cytokines, semblent différer. Outre les protéines kinases, les radicaux libres pourraient également, de manière indirecte, contribuer à l'activation du facteur NF-κB (Schreck et Baeuerle, 1990) (fig. I.30). Or, plusieurs cytokines induisent la production de radicaux libres.

3.3. QUEL EST LE ROLE DES RADICAUX LIBRES DANS L'ACTIVATION DU FACTEUR NF-κB?

Le rôle des radicaux libres dans l'activation du facteur NF-κB a été décrit à partir de deux types d'observations :

- primo, certains anti-oxydants se sont avérés capables d'inhiber l'activation induite par l'IL-1 ou le TNF de certains gènes, sous contrôle du NF-κB, comme par exemple l'activation du gène HIV-1 chez les lymphocytes T des cellules Jurkat (Roederer et al., 1990; Schreck et al., 1991). Les anti-oxydants habituellement utilisés pour inhiber l'activation du NF-κB sont le N-acétyl-L-cystéine (NAC) et la pyrrolidine dithiocarbamate

(PDTC). Le NAC peut réagir directement avec les radicaux libres, mais surtout il augmente le taux intracellulaire de GSH.

- secundo, une molécule oxydante comme l'H_2O_2, ajoutée au milieu extracellulaire, peut produire certaines réponses, induites par l'IL-1 ou le TNF. Par exemple, l'H_2O_2 provoque une rapide augmentation dose-dépendante de calcium intracellulaire chez les cellules P388D1 (Hyslop, 1986), ainsi qu'une activation de la PLA_2 chez les macrophages alvéolaires de rat (Sporn et al., 1990). L'H_2O_2 peut provoquer l'activation du NF-κB, en particulier chez les lymphocytes T en culture (Schreck et al., 1991). Mais quand l'H_2O_2 est directement confronté au complexe cytosolique NF-κB extrait dans un surnageant de cellules homogénéisées, ces auteurs n'observent pas d'activation du facteur NF-κB. Ils en concluent que ce n'est pas le H_2O_2 lui-même, mais des métabolites dérivés qui seraient responsables de l'activation du facteur NF-κB.

Ces informations ne nous permettent pas de tirer des conclusions quant à la nature des radicaux libres impliqués. Etant donné les multiples interactions qui existent entre les composants cellulaires des systèmes anti-oxydants, cette question restera probablement encore longtemps sans réponse, et on peut s'attendre à ce que la solution soit plus complexe que prévue initialement. Par contre, il devient de plus en plus évident que plusieurs cytokines sont bien capables d'induire une production de radicaux libres, même dans les cellules non inflammatoires. Des mesures directes ont permis de mettre en évidence une production d'$O2^{\circ(-)}$ et d'H_2O_2 chez les fibroblastes humains induite par le TNF (Reieret et al., 1989) et par l'IL-1 (Meier et al., 1989).

Mais les mécanismes moléculaires aboutissant à une production de radicaux libres restent méconnus à l'heure actuelle. On pensait qu'un pas important avait été franchi en découvrant que des esters de phorbols, activateurs directs de la PKC, induisaient la production de radicaux libres (Baeuerle et Schreck, 1991) ; malheureusement, l'activation du facteur NF-kB induite par le TNF subsiste en présence d'inhibiteurs de la PKC (Schreck et al., 1991).

Plusieurs mécanismes possibles ont été imaginés pour expliquer l'augmentation de radicaux libres consécutive à une activation cellulaire par l'IL-1 ou le TNF, mais jusqu'à présent, aucun d'entre eux n'a reçu de confirmation expérimentale. Les cytokines pourraient engendrer une augmentation des radicaux issus des mitochondries et des peroxysomes, ou bien une activation d'enzymes productrices de radicaux libres (du type xanthine oxydase par exemple), ou encore une inhibition des systèmes cellulaires anti-oxydants.

4. MODELE IN VITRO

Au cours de nos expériences, nous avons travaillé avec des fibroblastes embryonnaires de poumon humain. Ce type cellulaire répond en général facilement et de manière non négligeable aux stimulations par l'IL-1 (Bouchelouche et al., 1991 ; Burch, 1991 ; Corkey et al, 1991). De plus, les fibroblastes sont jusquà présent peu étudiés en matière d'activation du NF-κB, lequel a surtout été étudié chez les cellules immunitaires.

Comme le NF-κB est connu pour contrôler l'expression du gène de l'IL-6, nous avons voulu vérifier que l'IL-1 induisait bien la production d'IL-6 par ce type cellulaire. Mais nous nous sommes également intéressé à d'autres réponses cellulaires comme l'augmentation du taux calcique dans le cytosol et l'activation de la PLA_2. En effet, aucun rapport entre ces réponses cellulaires et le NF-κB n'a été mis en évidence jusqu'à présent ; pourtant ces réponses cellulaires sont induites par l'IL-1 (cfr. point 1.2.1.).

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier que certains résultats obtenus avec des fibroblastes se reproduisaient avec un autre type de cellules mésenchymateuses, les chondrocytes. Les chondrocytes sont des acteurs importants de l'inflammation de l'articulation (Knott, 1992), et l'inflammation avec tout son éventail de cytokines et de production radicalaire, constitue un contexte physiologique qui sous-tend toute la problématique de l'activation du NF-κB.

5. OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail consiste à vérifier le rôle des radicaux libres et du NF-κB dans l'activation cellulaire par l'IL-1. Pour ce faire, nous procéderons en quatre étapes.

Nous nous attacherons d'abord à vérifier l'action de l'IL-1 sur différentes réponses cellulaires, à savoir l'accroissement du taux de calcium cytosolique, l'activation de la PLA_2 et la libération d'IL-6.

Nous observerons ensuite l'impact de différents anti-oxydants sur chacune de ces réponses cellulaires.

Nous tenterons enfin de reproduire les effets de l'IL-1 avec un système oxydant comme l'H_2O_2 et la nitrofurantoïne.

Nous vérifierons également si, dans ces cellules, l'IL-1 active bien le facteur transcriptionnel NF-kB.

II. MATERIELS ET METHODES

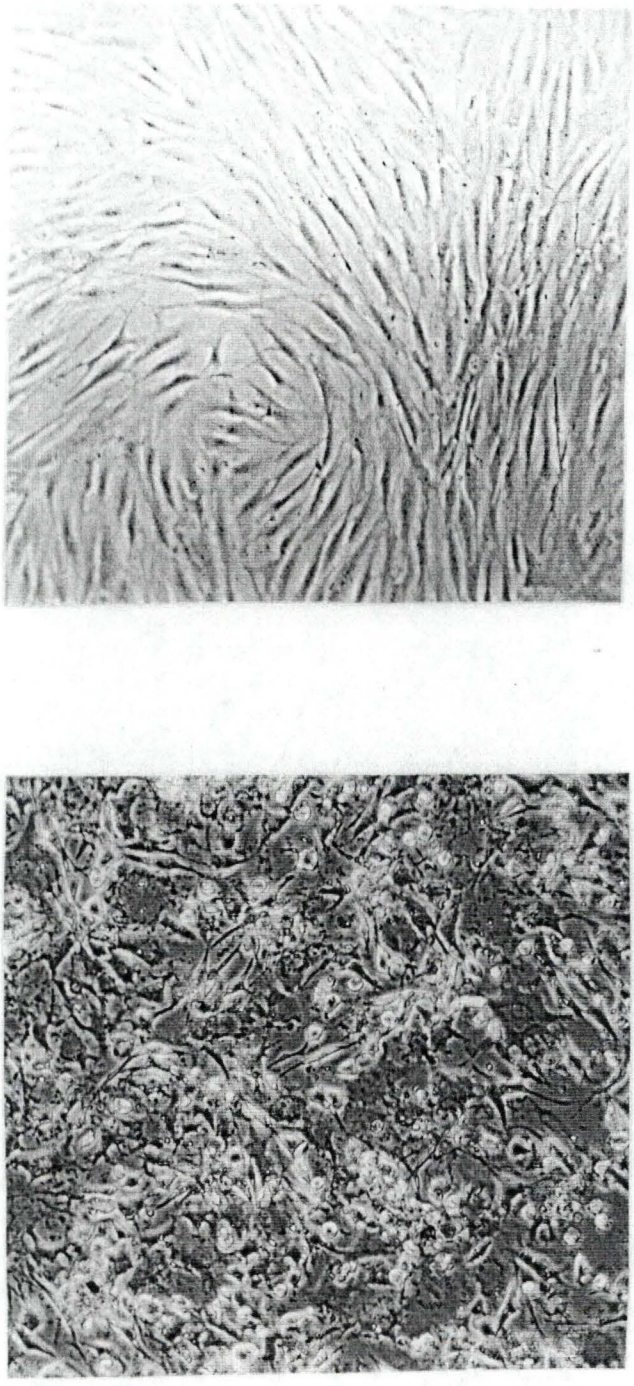


Figure II. 1 : Culture de fibroblastes de poumon en 21ème génération (A) et de chondrocytes humains (B) en 1ère génération.

1. CULTURE DE CELLULES.

1.1. MATERIELS.

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

Les chondrocytes sont mis en culture à partir de têtes fémorales de patients subissant le remplacement de cette partie du fémur par une prothèse. Seul le cartilage d'aspect "sain" est prélevé au cours de la mise en culture.

-OPT : milieu OPTI-MEM (Gibco, Grande-Bretagne) : milieu de culture composé du milieu minimum essentiel de Eagle (MEM), tamponné avec de l'HEPES et du bicarbonate de sodium (2,4 g/l), additionné d'hypoxantine, de thymidine, de facteurs de croissance. De plus, nous enrichissons ce milieu de pyruvate de sodium 1 mM, de L-glutamine 2 mM et de mercaptoéthanol 50 µM. L'addition de pyruvate et de mercaptoéthanol se justifie par leurs propriétés antioxydantes.

Nous utilisons aussi de l'OPT + GLU : milieu OPT enrichi uniquement de L-glutamine 2 mM, c'est-à-dire sans mercaptoéthanol ni pyruvate. Nous utilisons ce milieu pour toutes les expériences réalisées avec H_2O_2 et la nitrofurantoïne où la présence d'antioxidants dans le milieu de culture fausserait les résultats.

-OPT + SB : milieu OPTI-MEM contenant 10% de sérum de veau foetal (Gibco, Grande-Bretagne).

- OPT + SH : milieu OPTI-MEM contenant 10 % de sérum humain. Celui-ci est préparé par la Croix-Rouge de Namur à partir de prélèvements de sang réalisés sur des personnes saines agées de 18 à 25 ans. L'excès de lipides est éliminé par centrifugation puis filtration (Knott, 1992).

- Trypsine : solution stérile de trypsine à 0,25% dans une solution A Gibco (0,4 g/l KCl ; 2,2 g/l $NaHCO_3$; 6,8 g/l NaCl ; 1,0 g/l glucose ; 0,005 g/l rouge de phénol) (Gibco, Grande-Bretagne).

- Trypsine + EDTA : solution stérile de trypsine 0,25 % et EDTA 0,02 % préparée dans une solution saline modifiée de Puck (Gibco ref 043-05300, Grande-Bretagne).

-M : milieu de rinçage, en l'occurence le milieu basal de Eagle (BME, Flow, Irvine, Ecosse).

- HBSS + antibiotiques : solution stérile (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, Grande-Bretagne) à laquelle sont ajoutés les antibiotiques suivants : 200 µg / ml de streptomycine, 200 U/ ml de pénicilline, 5 µg / ml de fungizone (Gibco, Grande-Bretagne).

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

-OPT + DMSO 10% : milieu OPTI-MEM contenant 10% de diméthylsulfoxide (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le DMSO empêche la formation de gros cristaux d'eau dans les cellules lors de la congélation.

Les solutions de trypsine 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.

1.2. METHODE

1.2.1. FIBROBLASTES PULMONAIRES

A. REPIQUAGE DES FIBROBLASTES PULMONAIRES.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (Cel Cult, Grande-Bretagne). Lorsque les cellules arrivent à confluence, ce qui représente une densité moyenne de 80000 cellules/cm^2, on les repique en 2 ou en 4 , c'est-à-dire qu'après les avoir resuspendues dans de l'OPT + SB, les cellules de la boîte confluente sont réparties entre 2 ou 4 autres boîtes.

Tous les milieux utilisés lors du repiquage sont préchauffés à 37°C dans l'étuve, et les ustensiles employés sont stériles.

Après le rinçage de la boîte de culture avec 10 ml de milieu M, 2 ml de trypsine sont ajoutés. On laisse la trypsine agir pendant environ une minute à température ambiante, tout

en surveillant l'arrondissement cellulaire au microscope à contraste de phase. Ensuite, la trypsine est décantée et la boîte placée à 37°C durant une dizaine de minutes afin d'accélérer le processus de détachement des cellules.

Lorsque la majorité des cellules semblent très arrondies, on ajoute 10 ml de BME + SB, le sérum contenant des inhibiteurs de la trypsine. On récupère alors les cellules en agitant le milieu avec une pipette Pasteur afin de rompre les agrégats cellulaires et de bien rincer le support sur lequel étaient attachées les cellules.

Deux gouttes de la suspension cellulaire peuvent être prélevées pour réaliser un comptage de cellules à l'aide d'une chambre de Neubauer (Vel, Belgique).

Le milieu est recueilli et centrifugé (1000 RPM, 15 minutes, Hettich Universal, Tuttlingen, RFA).Le culot est resuspendu dans de l'OPT + SB (ou de l'OPT + HLA pour certaines expériences). Les cellules sont alors transférées dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (ou dans des boîtes multi-puits pour certaines expériences).

On ajuste enfin le pH du milieu en ajoutant du CO_2 aux cellules. Après quelques jours, un renouvellement du milieu s'impose afin de réapprovisionner les cellules en éléments nutritifs.

B. CONGELATION ET DECONGELATION DES CELLULES.

B.1. Congélation

Les cellules sont rincées avec du milieu M et trypsinisées suivant la méthode décrite ci-dessus. Après centrifugation, on obtient un culot que l'on resuspend dans 0,4 ml d'OPT + SB 40%.

On place ce milieu contenant les cellules dans une ampoule stérile (Nunc, Danemark). Juste avant la congélation, on ajoute 0,4 ml d'OPT + DMSO.

La congélation est réalisée grâce à un appareil programmable (l'Air Liquide, Liège) pour la diminution de la température. L'ampoule contenant les cellules est stockée dans de l'azote liquide à -196°C.

B.2. Décongélation

L'ampoule de cellules stockée dans de l'azote liquide est immédiatement plongée dans un bain à 40°C. Une fois décongelées, les cellules sont centrifugées pendant 15 minutes à 1000 RPM (Hettich Universal). Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans de l'OPT + SB avant d'être transféré dans une boîte de culture.

1.2.2. CHONDROCYTES

A. MISE EN CULTURE

La mise en culture des chondrocytes humains a été décrite de manière détaillée par Knott (1992) ; nous n'en retracerons que les étapes principales.

La tête fémorale est prélevée et directement placée dans un flacon contenant de l'HBSS + antibiotiques au cours de l'intervention chirurgicale ; elle sera mise en culture sous une hotte à flux laminaire dans les heures qui suivent l'opération.

Après trois rinçages, la pellicule cartilagineuse est prélevée, et découpée en très petits morceaux à l'aide de scalpels stériles. Ces fragments cartilagineux doivent subir une digestion enzymatique au cours d'incubations successives dans de l'OPT contenant de l'hyaluronidase 0,1 % (Sigma, USA) pendant 10 minutes, puis dans de la trypsine 0,25 % pendant 30 minutes, et enfin en présence de 0,1 % de collagénase (Sigma C-6885, USA) durant une nuit à 37°C. Après la digestion enzymatique, les chondrocytes sont filtrés sur des filtres nylex de 100 et 68 µm, avant d'être centrifugés. Le culot est resuspendu dans de l'OPT + SH et placé dans une boîte de culture de dimensions telles que la densité cellulaire soit de 50000 cellules par cm^2. Ceci constitue la primoculture ou la génération 0.

B. REPIQUAGE DES CHONDROCYTES

Les chondrocytes sont repiqués de la même façon que les fibroblastes de poumon, excepté quelques détails : tout d'abord, la densité cellulaire à confluence est plus faible que dans le cas des fibroblastes : elle est de l'ordre de 40000 cellules / cm^2. Ensuite, la trypsine utilisée pour détacher les cellules est additionnée d'EDTA, ce qui accélère la trypsinisation

puisque l'EDTA chélate les ions calcium. Enfin, nous utilisons de l'OPT + SH pour repiquer les cellules au lieu d'OPT + SB.

Les chondrocytes ne sont repiqués qu'une ou deux fois et ne sont donc pas congelés.En effet, ces cellules se dédifférencient très rapidement en culture (Knott, 1992).

2. TESTS DE CYTOTOXICITE

Au cours de nos expériences, nous avons fréquemment utilisé des molécules dont nous avons voulu vérifier la non-toxicité sur notre modèle cellulaire. Pour ce faire, nous avons d'abord utilisé le test classique au MTT. Malheureusement, certaines de nos molécules interfèrent avec la réduction du MTT, ce qui nous a obligé à nous tourner vers d'autres tests de cytotoxicité, à savoir le test au bromure d'éthidium et acridine orange, et le test de libération d'adénine tritiée.

Les molécules dont nous avons évalué la cytotoxicité sont :

. Actinomycine D (Sigma A-4262, Chemical Co, USA) diluée dans H_2O à raison de 0,125 mg/ml de façon à constituer une solution stock 100 µM. Les dilutions ultérieures (1 ; 0,5 ; 0,2 ; 0,1 µM) sont réalisées dans OPT + HLA.

. Cycloheximide (Sigma C-6255, Chemical Co, USA) à diluer dans H_2O pour créer une solution stock 1 mM. Les dilutions suivantes (50 µM et 10 µM) s'opèrent dans OPT + HLA.

. Nitofurantoïne (Sigma N-7878, Chemical Co, USA) est solubilisée à raison de 0,2M dans du DMF (distillé sur de la ninhydrine) avant de la diluer dans du milieu de culture OPT + HLA. La concentration finale en DMF ne peut dépasser 0,2 %.

. PDTC : pyrrolidine dithiocarbamate (Sigma P-8765, Chemical Co, USA). Une solution stock 10^{-2}M est constituée en dissolvant cet antioxydant dans de l'eau distillée ; les dilutions ultérieures sont réalisées dans de l'OPT + HLA.

. NAC : N-acétyl-L-cystéine (Sigma A-9165, Chemical Co, USA) dilué dans de l'eau à une concentration de 10^{-1}M, puis dans de l'OPT + HLA.

· H_2O_2 : perhydrol 30 % H_2O_2 pour analyse (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué dans H_2O à raison de 10,2 µl d'H_2O_2 dans 10 ml d'eau, ce qui constitue une solution de base d'H_2O_2 10^{-2} M. Les dilutions ultérieures sont réalisées dans OPT-GLU + HLA, c'est-à-dire du milieu OPT-GLU (voir point 1.1.) additionné de 0,2 % de HLA.

- Desferroxamine : achetée en pharmacie sous l'intitulé de Desferal (Ciba-Geigy, Groot Bijgaarden) et diluée dans de l'OPT + HLA à une concentration de 10^{-3} M.

- Trolox C : Trolox >97 % (Aldrich Chemical Co) dissous dans de l'eau pour constituer une solution stock de 10^{-3}M ; les dilutions ultérieures sont réalisées dans de l'OPT + HLA.

La cytotoxicité de l'H_2O_2 a été évaluée par la technique de l'adénine tritiée, celle du PDTC par la méthode au MTT, et la cytotoxicité des autres molécules a été étudiée par la méthode à l'acridine orange et bromure d'éthidium.

2.1. METHODE AU MTT

2.1.1. MATERIELS

- HLA : solution d'hydrolysat de lactalbumine 10 % (Gibco, Grande Bretagne).

- OPT + HLA : milieu OPT contenant 0,2 % d'HLA.

- OPT-GLU + HLA : milieu OPT-GLU (voir point 1.1.) contenant 0,2 % d'HLA.

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

- MTT : bromure de 3, (4,5-diméthylthiazol-2-yl) 2,5-diphényl térazolium (Sigma M-2128, Chemical Co, USA). Le MTT est dilué dans du PBS à raison de 2,5 mg/ml. La solution se conserve à 4°C pendant un mois.

-SDS : sulfate de sodium dodécyl (Janssen Chimica, Belgique). Nous préparons une solution 30% (w/v) de SDS dans de l'eau désionisée.

-DMF : diméthyl formamide (Merck, Darmstadt, Allemagne).

-Réactif de lyse SDS-DMF : réalisé en mélangeant un volume de DMF à deux volumes de solution SDS-H_2O préalablement chauffés à 37°C. Après dissolution complète, le pH est ajusté à 4,7 en ajoutant une solution acide composée de 9 volumes d'acide acétique 80 % pour un volume d'HCl 1N. Cette solution de lyse se conserve à 37°C.

- Un lecteur de plaques multi-puits (Micro-plate reader, Bio Rad, USA).

2.1.2. METHODE

Nous nous sommes inspiré de la méthode décrite par Mosmann (1983) et modifiée selon Hansen et al (1989). Mosmann dissout les cristaux de formazan avec de l'HCl dilué dans de l'isopropanol, tandis que Hansen et collaborateurs préconisent une solution de lyse

SDS-DMF qui améliore la dissolution des cristaux de foramzan. Cette méthode permet de déterminer le degré de cytotoxicité de certaines molécules vis-à-vis de cellules en culture. Le MTT est incorporé dans les mitochondries et transformé en cristaux de formazan (bleus) par la succinate déshydrogénase, active uniquement dans les cellules vivantes.

Les cellules sont repiquées (voir point 1.2.1.1.) dans de l'OPT + HLA à raison de 30000 cellules par cupule dans une plaque 96 puits (Cel Cult, Grande-Bretagne). Chaque puits contient 100 µl de la suspension cellulaire. Les puits consacrés aux "blancs" ne contiennent que du milieu de culture.

Le lendemain, nous décantons et déposons 100 µl de OPT + HLA contenant la molécule à tester (actinomycine D ou cycloheximide) excepté dans les puits "contrôles" qui ne reçoivent que du milieu de culture.

Les cellules sont alors incubées 6 heures ou 24 heures à 37°C, puis nous ajoutons 50 µl de colorant MTT. Au cours d'une incubation de 2 heures à 37°C, le MTT (jaune) se transforme en cristaux de formazan bleus.

Les protéines du milieu de culture et les débris cellulaires n'ont pas d'influence sur la coloration ; il n'est dons pas nécessaire de rincer les puits avant de décanter et d'ajouter 100 µl de réactif de lyse. Ce réactif permet de dissoudre les cristaux de formazan formés. Une incubation pendant la nuit à 37°C permet une dissolution parfaite des cristaux, ainsi que des quintuples homogènes.

La plaque est finalement agitée et lue grâce au lecteur de plaque multi-puits à 595 nm.

Le pourcentage de survie est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ de survie} = \frac{\text{D.O. cellules traitées - D.O. blancs}}{\text{D.O. cellules contrôles - D.O. blancs}} \times 100$$

2.2. COLORATION A L'ETHIDIUM BROMIDE

2.2.1. MATERIELS

- Milieux de culture : le milieu utilisé dépend de la molécule dont on veut tester la cytotoxicité. Pour tester le PDTC et le NAC, nous utilisons de l'OPT + HLA alors que la nitrofurantoïne est étudiée dans de l'OPT-GLU + HLA (voir point 2.1.1.). Les tests de cytotoxicité consécutifs à une décongélation s'effectuent dans de l'OPT + SB.

- PBS : tampon phosphate 10 mM contenant du NaCl 0,9% et à pH 7,4.

- Solution de coloration : 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma E-8751, Chemical Co, USA) et 15 mg d'acridine orange (Sigma, Chemical Co, USA) sont dissous dans 1 ml d'éthanol 95 % et 49 ml d'eau . Cette solution stock est aliquotée en fractions de 1 ml et stockée à -20°C. Nous l'utilisons diluée 100 fois dans du PBS : elle se conserve alors un mois à 4°C.

- Microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz)

2.2.2. METHODE

Comme l'ont décrit Parks et al (1979), cette méthode se base sur deux colorants fluorescents nucléaires : l'acridine orange et le bromure d'éthidium. L'acridine orange pénètre dans les cellules vivantes et colore leur noyau en vert fluorescent. Par contre, le bromure d'éthidium ne traverse pas la membrane des cellules vivantes, mais colore en orange le noyau des cellules mortes.

Ce test de cytotoxicité peut s'effecuer sur une suspension cellulaire (comme c'est le cas après une décongélation) ou sur des cellules attachées (coloration in situ).

A. COLORATION IN SITU

Les cellules sont repiquées comme décrit au point 1.2.1. dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey, USA) à raison de 100000 cellules par boîte. Le lendemain, le milieu de culture est décanté et remplacé par 2 ml de milieu contenant la molécule dont nous voulons connaître la cytotoxicité (PDTC ou NAC). Les boîtes contrôles

ne reçoivent que du milieu seul.

Après un temps d'incubation défini (6 ou 24 heures), le milieu est presque totalement décanté, et deux gouttes de la solution de coloration sont déposées dans la boîte de Pétri. Celle-ci est alors immédiatemant observée au microscope à fluorescence où les cellules apparaissent vertes ou oranges. Nous réalisons un comptage différentiel (cellules vertes et cellules oranges séparément) sur un total d'environ 500 cellules réparties sur l'ensemble de la boîte de Pétri.

Notons que le comptage doit s'effectuer dès que les cellules sont mises en présence du colorant, car celui-ci devient toxique au bout d'une dizaine de minutes.

B. COLORATION DE CELLULES EN SUSPENSION.

Nous prélevons une goutte de la suspension cellulaire que nous déposons sur une lame porte-objet. Nous déposons ensuite au même endroit une goutte de la solution de coloration. Le tout est recouvert d'une lamelle couvre-objet et observé au microscope à fluorescence. Le comptage différentiel s'effectue également sur environ 500 cellules.

Les résultats sont exprimés comme suit :

$$\% \text{ de survie} = \frac{\text{Nombre de cellules vertes}}{\text{Nombre de cellules vertes + nombre de cellules oranges}} \text{ X } 100$$

2.3. RELEASE D'ADENINE TRITIEE

2.3.1. MATERIELS

- OPT + HLA : milieu de culture OPT additionné de 0,2 % d'HLA.

- Adénine tritiée (Amersham, Royaume-Uni) : La solution stock nous est fournie à une concentration de 1 mCi / ml dans une solution aqueuse comprenant 2 % d'éthanol.

- Triton X100 (Merck 12298, Darmstadt, Allemagne) : à diluer dans de l'eau de façon

à réaliser, d'une part, une solution de triton 22 %, et d'autre part, une solution de triton 2 %.

- Aqua Luma : liquide scintillant (Lumac, Pays-Bas).

2.3.2. METHODE

Nous avons utilisé la méthode décrite par Andréoli et al. (1985). Le principe en est simple : si la molécule testée altère les cellules au point d'en détériorer les membranes, les cellules perdront au moins une partie de l'adénine radioactive qu'elles auront préalablement incorporée. Cette altération sera détectée en dosant la radioactivité contenue dans le surnageant.

Les cellules sont repiquées dans de l'OPT + HLA à raison de 30000 cellules par puits dans des plaques à 24 puits (Cel-Cult, Grande-Bretagne). La suspension cellulaire, additionnée de 1,5 µl/ml d'adénine tritiée (soit 2 µCi/ml) est répartie à raison de 1 ml par puits. Nous conservons 1 ml de la suspension cellulaire afin d'en évaluer sa radioactivité.

Suit une période d'incubation de 18 heures à 37°C, ce qui permet aux cellules d'incorporer le nucléotide radioactif parmi leurs constituants cellulaires.

Après ces 18 heures d'incubation, les cupules sont rincées quatre fois avec 1 ml d'OPT-GLU + HLA afin d'éliminer l'adénine tritiée non incorporée dans les cellules. Les rinçages de deux puits sont conservés ; ceux des autres puits sont rassemblés. Nous réalisons un comptage de radioactivité sur ces rinçages afin de contrôler l'évolution de la radioactivité au cours de ceux-ci.

Les cellules sont alors mises en présence d'un ml d'OPT-GLU + HLA contenant les molécules à tester, tandis que les puits contrôles ne reçoivent que du milieu seul. Ceux-ci permettront d'évaluer la libération spontanée d'adénine tritiée.

Après une incubation à 37°C de 6 ou 24 heures, nous prélevons délicatement le surnageant auquel nous ajoutons 100 µl de triton 22% afin de solubiliser les éventuelles cellules en suspension . A 200 µl de ce mélange, nous ajoutons 5 ml d'Aqua Luma pour le comptage de la radioactivité (S). Nous lysons le tapis cellulaire en y ajoutant 1,1 ml de triton 2% pendant 20 minutes. De même, 200 µl de lysat seront consacrés au comptage de la radioactivité (L).

