

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude comparative des effets de l'AMPC sur différents aspects de l'activation cellulaire induite par le PDGF: prolifération cellulaire, MAP kinase et facteur transcriptionnel AP-1

Fernemont, Isabelle

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

**ETUDE COMPARATIVE DES EFFETS DE L'AMPc SUR DIFFERENTS
ASPECTS DE L'ACTIVATION CELLULAIRE INDUITE PAR LE PDGF :
PROLIFERATION CELLULAIRE, MAP KINASE ET FACTEUR
TRANSCRIPTIONNEL AP-1**

Fernémont Isabelle

Résumé

Le PDGF est un facteur de croissance qui joue un rôle primordial dans la prolifération des fibroblastes de poumon humain. Une prolifération exessive des fibroblastes peut aboutir *in vivo* à des pathologies telles que la fibrose idiopathique interstitielle au niveau du poumon. Au laboratoire, nous avons montré que la PGE₂, dont les effets sont médiés par l'AMPc, inhibe l'effet pro-prolifératif induit par le PDGF. Nous nous sommes intéressés, dans ce mémoire, aux mécanismes moléculaires de cette régulation négative. Nous avons testé le dibutyryl-AMPc, un analogue de l'AMPc sur la phosphorylation des MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) ainsi que sur l'activation d'un facteur transcriptionnel situé en aval de la voie de transduction de nombreux facteurs de croissance, le facteur AP-1. Nous avons mis en évidence que dans la souche des fibroblastes de poumon humain étudiée, l'effet inhibiteur induit par l'AMPc sur la prolifération de ces cellules s'exerce probablement à d'autres niveaux qu'au niveau des MAP Kinases ou de ses activateurs dans la voie de transduction du PDGF. L'AMPc semble plutôt agir soit en aval de cette kinase au niveau des facteurs transcriptionnels dont AP-1 soit au niveau d'une autre voie moléculaire d'activation du PDGF.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : M. Raes

Co-promoteur : Prof. J. Remacle

A l'issue de ce mémoire, je tiens à remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidée, d'une manière ou d'une autre, à mener à bien ce travail.

Je commencerai tout d'abord par le Professeur J. Remacle, en le remerciant de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je tiens à remercier tout spécialement Martine Raes pour sa grande compétence scientifique, sa compréhension et sa grande disponibilité. Merci de m'avoir guidée tout au long de cette année.

Je remercie Maggi avec qui j'ai partagé des moments bien sympathiques mais également de déception, pour m'avoir suivie au cours de ce travail.

Je voudrais remercier Edouard pour son inlassable dévouement et sa sympathie. Merci à Andrée de m'avoir initiée aux cultures cellulaires.

Je ne risque pas d'oublier François, Noëlle, Martine pour ces dernières semaines de dur labeur, Mumu, Fred, Dédé, Marie, Nathalie, Anne, François, Isa,... et tous les autres pour la touche finale.

Marc, merci de m'avoir patiemment initiée, réinitiée à l'ABC de l'informatique.

Pour terminer, je tiens à remercier toute ma famille au sens large pour le soutien qu'elle a eu à mon égard, en particulier ces derniers jours. Merci beaucoup.

Un clin d'oeil à Cath, avec qui j'ai partagé beaucoup de choses durant cette année.

3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	20
3.1. LE FACTEUR AP-1	21
3.1.1. c-jun	21
3.1.2. c-fos	24
3.1.3. Le complexe AP-1	25
3.2. NF-KB	26
4. EFFET DE L'AMPC SUR LA PROLIFERATION INDUITE PAR LE PDGF DANS UN MODELE DE FIBROBLASTES HUMAINS EN CULTURE.....	28
5. OBJECTIFS	29

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES31

1. CULTURES DE FIBROBLASTES DE POUMON.....	31
1.1. MATERIEL	31
1.2. METHODE	32
1.2.1. Repiquage des fibroblastes pulmonaires	32
1.2.2. Congelation et decongelation des cellules.....	32
1.2.2.1. Congélation	32
1.2.2.2. Décongélation	33
2. TEST DE PROLIFERATION CELLULAIRE	33
2.1.1. MATERIEL	33
2.1.2. METHODE	34
3. EMSA	35
3.1. CULTURE ET STIMULATION DES CELLULES	36
3.1.1. Matériel	36
3.1.2. Methode	37
3.2. EXTRACTION DES PROTEINES.....	37
3.2.1. Matériel	37
3.2.2. Methode	39

3.3. MARQUAGE DE LA SONDE.....	40
3.3.1. Matériel	40
3.3.2. Methode	41
3.4. REACTION DE LIAISON ENTRE LA SONDE ET LES PROTEINES	41
3.4.1. Matériel	41
3.4.2. Methode	42
3.5. ELECTROPHORESE ET REVELATION DES FILMS	43
3.5.1. Matériel	43
3.5.2. Methode	44
3.6. QUANTIFICATION.....	44
4. WESTERN- BLOT	45
4.1. PREPARATION DE LA FRACTION CYTOSOLIQUE	46
4.1.1. Matériel	46
4.1.2. Methode	46
4.2. ELECTROPHORESE	47
4.2.1. Matériel	47
4.2.2. Methode	49
4.3. TRANSFERT	50
4.3.1. Matériel	50
4.3.2. Methode	51
4.4. TRAITEMENT ET REVELATION	52
4.4.1. Matériel	52
4.4.2. Methode	53
4.5. REVELATION DU FILM.....	54
4.5.1. Matériel	54
4.4.2. Methode	54
4.5. QUANTIFICATION.....	55
5. IMMUNOCYTOCHIMIE : IMMUNOFLUORESCENCE .	55
5.1 CULTURE ET STIMULATION DES CELLULES.....	55
5.2. IMMUNOFLUORESCENCE.....	56
5.2.1. Matériel	56
5.2.2. Methode	57