Pour estimer la quantité d'adénine tritiée incorporée dans les cellules après le marquage, c'est-à-dire juste avant la stimulation, le tapis cellulaire de deux cupules est lysé par 1,1 ml de triton 2 % et un comptage de radioactivité est effectué sur 200 µl du lysat.

Tout comme pour le release de dérivés de l'acide arachidonique, nous pouvons exprimer les résultats de deux façons :

1. Pourcentage de radioactivité libérée : $\frac{S}{(S+L)} \times 100$

2. Pourcentage de survie (par rapport au CTL) : $\frac{S \text{ contrôles}}{S \text{ tests}} \times 100$

3. DOSAGE DE CYTOKINES

3.1. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE 6

3.1.1 MATERIELS

- Eurogenetics IL-6 kit : kit ELISA fourni par la firme Eurogenetics, permettant de doser de façon quantitative l'IL-6 humaine. Le kit complet contient :

. Une plaque multi-puits dont les 96 cupules sont tapissées avec un anticorps monoclonal anti-IL-6.

. Solutions standard, prêtes à l'emploi, de 10, 25, 50, 200, et 500 pg d'IL-6 par ml.

. Standard 0 ou tampon de dilution.

. Un échantillon de 1 ng d'IL-6 lyophilisée, à reconstituer dans du milieu de culture par exemple.

. Tampon de rinçage : tampon phosphate additionné d'agents antimicrobiens.

. Anticorps anti-IL-6 biotinylés.

. Streptavidine couplée à de l'HRP (peroxidase de raifort).

. Solutions de révélation :

Solution A : tampon phosphate-citrate contenant de l'H_2O_2.

Solution B : solution de tétraméthylbenzidine.

. Solution stop : acide sulfurique 2N.

- Surnageant de cellules : 100 µl (ou moins, car certains échantillons peuvent être dilués).

- Lecteur de plaques multi-puits (Bio RAD, USA).

3.1.2. METHODE

A. CULTURE DE CELLULES

Des fibroblastes de poumon sont repiqués comme décrit au point 1.2.1.1. à raison de 3200 cellules par cupules dans une plaque multi-puits (96 puits, Cel-Cult, Sterilin, Grande-

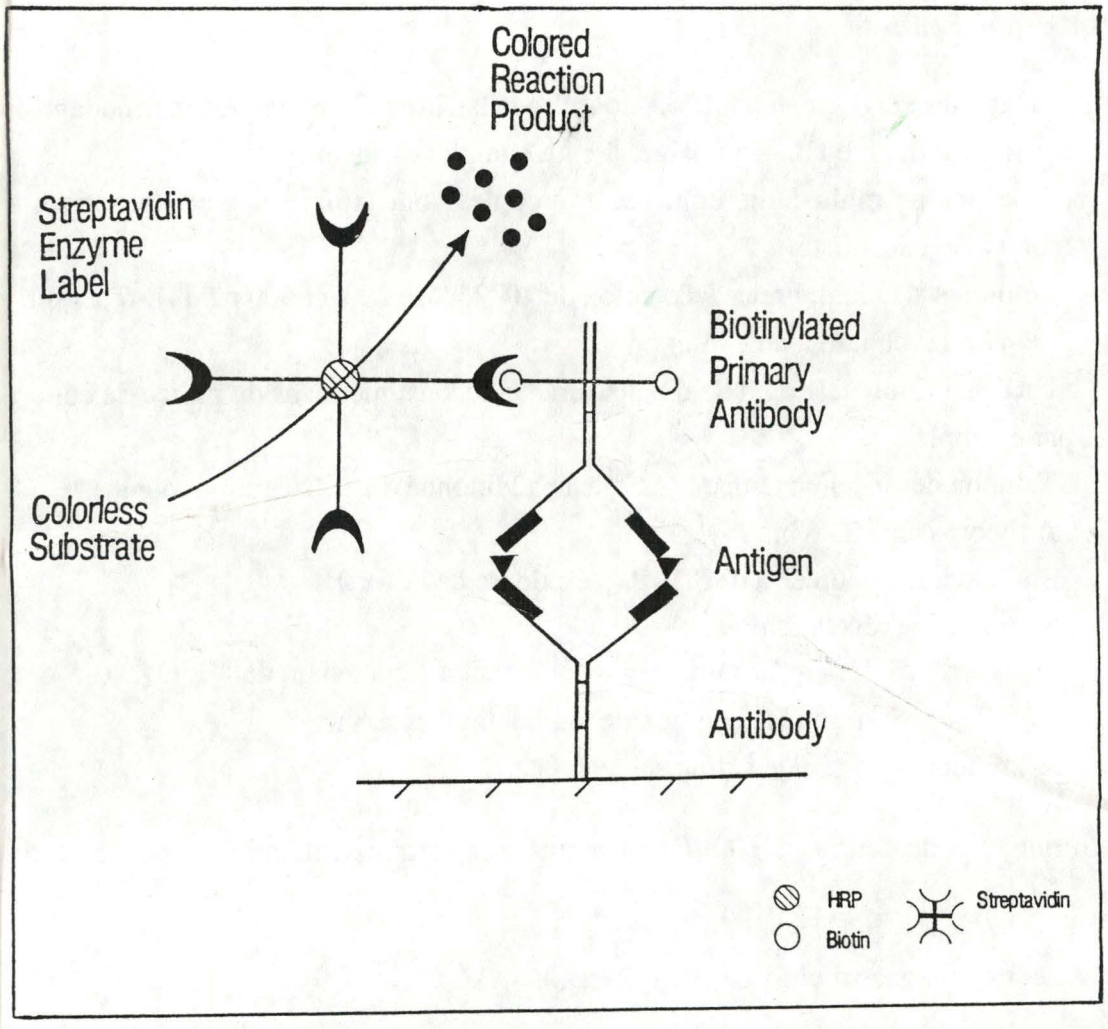
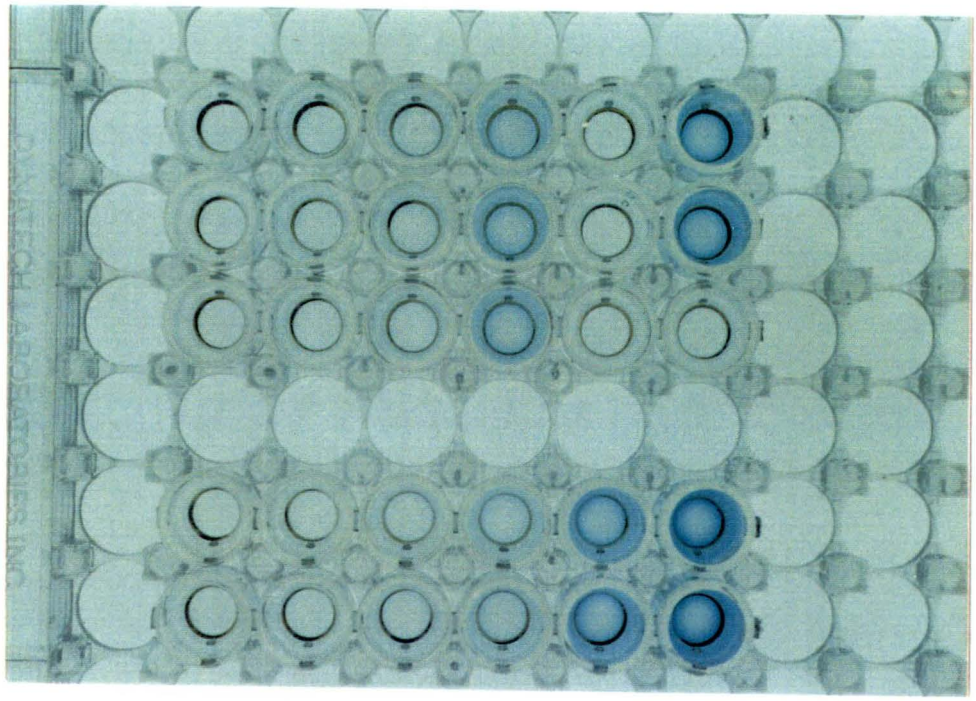


Fig. II-2 : Principe du test ELISA direct (d'après British Bio-technology limited, OXFORD, Grande-Bretagne).

A



B

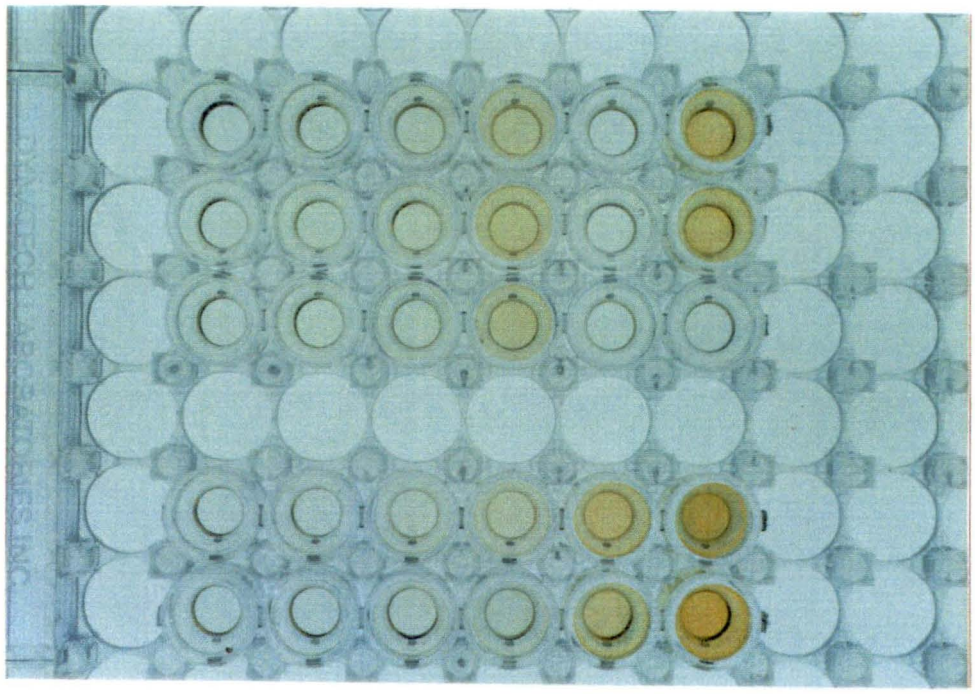


Fig. II-3 : Dosage d'IL-6 par la méthode de l'ELISA :
l'étape de révélation par l'H_2O_2 et le tétraméthyl-benzydine colore en bleu les puits contenant de l'IL-6 (A).
L'arrêt de la réaction entraîne une transformation de la couleur bleue en jaune (B).

Bretagne). Chaque cupule contient 200 µl de la suspension cellulaire (OPT + SB).

Le lendemain, le surnageant est décanté et remplacé par 200 µl de OPT + HLA 0,2 % contenant les molécules à tester (chaque test est réalisé en triple). Après incubation à 37°C pendant un temps à définir, les surnageants sont prélevés et éventuellement congelés à -20°C. D'après Eurogenetics, la congélation n'influence pas le dosage de l'IL-6.

B. PRINCIPE DU DOSAGE

Il s'agit d'un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) dont le principe est décrit à la fig II.2.

Les puits tapissés d'anticorps monoclonaux anti-IL-6 sont incubés en présence des solutions standards et des surnageants à tester. Pendant cette incubation, l'IL-6 contenue dans les échantillons se lie aux anticorps immobilisés, ce qui lui permet de ne pas être emportée par les rinçages, contrairement aux autres molécules présentes dans les surnageants.

Au cours d'une seconde incubation, l'IL-6 fixée est exposée à des anticorps monoclonaux anti-IL-6 biotinylés. Les rinçages emportent les anticorps biotinylés excédentaires.

La troisième étape consiste à ajouter de la streptavidine (couplée à de l'HRP) qui reconnaît la biotine avec une très grande affinité.

Après que l'excès de streptavidine ait été évacué grâce aux rinçages, la révélation s'effectue par addition d'H_2O_2 et de tétraméthylbenzidine.

A cette étape du protocole expérimental, les cupules appparaissent d'autant plus bleues qu'elles contiennent beaucoup d'IL-6 (fig. II.3.A.). La réaction enzymatique est arrêtée au bout de 20 minutes par l'addition d'acide sulfurique 2N, ce qui transforme la couleur bleue en jaune (fig II.3.B.). La plaque multi-puits est vortexée et l'absorbance est lue au lecteur de plaques multi-puits à 450 nm.

La valeur d'absorbance est transformée en pg d'IL-6 par ml de surnageant grâce à une droite d'étalonnage (fig. II.4.) établie lors de chaque test (chaque point de la droite se base sur des triples).

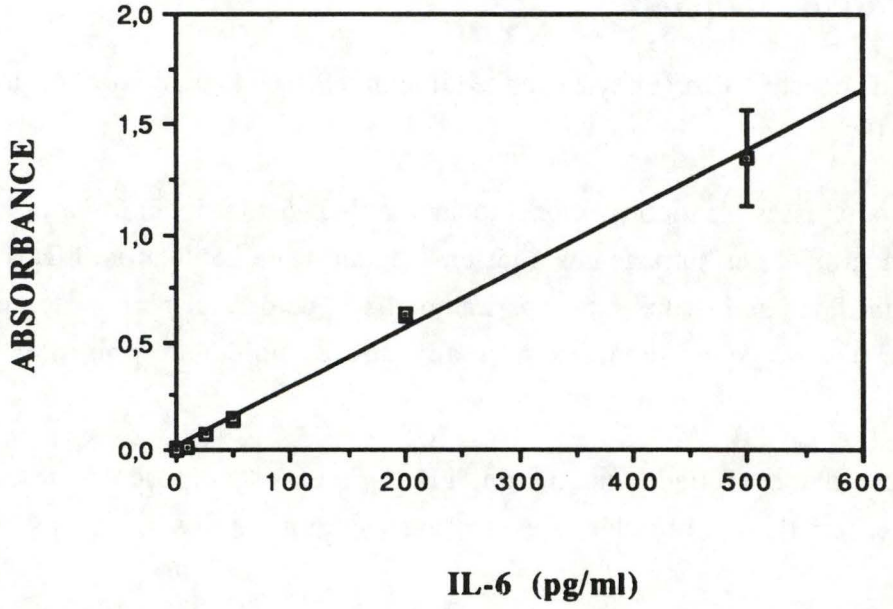


Fig. II-4 : Droite d'étalonnage réalisée au cours des dosages d'IL-6 par la méthode d'ELISA. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures.

C. MODE OPERATOIRE.

Remarque : tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant l'emploi.

1. Décongeler les surnageants et éventuellement les diluer (cfr tests préliminaires).
2. Déposer 100 µl d' échantillon ou d'étalon par cupule.

Incuber 20 minutes à 37°C dans une étuve à 5% de CO_2, dans une atmosphère humide.

3. Laver 5 fois avec du tampon de rinçage .
4. Ajouter 100 µl par puits d'anticorps monoclonal biotinylé.

Incuber 20 minutes à 37°C dans une atmosphère humide.

5. Laver 5 fois avec du tampon de rinçage.
6. Ajouter la streptavidine-HRP à raison de 100 µl par puits.

Incuber 20 minutes à 37°C dans une atmosphère humide.

7. Laver 5 fois avec du tampon de rinçage.
8. Ajouter 100 µl de solution A et 100 µl de solution B.

Incuber 20 minutes à température ambiante.

9. Ajouter 50 µl de solution stop.
10 . Lire l'absorbance à 450 nm.

3.2. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE-1ß

3.2.1. MATERIELS

- Kit ELISA "High Sensitivity Interleukin-1 beta" fourni par Cistron Biotechnology.

Le kit se compose de :

. Tampon phosphate-BSA (contenant 1% d'albumine bovine).

. IgG anti-Interleukin-1ß (antisérum de lapin).

. Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin, couplés à de la peroxidase de raifort (HRP ou horseradish peroxydase). A diluer dans un tampon phosphate-BSA.

. IL-1ß standard, lyophilisée, à reconstituer et à diluer dans de l'eau.

. Une plaque multi-puits avec un anticorps monoclonal anti-IL-1ß.

. Tampon phosphate-BSA (contenant 1% d'albumine bovine).

. Tampon de rinçage.

. Solutions de révélation :

Solution A : tampon phosphate-citrate contenant de l'H_2O_2.

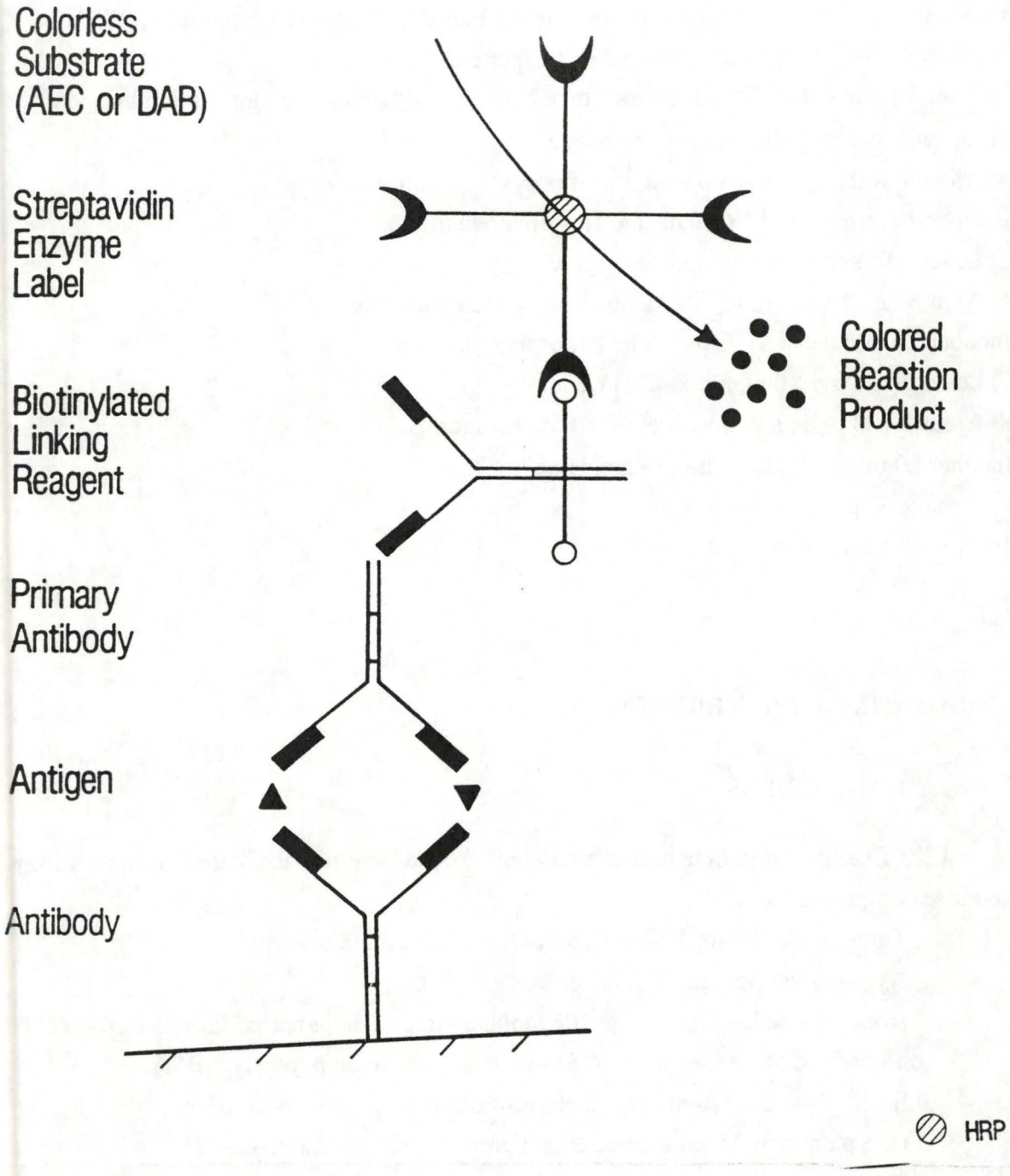


Fig II.5 : Principe du test ELISA tel qu'il est réalisé pour doser l'IL-1ß (d'après British Bio-Technology limited, OXFORD, Grande-Bretagne).

Solution B : solution de tétraméthylbenzidine.

- Acide sulfurique 4N.

- Surnageant de cellules : 100 µl stockés dans des tubes en verre (éviter le polystyrène).

- Lecteur de multi-puits (Bio Rad, USA).

3.2.2. METHODE

A. CULTURE DE CELLULES

Les cellules sont repiquées à raison de 30000 cellules par cupule dans une plaque multi-puits (96 puits, Cel-Cult, Grande-Bretagne). Chaque cupule contient 200 µl de la suspension cellulaire (OPT + SB).

Le lendemain, le surnageant est décanté et remplacé par 200 µl d'OPT + HLA 0,2% contenant les médiateurs (chaque test est réalisé en triple). Après incubation à 37°C pendant un temps voulu, les surnageants sont prélevés dans des tubes en verre, vortexés et le dosage d'IL-1ß est réalisé.

B. PRINCIPE DU DOSAGE

Ce test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) diffère du précédent parce qu'il utilise un anticorps primaire et un anticorps secondaire (fig II.5.). Il s'agit d'un test ELISA indirect qui se déroule en quatre étapes.

Tout d'abord, le surnageant à doser est déposé dans les puits tapissés avec l'anticorps monoclonal anti-IL-1ß. Si le surnageant contient de l'IL-1ß, celle-ci se fixera spécifiquement sur les anticorps pendant l'incubation. Les autres molécules sont éliminées avec les rinçages .

La deuxième étape consiste à ajouter des anticorps primaires (anti-IL-1ß) qui se lient à l'interleukine. Les excès d'anticorps primaires sont retirés au cours des rinçages.

Ensuite, les anticorps secondaires (des IgG de chèvre anti-IgG de lapin) couplés à la

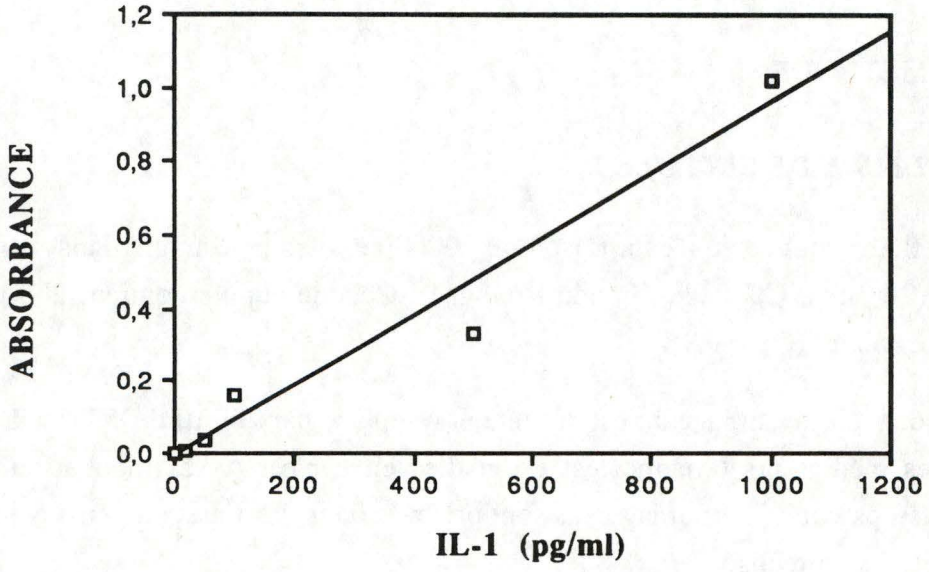


Fig. II-6 : Droite d'étalonnage réalisée au cours du dosage de l'IL-1β par la méthode d'ELISA. Chaque point représente la moyenne de 2 mesures.

HRP sont ajoutés. Ces anticorps reconnaissent les anticorps primaires de lapin de façon spécifique. Seuls les anticorps fixés subsisteront après les rinçages.

Pour terminer, on dépose le substrat de la HRP dans chaque puits. Si le conjugué anticorps-HRP est présent, ce substrat est oxydé, donnant au milieu une couleur bleue. De l'acide sulfurique 4N est ajouté pour arrêter la réaction et fixer la couleur.

L'intensité colorimétrique est proportionnelle à la quantité de conjugué lié, et donc à la quantité d'IL-1ß présente dans le surnageant. Cette intensité est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque multi-puits (Bio Rad, USA). Une droite d'étalonnage établie au cours de chaque dosage permet de transformer la valeur d'absorbance en pg d'IL-1 par ml (fig II.6.).

C. MODE OPERATOIRE

Remarque : tous les réactifs doivent être portés à température ambiante avant l'emploi.

1. Diluer l'IL-1ß dans le milieu de culture (OPT + HLA 0,2%) de façon à pouvoir établir une droite d'étalonnage à partir des concentrations suivantes : 20, 50, 100, 200, 500, 1000 pg/ml d'IL-1. Le point 0 est constitué uniquement de milieu de culture.
2. Déposer 100 µl de l'échantillon à tester ou des étalons dans chaque puits. Couvrir la plaque et incuber 20 minutes à 37°C dans une étuve à CO_2 5%.
3. Laver trois fois avec du tampon de rinçage.
4. Ajouter 100 µl d'IgG anti-IL-1ß (anticorps primaires). Couvrir la plaque et incuber 20 minutes à 37°C.
5. Laver trois fois avec du tampon de rinçage.
6. Déposer 100 µl de conjugué HRP-IgG anti-IgG de lapin (anticorps secondaires de chèvre). Couvrir la plaque et incuber 20 minutes à température ambiante.
7. Prélever la quantité nécessaire de solutions A et B (50 µl de chaque par puits) et les porter à température ambiante. Cinq minutes avant l'emploi, mélanger les deux composants dans un récipient en verre.
8. Laver trois fois avec du tampon de rinçage.
9. Ajouter 100 µl du mélange A + B à chaque puits. Couvrir la plaque et incuber 10 minutes à température ambiante.
10. Ajouter 50 µl d'acide sulfurique 4N et, dans les quinze minutes qui suivent l'addition d'acide sulfurique, lire l'absorbance à 450 nm à l'aide du lecteur de plaque multi-puits.

4. TEST DE LIBERATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE RADIOACTIF PREALABLEMENT INCORPORE.

4.1. MATERIELS

- OPT : milieu d'incubation (voir point 1.1.).

- HLA : solution d'hydrolysat de lactalbumine 10 % (Gibco, Grande Bretagne).

- OPT-GLU : milieu OPT enrichi uniquement de L-glutamine 2 mM, c'est-à-dire sans mercaptoéthanol ni pyruvate. Nous utilisons ce milieu pour toutes les expériences réalisées avec H_2O_2 où la présence d'antioxidants dans le milieu de culture fausserait les résultats.

- OPT + HLA : milieu OPT contenant 0,2 % d'HLA.

- OPT-GLU + HLA : milieu OPT-GLU contenant 0,2 % d'HLA.

- [^{3}H]-AA : acide arachidonique tritié (NET 2982, NEN products, Boston, USA). L'activité spécifique de la solution d'acide arachidonique tritié est de 180 Ci / mmole ; 10 µl d'[^{3}H]-AA correspond à un µCi.

- AQUA LUMA : liquide scintillant (Lumac, Landgraaf, Pays-Bas).

- IL-1ß : interleukine-1ß recombinante humaine (Janssen Biochimica, Turnhout, Belgique) diluée dans de l'OPT contenant 1% de sérum albumine bovine. La solution diluée à raison d'une unité d'IL-1ß par µl est filtrée, aliquotée et congelée à -70°C. .

- IL-1α : interleukine-1α humaine recombinante produite par E. Coli (Janssen Biochimica, Belgique), préparée de la même façon que l'IL-1ß.

- H_2O_2 : perhydrol 30% H_2O_2 pour analyse (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué dans H_2O à raison de 10,2 µl d'H_2O_2 dans 10 ml d'H_2O, ce qui constitue une solution de base de H_2O_2 10^{-2} M. Les dilutions ultérieures sont réalisées dans de l'OPT-GLU + HLA .

4.2. METHODE

Nous avons utilisé la méthode décrite par Godrey et al (1987).

Les cellules sont repiquées dans l'OPT + HLA à raison de 30000 cellules par puits, dans une plaque de 96 puits (Cel Cult, Grande-Bretagne). Chaque puits contient 200 µl de la suspension cellulaire additionnée de 2,5 µl/ml de [^{3}H]-AA (soit 0,25 µCi).