III. RÉSULTATS	58
1. MODULATION PAR L'AMPC DE LA PROLIFERATION INDUITE PAR LE PDGF	58
2. MODULATION PAR L'AMPC DE L'ACTIVATION DES MAP KINASES INDUITE PAR LE PDGF	60
2.1. EFFET DU PDGF SUR LA PHOSPHORYLATION DES P42MAPK	60
2.1.1. Mise au point du système de détection des p42mapk	60
2.1.1.1. Résultats obtenus à partir des fractions cytosoliques	61
2.1.1.2. Comparaison des fractions cytosoliques et des lysats cellulaires	62
2.1.1.3. Effet du PDGF en fonction du temps	64
2.1.1.4. Effet du PDGF en fonction de sa concentration	65
2.2. MODULATION PAR L'AMPC DE LA PHOSPHORYLATION DES P42MAPK INDUITE PAR LE PDGF	66
3. MODULATION PAR L'AMPC DE L'ACTIVATION DES MAP KINASES INDUITE PAR LE PMA	69
4. EFFET DU PDGF SUR LA TRANSLOCATION DES MAP KINASES PHOSPHORYLÉES VERS LE NOYAU	69
5. EFFET DU PDGF SUR L'ACTIVATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AP-1 ET NF-KB. MODULATION PAR L'AMPC	72
5.1. EFFET DU PDGF SUR AP-1. MODULATION PAR L'AMPC	72
5.2. EFFET DU PDGF SUR L'ACTIVATION DU "NUCLEAR FACTOR-KB" (NF-KB) ET MODULATION PAR L'AMPC	74

IV. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....78

V. BIBLIOGRAPHIE.....83

Abréviations utilisées

AA	: Acide arachidonique
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	: Activator-Protein 1
ATP	: Adénosine triphosphate
CKII	: Caséine kinase II
cpm	: Coups par minute
CREB	: cAMP response element binding protein
CSF-1	: Colony stimulating factor
D.O.	: Densité optique
DAG	: Diacylglycérol
dbAMPc	: Dibutyryl-AMPc
DBD	: DNA-binding domain
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DTT	: Dithiotréitol
EDTA	: Ethylènediamine tétraacétate de sodium
EGF	: Epidermal-growth factor
EGTA	: Acide éthylèneglycoltétraacétate
EMSA	: Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	: Extracellular regulated kinase
FGF	: Fibroblast growth factor
GAP	: GTPase activating protein
GDP	: Guanosine diphosphate
GEF	: GDP-GTP exchange factors
Grb2	: Growth factor receptor binding protein 2
GRF	: Guanine nucleotides releasing factor
GSK3	: Glycogène synthase kinase 3
GTP	: Guanosine triphosphate
HLA	: Hydrolysate de lactalbumine
I.O.D	: Intégration de la densité optique
IFN	: Interféron γ
IL-1 β	: Interleukine 1 β
IP3	: Inositol triphosphate
JNK	: c-jun NH2-terminal kinases
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	: MAPK kinase
MAPKKK	: MAPKK kinase
MEC	: Matrice extracellulaire
MEK	: MAPK/ERK kinase
MEKK	: MEK kinase
MEM	: Milieu de culture composé du milieu minimum essentiel de Eagle
NF1	: Neurofibromine
NF κ B	: Nuclear factor κ B
NGF	: Nerve growth factor
NGS	: Normal goat serum
OPT	: Milieu de culture OPTI-MEM
PAGE	: Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PBS	: Phosphate buffer saline
PDGF	: Platelet-derived growth factor
PGE ₂	: Prostaglandine E ₂
PI3K	: Phosphatidyl inositol 3' kinase
PIP ₂	: Phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate

PIP ₃	: Phosphoinositol-3-phosphate
PKC	: Protéine kinase C
PLA ₂	: Phospholipase A ₂
PLC	: Phospholipase C
PMA	: Phorbol 12-myristate 13-acétate
PTK	: Protéine tyrosine kinase
PTP	: Protéine tyrosine phosphatase
RBD	: Ras binding domain
rpm	: Rotations par minute
RTK	: Récepteur à activité tyrosine kinase
SAB	: Albumine de sérum bovin
SB	: Sérum bovin
SDS	: Dodécyl sulfate de sodium
SH2	: Src homology 2
SH3	: Src homology 3
SRE	: Serum response element
SRF	: Serum response factor
SS	: Simian sarcoma virus
TAD	: Trans activating domain
TCA	: Acide trichloroacétique
TEMED	: N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TGFβ	: Transforming growth factor β
TPA	: 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate
TRE	: TPA response element
Tris	: Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
ZIP	: Leucine zipper

Abréviations utilisées

AA	: Acide arachidonique
AMPC	: Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	: Activator-Protein 1
ATP	: Adénosine triphosphate
CKII	: Caséine kinase II
cpm	: Coups par minute
CREB	: cAMP response element binding protein
CSF-1	: Colony stimulating factor
D.O.	: Densité optique
DAG	: Diacylglycérol
dbAMPc	: Dibutyryl-AMPc
DBD	: DNA-binding domain
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DTT	: Dithiotréitol
EDTA	: Ethylènediamine tétraacétate de sodium
EGF	: Epidermal-growth factor
EGTA	: Acide éthylèneglycoltétraacétate
EMSA	: Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	: Extracellular regulated kinase
FGF	: Fibroblast growth factor
GAP	: GTPase activating protein
GDP	: Guanosine diphosphate
GEF	: GDP-GTP exchange factors
Grb2	: Growth factor receptor binding protein 2
GRF	: Guanine nucleotides releasing factor
GSK3	: Glycogène synthase kinase 3
GTP	: Guanosine triphosphate
HLA	: Hydrolysate de lactalbumine
I.O.D	: Intégration de la densité optique
IFN	: Interféron g
IL-1 β	: Interleukine 1 β
IP3	: Inositol triphosphate
JNK	: c-jun NH2-terminal kinases
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	: MAPK kinase
MAPKKK	: MAPKK kinase
MEC	: Matrice extracellulaire
MEK	: MAPK/ERK kinase
MEKK	: MEK kinase
MEM	: Milieu de culture composé du milieu minimum essentiel de Eagle
NF1	: Neurofibromine
NF κ B	: Nuclear factor κ B
NGF	: Nerve growth factor
NGS	: Normal goat serum
OPT	: Milieu de culture OPTI-MEM
PAGE	: Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PBS	: Phosphate buffer saline
PDGF	: Platelet-derived growth factor
PGE ₂	: Prostaglandine E ₂
PI3K	: Phosphatidyl inositol 3' kinase
PIP ₂	: Phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate

PIP ₃	: Phosphoinositol-3-phosphate
PKC	: Protéine kinase C
PLA ₂	: Phospholipase A ₂
PLC	: Phospholipase C
PMA	: Phorbol 12-myristate 13-acétate
PTK	: Protéine tyrosine kinase
PTP	: Protéine tyrosine phosphatase
RBD	: Ras binding domain
rpm	: Rotations par minute
RTK	: Récepteur à activité tyrosine kinase
SAB	: Albumine de sérum bovin
SB	: Sérum bovin
SDS	: Dodécyl sulfate de sodium
SH2	: Src homology 2
SH3	: Src homology 3
SRE	: Serum response element
SRF	: Serum response factor
SS	: Simian sarcoma virus
TAD	: Trans activating domain
TCA	: Acide trichloroacétique
TEMED	: N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TGF β	: Transforming growth factor β
TPA	: 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate
TRE	: TPA response element
Tris	: Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
ZIP	: Leucine zipper

I. Introduction

Table 1. Cells Capable of Secreting PDGF-like Molecules

Cell Type	Agent Inducing PDGF Secretion	Other Growth Factors Produced	Anatomical Considerations	Possible Biological Roles
Circulating cells				
Platelet	Thrombin, collagen, ADP, adherence	+(FGF, EGF, TGF- β , ?)	9-11 days in the circulation	Wound healing, atherosclerosis
Monocyte/macrophage	Endotoxin, concanavalin A, TPA, foreign agents, adherence	+(FGF, IL-1, ?)	Can reside in tissue for months	Wound healing; atherosclerosis; fibrotic disorders of lung, liver, and kidney; inflammation; arthritis
Resident cells				
Megakaryocyte	Thrombin, collagen, ADP, adherence	+(?)	Bone marrow	Abundant in some forms of myelofibrosis
Endothelium	Culture, thrombin, factor Xa, injury (endotoxin and phorbols)	+(IL-1,?)	Permeability barrier between circulating blood cells and underlying cells	Wound healing, atherosclerosis
Smooth muscle from:				
rat pup	"Development"	+(IGF-1,?)	Rat aorta	Development, growth
adult rat	Balloon catheter injury, culture	+(?)	Rat carotid (neointima), rat aortic media	Atherosclerosis, wound healing
First trimester human placental extracts	"Development"	+(?)	Cytotrophoblasts of the placental cytotrophoblastic shell	Development, growth
Transformed cells				
Cells transformed by SSV	SSV	+(?)	Multiple subcutaneous fibrosarcomas, astrocytomas (intracranial)	Neoplasia
Activation of c-sis during transformation	Wide variety of transforming agents			
PDGF-responsive cells		+(TGF- α ,?)	Principally blastomas and sarcomas	Autocrine stimulation in atherosclerosis, neoplasia
PDGF-nonresponsive cells		+(TGF- α ,?)	Erythroleukemic cells, bladder carcinoma, hepatoma	Paracrine stimulation in myelofibrosis, desmoplasia

Abbreviations: PDGF, platelet-derived growth factor; FGF, fibroblast growth factor; EGF, epidermal growth factor; TGF, transforming growth factor; IL-1, interleukin-1; IGF, insulinlike growth factor; SSV, simian sarcoma virus; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

Table I.1. : Cellules capables de sécréter le PDGF (d'après Ross *et al*, 1986).

1. LE PDGF

Découvert au début des années 70, le "platelet-derived growth factor" (PDGF) est un facteur de croissance d'origine plaquettaire dont l'intérêt n'a cessé de croître.

Pendant plusieurs années, on a cru que son origine cellulaire était limitée aux plaquettes. Balk *et al.*, (1971) avaient en effet constaté que le sérum obtenu après coagulation du sang stimulait la prolifération des fibroblastes, alors qu'un plasma pauvre en plaquettes était dépourvu d'activité mitogénique (Bryckaert *et al.*, 1991). Les mêmes observations ont été réalisées par la suite sur des cellules musculaires lisses par Ross *et al.* (1974); ils furent d'ailleurs les premiers à avoir appelé ce facteur "platelet-derived growth factor".

Mais il est rapidement apparu que plusieurs autres types de cellules, normales ou transformées, peuvent également synthétiser et sécréter le PDGF : les macrophages activés, les cellules endothéliales activées par des facteurs comme la thrombine ou le facteur X, les cellules musculaires lisses et plusieurs lignées de cellules tumorales (par exemple, les cellules transformées par le virus du sarcome simien) (Table I.1.).

Comme le montre également la Table I.1., on constate que le PDGF a depuis longtemps été impliqué tant dans les processus physiologiques normaux (croissance, développement, réparation tissulaire,...) que dans les processus pathologiques (athérosclérose, fibrose, arthrite, néoplasie, ...) (Figure I.1.).

1.1. CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES

Biologiquement actif sous la forme d'un dimère d'environ 30 kDa, le PDGF est composé de 2 chaînes peptidiques, A et B dont les poids moléculaires (PM) se situent respectivement autour de 16000 et 14000 daltons. Ces deux chaînes se dimérisent par l'intermédiaire de ponts disulfures pour donner une des trois isoformes AA, AB ou BB du PDGF. La présence de 8 résidus cystéine par monomère confère à la molécule une grande stabilité. De plus, cette dimérisation semble nécessaire pour assurer l'activité du PDGF (Pierce *et al.*, 1991).

La distribution des différents dimères du PDGF varie selon le type cellulaire et l'état physiologique des cellules : dans les plaquettes humaines, c'est l'hétérodimère AB qui est prédominant à 70 %, tandis que l'isoforme AA a été isolé à partir de cellules d'ostéosarcome.

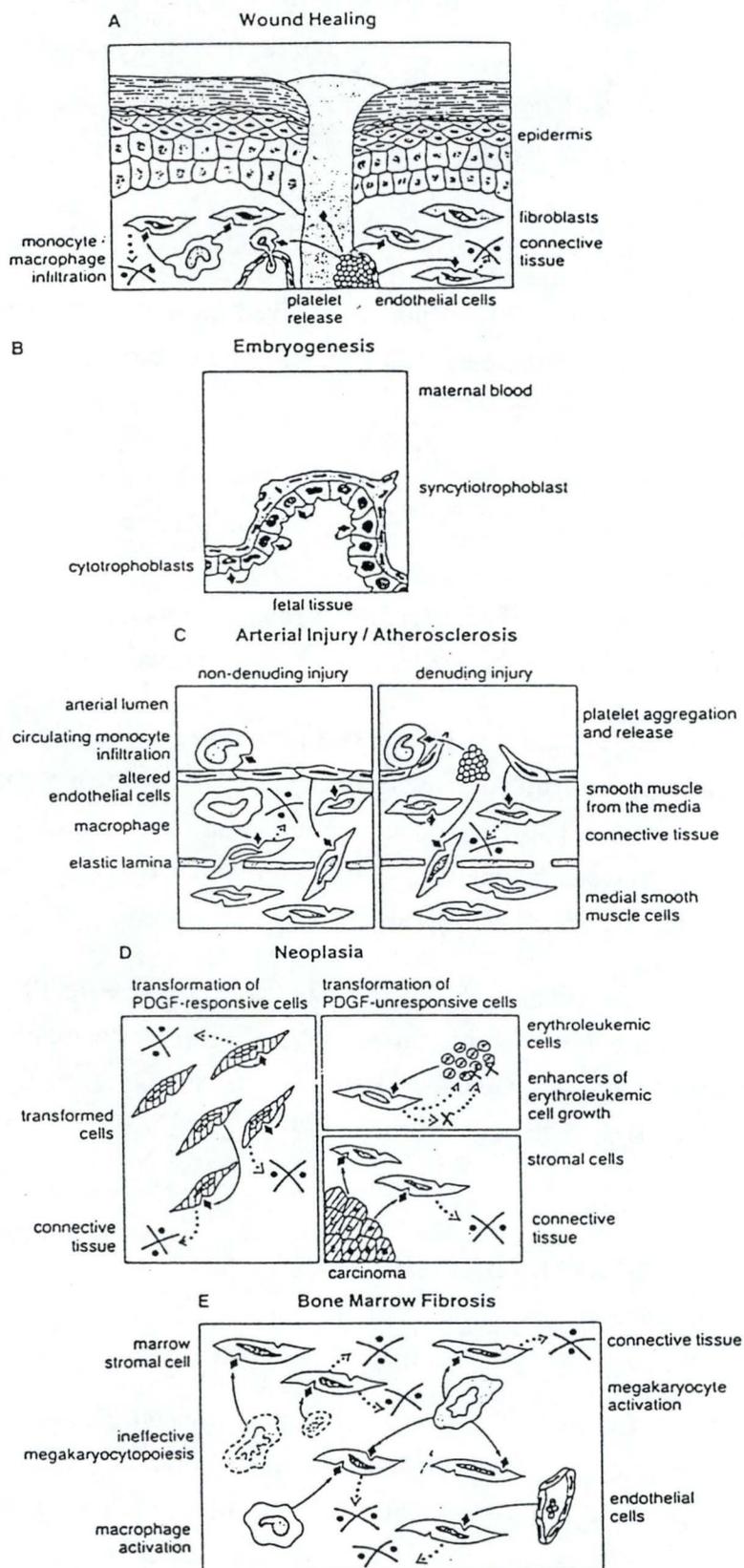


Figure I.1. : Représentation schématique des processus biologiques normaux et pathologiques impliquant le PDGF (d'après Ross *et al.*, 1986).

Les deux chaînes peptidiques sont codées par deux gènes situés sur des chromosomes différents : le chromosome 7 pour la chaîne A et le chromosome 22 pour la chaîne B. La séquence en acides aminés de la chaîne B est homologue à celle du produit du proto-oncogène *c-sis*, lui-même homologue cellulaire de l'oncogène viral du sarcome simien (SSV).