Après 18 heures d'incubation durant lesquelles les cellules ont incorporé l'acide arachidonique radioactif, deux rinçages sont réalisés avec de l'OPT + HLA 0,2% (ou de l'OPT-GLU + HLA pour les expériences réalisées avec H_2O_2).

Ensuite, chaque puits est décanté et se voit ajouter 200 µl de milieu contenant les médiateurs (IL-1ß dans OPT + HLA ou H_2O_2 dans OPT-GLU + HLA). Dans les cupules contrôles, nous n'ajoutons que du milieu seul.

Pour estimer la quantité d'acide arachidonique incorporée au temps 0, c'est-à-dire après les 18 heures d'incubation (juste avant la stimulation), nous rinçons 3 cupules deux fois, puis nous fixons les cellules en ajoutant 200 µl de NaOH 0,5 N pendant 30 minutes. Nous ajoutons ensuite 200 µl d'HCl 0,5 N pour neutraliser la suspension. On réalise enfin un comptage de radioactivité sur cette solution.

Après un temps déterminé (T) d'incubation à 37°C en présence ou non de médiateurs, les 200 µl de surnageant sont prélevés délicatement (afin de ne pas libérer la radioactivité contenue dans le tapis cellulaire) et déposés dans une cupule libre. Après homogénéisation, 100 µl sont prélevés et additionnés de 5 ml d'Aqua Luma pour réaliser un comptage de la radioactivité relarguée.

Nous pouvons exprimer les résultats de deux façons :

$$1.\ \text{Radioactivité libérée (\%)} : \frac{\text{radioactivité libérée au temps T}}{\text{radioactivité libérée au temps O}} \times 100$$

2. Radioactivité libérée par rapport au CTL (%) :

$$\frac{\text{radioactivité libérée avec médiateur}}{\text{radioactivité libérée par les contrôles}} \times 100$$

Remarque : le reste des surnageants peut être congelé à -20°C afin de réaliser ultérieurement un dosage d'IL-6.

5. DOSAGE DU CALCIUM LIBRE INTRACELLULAIRE.

5.1. PRINCIPE DU DOSAGE

Cette méthode a été décrite par Grynkiewicz (1986). Pour mesurer le calcium libre cytosolique, nous utilisons la sonde fluorescente FURA-2 sous forme ester acétoxyméthyl (FURA -2 AM, Molecular Probes, USA). Sous cette forme, le FURA-2 hydrophobe peut traverser la membrane plasmique et atteindre le cytoplasme où des estérases cytosoliques non spécifiques clivent l'ester acétoxyméthyl. Le FURA-2 désestérifié se lie à l'ion calcium avec une stoechiométrie 1:1. Cette liaison au calcium s'accompagne d'un déplacement du pic de la longueur d'onde d'excitation de 380 nm vers 340 nm, ainsi que d'une augmentation de l'intensité de fluorescence émise. Nous mesurons la fluorescence réémise par la sonde excitée.

5.1.1. MATERIELS

- FURA-2 AM (Molecular Probes,USA) : sonde fournie sous forme lyophilisée et aliquotée par fractions de 50 µg. Chaque aliquot est resuspendu dans 50 µl de DMSO (diméthylsulfoxide, Merck, Darmstadt, Allemagne) avant l'emploi, ce qui constitue une solution stock de 12,5 mM. La sonde, lyophilisée ou solubilisée, se conserve à -20°C à l'abri de la lumière.

- Tampon KRH à pH 7,4 composé de NaCl 125 mM, KCl 5 mM, $MgSO_4.7H_2O$ 1,2 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $CaCl_2$ 2 mM, glucose.H_20 6 mM, HEPES 25 mM.

- Tampon TRIS 1M (Janssen Chimica, Belgique) + EDTA 50 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne) à pH 8,3.

- $MnCl_2$ 1M (Merck, Darmstadt, Allemagne).

- Triton X100 (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué dans du tampon KRH.

- Il-1ß : interleukine-1ß recombinante humaine fournie à une concentration de 10000 unités / ml et diluée 10 fois dans de l'OPT. + SAB 1 % (sérum albumine bovine, Sigma A-4503, Chemical Co, USA) avant d'être aliquotée et congelée à -70°C.

- Un spectrofluorimètre KONTRON SMF-25.

5.1.2. METHODE

Les mesures spectrofluorimétriques de la concentration en calcium libre peuvent s'effectuer sur des cellules fixées ou sur des cellules en suspension.

A. CELLULES FIXEES.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Cel-Cult, Grande-Bretagne) au fond desquelles on a déposé une lame couvre-objet stérile de 13 mm x 27 mm (Vel, Belgique). Lorsqu'elles sont confluentes, nous les chargeons avec le FURA-2 AM en ajoutant 5 µl de sonde aux 2 ml d'OPT + SB déjà présents dans la boîte.

Après une heure d'incubation à 37°C, la boîte est rincée trois fois délicatement avec du tampon KRH préchauffé. Ensuite, nous déposons 3 ml de KRH dans une cuvette de spectrofluorimètre dotée de 4 faces polies. Le fond de la cuvette est garni d'un carré de téflon dont la diagonale a été limée. Cette fente est destinée à immobiliser le couvre-objet dans la cuvette.

Après les rinçages, nous transférons délicatement le couvre-objet garni de son tapis cellulaire dans la cuvette, en veillant à emboîter la lamelle dans la fente de téflon. La cuvette est alors placée dans le spectrofluorimètre de sorte que le couvre-objet forme un angle de 45° avec la source d'excitation, ainsi qu'avec le filtre d'émission.

Nous laissons la température se stabiliser pendant 5 minutes, puis nous prenons une dizaine de mesures dont la moyenne servira de valeur contrôle. Pour pouvoir calculer la concentration en calcium libre, il faut pouvoir mesurer l'émission de fluorescence à trois longueurs d'onde d'excitation différentes : 340, 358, et 380 nm. En effet, la sonde libre montre un pic d'excitation à 340 nm tandis que la sonde liée au calcium marque son pic d'excitation à 380 nm. La mesure de l'émission fluorescente suite à une excitation de 358 nm représente un facteur correctif qui permet de diminuer le bruit de fond (voir mode de calcul). Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, nous mesurons l'émission de fluorescence à 510 nm.

Lorsque nous avons enregistré une dizaine de valeurs contrôle, nous ajoutons de l'IL-1ß dans la cuvette du spectrofluorimètre, à raison de 20 unités / ml. Nous suivons la fluorescence aux trois longueurs d'onde d'excitation (F_{340}, F_{358} et F_{380}) pendant 45 minutes ou plus à raison d'une mesure toutes les 1 ou 2 minutes. Ensuite, nous ajoutons 30 µl de la solution de triton 10 % afin de perméabiliser les membranes cellulaires. La sonde peut donc sortir des cellules et se trouver en présence de l'excès de calcium présent dans le milieu (le KRH contient du $CaCl_2$ 2 mM). Après une agitation modérée, nous mesurons la fluorescence ; ceci représente la fluorescence maximale de la sonde (F_{340} max, F_{358} max, F_{380} max). Pour mesurer la fluorescence minimale de la sonde (F_{340} min, F_{358} min, F_{380} min), nous déposons dans la cuvette 300 µl de tampon TRIS-EDTA qui va chélater tout le calcim présent et maintenir la sonde sous forme libre. Enfin, l'autofluorescence est mesurée à 340 et 380 nm (AF_{340} et AF_{380}) après l'addition de 3 µl de $MnCl_2$ (le Mn quenche le FURA-2 et l'empêche de fluorescer).

La présence du couvre-objet dans la cuvette entraîne des variations importantes entre plusieurs mesures d'un même échantillon, d'où la nécessité d'introduire un facteur correctif destiné à réduire ce bruit de fond. Nous utilisons le mode de correction mis au point au laboratoire de cytologie de M.F. Ronveaux-Dupal (Verhoye, 1990). Toutes les valeurs de fluorescence mesurées à 340 et 380 nm sont corrigées en ajustant les valeurs de F_{358} à un plateau fixe de 500. De plus, à chaque F_{340} et F_{580} est soustraite la valeur de l'autofluorescence pour cette longueur d'onde.

ex : F_{380} ajustée = F_{380} + (500 - F_{358}) - AF_{380}

En utilisant ces valeurs ajustées, nous utilisons la formule rapportée par Grynkiewicz et al (1985) :

$$[Ca^{++}]_i \text{ (nanomole/litre)} = Kd_{20°C} \frac{(R-Rmin) \times F_{380} \text{ min}}{(R-Rmax) \times F_{380} \text{ min}}$$

$$\text{où } R = \frac{F_{340} \text{ ajustée}}{F_{380} \text{ ajustée}} \qquad Rmin = \frac{F340 \text{ min ajustée}}{F380 \text{ min ajustée}} \qquad Rmax = \frac{F340 \text{ max ajustée}}{F380 \text{ max ajustée}}$$

et $Kd_{20°C}$ = la constante de dissociation du calcium avec la sonde, soit 135 nM à 20°C.

B. CELLULES EN SUSPENSION

Cette méthode, utilisée par Bouchelouche et al (1988), ressemble beaucoup à celle décrite au point précédent, mais cette fois, les cellules sont en suspension dans la cuvette et non plus fixées sur un couvre-objet. Seule diffère la préparation des cellules avant la lecture, c'est pourquoi nous ne décrirons que les étapes qui précèdent la stimulation.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes T25 (Cel-Cult, Grande-Bretagne) à raison de 1,5 millions de cellules par boîte, dans 8 ml d'OPT + SB. Le lendemain, nous chargeons les cellules avec 10 µl de FURA-2 1 mM pendant 1h à 37°C. Ensuite, nous rinçons deux fois la boîte avec du PBS (tampon phosphate 10 mM additionné de 0,9 % de NaCl, pH 7,2) avant d'ajouter 7 ml de tampon permettant la mise en suspension des cellules. Ce tampon se compose de NaCl 132 mM, KCl 6 mM, HEPES 20 mM, K_2HPO_4 1,2 mM, EDTA 5 mM, porté à pH 7,4. Notons l'absence totale de calcium et de magnésium, deux ions indispensables à l'adhérence cellulaire.

La boîte est ensuite incubée à 37°C sous agitation pendant une vingtaine de minutes au cours desquelles on surveille l'arrondissement cellulaire. Les cellules détachées sont récoltées, et la boîte est rincée avec du PBS. L'ensemble est centrifugé 5 minutes à 1500 rpm, puis lavé deux fois avec du PBS et centrifugé de la même façon. Etant donné qu'une proportion non négligeable des cellulles est éliminée avec ces rinçages, une goutte de la suspension cellulaire est prélevée avant la dernière centrifugation afin de réaliser un comptage cellulaire à l'aide de la chambre de Neubauer. Finalement, le culot est resuspendu dans 0,6 ml de tampon KRH et transféré dans une cuvette étranglée dotée de 4 faces polies.

La lecture de la fluorescence se déroule de la même façon que dans le cas des cellules fixées. Toutefois, il faut veiller à agiter la cuvette régulièrement (toutes les 5 ou 10 minutes) pour éviter des interférences dues à la sédimentation cellulaire.

5.2. ANALYSE D'IMAGES

5.2.1. MATERIELS

- Anneaux de clonage de 10 mm de diamètre (Hilgenberg, Allemagne).

- Lamelle couvre-objet, 13 x 13 mm (Vel, Belgique).

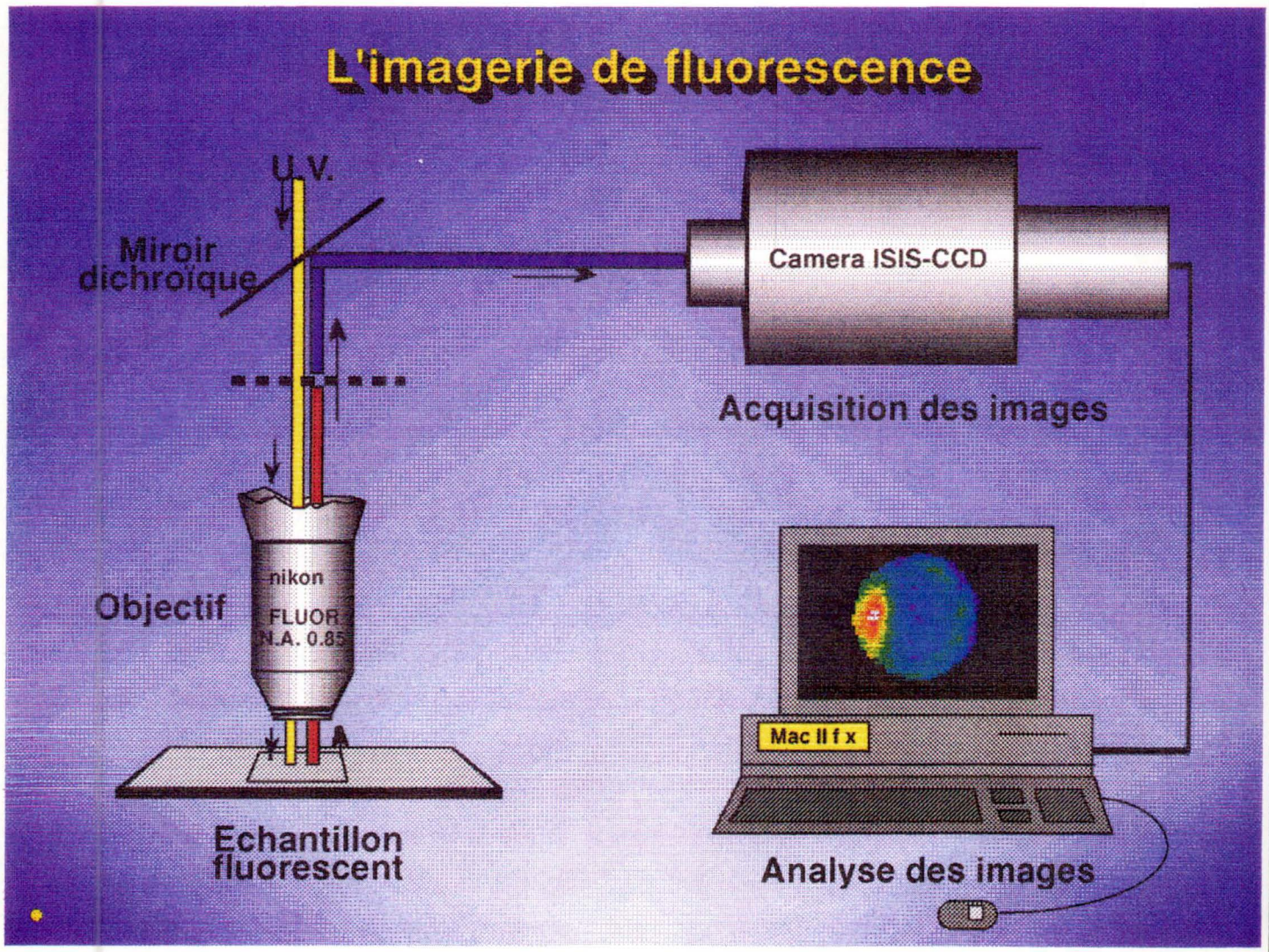


Fig. II-7 : Schéma de montage de l'appareillage d'analyse d'images, réalisé par Y.MENSEN, au laboratoire de biotechnologie théorique du Professeur Van Cutsem.

- Silicone Polyfilla transparent.

- FURA-2 AM (Molecular Probes,USA) : sonde fournie sous forme lyophilisée et aliquotée par fractions de 50 µg. Chaque aliquot est resuspendu dans 50 µl de DMSO (diméthylsulfoxide, Merck, Darmstadt, Allemagne) avant l'emploi, ce qui constitue une solution stock de 12,5 mM. La sonde, lyophilisée ou solubilisée, se conserve à -20°C à l'abri de la lumière.

- IL-1ß : interleukine-1ß recombinante humaine (Janssen Biochimica, Turnhout, Belgique) diluée dans de l'OPT contenant 1% de sérum albumine bovine. La solution diluée à raison d'une unité d'IL-1ß par µl est filtrée, aliquotée et congelée à -70°C.

- Matériel d'imagerie de fluorescence, dont le schéma de montage est représenté à la fig. II.7., composé d'un microscope à fluorescence inversé, d'une caméra à haute sensibilité (ISIS-CCD), et d'un ordinateur Mac II f x.

5.2.2. METHODE

Cette technique récente a été développée aux FUNDP par les membres du laboratoire de biotechnologie théorique du professeur Van Cutsem. Elle permet de visualiser et de quantifier l'évolution de la concentration cytosolique en calcium des cellules peuplant un champ microscopique défini. Ceci nécessite un couplage entre un logiciel informatique de traitement d'images, une caméra à haute sensibilité et un microscope à fluorescence inverse.

L'étude de cellules fixées en imagerie de fluorescence nécessite la confection de puits spéciaux. Ceux-ci doivent remplir deux conditions : primo, la culture et la fixation des cellules doit pouvoir s'effectuer de manière stérile, et secundo, ces puits doivent posséder un fond très mince pour permettre l'observation des cellules en microscopie à fluorescence. Nous confectionnons ces puits à l'aide de lamelles couvre-objet sur lesquelles nous collons des anneaux de clonage. Pour le collage, nous utilisons du silicone que nous déposons autour de l'anneau de clonage. Il est préférable de laisser sécher le silicone pendant une nuit.

Nous repiquons les cellules dans de l'OPT + SB à raison de 20000 cellules par puits (les puits ont été préalablement stérilisés à l'alcool). Le lendemain, nous chargeons les cellules en ajoutant 1 µl de sonde Fura-2 AM aux 400 µl contenus dans le puits. Après une heure d'incubation, nous déposons le puits sur la plaque du microscope à fluorescence afin

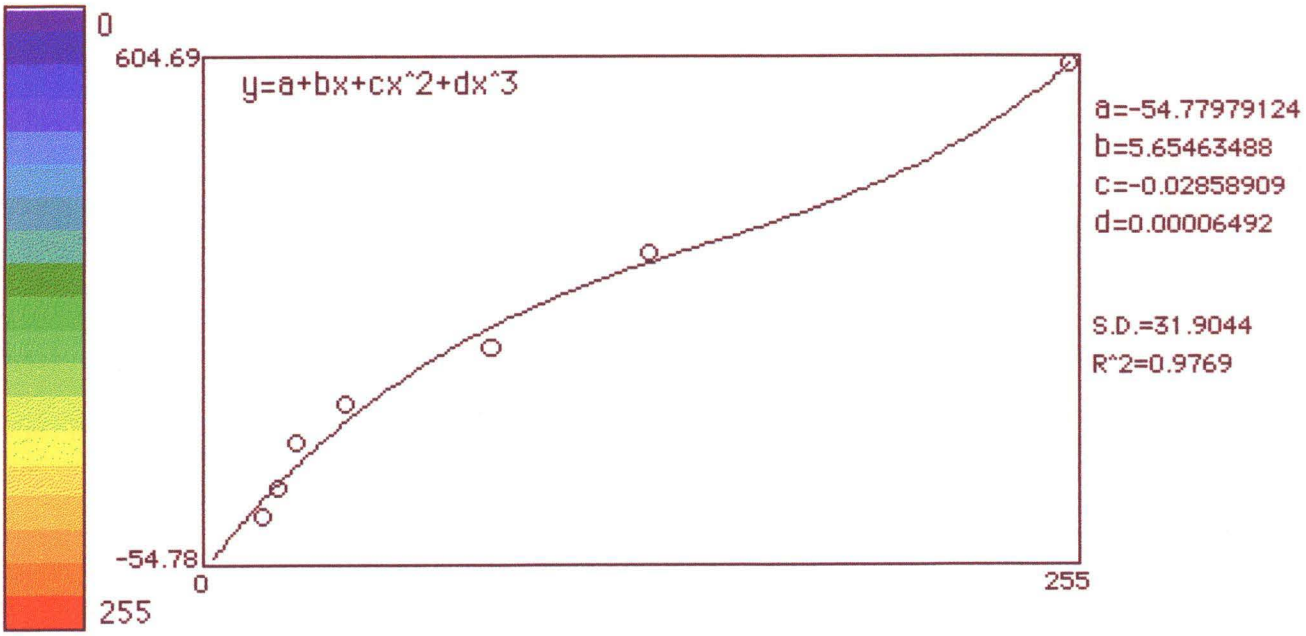


Figure II. 8 : Courbe d'étalonnage mettant en corrélation les concentrations calciques en nM (ordonnée) et les valeurs de pixels correspondantes (abcisse). L'échelle des pixels s'étend de 0 (bleu) à 255 (rouge).
Cette courbe d'étalonnage a été réalisée par F. Verhoye de l'unité de Cytologie (Prof. Ronveaux).

de réaliser une mise au point.

Nous pouvons maintenant utiliser l'appareillage d'imagerie de fluorescence. Un changeur de filtres, composé d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'excitation, permet la sélection de certaines longueurs d'ondes à partir d'une lumière blanche issue d'une lampe au xénon. La fluorescence secondaire émise par l'échantillon passe à travers le miroir dichroïque pour frapper un filtre d'émission situé juste avant la caméra. Dans le cas du Fura-2 AM, le filtre d'excitation sélectionne une gamme de longueurs d'onde centrée sur 340 ou 380 nm avec une bande passante de 10 nm ; le filtre d'émission, lui, est centré sur une longueur d'onde de 510 nm.

Une image précise de l'objet apparaît sur le moniteur auquel la caméra a transmis la fluorescence émise par l'échantillon. Cette première image est digitalisée et enregistrée par l'ordinateur. On peut alors changer le filtre d'excitation et par le même principe obtenir une image du même échantillon à une autre longueur d'onde. La rapidité de l'appareillage permet de prendre des images à 340 et à 380 nm d'excitation espacées de moins d'une seconde.Une paire d'images constitue une "acquisition". Nous enregistrons une acquisition toutes les 3 minutes durant une heure. De cette façon, nous pouvons étudier l'évolution de la concentration calcique dans le cytosol d'un même champ de cellules durant une heure.

Il nous reste à traiter les images enregistrées au moyen d'un logiciel informatique appelé "Image". Celui-ci permet de faire le rapport entre les deux images constituant une acquisition et d'obtenir une image "ratio". Cette opération revient à diviser l'intensité de couleur de chaque point d'une image enregistrée à 340 nm par l'intensité du point correspondant sur l'image enregistrée à 380 nm. L'image résultante présente des variations de couleur correspondant à des variations de concentrations en calcium. A l'aide d'une droite d'étalonnage, réalisée en milieu acellulaire avec du Fura-2 désestérifié mis en présence de différentes concentrations en calcium, les valeurs de pixels sont converties en valeurs de concentration calcique (fig. II.8.).

6. EMSA

La technique de l'"Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) permet de mettre en évidence la (non)-liaison d'une protéine avec une séquence génomique. Un oligonucléotide contenant la séquence-cible d'un facteur de transcription est incubé en présence d'un extrait cellulaire avant d'être déposé sur un gel d'électrophorèse. Si la protéine active est présente dans l'extrait cellulaire, elle se lie au DNA marqué, et la migration du complexe DNA-protéine formé sera retardée par rapport à la migration de la sonde seule ("shift").

6.1. MATERIELS

- Molécules utilisées pour stimuler les cellules :
  . IL-1ß : interleukine-1ß recombinante humaine (Janssen Biochimica, Belgique) fournie à une concentration de 10000 unités / ml et diluée 10 fois dans de l'OPT + SAB 1 % (sérum albumine bovine, Sigma A-4503, Chemical Co, USA) avant d'être aliquotée et congelée à -70°C.
  . IL-1α : interleukine-1α humaine recombinante produite par E. Coli (Janssen Biochimica, Belgique), préparée de la même façon que l'IL-1ß.
  . PDTC : pyrrolidine dithiocarbamate (Sigma P-8765, Chemical Co, USA). Une solution stock 10^{-2} M est constituée en solubilisant cet antioxydant dans de l'eau distillée ; les dilutions ultérieures sont réalisées dans de l'OPT + HLA.
  . NAC : N-acétyl-L-cystéine (Sigma A-9165, Chemical Co, USA) dilué dans de l'eau à une concentration de 10^{-1} M, puis dans de l'OPT + HLA.

- PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9 %, porté à pH 7,4.

- Tampon A : tampon de lyse destiné à extraire les protéines cellulaires, contenant :
  . HEPES 0,02 M à pH 7,5 (Janssen Chimica)
  . NaCl 0,35 M (Merck)
  . Glycérol 20 % (Merck)
  . NP-40 1 % : Nonidet P-40 (Sigma N-6537)
  . $MgCl_2$ 1 mM (Merck)

. EDTA 0,5 mM à pH 7,5 (Titriplex, Merck)
. EGTA 0,1mM à pH 7,5 (Sigma E-4378)
. Leupeptine 10 µg / ml (Sigma L-2884)
. DTT 5 mM (dithiotréitol, Sigma D-8024)
. Pefabloc 0,0005 % (Boerhinger Mannheim, n° 236608)
. Aprotinine 100 µl / 100 ml (Sigma A-6279)
Le DTT, le pefabloc et l'aprotinine sont ajoutés juste avant l'emploi.

- Tampon B permettant la liaison entre la sonde oligonucléotidique et les protéines :
. Ficoll 400 (Pharmacia n°17-0400-01, Sweden) : 20 %
. HEPES 100 mM pH 7,5 (Janssen Chimica)
. KCl 300 mM (Merck)
. DTT 10 mM (Sigma D-8024)

- Poly d[I-C] (Boeringher Mannheim n°108812) resuspendu dans du tampon TRIS 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, à une concentration finale de 1 mg / ml. Cette solution est fractionnée et congelée à -20°C. Le poly d[I-C] permet d'éviter la liaison non spécifique de protéines avec la sonde marquée.

- BSA : albumine de sérum bovin sans DNAases (Sigma B-2518). La présence de BSA dans le mélange permet d'éviter la liaison non spécifique entre la sonde et diverses protéines de l'extrait cellulaire.

- La sonde oligonucléotidique marquée nous a été gracieusement donnée par N. P. Patestos et G. C. Hageman du laboratoire de biologie moléculaire du Professeur Fiers de la RUG de Gent. Elle est constituée d'un oligonucléotide de 26 paires de bases reproduisant la séquence enhancer de la chaîne légère κ de souris :

'5-AGCTTCAGAGGGGACTTTCCGAGAGG-3'
'3-AGTCTCCCCCTGAAAGGGTCTCCAGCT-5'

d'après Urban et Baeuerle (1990).
Cet oligonucléotide est marqué avec l'isotope radioactif du phosphore (^{32}P) par l'enzyme Kleenow, en suivant la méthode décrite par Urban et Baeuerle (1990).

- Tampon C : tampon d'électrophorèse composé de
. TRIS 0,9 M (Janssen Chimica)
. Acide borique 0,9 M (Merck)
. EDTA 0,02 M (Merck)

- Gel d'électrophorèse : pour 100 ml :

. Acrylamide / bisacrylamide 4 % : la solution stock se compose de 30 % d'acrylamide pour 1 % de NN méthylène bisacrylamide.

. Tampon d'électrophorèse : 5 ml

. H_2O : 82,25 ml

. TEMED 0,005 %

. Persulfate d'ammonium 0,06 %

Tous ces produits proviennent de chez BRL (Galthersburg, USA).

- Films MP pour isotopes émettant des radiations ß et γ (Amersham, Angleterre).

- Pour révéler les films, nous utilisons le révélateur Kodak D19 dilué 3x, et le fixateur Hypam dilué 5x.

6.2. METHODE

Nous avons utilisé la technique décrite par Urban et Baeuerle (1991) et adaptée par N.P. Patestos et G.C. Hageman. Elle comporte plusieurs étapes : la culture des cellules et l'extraction des protéines, le marquage de la sonde, la réaction entre les protéines et la sonde marquée, l'électrophorèse et la révélation des films, et enfin la quantification des bandes marquées sur le film. Nous ne décrirons pas l'étape de marquage de la sonde puisqu'elle a été réalisée par N. Patestos à l'université de Gent. Notons seulement qu'il faut utiliser rapidement la sonde oligonucléotidique après son marquage car la durée de demi-vie du ^{32}P n'est que de 14 jours.

6.2.1. CULTURE DE CELLULES ET EXTRACTION DES PROTEINES.

Les cellules sont repiquées dans des plaques de Pétri de 35 mm de diamètre (Cel-Cult, Grande-Bretagne) à raison d'un million de cellules par boîte dans de l'OPT + SB. Le lendemain, nous rinçons la boîte avec de l'OPT + HLA puis nous stimulons les cellules avec 20 unités d'IL-1 par ml d'OPT + HLA . D'autres boîtes reçoivent en plus des antioxydants (PDTC ou NAC) tandis que les boîtes contrôles ne reçoivent que du milieu seul.

Après 30 minutes de stimulation, les boîtes sont décantées et rincées deux fois avec du PBS froid. Les cellules sont alors raclées dans 5 à 10 ml de PBS froid, puis centrifugées 20 minutes à 1100 rpm à 4°C. Pour laver les cellules, nous les resuspendons dans 1 ml de PBS froid par un vortex doux, avant de les centrifuger une deuxième fois dans les mêmes conditions que lors de la première centrifugation. Le culot est alors resuspendu dans 1 ml de tampon de lyse. Nous laissons se dérouler la réaction pendant 10 minutes à 4°C, puis nous centrifugeons les eppendorfs à vitesse maximale (13000 rpm) à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Nous récoltons le surnageant duquel nous prélevons quelques µl pour réaliser un dosage de protéines suivant la méthode de Lowry et al. (1951). Pour terminer, nous fractionnons l'extrait protéique avant de le congeler à -70°C.

6.2.2. REACTION DE LIAISON ENTRE LA SONDE ET LES PROTEINES.

Le mélange de réaction contient 7,4 µl d'eau, 4 µl de tampon B, 2 µl de poly d[I-C], 2 µl de BSA 10 mg / ml, un volume de sonde marquée au ^{32}P tel que chaque test contienne 10000 à 15000 cpm (l'énergie de la sonde doit être réévaluée par comptage avant chaque expérience), et enfin 8 à 12 µg de protéines extraites. Les eppendorfs sont centrifugés quelques secondes afin de rassembler tous les réactifs dans le fond des eppendorfs.

Nous laissons incuber ce mélange réactionnel 30 minutes à température ambiante, puis nous ajoutons dans chaque eppendorf 1 µl de bleu de bromophénol 0,3 % (Janssen Chimica, Belgique) juste avant de déposer les échantillons sur le gel.

6.2.3. ELECTROPHORESE ET REVELATION DES FILMS.

Nous coulons le gel dont la composition est donnée au point 6.1. et nous le laissons durcir pendant environ 1 heure. Il s'agit d'un gel natif (c'est-à-dire sans SDS) afin de ne pas dénaturer le NF-kB éventuellement présent dans les extraits protéiques.

Lorsque le gel est polymérisé, nous le plaçons dans la cuve d'électrophorèse, ainsi que le tampon C dilué 20 fois, afin que le gel subisse un pré-run durant une 1 h 30 à 100 V. Ensuite, nous déposons les échantillons dans les puits et nous les laissons migrer durant environ 3 h (voltage : 100 V), jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne les 2 / 3 de la hauteur du gel.

Le gel est alors démoulé et séché sous vide à 80°C pendant 40 minutes entre un papier Whatman d'un côté et un papier cellophane de l'autre. Ensuite, dans l'obscurité, nous déposons le gel dans une cassette Kodak (KP 63375) en présence d'un film pré-flashé.

Un jour plus tard, nous révélons les résultats dans l'obscurité en mettant le film 4 minutes en présence du révélateur, puis dans de l'eau, et enfin dans un bain contenant le fixateur. Le film est rincé à l'eau distillée avant d'être séché à l'air libre.

6.2.4. QUANTIFICATION

Pour quantifier l'intensité des différentes bandes apparues sur le film, nous utilisons un système d'analyse d'images, le Visage 101 (Millipore, USA). Il est composé principalement d'une caméra haute résolution 1024 x 1024 (Videk) et d'un ordinateur doté entre autres du logiciel Whole Band (Millipore, USA).

Après avoir été calibrée sur une échelle de gris précise, la caméra enregistre l'image du film qu'on lui présente. L'image est traitée par le logiciel qui transforme les différents niveaux de gris (pixels) en densité optique (D.O.).

Nous demandons au logiciel de repérer les bandes sur le gel, de les délimiter, de calculer leur surface et de définir leur niveau de gris. Pour chaque bande, les résultats sont exprimés en D.O. ainsi qu'en I.O.D. (Intégration de la Densité Optique) représentant le produit de la D.O. et de la surface (en mm^2) de la bande. Ces données permettent de calculer la proportion de radioactivité présente dans la bande "shiftée".

Remarque : afin de confirmer la validité de cette méthode de quantification, il est conseillé d'analyser les mêmes films en découpant les taches de radioactivité sur le gel après la révélation. Les morceaux de gel sont déposés dans une fiole dans laquelle on ajoute 5 ml d'Aqua-Luma (Lumac, Pays-Bas). Les fioles sont soumises au compteur à scintillation.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Comme nous l'avons expliqué dans les objectifs du mémoire (voir le point I.5. de l'introduction), nous avons commencé par examiner l'effet de l'IL-1 sur trois aspects de l'activation cellulaire : l'évolution de la concentration en calcium libre intracellulaire, l'activation de la PLA_2 et la libération de l'IL-6.

Dans un deuxième temps, nous avons observé les effets des différents anti-oxydants sur ces trois aspects de l'activation cellulaire.

Nous avons également tenté de reproduire les effets observés lors d'une stimulation par l'IL-1 à l'aide de systèmes oxydants.

Nous avons enfin tenté de réaliser une approche directe de l'activation du facteur NF-κB par la technique de l'EMSA.

1. ACTION DE L'IL-1 SUR LES DIFFERENTS TEMOINS DE L'ACTIVATION CELLULAIRE.

1.1. EFFETS DE L'IL-1 SUR L'EVOLUTION DE LA CONCENTRATION CALCIQUE DANS LE CYTOSOL.

L'utilisation de la sonde fluorescente FURA-2 AM nous a permis de mesurer le calcium intracellulaire par spectrofluorométrie d'abord, et par imagerie de fluorescence ensuite (voir le point 5 des Matériels et Méthodes).

1.1.1. ANALYSES SPECTROFLUOROMETRIQUES

A. CELLULES ADHERENTES

La méthode classique de mesure du calcium libre intracellulaire (Ca_i^{++}) est réalisée sur des cellules adhérentes sur une lamelle couvre-objet, celle-ci étant déposée dans la cuvette du spectrofluorimètre (voir le point 5.2.2. des Matériels et Méthodes).

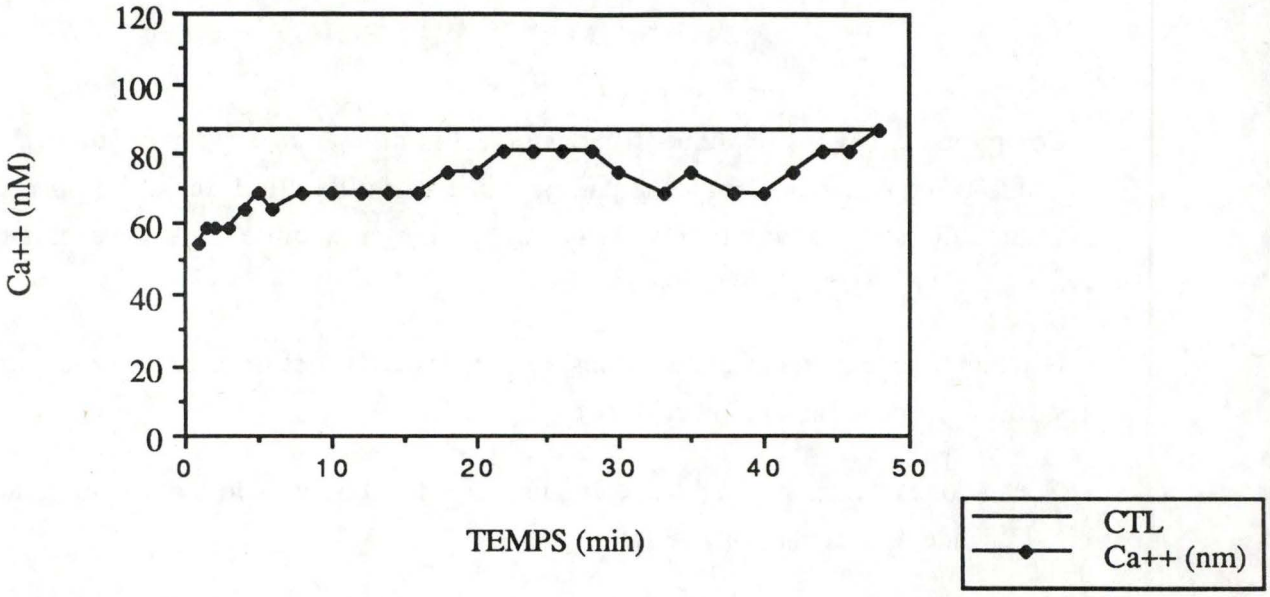


Fig. III.1 : Evolution de la concentration en calcium intracellulaire chez des fibroblastes de poumon ensemencés sur une lamelle couvre-objet, après une stimulation par 20 U/ml d'IL-1 β. La valeur contrôle est calculée sur base de 5 mesures enregistrées juste avant l'addition de 20 U/ml d'IL-1 β. Une mesure au spectrofluorimètre est enregistrée toutes les 2 min. Cette expérience a été réalisée sur des fibroblastes de poumon en 18 ème génération.

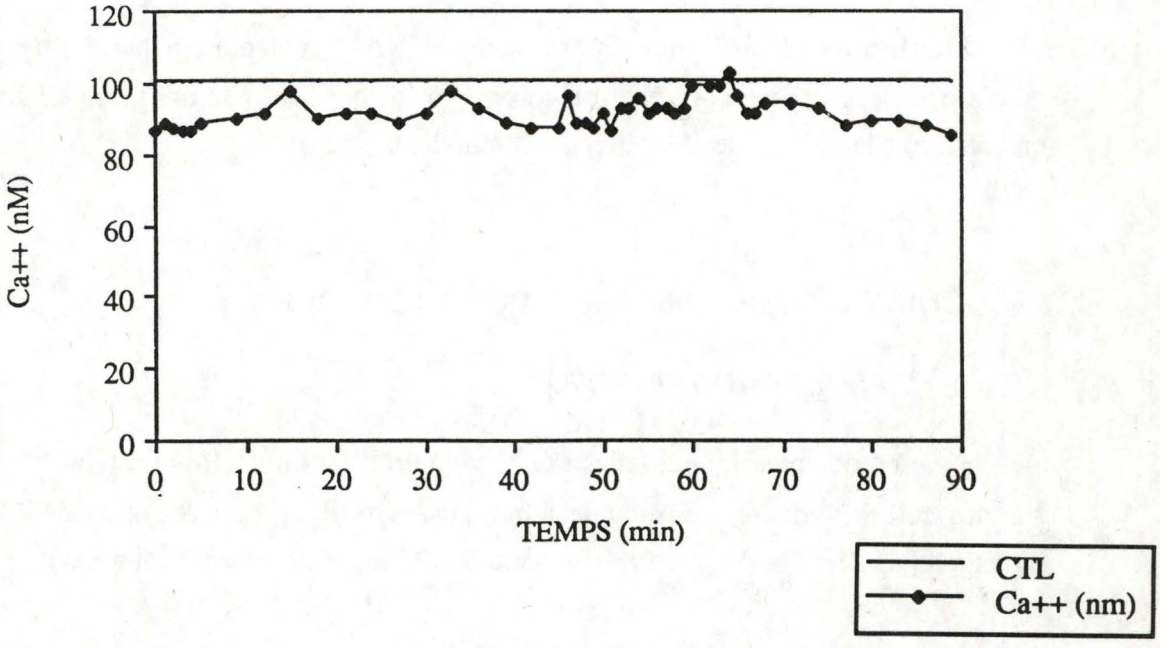


Fig. III.2 : Evolution de la concentration en calcium intracellulaire chez des fibroblastes de poumon (en 21 ème génération) en suspension, après une stimulation par 20 U/ml d'IL-1β. Une mesure au spectrofluorimètre est enregistrée toutes les 2 min. Le milieu est régulièrement homogénéisé au cours de l'expérience. Cette expérience réalisée une deuxième fois présentait le même profil.

Les cellules préalablement chargées avec la sonde FURA-2 AM sont stimulées par 20 U/ml d'IL-1ß et l'évolution du Ca_i^{++} est suivie pendant 50 minutes (fig.III.1.). Nous n'avons pu détecter aucune augmentation de calcium de cette manière, même à des concentrations en IL-1ß plus élevées, à savoir 40, 50, 60 et 80 U/ml (données non montrées).

Bouchelouche et al. (1988) ont mesuré le calcium intracellulaire dans des fibroblastes humains et murins. Sur les cellules au repos, ils obtiennent des valeurs de 100 nM environ, ce qui correspond à l'ordre de grandeur du Ca_i^{++} que nous avons mesuré, avec ou sans stimulation avec l'IL-1ß (environ 70 nM).

Afin de détecter une éventuelle réponse calcique faible et/ou tardive, nous avons à nouveau utilisé la technique de spectrofluorométrie, mais appliquée cette fois à des cellules en suspension.

B. CELLULES EN SUSPENSION

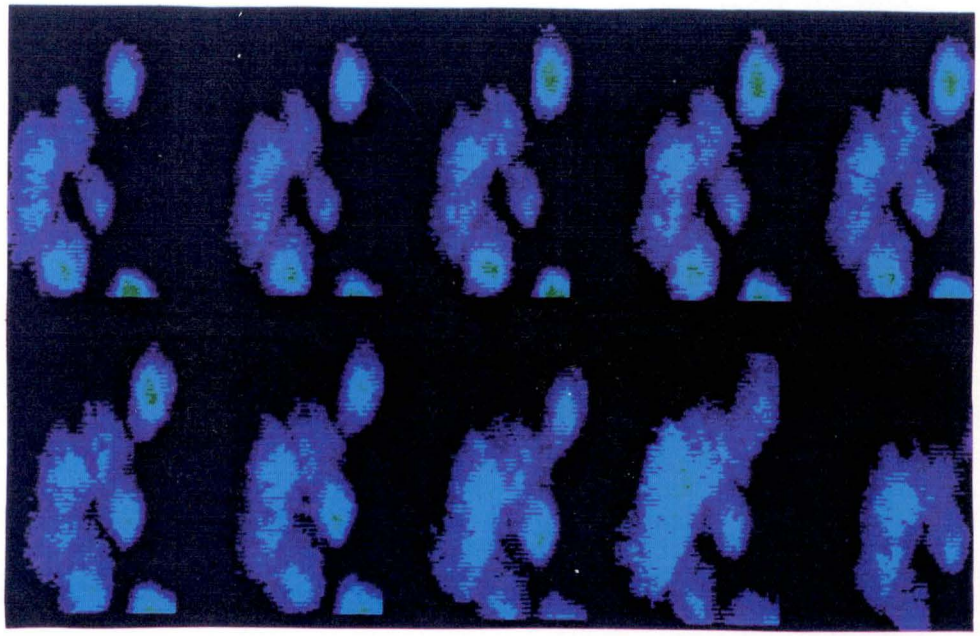
Lorsque les cellules adhèrent à lamelle couvre-objet, la surface cellulaire exposée aux molécules présentes dans le milieu est réduite ; nous avons supposé que le nombre de récepteurs à l'IL-1 disponibles l'étaient également. Dans ce cas, la mesure du Ca_i^{++} réalisée sur des cellules en suspension,devrait nous permettre d'augmenter légèrement la sensibilité de la méthode grâce à une plus grande proportion de récepteurs à l'IL-1 disponibles.

D'autre part, une autre souche de fibroblastes de poumon cultivée en suspension, montre une réponse calcique à l'IL-1 présentant un plateau à 400 nM, à partir de la 45ème minute après la stimulation (Bouchelouche et al., 1988). Dans le but de détecter une éventuelle réponse tardive des fibroblastes de poumon, nous avons suivi l'évolution du Ca_i^{++} pendant 1 heure et demie après la stimulation des cellules par 20 U/ml d'IL-1.

Cette fois encore, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'augmentation de Ca_i^{++} provoquée par l'IL-1 chez les fibroblastes de poumon (fig. III.2.). Le Ca_i^{++} reste stable et est de l'ordre des valeurs de concentrations calciques caractéristiques pour des fibroblastes au repos.

Avant d'admettre que les fibroblastes de poumon que nous utilisons ne présentent pas d'augmentation de Ca_i^{++} suite à une stimulation par l'IL-1, nous avons voulu nous assurer qu'il n'existait pas une sous-population de cellules montrant une réponse calcique, réponse

Temps : 0 6 12 18 24



30 36 42 48 54

Fig.III.3: Evaluation au cours du temps du Ca_i^{++} des fibroblastes de poumon stimulés par l'Il-1. Les images ont été prises aux temps 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 et 54 après la stimulation par 20 U/ml d'Il-1.
La couleur bleue représente une concentration voisine de 100 nM (voir Matériels et Méthodes point 5.3).

masquée par le bruit de fond et par le reste de la population cellulaire. Ceci nous a amené à utiliser la technique de l'imagerie de fluorescence.

1.1.2. IMAGERIE DE FLUORESCENCE

Cette technique permet de visualiser la concentration calcique intracellulaire de toutes les cellules présentes dans un champ microscopique. Nous passons donc du niveau de la population de cellules étudiée par spectrofluorimétre, au niveau de l'"individu cellulaire".

La cupule, dotée de son tapis de cellules préalablement chargées avec le FURA-2 AM, est déposée sur la platine du microscope à fluorescence. Les cellules sont srimulées par 20, 40 ou 80 U/ml d'IL-1, et la fluorescence, transformée en pixels, est suivie au cours du temps sur le moniteur. Des images sont enregistrées durant 54 minutes.

La fig. III.3. nous montre les images d'une portion de champ microscopique enregistrées aux temps 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 et 54 minutes après la stimulation par 20 U/ml d'IL-1. Nous voyons que la couleur correspondant à la fluorescence émise par les cellules n'évolue pas au cours du temps. D'après la courbe d'étalonnage montrée au point 5.3 des Matériels et Méthodes, la couleur bleue correspond à une concentration de l'ordre de 100 nM. Des cellules endothéliales activées, par exemple, présentent typiquement des couleurs rouge ou jaune, qui correspondent à des concentrations en calcium beaucoup plus élevées. Cette expérience a été réalisée 8 fois, en utilisant différentes concentrations en IL-1 (20, 40 et 80 U/ml), sans qu'aucune variation de couleur et donc de Ca_i^{++}, n'ait pu être mise en évidence.

En conclusion, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation de Ca_i^{++} suite à une stimulation par l'IL-1 chez les fibroblastes de poumon que nous utilisons. Ce type de résultat avait déjà été obtenu par Kester et al. (1989) : suite à une stimulation des cellules mésangiales de rat par de l'IL-1, ils observaient une augmentation du taux de DAG en l'absence de toute variation de Ca_i^{++}. En parcourant la littérature, nous voyons donc que, en général, les cellules répondent à l'IL-1 par un accroissement du Ca_i^{++}, à quelques exceptions près.

Les résultats que nous avons obtenus suivant trois techniques différentes nous laissent penser que les fibroblastes de poumon que nous utilisons constituent une exception. En absence de réponse calcique suite à une stimulation par l'IL-1, nous avons été contraints

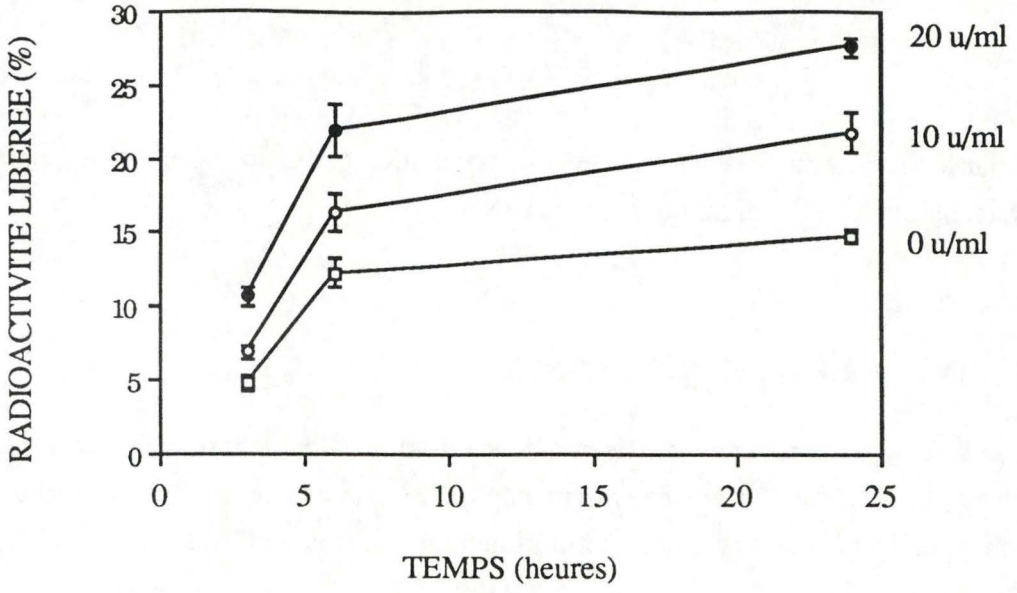


Fig. III.4 : Effet de l'IL-1 β sur la libération d'acide arachidonique tritié préalablement incorporé par les firoblastes de poumon, au cours du temps. Les cellules ont été stimulées pendant 3, 6 et 24 heures en présence de 0 (contrôle), 10 ou 20 U/ml d'IL-1 β. Les résultats sont exprimés en pourcentages de radioactivité libérée par rapport à la radioactivité incorporée par les cellules. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type. Cette expérience a été réalisée sur des fibroblates de la 28ème génération.

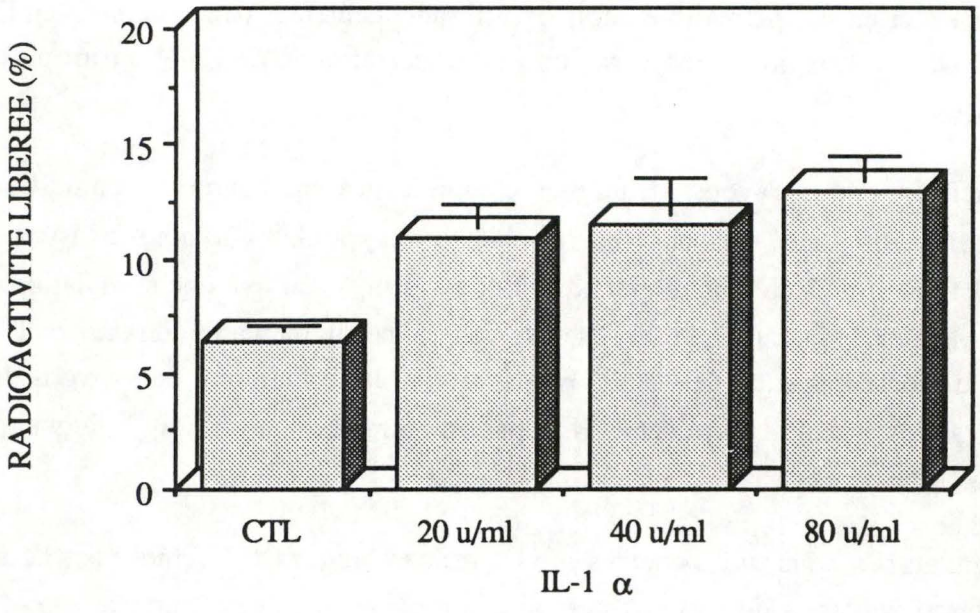


Fig. III. 5 : Effet de l'IL-1α sur la libération d'acide arachidonique préalablement incorporé par des fibroblastes de poumons à la 25ème génération. Les cellules ont été stimulées pendant 6 heures par 0 (contrôle), 20, 40 et 80 U/ml d'IL-1α. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité libérée par rapport à la radioactivité incorporée par les cellules. Chaque point représente la moyenne de 6 mesures ± 1 écart-type.

d'abandonner cet aspect classique de l'activation cellulaire pour nous tourner vers d'autres aspects tels que l'activité de la PLA_2 et la libération d'IL-6.

1.2. EFFETS DE L'IL-1 SUR L'ACTIVATION DE LA PLA_2

Au cours de ce test, les cellules sont incubées pendant 18 heures en présence d'acide arachidonique radioactif. Cette incubation leur permet d'incorporer l'acide gras marqué dans leurs membranes. Elles sont ensuite stimulées par l'IL-1, ce qui active la PLA_2. Celle-ci clive les phospholipides, ce qui provoque la libération de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique et ses dérivés marqués, sont libérés dans le surnageant. Après un temps déterminé, on estime la radioactivité présente dans le surnageant.

La fig.III.4. représente l'évolution de la radioactivité libérée au cours du temps (3, 6 et 24 heures) par des cellules traitées avec différentes concentrations en IL-1ß. Nous constatons un effet dose- et temps-dépendant de l'IL-1ß sur l'activation de la PLA_2.

A titre indicatif, nous avons également réalisé une expérience similaire dans laquelle les fibroblastes de poumon sont stimulés pendant 6 heures par différentes concentrations en IL-1α (20, 40 et 80 U/ml). L'activation de la PLA_2 apparaît ici aussi dose-dépendante.

L'activation de la PLA_2 durant 6 heures de stimulation par 20 U/ml d'IL-1 entraîne une libération de radioactivité qui est comparable dans les cas de l'IL-1α et de l'IL-1ß : elle représente respectivement 171 et 180 % de libération de radioactivité par rapport aux contrôles.

Nous voyons donc que, tant l'IL-1α que l'IL-1ß provoquent l'activation de la PLA_2. Ces résultats correspondent aux données de la littérature que décrivent une augmentation des métabolites dérivés de l'acide arachidonique induite par l'IL-1 chez les fibroblastes 3T3 (Burch et al., 1989) et chez les cellules mésangiales de glomérule de rat (Schalkwijk et al., 1991).

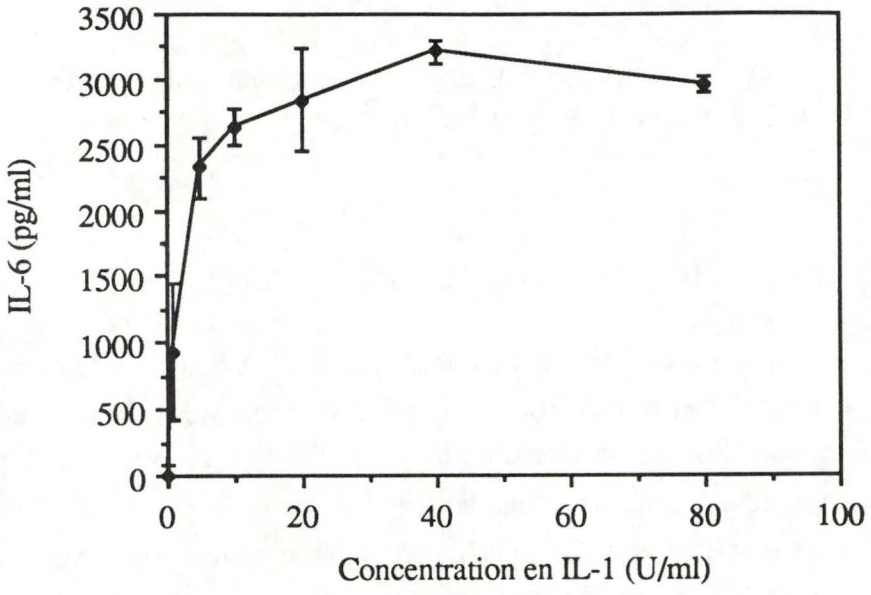


Fig. III. 6 : Effet de la concentration en IL-1 β sur la libération d'IL-6 par des fibroblastes de poumon en 27 ème génération. Les cellules ont été ensemencées à raison de 3200 cellules par cupule d'une plaque à 96 puits comme indiqué dans les Matériels et Méthodes, sauf indication contraire. L'IL-1 β a stimulé les cellules pendant 24 heures. Les surnageants ont été dilués 15 x pour doser l'IL-6. Les résultats exprimés en pg d'IL-6/ml tiennent compte de la dilution. Chaque point représente la moyenne de 3 observations ± 1 écart-type.