Le gène de la chaîne A code pour 3 ARN messagers (dont les tailles sont de 1,9; 2,3 et 2,8 kb) tandis que celui de la chaîne B code pour un seul ARN de 3,5 kb. La régulation de ces deux gènes est indépendante et est réalisée aussi bien au niveau transcriptionnel (par splicing alternatif) qu'au niveau post-traductionnel (Marinelli *et al.*, 1991) par clivage de leur séquence signal lors de la phase sécrétoire. La signification physiologique des variants obtenus par splicing alternatif n'est pas encore totalement comprise. Toutefois, pour quelques uns d'entre eux, des hypothèses ont été émises. Le gène codant pour la chaîne A du PDGF peut générer par splicing alternatif au niveau de l'exon 6 deux protéines A fonctionnelles (Figure I.2.). Les chaînes longues possèdent du côté carboxy-terminal une séquence supplémentaire de 18 acides aminés, essentiellement des acides aminés basiques. Celle-ci constitue un site potentiel de liaison pour l'héparine. Elle permet à la forme PDGF AA sécrétée de se lier à divers constituants de la matrice extracellulaire tels que les glycosaminoglycans. Cette liaison aurait pour but de maintenir le PDGF disponible pour la cellule, prolongeant ainsi l'effet mitogène qu'il induit (pour une revue, voir Khachigian et Chesterman, 1992).

Outre l'isoforme sécrétée de 30 kDa, il existe pour le PDGF BB une forme intracellulaire de 25 kDa. Cette forme de 24 kDa du PDGF BB comprend dans sa partie carboxy-terminale une autre séquence signal qui la retient au niveau soit du réticulum endoplasmique, soit un niveau du Golgi de la cellule.

1.2. LES RECEPTEURS DU PDGF

Les activités biologiques des trois isoformes du PDGF dépendent de leur liaison à un récepteur membranaire exprimé par la cellule-cible. On distingue à l'heure actuelle deux types de récepteurs : le récepteur α et le récepteur β . Ces deux types de récepteurs sont codés par des gènes différents : le récepteur α est codé par un gène du chromosome 4 alors que le récepteur β est codé par un gène situé sur le chromosome 5. Des modifications post-traductionnelles telles que l'ajout d'oligosaccharides, produisent des récepteurs matures associés à la membrane et de poids moléculaire semblable (de 170 à 180 kDa) (Olashaw *et al.*, 1991). Bien qu'il n'y ait que 30 % d'homologie au niveau de leur séquence en acides aminés, les deux récepteurs α et β sont structurellement très semblables (Olashaw *et al.*,

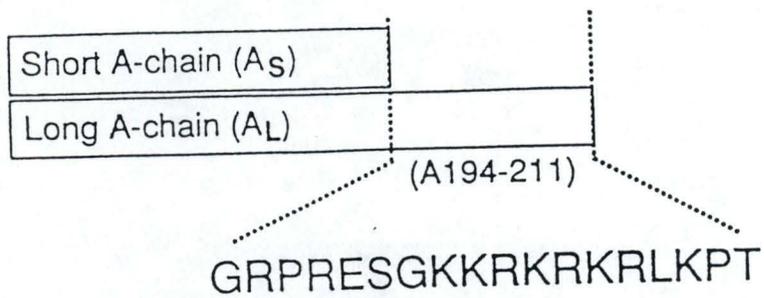


Figure I.2. : Représentation schématique des 2 isoformes de la chaîne A obtenus par splicing alternatif au niveau de l'exon 6 (d'après Khachigian et Chesterman, 1992).

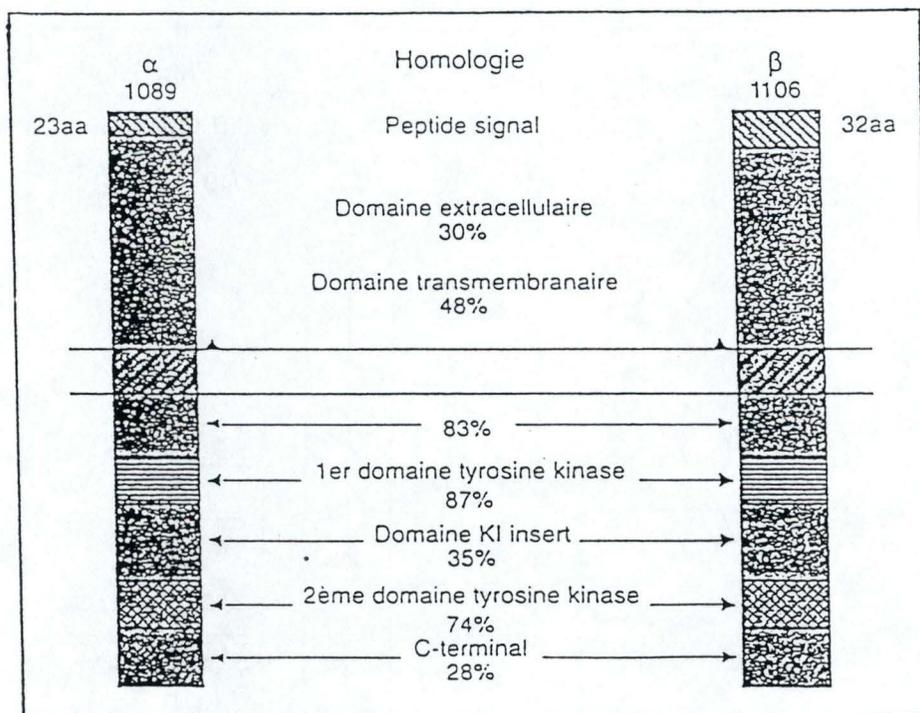


Figure I.3. : Comparaison des deux-sous-unités α et β du récepteur au PDGF (d'après Bryckaert *et al.*, 1991).

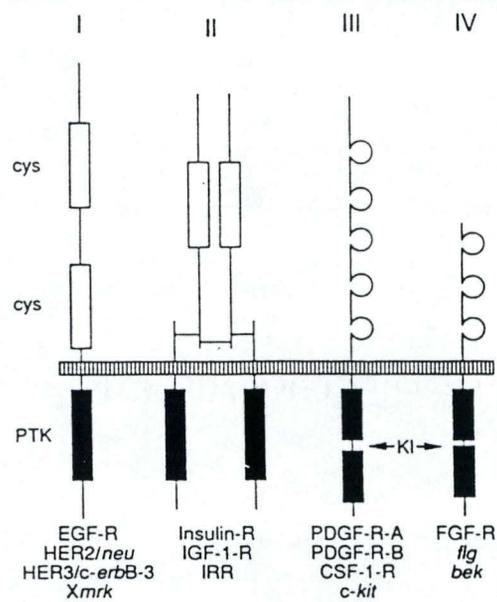


Figure I.4. : Représentation des différentes sous-classes de récepteurs à activité tyrosine kinase (PTK = Protéine Tyrosine Kinase) (d'après Maruta et Burgess, 1994).

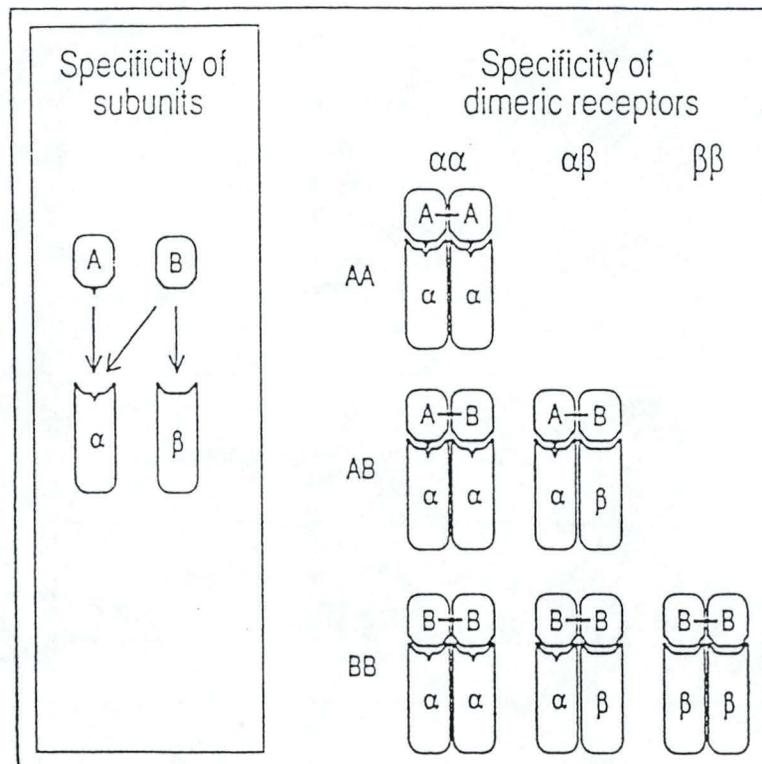


Figure I.5. : Schéma représentant les différents types de récepteurs au PDGF et leur affinité spécifique pour les différentes isoformes du PDGF (d'après Bowen-Pope *et al.*, 1991).

1991). Tous deux comportent trois domaines : un domaine extracellulaire, domaine de liaison du PDGF, comportant 8 sites de N-glycosylation pour le récepteur α et 11 sites pour le récepteur β , un domaine intra-membranaire et un domaine intracellulaire, ce dernier étant pourvu d'une activité tyrosine kinase permettant une auto-phosphorylation du récepteur (Benito, 1993) (Figure I.3.). Parmi les récepteurs de type tyrosine kinase, le récepteur au PDGF ainsi que le récepteur du "colony stimulating factor" (CSF-1), diffèrent des récepteurs à insuline et à l'EGF (ou "epidermal growth factor") par la présence au sein du domaine tyrosine kinase d'une région inter-kinasique (Ullrich et Schlessinger, 1990) (Figure I.4.). Des différences existent également entre les récepteurs α et β au niveau de leur affinité pour les différentes isoformes du PDGF : le récepteur α lie les 3 isoformes du PDGF avec une haute affinité tandis que le récepteur β lie uniquement le PDGF BB avec une haute affinité et le PDGF AB avec une faible affinité (Eriksson *et al.*, 1992). Des travaux récents ont montré la nécessité pour ces récepteurs d'être sous une forme dimérique pour transduire le signal. Il y a donc trois types de récepteurs dimériques : un hétérodimère $\alpha\beta$ et deux homodimères $\alpha\alpha$ et $\beta\beta$. Ceux-ci montrant des affinités différentes dans la liaison du PDGF, on obtient selon ce modèle, toute une série d'interactions possibles entre les différents récepteurs dimériques et les 3 isoformes du PDGF (Figure I.5.).

La distribution de ces récepteurs varie selon le type cellulaire. Les cellules d'origine fibroblastique dont les cellules musculaires lisses et les fibroblastes humains expriment les deux récepteurs α et β (Kazlauskas *et al.*, 1988). Par contre, plusieurs types cellulaires dont les cellules précurseurs des oligodendrocytes, les cellules mésothéliales et les cellules endothéliales des capillaires hépatiques ne présentent que des récepteurs α . Les neurones, les cellules méningeales, les cellules de Schwann et les cellules endothéliales des capillaires cérébraux ne portent que des récepteurs β (Westermarck et Heldin, 1993).

1.3. FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DU PDGF

1.3.1. ACTIONS DU PDGF DANS LES PROCESSUS DE REPARATION TISSULAIRE

Nous passerons rapidement en revue les propriétés majeures attribuées au PDGF dans les processus de réparation tissulaire.

1.3.1.1. Effet mitogène

In vitro, le PDGF est capable d'initier la transition des cellules quiescentes ou non-répliquatives (en phase G₀) vers la phase G₁ du cycle cellulaire. Il fait partie de la classe des facteurs de compétence qui sont définis par leur capacité à déclencher les premiers événements menant à la synthèse d'ADN et à la mitose. Ces facteurs de compétence sont assistés par des facteurs de progression tels l'IL-1, l'EGF.... Ceux-ci détermineraient l'entrée de la cellule dans la phase de synthèse de l'ADN (phase S), première étape de la division cellulaire (Kelley, 1990).