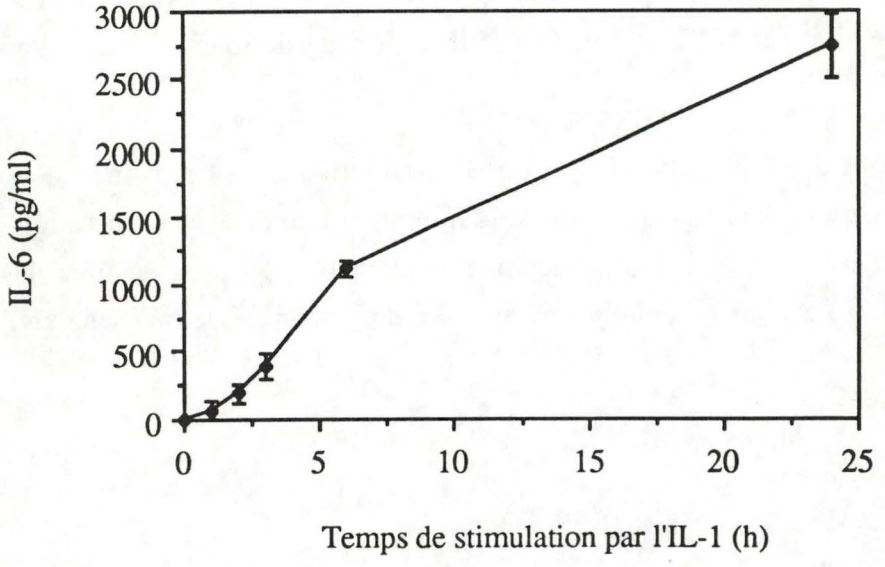


Fig. III. 7 : Effet du temps de stimulation par l'IL-1β sur la libération d'IL-6. Les fibroblastes de poumon en 30ème génération ont été stimulés par 20 U/ml d'IL-1β. Inh représente un ensemble d'inhibiteurs composé du vérapamil 10^{-4} M, du néomycine sulfate 10-3 M et du 2'5'-didéoxyadénosine monophosphate 10^{-4} M. Les résultats exprimés en pg/ml tiennent compte de la dilution (10x) du surnageant réalisée pour doser l'IL-6. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

1.3. EFFET DE L'IL-1 SUR LA PRODUCTION D'IL-6.

Après avoir examiné les effets de l'IL-1 sur la libération de radioactivité préalablement incorporée dans les cellules sous forme d'acide arachidonique marqué, nous avons examiné l'influence de l'IL-1 sur la libération d'IL-6. Celle-ci est dosée dans les surnageants grâce à un test ELISA (cfr. Matériels et méthodes, point 1.3).

Au cours d'essais préliminaires, nous avons établi les conditions de densité cellulaire (3200 cellules/puits) et de dilution des surnageants qui nous permettraient de doser l'IL-6 par la méthode de l'ELISA en nous situant dans les limites d'absorbance de la droite d'étalonnage. Nous avons également établi que la présence de sérum dans les surnageants n'influençait pas le dosage (résultats non montrés). Néanmoins, les stimulations ont toujours été effectuées dans de l'OPT + HLA de façon à éviter toute interférence entre d'une part le sérum, et d'autre part les médiateurs et/ou molécules antioxydantes qui seront traitées dans le travail.

La quantité d'IL-6 produite dépend de la concentration en IL-1, comme le montre la figure III.5. Les fibroblastes de poumon ne produisent pas d'IL-6 de façon constitutive, mais ils sont très sensibles à une stimulation par l'IL-1 puisque 1 U/ml d'IL-1 provoque la libération d'une quantité non négligeable d'IL-6. Nous voyons également que la réponse présente un plateau débutant à 20 U/ml d'IL-1. Les expériences ultérieures seront réalisées à cette concentration.

La production d'IL-6 induite par l'IL-1 dépend également du temps de stimulation (Fig. III.7). La réponse cellulaire est très précoce : après seulement une heure d'incubation en présence de 20 U/ml d'IL-1, on détecte déjà la présence d'IL-6 dans le surnageant.

Les travaux de Carty et al. (1990), concernant la production d'IL-6 par des fibroblastes de peau (cellules FS4) stimulés par l'IL-1, présentent exactement le même profil de cinétique de production et de dose dépendance. Les fibroblastes de peau utilisés ne produisent pas non plus d'IL-6 de manière constitutive, contrairement aux cellules endothéliales (Arnould, 1992), aux cellules synoviales (Guerne et al., 1989) et aux chondrocytes (Shinmei et al., 1991).

La production d'IL-6 par les fibroblastes étudiés renforce l'importance physiologique de notre travail, en arrière plan duquel se trouve tout un contexte inflammatoire, comprenant l'IL-1 d'une part et les radicaux libres d'autre part. En effet, l'IL-6 est un polypeptide de 26 KDa sécrété par plusieurs types cellulaires en réponse à divers stimuli

infectieux et inflammatoires comme l'IL-1, les LPS, les infections virales, etc.

Cette cytokine, dotée de propriétés pléiotropes par excellence, exerce des effets biologiques locaux mais aussi systémiques. Parmi les nombreux rôles joués par l'IL-6, citons par exemple l'induction de la maturation finale des lymphocytes B, l'induction de la croissance et de la différenciation cytotoxique des cellules T, la stimulation des cellules souches de la moëlle osseuse et la régulation de la réponse de phase aiguë des hépatocytes. L'IL-6 peut donc être considérée comme un important médiateur des mécanismes de défense de l'organisme par son effet sur la production d'anticorps, sur l'hématopoièse et sur la réponse de phase aiguë.

De cette première série d'expériences, nous pouvons conclure que les fibroblastes de poumon étudiés répondent effectivement à l'IL-1, entre autres par une activation de la PLA_2 et une libération d'IL-6. Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation du taux de calcium intracellulaire engendrée par l'IL-1. Cette absence de réponse calcique nous a contraint à abandonner l'étude de cet aspect de l'activation cellulaire dans la suite du travail.

Afin de déterminer si les radicaux libres interviennent dans une voie de transduction utilisée par l'IL-1, nous allons observer l'effet d'antioxydants sur les 2 réponses cellulaires observées, c'est-à-dire sur l'activation de la PLA_2 et la libération d'IL-6.

2. EFFET D'ANTIOXYDANTS SUR LES REPONSES CELLULAIRES INDUITES PAR L'IL-1.

Avant toute chose, nous avons voulu vérifier que les molécules anti-oxydantes que nous utilisons ne présentent pas d'effet toxique pour les cellules.

Comme il fallait s'y attendre, les antioxydants utilisés interfèrent avec le test de toxicité classique utilisant la méthode au MTT (voir Matériels et Méthodes, point 2.1), puisque celle-ci se base sur l'activité d'une déshydrogénase mitochondriale. Nous avons donc utilisé la méthode à l'acridine orange pour déterminer la toxicité du PTDC, du NAC, du trolox C et de la deferoxamine.

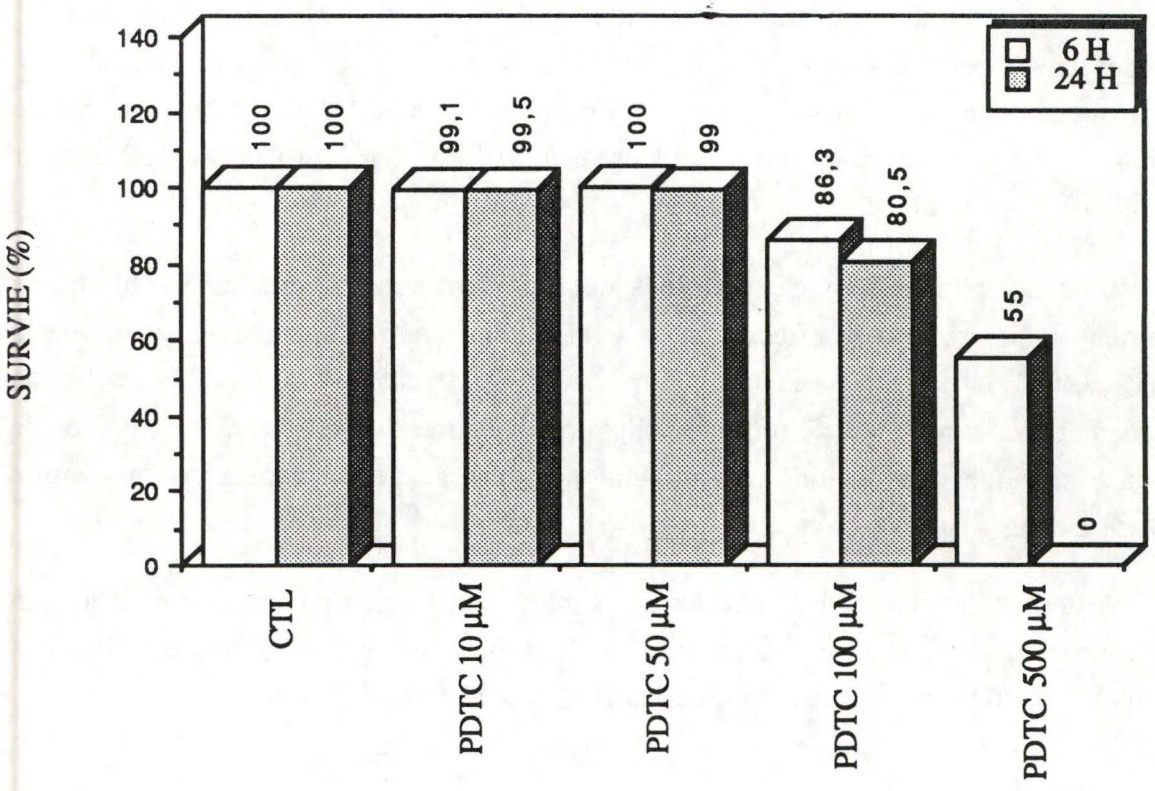


Fig. III. 8 : Effet du PTDC sur la viabilité cellulaire, par la méthode de l'acridine orange. Les fibroblastes de poumon en 22ème génération sont restées 6 h (colonnes en blanc) et 24 h (colonnes en pointillé) en présence de différentes concentrations en PDTC. Les comptages de cellules ont été réalisés sur 500 cellules environ.

Le PTDC présente une toxicité négligeable jusqu'à 50 µM (Fig III.8) et très importante à 500 mM (100 % de mortalité après 24 heures d'incubation). La concentration de 100 µM, recommandée par Schreck et Baeuerle (1991), présente une faible toxicité après 6 heures d'incubation (13,7 % de mortalité) et une cytotoxicité plus importante après 24 h d'incubation (20 % de mortalité). Afin de pouvoir par la suite comparer nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons choisi d'utiliser la concentration 100 µM lors des incubations de 6 heures et celle de 50 µM pour les incubations plus longues.

Les cellules ne présentent aucune mortalité lorsqu'elles sont incubées pendant 6 h ou 24 h en présence de NAC 15, 30 et 60 mM (résultats non montrés). Nous réaliserons nos expériences avec du NAC 30 mM, comme l'indiquent Schreck et Baeuerle (1991).

Le trolox C et la deferoxamine n'entraînent pas non plus de cytotoxicité après une incubation de 6 ou de 24 heures, aux concentrations recommandées dans la littérature, c'est-à-dire 10^{-4} M pour le trolox C et 10^{-3} M en ce qui concerne la deferoxamine (résultats non montrés).

Ces tests préliminaires de cytotoxicité nous ont procuré la certitude qu'un éventuel effet inhibiteur observé en présence d'un de ces antioxydants ne pouvait pas être attribué à une mortalité cellulaire. Nous avons alors pu tester l'influence de ces anti-oxydants sur l'activation de la PLA_2 et la libération d'IL-6.

2.1. EFFET DU PTC ET DU NAC SUR L'ACTIVATION DE LA PLA_2.

Deux éléments importants ressortent de l'abondante littérature relative à la transduction du signal induit par l'IL-1 : tout d'abord, l'IL-1 semble déclencher plusieurs voies de transduction du signal chez un même type cellulaire (Munoz et al., 1991 ; Rink, 1990) et ensuite, les voies activées semblent différer d'un type cellulaire à l'autre. On pouvait donc craindre de ne pouvoir mettre en évidence un effet inhibiteur des anti-oxydants parce que d'autres voies d'activation seraient également impliquées. C'est pourquoi, en plus des antioxydants, nous avons utilisé un ensemble d'inhibiteurs des voies classiques de transduction composé de

- Verapamil 10^{-2} M qui inhibe les canaux calciques voltage-dépendants. Nous l'avons introduit parmi les autres inhibiteurs parce qu'à l'époque où ces expériences ont été réalisées, nous n'avionspas encore confirmé que les fibroblastes de poumon étudiés ne

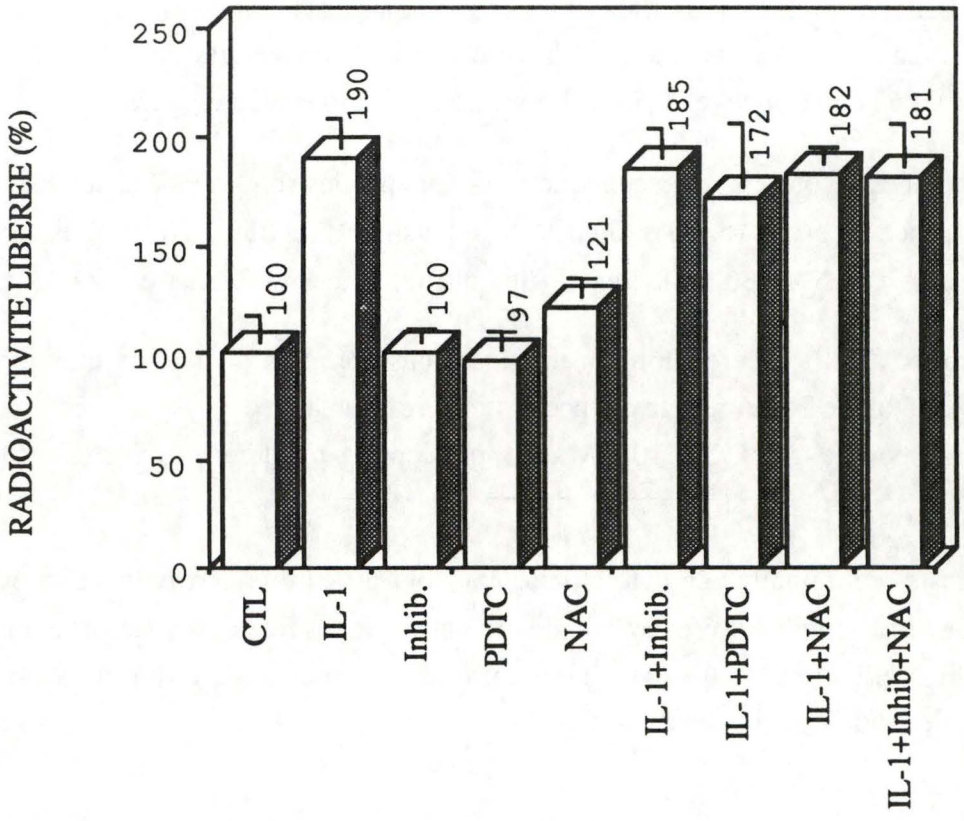


Fig. III. 9 : Effet de différents anti-oxydants sur la libération d'acide arachidonique préalablement incorporé par les cellules stimulées par l'IL-1 β. Les fibroblastes de poumon en 24ème génération ont été incubés durant 6 h en présence ou non de médiateurs : IL-1 (20 U/ml), PDTC 10^{-4}M avec ou sans IL-1, NAC 30 mM avec ou sans IL-1. Ces 3 séries de médiateurs sont additionnées ou non d'un ensemble d'inhibiteurs (=inhib;) composé de verapamil 10^{-2} M, de néomycine sulfate 10^{-3} M et de DDA 10^{-4} M. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité libérée par rapport au contrôle arbitrairement porté à 100%.

répondaient pas à l'IL-1 par une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (nous nous étions limités aux mesures spectrofluorimétriques).

- Néomycine sulfate 10^{-3} M : l'utilisation de cet inhibiteur de la phospholipase C se justifie par les nombreux articles concernant l'implication de la voie des inositols phosphates dans l'activation cellulaire par l'IL-1 (Dinarello, 1990 ; O'Neill, 1992).

- 2, 5'-Didéoxyadénosine (DDA) 10^{-4} M : cet inhibiteur réversible de l'adénylate cyclase (Florio et Ross, 1983), permet de bloquer la voie de l'AMPc qui, selon de nombreux auteurs est impliquée dans certaines activations cellulaires par l'IL-1 (voir point 1.2.3 (B.2) de l'Introduction).

La figure III.9 nous montre l'effet des anti-oxydants PDTC et NAC, additionnés ou non au mélange d'inhibiteurs, sur l'activation de la PLA_2 induite par l'IL-1. Les inhibiteurs seuls ne modifient pas la radioactivité libérée par rapport au contrôle. L'IL-1 β seule stimule comme prévu la PLA_2 en augmentant la libération de radioactivité de 90 % par rapport au contrôle, ce qui représente 1011 cpm pour les cellules stimulées par 20 U/ml d'IL-1, contre 531 cpm pour les cellules contrôles. Aucun des inhibiteurs, qu'il s'agisse du PDTC, du NAC ou du mélange d'inhibiteurs n'affecte cette réponse de la PLA_2 à la stimulation par l'IL-1.

D'après ces résultats importants, l'activation de la PLA2 ne semble pas dépendre des radicaux libres qui seraient induits par l'IL-1. Cette cytokine activerait la PLA2 par une voie de transduction différente. Toutefois, nous avons continué à vérifier les effets d'anti-oxydants, sur une autre réponse induite par l'IL-1, la libération d'IL-6.

2.2 EFFETS DES ANTIOXYDANTS SUR LA LIBÉRATION D'IL-6 INDUITE PAR L'IL-1.

Nous avons réalisé des expériences à ce sujet, d'abord sur des fibroblastes de poumon, puis sur des chondrocytes humains.

Nous avons commencé par examiner l'effet du PDTC sur la production d'IL-6 consécutive à une stimulation par l'IL-1. Pour les raisons sus-mentionnées, nous avons également introduit parmi les médiateurs un ensemble d'inhibiteurs décrits au point 2.

Au vu de la figure III.10, nous constatons que la production d'IL-6 induite par l'IL-1

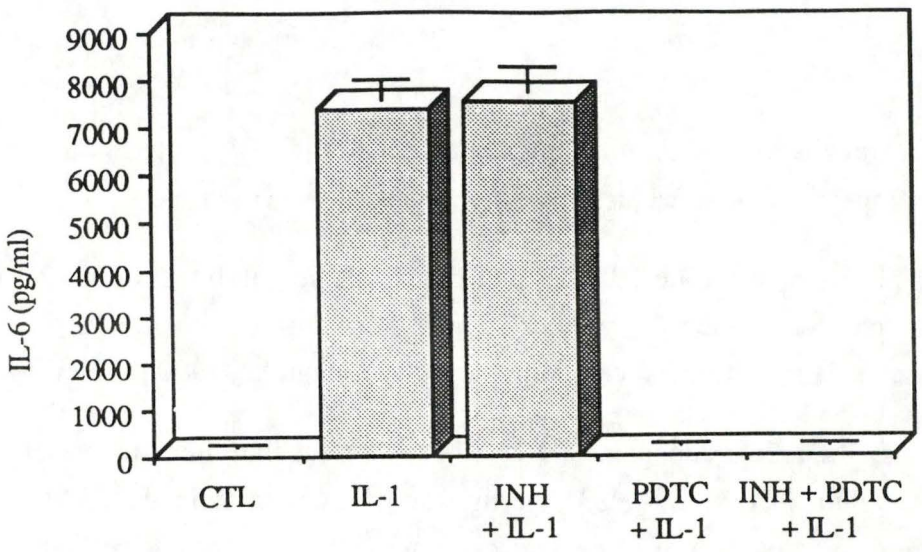


Fig. III. 10 : Effet d'inhibiteurs dont le PTDC sur la libération d'IL-6 par les fibroblastes de poumon en 20ème génération stimulés par 20 U/ml d'IL-1 pendant 6 h. L'IL-6 a été dosée sur les surnageants utilisés pour la mesure de libération d'acide arachidonique de la fig III.9. Pour cette raison, il y avait 30000 cellules par cupule d'une boîte de 96 puits. Les surnageants ont donc été dilués 25 x pour le dosage. Ces résultats exprimés en pg/ml d'IL-6 tiennent compte de la dilution effectuée pour le dosage. Le PTDC est utilisé à une concentration de 10^{-4} M. INH représente un ensemble d'inhibiteurs composé du vérapamil 10^{-4} M, de la néomycine sulfate 10^{-3} M et du 2'5'-didéoxyadénosine monophosphate 10^{-4} M. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

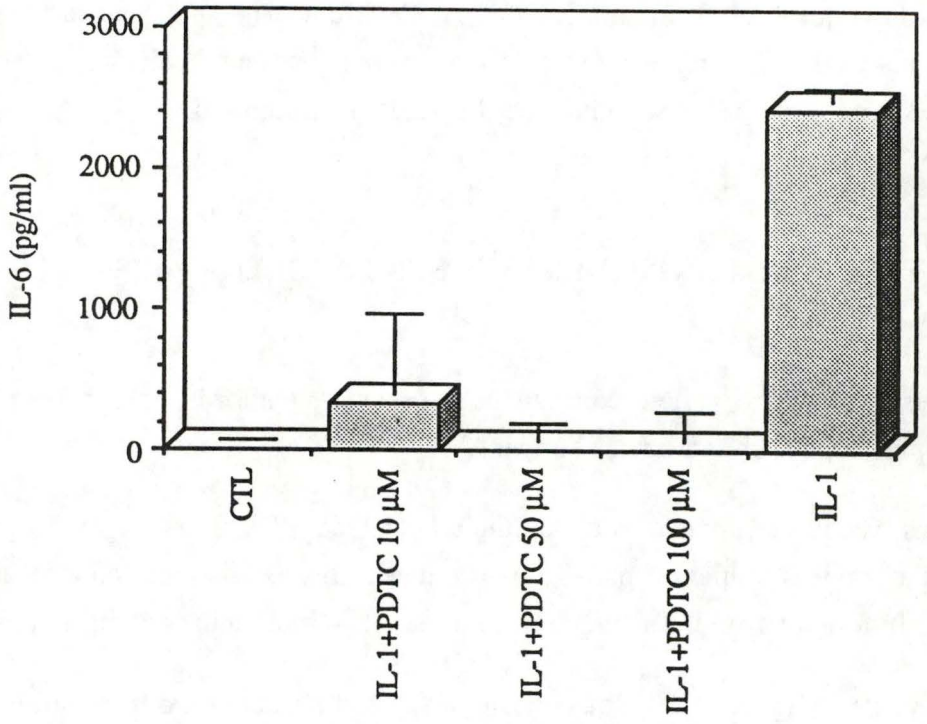


Fig. III.11 : Effet de différentes concentrations en PDTC sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1, chez des fibroblastes de poumon en 19 ème génération. Les concentrations utilisées sont de 10, 50 et 100 µM pour le PDTC, et de 20 U/ml pour l'IL-1. Les contrôles (CTL) correspondent aux cellules non stimulées. Les fibroblastes sont restés en présence des médiateurs durant 6h. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

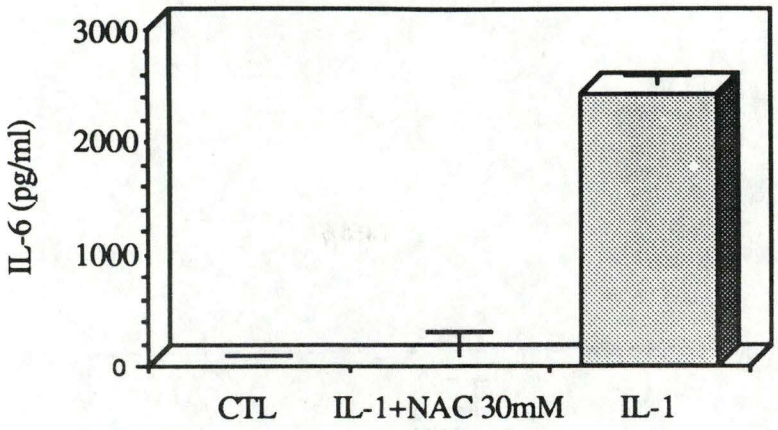


Fig. III. 13 : Effet du NAC sur la libération d'IL-6 induite par 20 U/ml d'IL-1 chez des fibroblastes de poumon en 19 ème génération. Les contrôles (CTL) correspondent aux cellules non stimulées. Dans le second test, les cellules ont été préincubées en présence de NAC 30 mM durant une heure, avant d'être stimulées par de l'IL-1β à 20 U/ml additionnée de NAC 30 mM. Au moment de la stimulation, d'autres puits constituant un contrôle positif reçoivent 20 U/ml d' IL-1β seule. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

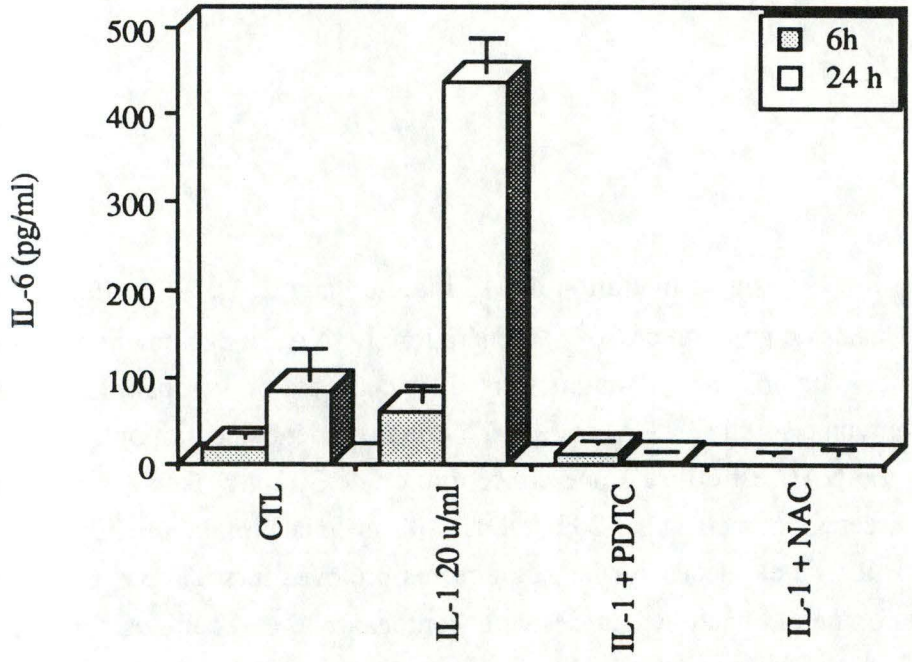


Fig. III. 14 : Effet du PDTC et du NAC sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1α chez des chondrocytes humains en 1ère génération. Durant 6 h (colonne en pointillé) ou 24 h (colonne en blanc), les cellules ont été incubées en présence ou non des médiateurs IL-1α (20 U/ml), PDTC (10^{-4} M) + IL-1 (20U/ml), NAC (30 mM) + IL-1α (20 U/ml). Dans le cas du NAC, les cellules ont été préincubées avant la stimulation pendant 1 h avec du NAC 30 mM. Chaque puit ne contient que 2500 chondrocytes au lieu de 3200 comme décrit dans les Matériels et Méthodes. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

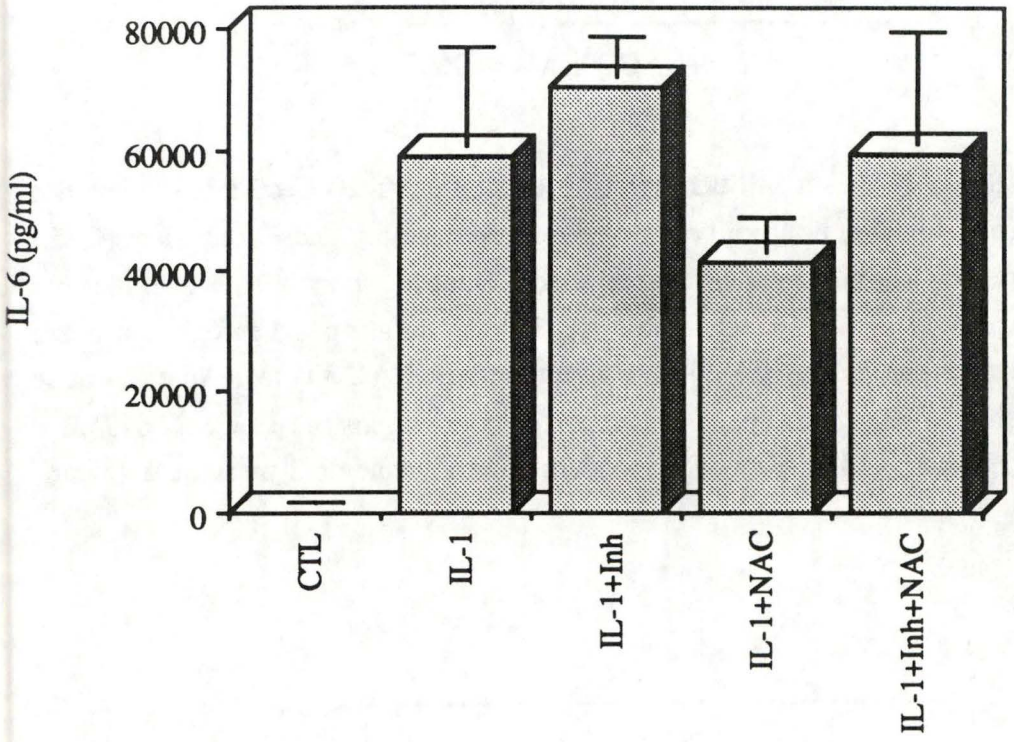


Fig. III.12 : Effet du NAC sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1β à 20 U/ml, par des fibroblastes de poumon en 26ème génération. Le NAC a également été testé en présence d'un ensemble d'inhibiteurs (=Inh) composé du verapamil 10^{-4} M, de la néomycine sulfate 10^{-3} M et de la 2'5'-didéoxyadénosine monophosphate 10^{-4} M. Le NAC est utilisé à une concentration de 30 mM. Tous les inhibiteurs sont directement mélangés à 20 U/ml d'IL-1 lors de la stimulation. Celle-ci dure 6 h. L'IL-6 a été dosée sur les surnageants prélevés lors d'une expérience de libération de radioactivité sur des puits contenant 30 000 cellules chacun. Les surnageants ont donc été dilués 25 x pour le dosage. Ces résultats exprimés en pg/ml d'IL-6 tiennent compte de la dilution effectuée pour le dosage. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type. Les tests statistiques ont été effectués par un test t de Sudent ($\alpha = 0,05$) où n=3. N.S. : non significatif.

n'est pas inhibée par les inhibiteurs classiques, mais bien par le PDTC. Celui-ci provoque une inhibition de 100 % de la libération d'IL-6, même à 50 μM (Fig. III 11). Une expérience similaire réalisée avec le NAC 30 mM ne nous a pas permis de tirer les mêmes conclusions. La figure III.12 nous montre, en effet, que le NAC n'inhibe pas de manière significative la production d'IL-6 engendrée par l'IL-1. Ce résultat nous a semblé d'autant plus étonnant que Schreck et Baeuerle (1991), par exemple, affirment que le NAC comme le PDTC inhibent des réponses cellulaires induites par l'IL-1.Le NAC devrait donc inhiber également la synthèse d'IL-6. La solution à ce problème nous est venue d'un autre article de Schreck et ses collaborateurs (1991) dans lequel il mentionne que le NAC n'exerce son effet inhibiteur sur les réponses induites par l'IL-1 que si les cellules sont préincubées en présence de NAC avant d'être stimulées. En effet, la figure III.13 nous indique qu'une préincubation d'une heure en présence de NAC inhibe à 100 % la synthèse d'IL-6 induite par l'IL-1. Cette inhibition de la libération d'IL-6 par le PDTC et le NAC suggère que chez les fibroblastes de poumon, le gène codant pour l'IL-6 est sous la régulation du facteur NF-κB. Ceci avait déjà été montré par Baeuerle (1991) et Pravinkumar (1990) sur d'autres types cellulaires. De plus, nous voyons que cette inhibition est totale , ce qui signifierait que seule la voie d'activation que nous investiguons intervient dans l'activation du gène codant pour l'IL-6 dans le cas des fibroblastes de poumon. La régulation de l'expression de ce gène est pourtant connue pour être dépendante de l'activation des PKA et des PKC chez les fibroblastes de peau (Pravinkumar, 1990 ; Sehgal, 1990).