Au cours des années, le PDGF s'est révélé être *in vitro* un puissant agent mitogène, principalement pour les cellules formant le tissu conjonctif : les fibroblastes et les cellules musculaires lisses des artères, et au niveau du système nerveux, les cellules gliales. *In vivo*, le PDGF agissant localement et à des concentrations très faibles, il n'est normalement pas détecté dans les plasmas collectés et est rapidement évacué du flux sanguin (Ross *et al.*, 1986).

Outre son action mitogène, le PDGF est également un puissant chémo-attractant.

1.3.1.2. Effet chemotactique

Le PDGF représente un chémo-attractant important pour les fibroblastes, pour les cellules musculaires lisses ainsi que pour les monocytes et les neutrophiles bien que sur ces dernières cellules le PDGF n'a pas d'effet mitogène (Antoniades, 1991). Cette capacité à stimuler la migration des cellules est essentielle lors des processus de réparation tissulaire comme nous le verrons au point 1.3.1.4. En effet, elle permet au PDGF d'attirer entre autre les fibroblastes au niveau du site lésé avant de stimuler leur prolifération.

Des effets chémotactiques maximaux s'observent pour des concentrations en PDGF comparables à celles utilisées pour induire un effet mitogénique maximal (Ross *et al.*, 1986).

Signalons que des différences entre les diverses isoformes du PDGF dans leur capacité à stimuler la croissance cellulaire et la chémotaxie ont été observées (Van Zoelen *et al.*, 1993, Kazlauskas *et al.*, 1988). Par exemple, contrairement au PDGF AB, le PDGF AA n'a que peu d'action mitogénique et aucun effet chémotactique sur les fibroblastes humains (Nister *et al.*, 1988).

1.3.1.3. Modifications de la matrice extracellulaire

Les cellules, en réponse à certains facteurs de croissance, sécrètent divers composants de la matrice extracellulaire ainsi que les enzymes qui la dégradent. Dans les fibroblastes gingivaux, le PDGF stimule la synthèse de collagène de type V, régule la synthèse des collagènes de types III et IV et active les collagénases (Antoniades, 1991). Il joue donc un rôle important dans la métabolisation et l'organisation de la matrice conjonctive entourant les cellules. Les fibroblastes de peau humaine, stimulés au PDGF activent jusqu'à 3 fois leur sécrétion de collagénases (Ross *et al.*, 1986). Les implications biologiques d'une telle réorganisation tissulaire sont nombreuses dans une série de phénomènes : mouvements cellulaires, mitoses, développement embryonnaire...).

Par ses actions sur la prolifération, le chémotactisme et le dépôt de la matrice extracellulaire, le PDGF contribue à la régulation de la croissance cellulaire mais tient aussi un rôle primordial dans le processus de réparation tissulaire (Daniel et Kunjian, 1992).

1.3.1.4. Réparation tissulaire

In vivo, le PDGF est synthétisé par les mégacaryocytes. Il est stocké et transporté dans les granules α des plaquettes sanguines. Ces cellules ayant une forte affinité pour les endothéliums blessés, elles s'y agrègent et y libèrent leur contenu. Ainsi relargué, le PDGF peut stimuler la réparation du tissu lésé.

Classiquement, la réparation tissulaire est décrite en 3 phases successives : la réponse inflammatoire aiguë, la réparation et le remodelage des collagènes (Pierce *et al.*, 1991). Dans un premier temps, Seppa *et al.* (1982) ont montré que les fibroblastes migraient suivant un gradient de concentration en PDGF et qu'à une concentration supérieure à une unité par ml, l'action mitogénique se substituait au chémotactisme. Les macrophages et les fibroblastes