D'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales, les cellules synoviales et les chondrocytes produisent de l'IL-6 de manière constitutive. Nous nous sommes interrogés à propos de l'effet que pouvaient exercer le PDTC et le NAC sur la synthèse d'IL-6 induite par l'IL-1 chez ces types cellulaires.

Nous avons dosé l'IL-6 présente dans les surnageants de chondrocytes humains stimulés ou non par 20 U/ml d'IL-1, en présence de PDTC et de NAC (fig. III.14). Comme prévu, nous avons décelé une production constitutive d'IL-6, fortement augmentée lors d'une stimulation par 20 U/ml d'IL-1 : la production d'IL-6 augmente de 431 % après 6 h et de 519 % après 24 h pour les cellules stimulées par l'IL-1. Ces résultats corroborent les précédents, obtenus avec les fibroblastes de poumon.

Remarque : nous avons utilisé de l'IL-1 α pour stimuler les chondrocytes parce que la firme Janssen Pharmaceutica était en rupture de stock d'IL-1 β au moment où nous disposions des chondrocytes. D'après les données de la littérature, l'IL-1 α comme l'IL-1 β stimulent le facteur NF-κB (O'Neill, 1992) ce qui se comprend aisément puisque les 2

Antioxydant	Concentration (µM)	Inhibition (%)
PDTC	100 50 10	100 100 86
NAC	30 15 5 1	96 68 13 0
Deferoxamine	1	0
Trolox c	0,1	98

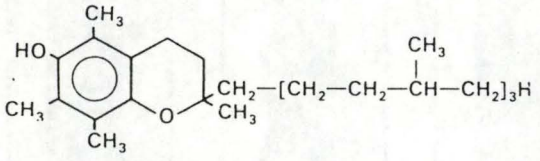
Table III. 1 : Estimation du potentiel inhibiteur de différents antioxydants sur la production d'IL-6 induite par l'IL-1. Les résultats sont calculés comme suit :

$$100 - \left(\frac{\text{IL-6 produite en présence d'IL-1 + inhibiteur}}{\text{IL- 6 produite en présence d'IL-1 seule}}\right) \times 100$$

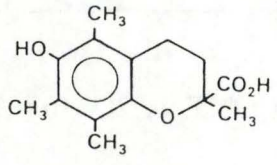
Chaque valeur représente la moyenne la moyenne de 3 mesures. L'expérience a été réalisée 2 fois pour le PDTC 100 mM et le NAC 30 mM et une fois pour les autres valeurs.

formes d'IL-1 agissent sur le même récepteur membranaire. Il est donc hautement probable que nous obtiendrions qualitativement un même type de profil de réponse avec l'IL-1 β, avec éventuellement des différences dans les quantités d'IL-6 produites.

Dans le but de mieux cerner le type de phénomènes oxydatifs qui pourraient provoquer l'activation du facteur NF-κB, nous avons voulu tester d'autres anti-oxydants agissant suivant un mécanisme différent de ceux utilisés par le PDTC et le NAC. Le NAC exerce son effet inhibiteur sur l'activation du NF-κB en provoquant l'élévation du taux de GSH et/ou en réagissant directement avec un dérivé de l'H_2O_2 (Schreck et al, 1991). Nous avons choisi de tester la deferoxamine, un agent chélateur de métaux montrant une haute affinité pour le Fe^{3+}. Elle inhibe la formation de radicaux °OH, in vitro, en chélatant le fer catalysant la réaction d'Haber-Weiss (Fudman et al, 1987). Nous avons également utilisé le trolox C, un analogue hydrosoluble de la vitamine E, elle-même hautement hydrophobe .



Vitamin E



Trolox C

Formules structurelles de la vitamine E et du trolox C. (D'après Davies et al, 1988)

Le tableau III.1 récapitule le pourcentage d'inhibition de la production d'IL-6 induite par l'IL-1 exercé par les différents anti-oxydants que nous avons étudiés. Le PTDC et le NAC, aux concentrations recommandées, inhibent cette réponse à 100 %. Leur inhibition s'atténue lorsque les concentrations en anti-oxydants diminuent.

La deferoxamine n'affecte aucunement la libération d'IL-6 induite par l'IL-1, alors que le trolox C l'inhibe totalement. Ces résultats doivent cependant être considérés avec prudence car l'expérience avec la deferoxamine et le trolox C n'a été réalisée qu'une seule

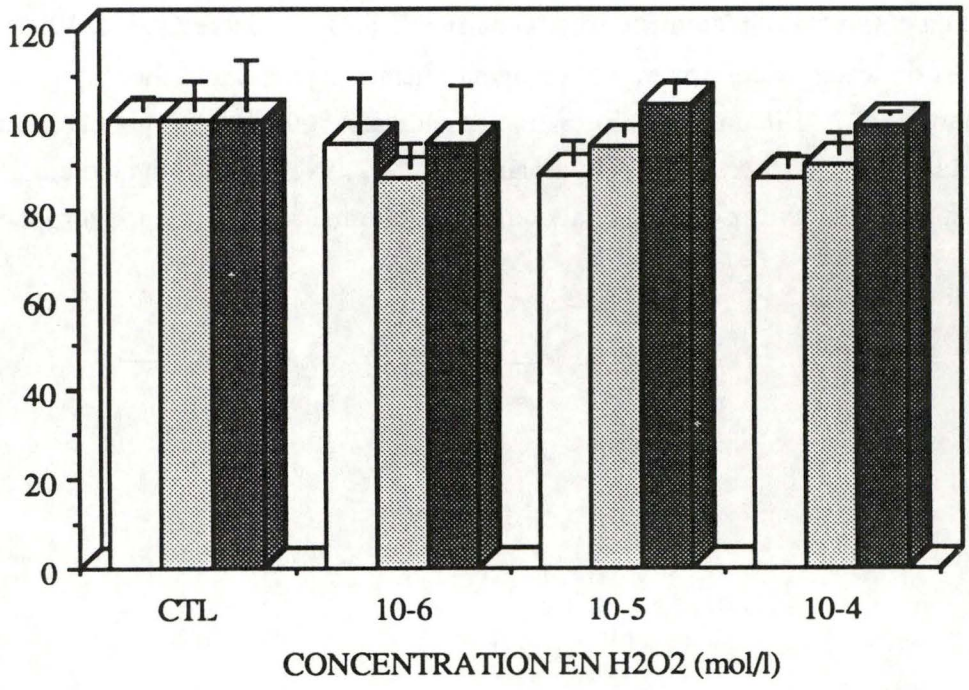


Fig. III. 15 : Cytotoxicité de l'H_2O_2 sur les fibroblastes de poumon en 26ème génération, évaluée par la méthode de l'adénine tritiée. Les cellules ont été incubées durant 4 h (colonnes en blanc), 8 h (colonnes en pointillés clairs) et 24 h (colonns en pointillés foncés) en présence d'H_2O_2 10^{-6}, 10^{-5} et 10^{-4} M. Les résultats représentent la radioactivité présente dans le surnageant et sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

fois. Nous interpréterons les résultats obtenus avec le trolox C et la deferoxamine dans la discussion générale.

De cette deuxième série d'expérience, nous pouvons tirer des conclusions relatives à trois points importants :

- primo, les anti-oxydants PDTC et NAC n'inhibent pas l'activation de la PLA_2 induite par l'IL-1, ce qui signifie que l'activation de cette enzyme est indépendante de la voie de transduction qui transite par des mécanismes oxydatifs activateurs du facteur de transcription NF-κB, telle que cette voie est décrite par Schreck et Baeuerle (1991).

- secundo, le PDTC ainsi que le NAC inhibent la libération d'IL-6 consécutive à une stimulation par l'IL-1. Ceci suggère que la libération de l'IL-6 déclenchée par l'IL-1 serait sous le contrôle direct du NF-κB, facteur activé par des mécanismes oxydatifs. Cette constatation s'applique aussi bien aux fibroblastes de poumon qu'aux chondrocytes, chez lesquels les anti-oxydants abaissent le taux d'IL-6 libérée en deçà du niveau basal. Il est possible que ces anti-oxydants inhibent même la production constitutive d'IL-6.

-tertio, le fait que la production d'IL-6 dépende du facteur NF-κB alors que celui-ci n'affecte pas la PLA_2 semble indiquer que l'IL-1, sur les mêmes cellules, enclenche au moins deux voies de transduction différentes.

Après avoir montré que la synthèse d'IL-6 induite par une stimulation à l'IL-1 est inhibée par des anti-oxydants, nous avons recherché des conditions oxydantes qui reproduiraient la libération d'IL-6 observée avec l'IL-1.

3. RECHERCHE DE CONDITIONS OXYDANTES REPRODUISANT LES EFFETS OBSERVES AVEC L'IL-1.

3.1. L'H_2O_2

D'après Schreck et Baeuerle (1991), l'H_2O_2 ou plutôt l'H_2O_2 métabolisé, induit l'activation du facteur NF-κB chez les cellules Jurkat. Nous avons donc d'abord testé peroxyde d'hydrogène en tant qu'oxydant susceptible de provoquer l'activation du facteur

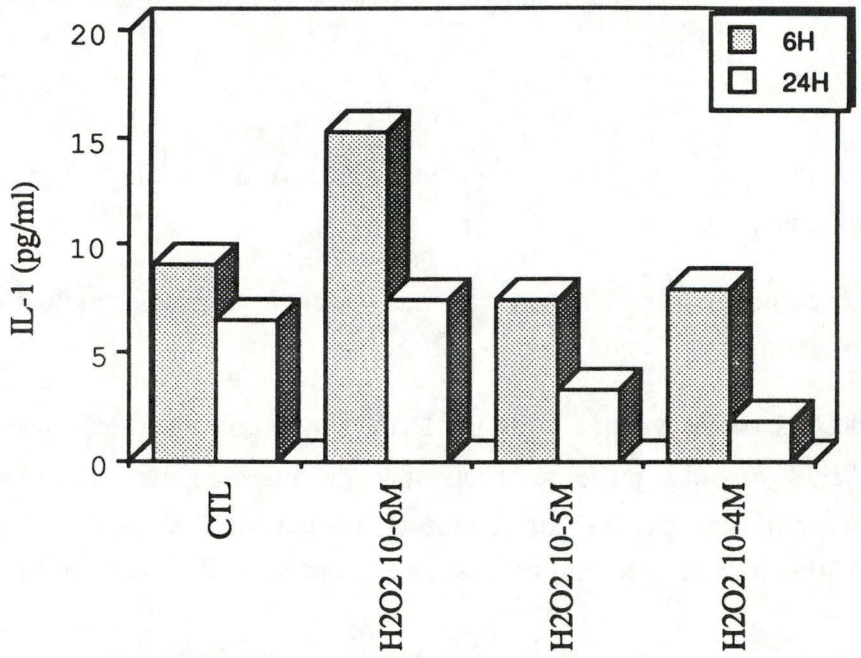


Fig. III. 16 : Effet de l'H_2O_2 sur la production d'IL-1 β par des fibroblastes de poumon en 18ème génération. Les cellules ont été incubées durant 6h (colonnes en blanc) ou 24 h (colonnes en pointillés) en présence ou non d'H_2O_2 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4} et 10^{-3} M. Pour chaque traitement, l'IL-1 β a été dosée sur le surnageant de 30000 cellules / cupule dans une plaque à 96 puits, comme indiqué dans les Matériels et Méthodes. Chaque point représente la moyenne de 2 mesures.

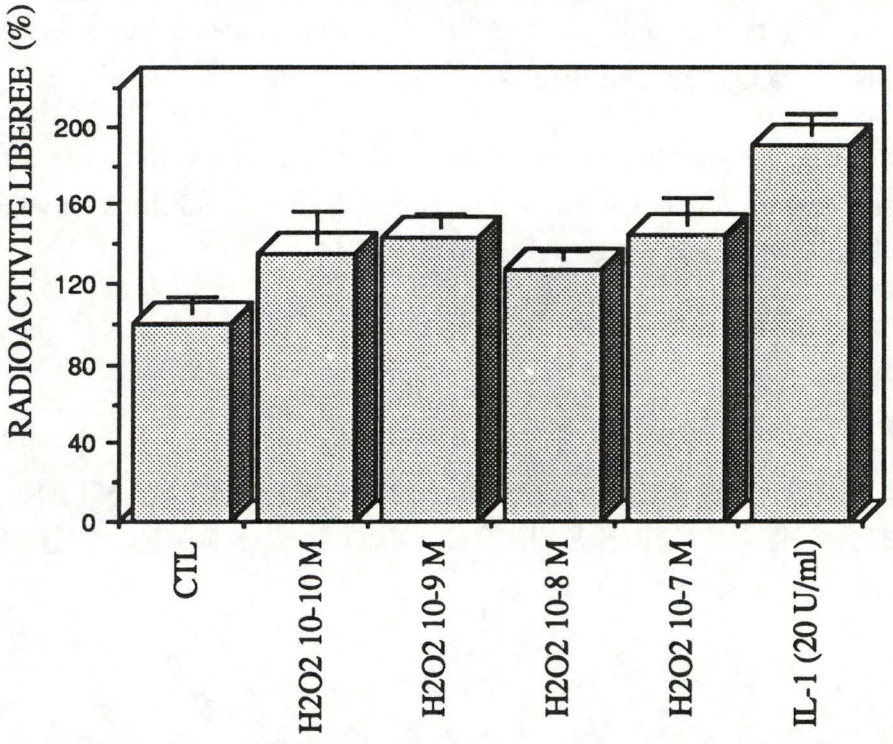


Fig. III. 17 : Effet de l'H_2O_2 sur la libération de radioactivité par des fibroblastes de poumon en 32ème génération préincubés pendant 18 h avec l'acide arachidonique tritié. Les résultats sont exprimés en % de radioactivité libérée par rapport au contrôle. Les cellules ont été préincubées ou non durant 1 h en présence d'H_2O_2 (10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} et 10^{-10} M) avant d'être rincées 2 fois avec de l'OPT + HLA. Un comptage de radioactivité est réalisé sur les surnageants 3 h après les rinçages. Des cellules stimulées durant 3 heures par 20 U/ml d'IL-1 constituent un contrôle positif. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

NF-κB, d'autant plus que l'H_2O_2 diffuse facilement à travers les membranes biologiques (Schreck et al, 1991) et qu'il se trouve dans les liquides biologiques à des concentrations non négligeables : la quantité d'H_2O_2 dans le plasma de sujets sains varie de 0,25 à 5 µM (Shreck et al, 1991).

Avant d'utiliser l'H_2O_2 comme activateur potentiel des fibroblastes de poumon, nous avons vérifié que cette molécule oxydante ne provoquait pas de toxicité cellulaire aux concentrations utilisées. Comme le montre la fig. III.15, l'H_2O_2 à 10^{-6}, 10^{-5} et même 10^{-4} M ne provoque pas de mortalité cellulaire importante et ce après 4, 8 et 24 heures d'incubation.

Un second test préliminaire consistait à s'assurer que l'H_2O_2 n'induisait pas la production d'IL-1ß par les fibroblastes de poumon, sans quoi les éventuels effets activateurs attribués à l'H_2O_2, sur la production d'IL-6, par exemple, auraient sans doute été médiés par l'IL-1ß produite.

Nous avons donc dosé l'IL-1ß par un test ELISA réalisé sur des surnageants de cellules incubées en présence d'H_2O_2. Ce test ne nous a pas permis de mettre en évidence une production d'IL-1ß induite par l'H_2O_2, les valeurs montrées à la fig.III.16 se situant en deçà du seuil de sensibilité de cette méthode de dosage.

3.1.1. EFFET DE L'H_2O_2 SUR LE RELEASE DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE

Bien que les résultats obtenus avec les anti-oxydants n'indiquent pas de rapport entre l'activation de la PLA2 et le NF-κB, nous avons quand même l'effet de l'H_2O_2 sur la libération de radioactivité prélablement incorporée dans les membranes sous forme d'acide arachidonique tritié. Au cours de ces expériences, nous incubons les cellules en présence de différentes concentrations en H_2O_2 pendant une heure, puis nous rinçons les cellules afin d'évacuer toute trace d'H_2O_2, et nous estimons la radioactivité contenue dans le surnageant après trois heures d'incubation. La Fig.III.17 nous indique une augmentation de l'activité de la PLA2 suite à une incubation en présence d'H_2O_2 (10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8} et 10^{-7} M). Cet effet, qui ne présente pas de dose-dépendance, s'observe également à 10^{-6} M et 10^{-5} M mais il s'estompe à 10^{-11} M (résultats non montrés). Cette augmentation reste toujours plus faible que celle induite par l'IL-1..

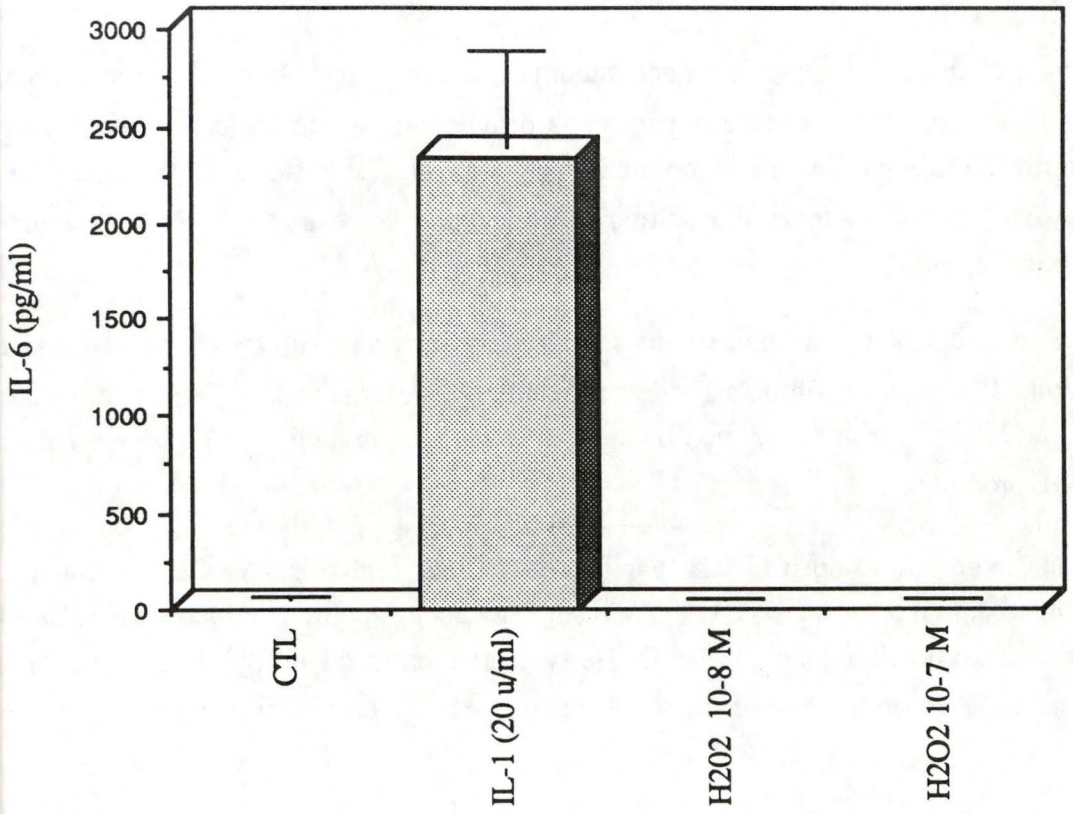


Fig. III. 18 : Effet de l'IL-1β et de l'H_2O_2 sur la libération d'IL-6 par des fibroblastes de poumon en 23ème génération. Les cellules ont été incubées pendant une heure avec l'H_2O_2 (10^{-7} et 10^{-8} M), puis rincées 2 fois avec de l'OPT + HLA. Le dosage d'IL-6 a été effectué sur les surnageants prélevés 6 h après les rinçages. D'autres cellules ont été incubées ou non en présence de 20 U/ml d'IL-1β durant 6 h. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

Ces résultats concordent avec ceux de Zor (1991) qui a montré que dans des mastocytes, l'H_2O_2 augmente l'activité de la PLA_2 de 400 %. Il attribue cette activation de la PLA_2 à un effet inhibiteur de l'H_2O_2 sur les phophatases acides, ce qui entraîne une diminution des déphosphorylations. Si l'on considère que , d'une part, les PLA_2 ne sont actives que sous forme phosphorylée, et que, d'autre part, leur activité nécessite une phophorylation, alors ce taux affaibli de déphosphorylations permettrait de les maintenir activées plus longtemps. Il amplifierait également leur activation induite par un agoniste. Les travaux de Zor expliqueraient pourquoi nous observons une activation de la PLA_2 par l'H_2O_2, alors que les anti-oxydants n'inhibent pas l'activation de la PLA_2 induite par l'IL-1. En effet, l'action de l'H_2O_2 se situe au niveau de l'activation de l'enzyme déjà présente dans le cytoplasme, et non pas au niveau de la transcription du gène de la PLA_2.

3.1.2. EFFET DE L'H_2O_2 SUR LA LIBÉRATION D'IL-6

Nous avons réalisé le même type d'expérience que précedemment (voir le point 3.1.1.) en incubant les cellules pendant une heure en présence d'H_2O_2 à différentes concentrations, mais cette fois nous avons dosé l'IL-6 présente dans les surnageants prélevés après 6 heures de stimulation. La fig.III.18. nous montre que l'H_2O_2 à 10^{-7} et 10^{-8} M n'induit pas la libération d'IL-6 chez les fibroblastes de poumon, contrairement à l'IL-1. Suite à ces résultats, nous avons varié les conditions d'incubation en présence d'H_2O_2 en testant une plus large gamme de concentrations allant de 10^{-4} à 10^{-8} M et ce pour des temps d'une ou six heures. Malgré cela, nous n'avons pu détecté d'IL-6 dans les surnageants.

Ces expériences réalisée avec l'H_2O_2 ne nous ont donc pas permis de reproduire les effets stimulateurs observés en présence d'IL-1. Cela pourrait s'expliquer par une dégradation rapide de l'H_2O_2 dans le milieu extracellulaire. Shreck et al (1991) mentionnent que 60% de l'H_2O_2 ajouté à un milieu de culture contenant du sérum est dégradé au bout d'une heure. Remarquons que dans les mêmes conditions oxydantes, nous avions toutefois observé une activation de la PLA_2.

Dans une seconde série d'expérience, nous avons utilisé un autre système oxydant, intracellulaire cette fois : la nitrofurantoïne.

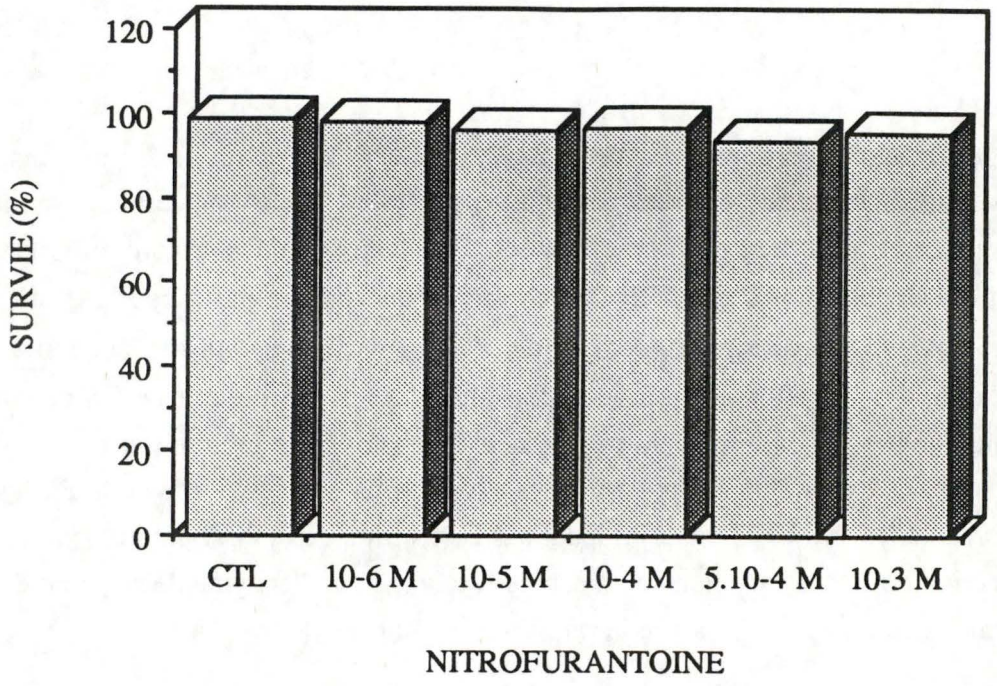


Fig. III. 19 : Effet de la nitrofurantoïne, à diverses concentrations, sur la viabilité cellulaire estimée par la méthode de l'acridine orange. Les cellules en 16ème génération sont restées duran 6 h en présence des différentes concentrations en nitrofurantoine avant de subir le test de l'acridine orange. Le comptage cellulaire a été réalisé sur 600 cellules environ.

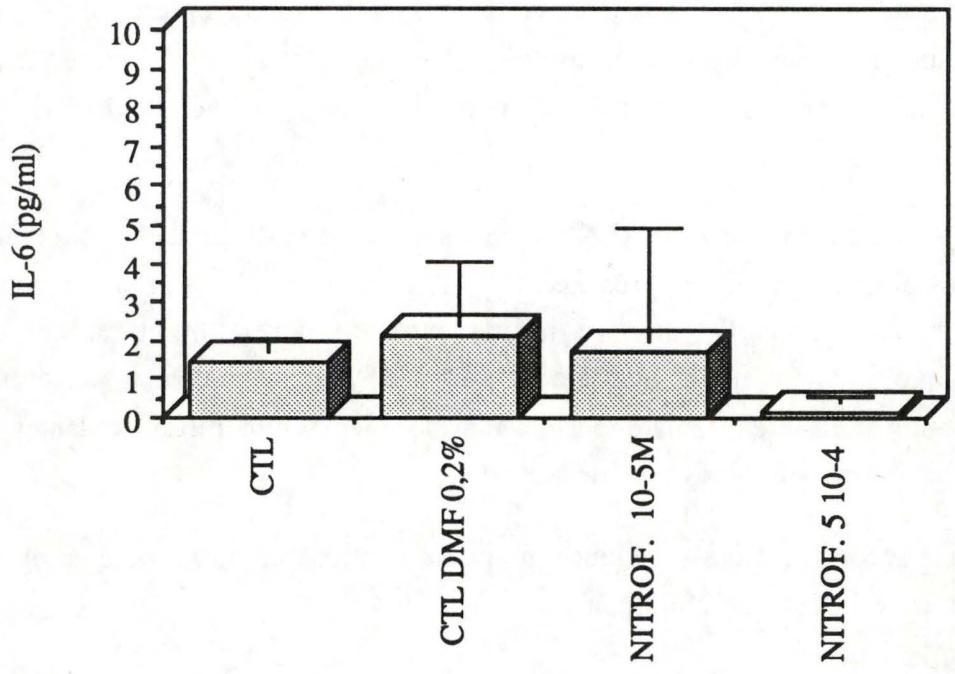


Fig. III. 20 : Effet de la nitrofurantoïne sur la production d'IL-6 par les fibroblastes de poumon en 16ème génération. Les cellules ont été incubées 6 h en présence de nitrofurantoïne 10^{-5} et 5.10^{-4} M. Les cellules contrôles ont été incubées en présence de l'OPT + HLA et le contrôle en présence en présence de DMF 0,2 % dans de l'OPT + HLA. Ce contrôle permet de vérifier que le DMF dans lequel est dissoute la nitrofurantoïne n'interfère pas avec le dosage d'IL-6 (voir Matériels et Méthodes, point 2.1.1.). Chaque point représente la moyenne de 3 mesures ± 1 écart-type.

3.2. LA NITROFURANTOINE

La nitrofurantoine est une molécule métabolisée par la cellule qui la réduit grâce à une NADPH oxydo-réductase du réticulum endoplasmique ou mitochondriale. La réduction monovalente de la nitrofurantoïne génère des radicaux nitro anioniques. Ces derniers en présence d'oxygène s'autooxydent rapidement en produisant des $O_2^{\circ(-)}$ à partir desquels se forment des autres espèces radicalaires (OH°, H_2O_2, ...) (Michiels et Remacle, 1988).

Cette molécule étant réputée toxique à forte concentration, nous avons d'abord évalué sa toxicité avant de l'utiliser. La fig III.19 nous indique que la nitrofurantoïne après 6 heures d'incubation n'est pas toxique sur les fibroblastes de poumon. Nous avons ensuite testé cette molécule sur la production d'IL-6 à différentes concentrations (10^{-5} et $5x10^{-4}$ M). Nous n'avons pas pu détecter d'IL-6 sur les surnageant de cellules incubées poendant 6 heures en présence de nitrofurantoïne : les valeurs obtenues se situent en deçà du seuil de sensibilité (5 pg/ ml) de la méthode de dosage par ELISA (fig III.20.).

Nous ne sommes donc pas parvenus à trouver des conditions oxydantes capables de reproduire les effets de l'IL-1. Nous nous trouvons probablement face à un équilibre intracellulaire, entre d'une part les oxydants d'origine endogène ou exogène, et les systèmes anti-oxydants d'autre part. Une modification précise de cet équilibre en faveur de certains oxydants, induite par l'IL-1 entre autres, provoquerait l'activation du facteur NF-κB, de manière directe ou indirecte. En utilisant le PDTC, le NAC et le trolox C, nous avons contrecarré l'apparition ou l'action de ces oxydants particuliers. La deferoxamine, par contre, doit affecter un autre domaine de la machinerie cellulaire productrice et destructrice de radicaux libres, puisqu'elle n'affecte pas la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.

La modification de la balance anti-oxydants / radicaux libres susceptible d'induire l'activation du facteur NF-κB est probablement très précise et restreinte, ce qui expliquerait que nous n'ayons pas réussi à l'imiter en utilisant l'H_2O_2 et la nitrofurantoïne. Il faudrait donc dans les expériences futures, non seulement tester d'autres conditions oxydantes, mais aussi suivre les espèces moléculaires produites (H_2O_2, $O_2^{\circ(-)}$,...).

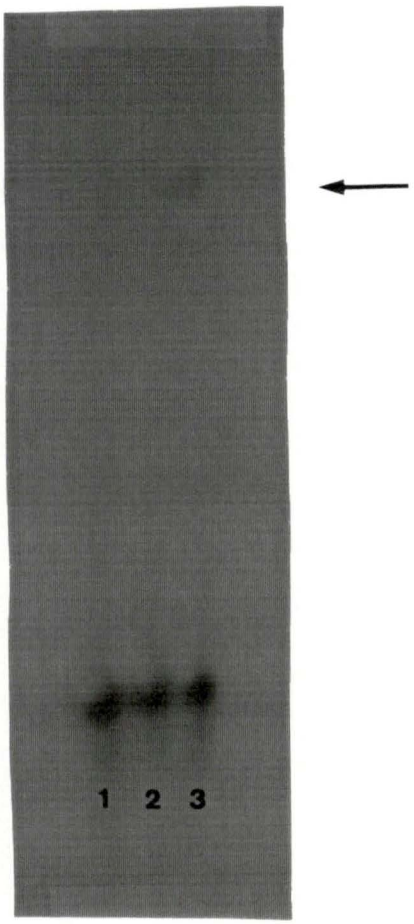


Fig. III. 21 : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet de l'IL-1β sur l'activation du NF-κB. La piste 1 représente le blanc (sonde oligonucléotidique sans protéine), la piste 2, les cellules non stimulées et la piste 3 correspond aux fibroblastes stimulés pendant 30 min par 20 U/ml d'IL-1β. Nous avons déposé 10 μg de protéines sur les pistes 2 et 3, et 1 ml de sonde radioactive par piste, ce qui représente environ 10 000 cpm.

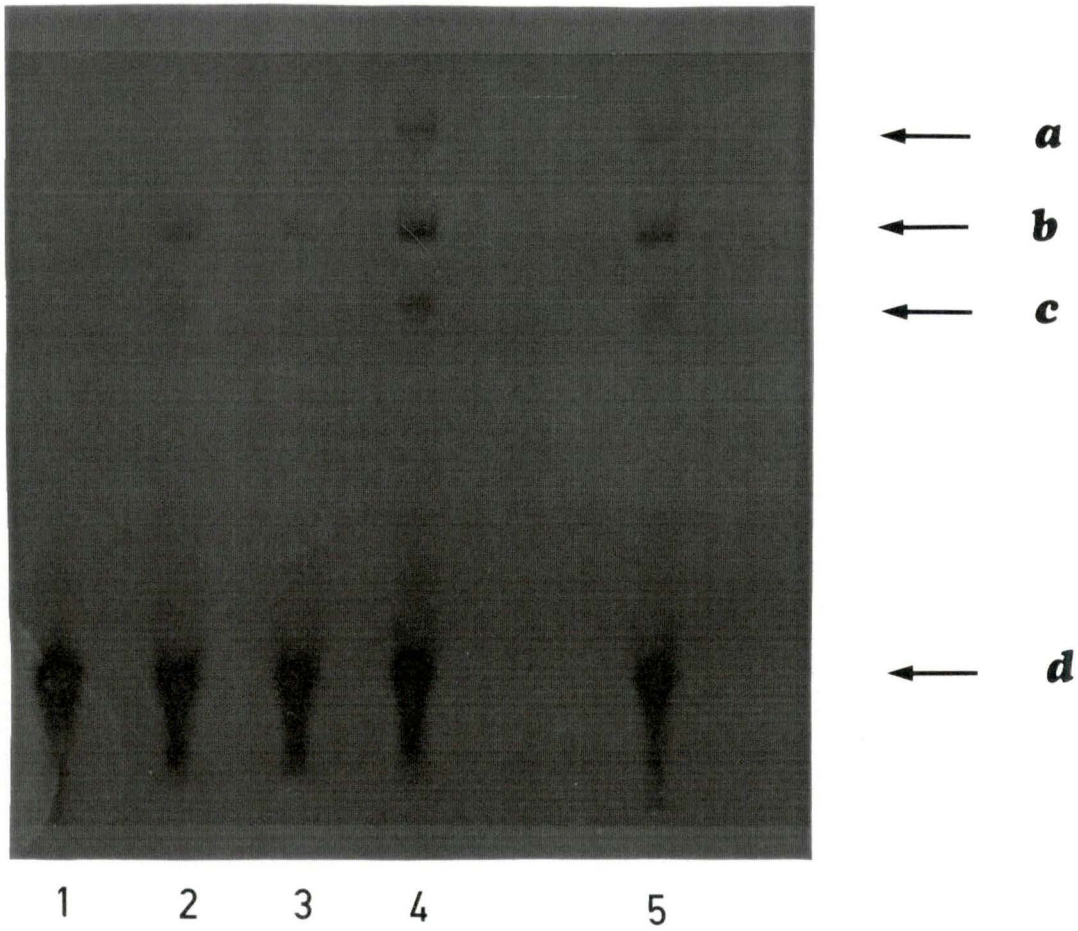


Fig III.22 : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet du temps de stimulation par l'IL-1α sur l'activation du NF-κB. La piste 1. représente le blanc (sonde oligonucléotidique sans protéine) ; la piste 2, les cellules non stimulées. Les pistes 3, 4 et 5 correspondent respectivement aux fibroblastes stimulés pendant 15, 30 et 45 minutes par 20 u/ml d'IL-1α.

4. APPROCHE DIRECTE DE L'ACTIVATION DU NF-KB PAR LA TECHNIQUE DE L'EMSA.

Toutes les expériences que nous avons réalisées jusqu'à présent nous ont fourni des renseignements indirects quui, en ce qui concerne la production d'IL-6,vont dans le sens du modèle d'activation par des mécanismes oxydatifs du facteur NF-κB, proposé par Schreck et Baeuerle (1991). A la fin de ce travail, nous avons eu l'opportunité de nous familiariser avec la technique de " Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) qui nous a procuré un moyen d'étudier directement l'activation du facteur NF-κB et donc de confirmer les résultats précédents.

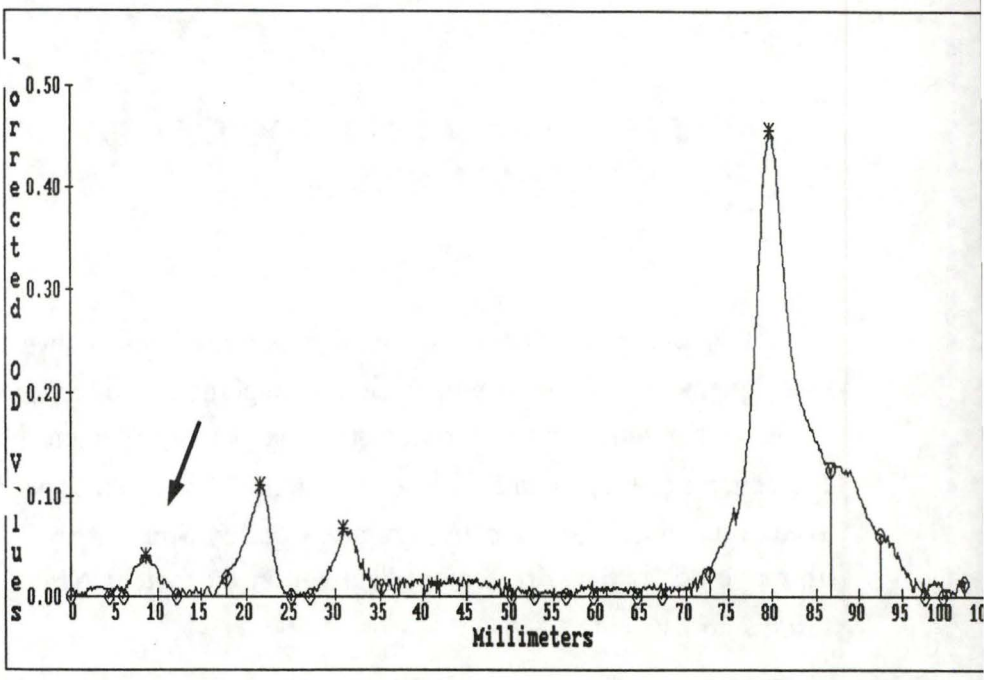
Cette technique consiste à mettre en présence une sonde oligonucléotidique radioactive représentant la séquence-cible du facteur de transcription NF-κB et un extrait protéique de cellules, par exemple stimulées par l'IL-1. Si le facteur NF-κB activé se trouve dans l'extrait protéique, il peut se lier à la sonde oligonucléotidique et donc retarder sa migration sur un gel d'électrophorèse, provoquant ainsi l'apparition d'une bande déplacée ("shift").

Au cours d'une première expérience, nous avons vérifié que l'IL-1ß provoquait bien l'activation du facteur de transcription NF-κB. Nous voyons effectivement un déplacement d'une bande dans la piste 3 de la figure III.21. Cette bande de poids moléculaire plus élevé que la sonde oligonucléotidique seule résulte de la liaison de la sonde avec le facteur NF-κB présent dans l'extrait cellulaire sous forme activée. La piste 2, par contre, représentant les cellules non stimulées, ne contient pas de bande déplacée. Ceci est en accord avec les les résultats précédents obtenus avec le dosage d'IL-6, puisque les fibroblastes n'en produisent pas de manière constitutive.

Suite à ce premier résultat encourageant, nous avons réalisé une cinétique de stimulation, au cours de laquelle des cellules on été mises en présence d'IL-1α durant 15, 30 et 45 minutes (fig III.22.). Nous avons exceptionnellement utilisé de l'IL-1α parce que la firme Janssen Biochimica était en rupture de stock d'IL-1ß. Rappelons que l'IL-1α et l'IL-1ß se lient au même récepteur cellulaire et qu'elles activent toutes les deux le facteur NF-κB (O'Neill, 1992).

Au vu de la fig. III.22. nous constatons que dans toutes les pistes contenant des extraits protéiques de cellules, stimulées ou non, apparaissent au moins deux bandes

Piste 4 : IL-1 (30 min.)



Piste 5 : IL-1 (45 min.)

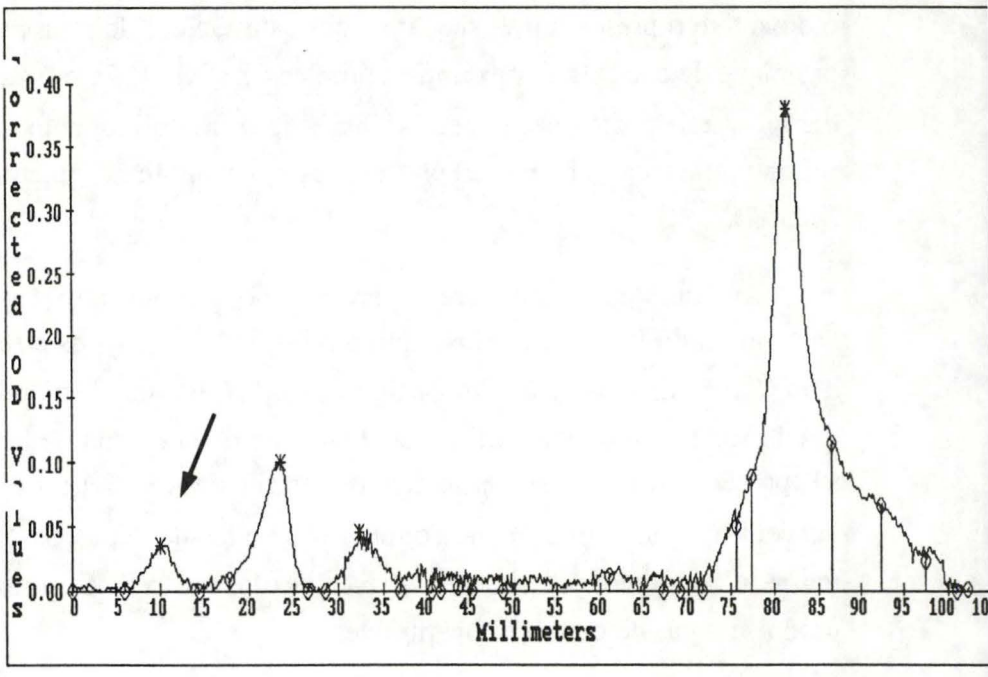
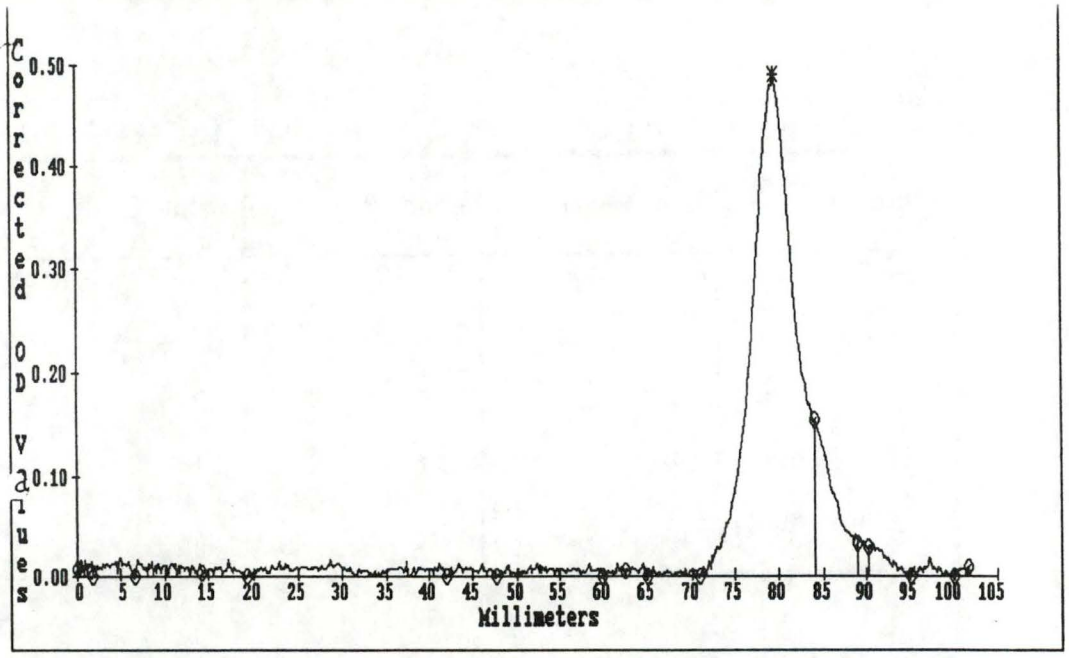
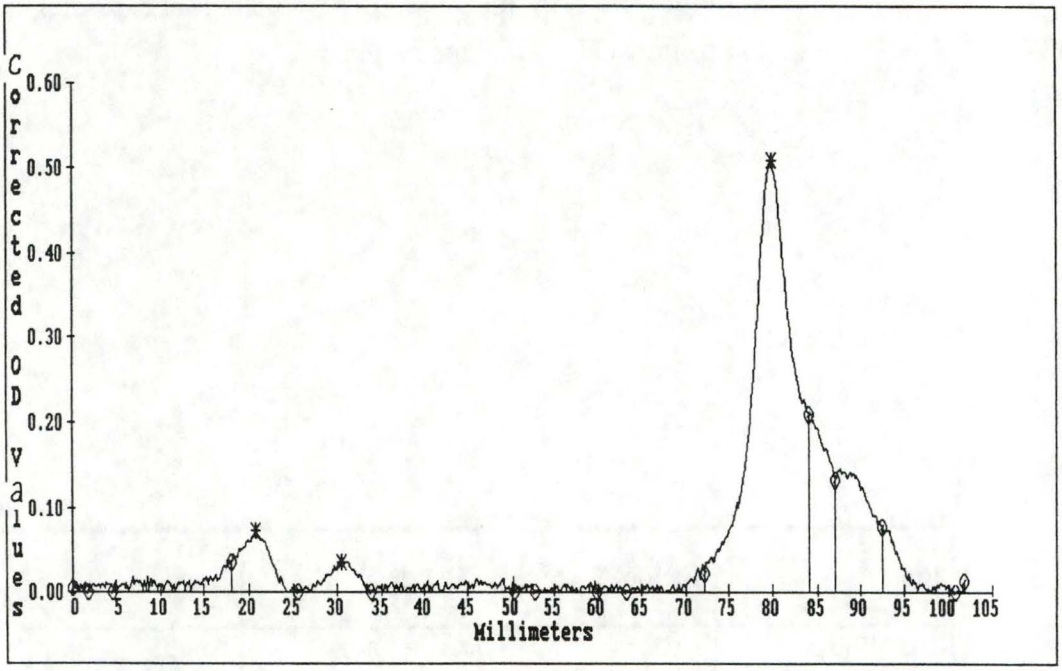


Fig. III.23 : Profils résultant de l'analyse de l'autoradiographie présentée à la page précédente par le système d'analyse d'images Visage 101. Les numéros des pistes correspondent à ceux de la figure III.22.

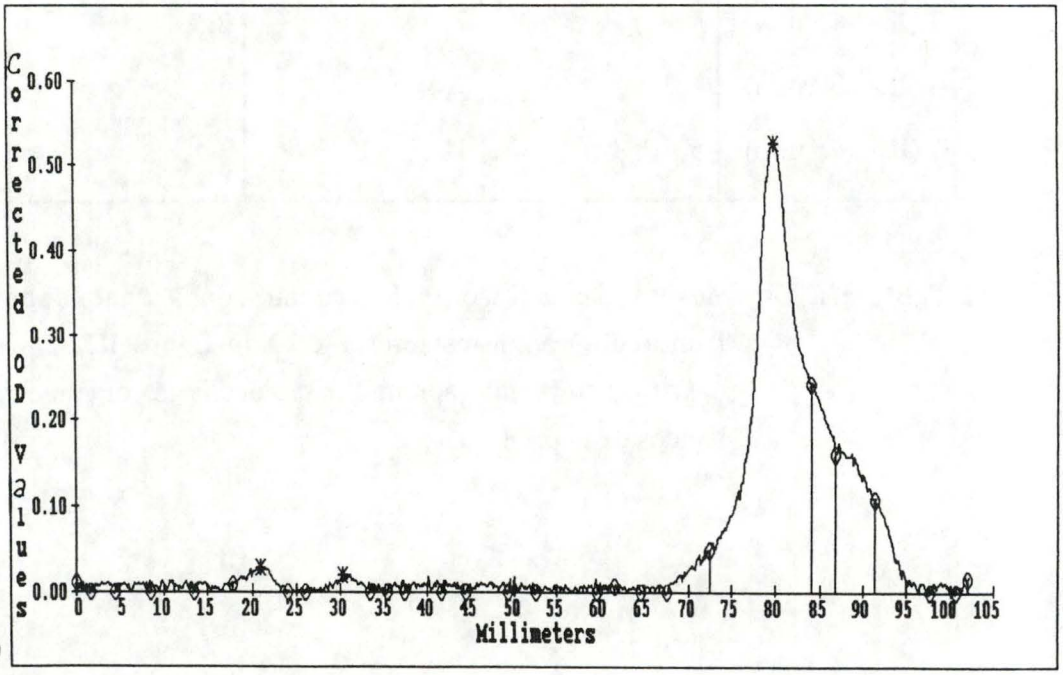
Piste 1 : Blanc



Piste 2 : Contrôle



Piste 3 : IL-1 (15 min.)



Pistes	Bande A	Bande B	Bande C	Bande D
1 (blanc)	/	/	/	100
2 (contrôle)	/	8,9	4,7	86,4
3 (IL-1 15 min)	/	3,5	2,2	94,3
4 (IL-1 30 min)	3,8	10,6	7,1	78,5
5 (IL-1 45 min)	5,3	15,1	7,1	72,5

Table III.2. : Mesure de I.O.D. contenu dans chacune des bandes de l'autoradiographie représentée à la figure III.22. Les résultats sont exprimés en % de la somme de toutes les I.O.D. d'une même piste.

Pistes	Bande A	Bande B	Bande C	Bande D
1 (blanc)	/	/	/	100
2 (contrôle)	/	6,7	4,9	88,4
3 (IL-1 15 min)	/	2,8	2,5	94,7
4 (IL-1 30 min)	4,2	7,4	6,0	82,4
5 (IL-1 45 min)	5,5	10	7	77,5

Table III.3. : Mesure de radioactivité contenue dans chaque bande du gel dont l'autoradiographie est présentée à la figure III.22. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la radioactivité contenue dans l'ensemble des bandes de la piste.

déplacées. Celles-ci seraient dues à la présence d'hétérodimères formés par des membres de la famille protéique Rel/ dorsal qui reconnaissent au moins une partie de la séquence de la sonde. Les membres de cette famille se lient à des séquences-cibles apparentées (Blank et al, 1991).

Mais une bande nous intéresse bien davantage que ces bandes "parasites" : il s'agit de celle que nous ne voyons apparaître aux pistes 4 et 5, correpondant aux cellules stimulées pendant 30 et 45 minutes par l'IL-1. En effet, cette bande n'apparaît ni pour les cellules non stimulées (piste 2), ni pour les cellules stimulées par de l'IL-1 pendant seulement 15 minutes (piste 3). Nous pensons qu'il s'agit d'une bande formée par le NF-κB activé qui s'est lié à la sonde oligonucléotidique marquée.

Nous avons analysé l'autoradiographie grâce au système d'analyse d'image V 101 (voir Matériels et Méthodes, point 6.2.4.). Les résultats sont exprimés sous forme de cinq profils correspondant aux 5 pistes (fig. III.23.). La piste correspondant au blanc ne présente que le pic à 9 cm représentant la sonde oligonucléotidique marquée. En plus des pics "parasites" communs à toutes les pistes contenant des protéines, nous observons l'apparition d'un pic supplémentaire dans les pistes correspondant aux cellules stimulées pendant au moins 30 minutes par l'IL-1α. Cela signifierait que l'activation du facteur NF-κB nécessite entre 15 et 30 minutes de stimulation par l'IL-1.

Ce type d'analyse permet également de quantifier l'I.O.D. (D.O. multipliée par la surface de la bande) correspondant à chaque bande (Table III.2.). Cette forme de présentation des résultats nous montre une nouvelle fois que la bande que nous attribuons au NF-κB n'apparaît qu'après 30 minutes de stimulation par l'IL-1α. La table III.3. présente les résultats obtenus en mesurant la radioactivité contenue dans les bandes du gel. Les pourcentages exprimés à la table III.3. sont très proches de ceux de la table III.2., obtenus par l'analyse d'image, ce qui indique que les deux méthodes de quantification des résultats paraissent fiables.

Etant donné que nous avons observé une intensité de réponse comparable après 30 et 45 minutes de stimulation, au cours de la troisième expérience que nous nous avons réalisée, les stimulations ont duré 30 minutes. Cette fois, nous avons observé l'effet du PDTC et du NAC sur l'activation du facteur NF-κB induite par l'IL-1 (fig. III.24.). Nous voyons apparaître une bande propre à la piste 3, correspondant aux cellules stimulées par l'IL-1ß. Cette bande n'apparaît pratiquement pas pour les cellules non stimulées (piste 2), ni pour les cellules stimulées par de l'IL-1 en présence de PDTC (piste 4) ou de NAC (piste

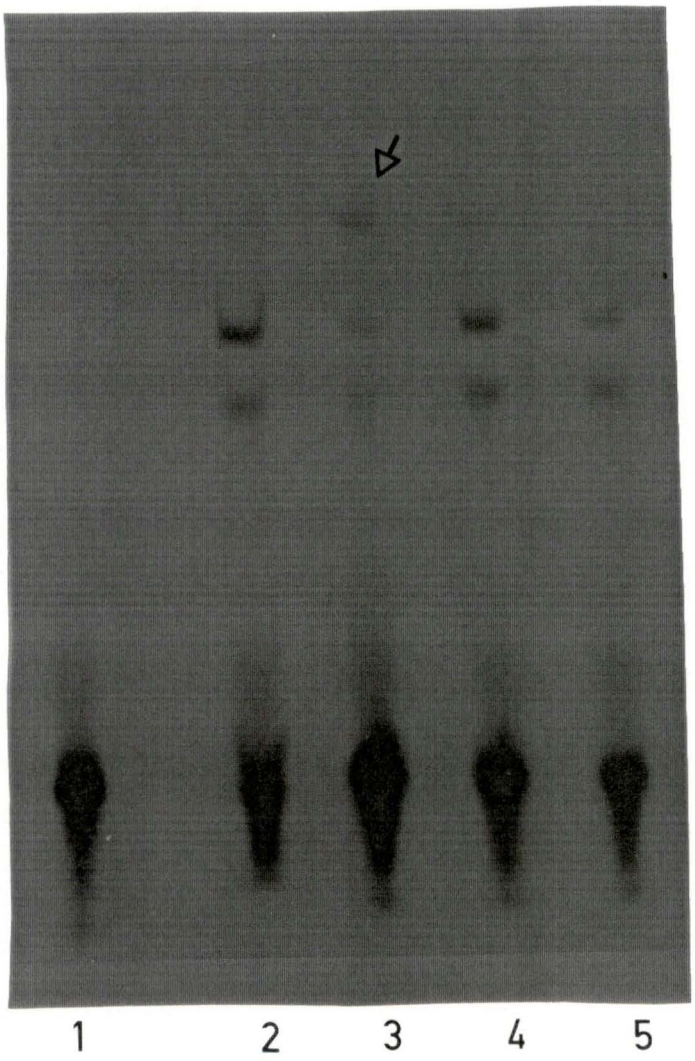


Fig. III.24 : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet d'antioxydants sur l'activation du NF-κB par l'IL-1. La piste 1 représente le blanc (sonde oligonucléotidique sans protéines), la piste 2, les cellules non stimulées (contrôle). L'extrait protéique des cellules stimulées par l'IL-1 se trouve à la piste 3. Les pistes 4 et 5 correspondent aux cellules stimulées par l'IL-1, respectivement en présence de PDTC et de NAC.

5). Cette bande témoigne de l'activation du NF-κB.

Malheureusement, nous n'avons pas pu quantifier les réponses obtenues au cours de cette dernière expérience, comme nous l'avions fait précédemment, car la quantité de protéines déposée sur les différentes pistes n'était pas constante, vraisemblablement à cause d'une erreur de manipulaton. Ceci explique que la réponse observée à la piste 3 avec les cellules stimulées par l'IL-1, paraisse beaucoup plus faible que dans les autres pistes.

En dépit d'une absence de quantification, cette dernière expérience constitue la confirmation directe des nombreux résultats obtenus avec l'étude de la production d'IL-6 induite par l'IL-1, en présence ou non d'inhibiteurs. Lorsque toutes les mises au point seront effectuées, cette technique prometteuse constituera un outil majeur dans l'investigation des conditions d'activation du facteur NF-κB.

Nous pouvons également vérifier si, dans les chondrocytes, le facteur NF-kB actif est présent de manière constitutive. En effet, les chondrocytes sécrètent de manière constitutive l'IL-6 et cette secrétion stimulée par l'IL-1 est également inhibée par les anti-oxydants.

IV. CONCLUSION

ET PERSPECTIVES

	Ca_i^{++}	Activation de la PLA_2	Libération d'IL-6	Activation du NF-κB
Réponse à une stimulation par l'IL-1	NON	OUI	OUI	OUI
Réponse à une stimulation par PDTC/NAC	_	NON	OUI	OUI
Réponse à H_2O_2	_	OUI	NON	N.D.
Nitrofurantoïne	_	N.D.	NON	

Table IV.1. : Récapitulatif des résultats obtenus au cours du mémoire (N.D. = non déterminé)

Schreck et Baeuerle (1991) ont émis une hypothèse attribuant aux radicaux libres un rôle de second messager dans l'activation du facteur de transcription NF-κB par l'IL-1. Afin de confirmer cette hypothèse dans le cas des fibroblastes de poumon, nous avons travaillé en 4 étapes :

- primo, nous avons étudié trois aspects de l'activation cellulaire, connues pour être provoquées par l'IL-1 : la variation de calcium intracellulaire, l'activation de la PLA_2 et la libération d'IL-6.
- secundo, nous avons tenté d'inhiber ces effets de l'IL-1 en utilisant divers anti-oxydants.
- tertio, dans le but de reproduire les effets observés avec l'IL-1, nous avons testé différentes conditions oxydantes.
- pour terminer, nous avons abordé l'étude du facteur NF-κB par une approche directe, grâce à la technique de l'EMSA.

En étudiant l'activation cellulaire induite par l'IL-1, nous n'avons pu mettre en évidence d'augmentation du calcium cytosolique dans nos cellules. Nous en avons conclu que la souche de fibroblastes utilisée ne présentait pas de variation de calcium intracellulaire en réponse à une stimulation par l'IL-1. Cette observation avait déjà été réalisée pour d'autres souches de cellules (Kester et al, 1989). Nous n'avons donc pas persévéré dans l'étude du calcium intracellulaire.

Par contre, les fibroblastes de poumon répondent bien à la stimulation par l'IL-1, sous la forme d'une activation de la PLA_2 et d'une secrétion d'IL-6 temps- et dose-dépendantes, conformément aux renseignements fournis par la littérature (Carty et al, 1990 ; Schalwijk et al, 1991).

Ce sont ces deux dernières réponses que nous avons tenté d'inhiber avec des anti-oxydants, afin de déterminer si les radicaux libres jouaient un rôle dans ces deux formes d'activation cellulaire.

Le PDTC et le NAC n'affectent pas la libération d'acide arachidonique radioactif induite par l'IL-1, ce qui semble indiquer que l'activation de la PLA_2 par l'IL-1 s'effectuerait via une voie de transduction du signal indépendante de l'activation du NF-κB par des mécanismes oxydatifs.

La production d'IL-6, par contre, est totalement inhibée par ces anti-oxydants. Ceci est en accord avec le modèle d'activation de Schreck et Baeuerle (1991) : le gène de l'IL-6

est sous le contrôle du facteur NF-kB (Pravinkumar, 1990 ; Baeuerle, 1991), et l'activation de ce facteur peut se faire par des mécanismes oxydatifs. L'addition d'antioxydants empêche l'activation de ce facteur NF-kB, et donc la transcription du gène codant pour l'IL-6 ne s'effectue pas. Afin de cerner le type de phénomène d'oxydation qui provoque l'activation du NF-κB, nous avons testé d'autres antioxydants que le PDTC et le NAC connus, pour inhiber l'activation du facteur de transcription. Rappelons également que Schreck et Baeuerle (1991) ont montré que ce n'est pas le H_2O_2 lui-même qui active le facteur NF-κB. Il s'agirait donc soit d'un métabolite de l'H_2O_2, soit d'un constituant cellulaire modifié par le H_2O_2. Dans une étape préliminaire, nous avons utilisé la deferoxamine et le trolox C. La deferoxamine ne semble pas influencer la libération d'IL-6 induite par l'IL-1, contrairement au trolox C qui inhibe cette réponse cellulaire à 100 %. L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que, tout d'abord, le taux de glutathion intracellulaire paraît important, puisque le NAC provoque l'augmentation de ce taux (Schreck et al, 1991). Ensuite, si l'on peut considérer que le trolox C agit suivant un mécanisme similaire à celui de la vitamine E, les phénomènes de peroxydation pourraient jouer un rôle important dans l'activation du NF-κB, d'autant plus que la glutathion peroxydase, qui utilise le GSH comme substrat, intervient également dans l'élimination des peroxydes. Rappelons à cet égard que l'IL-1 est reconnue pour activer la PLA_2, dont l'action sur les phospholipides membranaires contribue à libérer l'acide arachidonique, comme nous l'avons également montré dans ce travail, mais aussi les acides gras peroxydés . L'action de la PLA2 est indispensable pour que la glutathion peroxydase puisse exercer ses effets détoxifiants. Il n'est donc pas exclu que certains acides gras peroxydés puissent servir de messagers actifs au même titre que l'acide arachidonique. Mais nous ne disposons pas de suffisamment de données à l'heure actuelle pour pouvoir proposer un mode d'action hypothétique des radicaux libres ou d'autres molécules oxydantes dans l'activation du facteur NF-κB.

Etant donné que les anti-oxydants PDTC et NAC inhibent la libération d'IL-6, mais pas l'activation de la PLA_2, cela signifie que l'IL-1 déclenche au moins deux voies d'activation différentes chez les fibroblastes de poumon. Ceci concorde avec la majorité des travaux qui ont étudié les voies de transduction du signal activées par l'IL-1.

Au cours d'une troisième série d'expériences, nous avons recherché des conditions d'oxydation qui seraient capables de reproduire les effets observés avec l'IL-1. L'"H_2O_2 s'est avéré capable d'activer la PLA_2, alors que le PDTC et le NAC n'affectaient pas la réponse de la PLA_2 induite par l'IL-1. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de Zor (1991) selon laquelle l'H_2O_2 inhiberait des phosphatases acides, ce qui provoque une

diminution des déphosphorylations et maintient donc une phosphorylation de la PLA_2 qui resterait ainsi active. Le H_2O_2 renforcerait donc l'activité du pool de PLA_2 basale, en l'absence de toute stimulation. Signalons cependant que la phosphorylation de la PLA_2 n'a pas encore été prouvée de manière définitive.

Par contre, les conditions d'oxydation que nous avons utilisées avec l'H_2O_2 et la nitrofurantoïne, n'ont pas permis de mettre en évidence une libération d'IL-6 par les fibroblastes de poumon. Nous pensons que les conditions d'oxydation qui provoqueraient l'activation du NF-κB sont probablement très restreintes. N'oublions pas, en effet, que le taux de dérivés oxygénés est contrôlé de façon précise par les systèmes anti-oxydants cellulaires. Les conditions d'oxydation que nous avons utilisées ont sans doute provoqué une modification trop faible ou trop forte de cette "balance radicalaire". La recherche du (des) oxydant(s) qui pourra (pourront) provoquer la (les) modification(s) de l'équilibre radicalaire intracellulaire constitue une des perspectives de ce travail.

Pour terminer, nous avons utilisé la technique de l'EMSA qui nous a permis d'étudier de manière directe l'activation du NF-κB. Celui-ci est effectivement activé par l'IL-1, activation qu'inhibent le PDTC et le NAC. Ces résultats confirment tous ceux que nous avions obtenus avec l'effet des anti-oxydants sur la secrétion d'IL-6.

Les perspectives ouvertes par ce travail sont très nombreuses, en raison des multiples points d'interrogation qui subsistent quant aux mécanismes d'activation du facteur NF-κB par l'IL-1.

Dans un premier temps certains résultats obtenus mériteraient d'être confirmés. Tout d'abord, l'expérience originale concernant l'effet de la deferoxamine et du trolox C sur la production d'IL-6 devrait être répétée car nous ne l'avons réalisée qu'une seule fois. Ensuite, l'effet de ces deux inhibiteurs mériterait d'être testé directement sur l'activation du NF-κB, par la technique de l'EMSA. Auparavant, nous pourrions optimaliser cette dernière en réalisant des expériences déterminant de façon précise le temps de stimulation et la concentration qui induisent la plus forte réponse.

Dans un second temps, il serait intéressant, par la technique de l'EMSA, de tester d'autres anti-oxydants comme la vitamine E (hydrophobe), la vitamine C, ... afin de collecter des renseignements relatifs aux types de d'oxydation qui provoquent l'activation du NF-κB. A ce sujet, nous pourrions également observer l'effet de l'H_2O_2 directement sur

l'activation du NF-κB, et non plus sur la libération d'IL-6. Plutôt que d'incuber les cellules en présence d'H2O2 instable, nous pourions les soumettre à des systèmes générateurs de molécules oxydantes, tel le système xanthine / xanthine oxydase, générateur de radicaux superoxydes $O_2^{\circ(-)}$ ou le système glucose oxydase, générateur de $O2^{\circ(-)}$ et de H_2O_2. Parallèlement, il serait intéressant d'évaluer la quantité de radicaux libres engendrés par ces systèmes d'oxydation. Les radicaux $O_2^{\circ(-)}$ peuvent être détectés par le test de réduction du cytochrome C. La peroxydase transforme la dichlorofluorescine en dichlorofluorescéine (fluorescente) en présence d'H_2O_2 ; ce test de détection des H_2O_2 s'applique aussi aux hydroperoxydes lipidiques (Catchcart et al, 1984 ; Tiku et al, 1990). Nous pourrions donc optimaliser à souhait les conditions de production d'espèces moléculaires oxydantes (cinétique, quantités, ...) par les systèmes enzymatiques décrits.

Enfin, nous avons obtenu des résultats encourageants en ce qui concerne l'IL-6 produite par les chondrocytes humains stimulés par l'IL-1, cette secrétion d'IL-6 étant inhibée par le PDTC et le NAC. Nous pourrions également étudier l'activation du NF-κB par la technique de l'EMSA chez ce type cellulaire. Ceci semble d'autant plus intéressant que dans certaines pathologies manifestant une inflammation des articulations, on détecte des produits de peroxydation lipidique (Merry et al, 1989) et d'oxydation des protéines (Lunec, 1990). Kaiki et al (1990) utilisent d'ailleurs un modèle d'arthrose dans lequel ils injectent de l'H_2O_2 dans les articulations. De plus, Arend et al (1990) ont montré que l'injection d'IL-1 dans des articulations enflammées provoquait une augmentation de la réaction inflammatoire accompagnée d'une destruction du cartilage. En outre, contrairement aux fibroblastes pulmonaires, les chondrocytes produisent l'IL-6 de manière constitutive. Nous pourrons donc vérifier si cette production constitutive repose sur un pool de facteur NF-κB actif. Dans ce cas, il est probable que les mécanismes d'activation du facteur NF-κB n'implique pas de mécanismes oxydatifs.

BIBLIOGRAPHIE

Pour la Science, 98, 134-146.

BEUSCHER R., GÜRTHER C., RÖLLINGHOFF M. (1990)
IL-I β is secreted by activating murine macrophages as a biologically inactive precursor.
J. Immunol., 144, 2179-2183.

BILLINGHAM M.E.J. (1987)
Cytokines as inflammatory mediators.
Br. Med. Bull, 47, 350-370.

BLANK V., KOURISLSKY P., ISRAEL A. (1992)
NF-kappa B and related proteins : Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats.
TIBS, 17, 135-140

BOMSTYK K., SIMS J.E., STANTON T.H., SLACK J., Mc MAHAN C.T., VALENTINE M.A., DOWER D.K. (1898)
Evidence for differents interleukin-1 receptors in murine B- and T-cell lines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8034-8038.

BOUCHELOUCHE P.N., REIMERT C., BENDTZNE K. (1988)
Effects of natural and recombinant IL 1 α and β on cytosolic free calcium in human and murine fibroblasts.
Leukemia, 2, 691-696.

BUNNING R.A.D., RUSSELL R.G.G., VAN DAMME J. (1990).
Independent induction of IL-6 and PGE_2 by IL1 in human articular chondrocytes.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 166, 1163-1170.

BURCH R., WHITE M., CONNOR J. (1989)
IL-1 stimulates prostaglandins synthesis and cAMP accumulation in Swiss 3T3 fibroblasts : interactions between two second messenger systems.
J. Cell. Physiol., 139, 29-33.

BYCZKOWSKI J., GESSNER T. (1988)
Biological role of superoxide ion-radical

Int. J. Biochem., 20 (6), 569-580

CARAFOLI E. (1987)
Intracellular calcium homeostasis.
Ann. Rev. Biochem.,56, 395-433.

CARTY S.E., BURESH C.M., NORTON J.A. (1991)
Decreased IL-6 secretion by fibroblasts following repeated doses of TNF α or IL1α : post transcriptional gene regulation.
J.Surg. Res., 51, 24-32

CATHCART R., SCHWIERS E., AMES B.N. (1984)
Detection of picomole levels of lipid hydroperoxides using a dichlorofluorescein fluorescent assay
Meth.Enzymol., 105, 352-359

CHEDID M., SHIRAKAWA F., NAYOR P., MIZEL S. (1989)
Signal transduction pathway for IL-1. Involvement of a toxin-sensitive GTP-binding protein in the activation of adenylate cyclase.
J. Immunol., 142, 4301-4306

CHIN J., CAMERON P.M., RUPP E., SCHMIDT J.A. (1987)
Identification of a high affinity receptor for native human IL-1β and IL-1α on normal human lung fibroblasts.
J. Exp. Med., 165, 70-86.

CHIN J., RUPP E., CAMERON P.M., MC NAUL K.L., LOTKE P.A., TOCCI M.J., SCHMIDT J.A. (1988)
Identification of a high affinity receptor for native human IL-1β and IL-1α on cultured human rheumatoid synovial cells.
J. Clin. Invest., 82, 420-426 .

CHIZZONITE R., GUBLER V. (1989)
Two high-affinity IL-1 recepors represent separate gene products.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8029-8033 .

CORKEY B.E., GESCHWIND J.F., DECREY J.T., HALE D.E., DOUGLAS S.D., KILPOTRICK L. (1991)

Calcium response to IL-1 and TNF in cultured human skin fibroblasts.
J. Clin. Invest., 87, 778-786.

DEBY C. (1991)

La biochimie de l'oxygène
La Recherche, 228, 57-64

DINARELLO C.A., BURTON D., IKEJIMA T., ADRIAN P.D., PUREN J., SAVAGE N., ROSOFF P.M. (1990)

Interleukin 1 receptors and biological response.
Yale J. Biol. Med., 63 87-93 .

DINARELLO C.A. (1987)

The biology of IL-1 and comparison to TNF.
Immunol. Lett., 16, 227-232 .

DINARELLO C.A. (1988)

Biology of IL-1.
FASEB J., 2, 108-115.

DINARELLO C.A., SAVAGE N. (1988)

IL-1 and its receptor.
Crit. Rev. Immunol., 9, 1-20.

DINARELLO C.A., BURTON D.C., PUREN A.J., SAVAGE N., ROSOFF P.M. (1989)

The interleukin 1 receptor.
Immunol. Today, 10, 49-51

DODET B. (1989)

Stratégies inflammatoires : l'inflation.
Biofutur, 82, 25-37.

DOWNES C.P., CARTER A.N. (1990)

Inositol lipids and phosphates.

Curr. Opinion Cell Biol., 2, 185-191.

EMERIT J., KLEIN, J. COUTELLIER, CONGY F. (1991)
Radicaux libres et peroxydation lipidique en biologie cellulaire : perspectives physio-pathologiques.
Path. Biol., 39, 316-327

FLORIO V.A., ROSS E.M. (1983)
Regulation of the catalytic component of adenylate cyclase
Mol.Pharmacol., 24, 195-202

FRANCESCI D., GRAHAM D., SARASUA M., ZOLLINGER R. (1990)
Mechanisms of oxygen free radical-induced calcium overload in endothelial cells.
Surgery, 108, 292-297.

FUDMAN E.J., TILL G.O., FOX I.H. (1987)
Deferoxamine induced decreases of lipid peroxides in rheumatoïd arthritis.
J.Rheumatol., 14, 686-691

GALLIS B., CRICKET K., JACKSON J., SLOCK J., SCHEDEY K., SIMS J.E., DAWER S. (1989)
IL-1 induces phophorylation of IL-1 receptor.
J. Immunol., 143, 3235-3240.

GIOVINE F.S., DUFF G.W.
Interleukin 1 : the first interleukin.
Immunol. Today, 11, 13 .

GRYNKIEMICKZ G., POENIE M. TSIEN R. (1985)
A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties.
J. Biol. Chem., 260, 3440-3450

GUALDE N. (1986)
La réaction inflammatoire : une défense aggressive.
La Recherche, 177, 622-635.

GUERNE P., ZURAW B., VAUGHAN J., CARSON D., LOTZ M. (1989)
Synovium as a source of interleukin-6 in vitro.
Am. Soc. Clin. Invest., Inc., 83, 585-592

HANSEN M.B., NIELSEN S.E., BERG K. (1989)
Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill
J.Immunol.Methods , 119, 203-210

HORI, T., YAMANAKA, Y., HAYAKAWA, M., SHIBAMOTO, S., TSUJIMOTO, M., OKU, N. & ITO, F. (1991)
Prostaglandins antagonize fibroblast proliferation stimulated by tumor necrosis factor.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 174, 758-766.

HYSLOP P., HINSHAW D., SCHRAUFSTATTER I., SKLAR L., SPRAGG R. COCHRANE C. (1986)
Intracellular calcium homeostasis during hydrogen peroxyde injury to cultured P388D1 cells.
J. Cell. Phys., 129, 356-366.

KAIKI G., TSUJI H. (1990)
Osteoarthrosis induced by intra-articular H_2O_2 injection and running load.
J. Orth. Res. Soc.,

KELSO A. (1989)
Cytokines : structure, function and synthesis.
Cur. Opinion Immunol., 2, 215-225.

KESTER M., SIMONSON M.S., MENE P., SEDOR J.R. (1989)
Interleukin-1 generates transmembrane signals from phopholipids through novel pathway in cultured rat mesangial cells.
J. Clin. Invest., 83, 718-723.

KLEIN J. (1990)
Immunology (Cambridge : Blackwell Scientific Publications)

KNOTT I. (1992)

Comparaison des cellules synoviales et des chondrocytes humains en culture : activation de la cascade de l'acide arachidonique par l'interleukine 1.
(Thèse de doctorat) FUNDP, Namur

LANDEGREN U. (1984)

Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to the detection of lymphokines and cell surface antigens.
J.Immunol.Meth., 67, 379-388.

LARRICK J.W., KUNKEL S.L. (1988)

The role of TNF and IL 1 in the immunoinflammatory response.
Pharmaceut. Res., 5, 129-139.

LUNEC J. (1990)

Free Radicals : their involvement in disease processes
Ann. Clin. Biochem., 27, 173-182.

MAUVIEL A., TENIME N., CHARRON D., LOYAU G., PUJOL J.P. (1988)

IL-1 α and β induce IL-1 β gene expression in human fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 156, 1209-1214.

MEIER B., RADEKE H.H., SELLE S., YOUNES M., SIES H., RESCH K., HABERMEHL G.G. (1989)

Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor-α.
Biochem.J., 263, 539-545.

MERRY, WINYARD, MORRIS, GROOTVELD, BLAKE (1989)

Oxygen free radicals, inflammation and synovitis : the current status.
Ann.Rheum.Dis., 48, 864-870

MICHIELS C., REMACLE J. (1988)

Quantitative study of natural antioxidant systems for cellular nitrofurantoïn toxicity.
Biochim.Biophys.Acta, 967, 341-347

MIZEL S. B. (1989)
The interleukins.
FASEB., 3, 2379-2388

MOSMANN T. (1983)
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays.
J.Immunol.Meth., 65, 55-63.

MUNOZ E., ZUBIAGA A. SIMS J. HUBER B., (1991)
IL-1 signal transduction.
Immunol. Today, 12, 278-288.

MUNOZ E., ZUBIAGA A., SIMS J., HUBER B. (1991)
IL-1 signal transduction pathway. Two functional IL-1 receptors are expressed in T cells.
Journal Immunol., 146, 136-149.

NIETFELD J., WILBRINK B., HELLE M., VAN ROY A., DENOTTER W., SWAAK A., HUBER-BRUNING O. (1990)
IL-1 induced IL-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by IL-1 in human articular cartilage.
Arthr. ans Rheum., 33, .56-62

O'NEILL L.A. (1992)
How does IL-1 activate cells ?
Kidney Int., 41, 546-549

PALMBERG, L., LINDEGREN, J.A., THYBERG, J. & CLAESSON, H.E. (1991)
On the mecanism of induction of DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells by leukotrienes. Possible role of prostaglandin endoperoxyde synthetase products and platelet-derived growth factor.
J. Cell. Sci., 98, 141-149.

PARKS D., BRYAN V., OI V., HERZENBERG L.

Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1962-1966

PELECH S., VANGE D. (1989)
Signal transduction via phosphatidyl choline.
TIBS, 14, 28-30.

PLATANIAS L.C., VOGELZANG N.J. (1990)
IL-1 : biology, pathophysiology and clinical prospects.
Am. J. Med., 89, 621-629.

RADEKE H., MEIER B. , TOPLEY N., FLOGE J., HABERMEHL G., RESCH K. (1990)
IL-1α and TNFα induce oxygen radical production in mesangial cells.
Kidney Int., 37, 767-775

RASMUSSEN H. (1989)
Les ions calcium, messagers intracellulaires.
Pour la Science, 146, 86-92.

REMACLE J., RAES M., RAO G.
Oxygen free radicals as modulators of cell function
(soumis pour publication).

RINK T.J., MERRITT J.E. (1990)
Calcium signalling.
Cur. Opinion Cell Biol., 2, 198-205.

ROBERFROID M., VIEGHE H., REMACLE J. (1987)
Free radicals in drug research.
Adv. Drug Res., 16, 1-84

ROBERFROID M. (1987)
Free radicals and oxidative phenomena in biological systems.
Belg. J. Food Chem Biotechnol. , 6, 163-175

ROEDERER M., STAAL F.J.T., RAJU P.A., ELA S.W., HERZENBERG L.A., HERZENBERG L.A. (1990)

Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87, 4884-4888.

ROSOFF P., SAVAGE N., DINARELLO C. (1988)

IL-1 stimulates DAG production in T lymphocytes by a novel mechanism.

Cell, 54, 73-81.

ROSOFF P.M. (1989)

Characterisation of the IL-1 stimulated PLC activity in human T lymphocytes.

Lymphokine Res., 8, 407-413.

SAKLATVALA J.,BIRD T., KAUR P., O'NEILL L. (1990)

IL-1 signal transduction : evidence of activation of G protein and protein kinase.

Dans : Cytokine and lipocortines in inflammation and differentation, (Eds Melli M. and Parente, L.), Wiley-Liss&Sons, INC, New-york, 285-295.

SALTMAN P. (1989)

Oxidative stress : a radical view.

Semi. Hematol., 26 (4), 249-256

SCHALWIJK C., PFEILSCHIFTER J., MÄRKI F., Van den BOSCH (1991)

IL-1β, TNF and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II PLA_2.

Bioch. Bioch. Res. Comm., 174, 268-275.

SCHRECK R., RIEBER P., BAEUERLE P.A. (1991)

Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1.

EMBO.J., 10 , 2247-2258

SCHINDLER R., GHEZZI P., DINARELLO C.A. (1990)

IL-1 induces IL-1.

J. Immunol., 144, 2216-2222.

SCHINMEI M., MASUDA K., KIKUCHI T. (1991)
Production of cytokines by chondrocytes and its role in proteoglycan degradation
J. Rheumatol., 18, 89-91

SEHGAL P.B. (1990)
IL6 : molecular pathophysiology
J.Invest.Dermatol., 94 (6), 25-65

SIRONI M., BREVIARO F., PROSERPIO P., BIANDI A., VECCHI A., Van DAMME J., DYANA E., MANTORANI A. (1989)
IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells.
J. Immunol., 142, 549-553.

SPORN P.H.S., MURPHY T.M., PETRES-GOLDEN M. (1990)
Glucocorticoids fail to inhibit arachidonic acid metabolism stimulated by hydrogen peroxide in the alveolar macrophage
J.Leuk.Biol., 48, 81-88

MIZEL S.B. (1989)
The interleukins.
The FASEB., 3, 2379-2388.

TANSWELL A.K., OLSON D.M., FREEMAN B.A. (1990)
Response of fetal rat lung fibroblasts to elevated 0_2 concentrations after liposome-mediated augmentation fo antioxydant enzymes.
Biochem. Biophys. Acta, 1044, 269-274.

THIELE, LIPSKY (1989)
Endothelial cells as a source of cytokines
Immunol. Today, 10 (11)

TIKU M.L., LIESCH J.B., ROBERTSON F.M. (1990)
Production of hydrogen peroxide by the rabbit articular chondrocytes
J.Immunol., 145, 690-696

URBAN M.B., BAEUERLE P.A. (1990)

The 65kd subunit of NF kappa B is a receptor for IκB and a modulator of DNA-binding specificity
Genes, 4, 1975-1984

VAN DAMME J., OPDENAKKER G. (1990)
Interaction of interferons with skin reactive cytokines : from IL-1 to IL-8.
J. Invest. Dermatol., 95, 905-935.

ZHANG Y., LIN J.X., KEUNG YIP Y., VILCEK J. (1988)
Enhancement of cAMP levels and PK? activity by TNF and IL-1 in human fibroblasts : Role in the induction of IL-I.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6802-6805.

ZOR U. (1991)
Regulation of PLA_2 activity by phosphorylation/dephosphorylation : a novel mechanism of H_2O_2 and glucocorticoïd action.
Second international Conference, Klinikum Steglitz, Berlin Septembre 91, Abstract Book : Eïcosanoïds and other bioactive lipids in cancer, inflammation and radiation injury, 194..