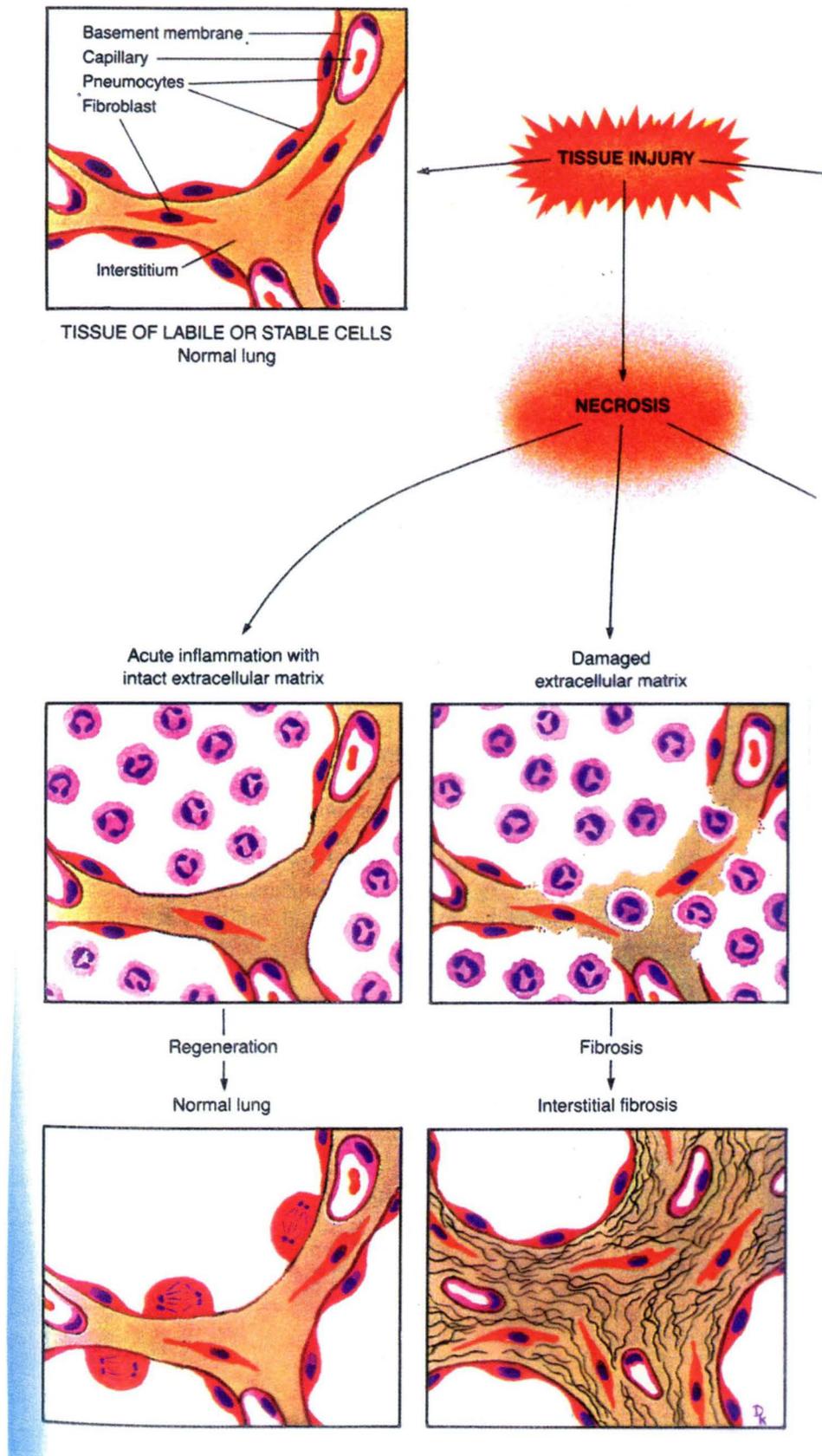


Figure I.6. : A. Représentation schématique des espaces alvéolo-capillaires et de leurs principaux constituants cellulaires.

B. Schémas illustrant les modifications structurales de ces espaces dans les processus de réparation tissulaire (a) et de fibrose (b) (d'après Rubin et Faber, 1988).

synthétisant également du PDGF, on assiste à un effet de feed-back positif autocrine, renforçant ainsi l'action initiale du PDGF d'origine plaquettaire. Dans un second temps, le PDGF activant les macrophages et les fibroblastes, il induit la synthèse de facteurs de croissance endogènes et de composants de la matrice extracellulaire dont le collagène de type I, l'acide hyaluronique et la fibronectine. Finalement, le PDGF est responsable du remodelage tissulaire par l'activation de collagénases, suivie d'une induction de la synthèse de collagène de type V par les fibroblastes.

Facteur de croissance ubiquitaire, le PDGF intervient également dans la croissance et la prolifération de cellules impliquées dans les maladies fibrosantes telles que la fibrose pulmonaire, la myélofibrose et l'athérosclérose ainsi que dans les transformations néoplasiques.

1.3.2. ACTIONS DU PDGF DANS LES PROCESSUS PATHOLOGIQUES

Le PDGF est également impliqué dans plusieurs processus pathologiques. Nous n'évoquerons que quelques uns dont la fibrose pulmonaire, l'athérosclérose et les transformations néoplasiques bien que le PDGF ait également été associé à d'autres pathologies telles que l'arthrite et la myélofibrose.

1.3.2.1. Fibrose pulmonaire

Dans le poumon normal, l'activité des fibroblastes est limitée au renouvellement de la matrice extracellulaire dont le contenu en collagènes est maintenu constant du fait d'un équilibre entre phénomènes de synthèse et de dégradation.

En cas d'agression, le poumon distal réagit comme d'autres organes (peau, foie, ...) en déclenchant des phénomènes de réparation tissulaire. Trois types de phénomènes sont observés : une invasion des alvéoles par des cellules inflammatoires (alvéolite), une prolifération locale des fibroblastes et une augmentation de la synthèse des divers composants de la matrice extracellulaire (MEC) (collagènes, élastine, fibronectine, glycosaminoglycans, ...). Ces phénomènes de réparation peuvent respecter l'homéostasie et contribuer à la récupération d'une architecture pulmonaire normale. Dans d'autres cas, ils dépassent leur but et peuvent aboutir à une fibrose (Fig I.6). En effet, la fibrose pulmonaire est caractérisée par l'accumulation de fibroblastes, de collagènes et d'autres protéines de la MEC dans

l'interstitium et les alvéoles.

Les cellules de l'alvéole (macrophages, polymorphonucléaires, neutrophiles,...) jouent un rôle-clé en produisant en excès des facteurs tels que le PDGF qui stimulent la prolifération, le chemotactisme et l'activité sécrétoire des fibroblastes. Des études ont ainsi montré que les macrophages alvéolaires de patients atteints de fibrose interstitielle diffuse idiopathique sécrètent 4 fois plus de PDGF que ceux de sujets normaux. Cette augmentation est liée à la surexpression du gène du PDGF. Il est à noter que si le macrophage alvéolaire semble jouer un rôle pivot, ce dernier n'est pas le seul. En effet, les cellules épithéliales, endothéliales ainsi que les plaquettes et les fibroblastes eux-mêmes peuvent contribuer, en partie du moins, à la sécrétion de ce facteur de croissance (Carré et Léophonte, 1993).

D'un point de vue physiologique, la fibrose altère les propriétés mécaniques du poumon, sa vascularisation et la capacité de diffusion de l'O₂, provoquant ainsi progressivement une insuffisance respiratoire.

Dans un nombre très limité de cas, survient une phase dite de résolution : une étape remarquable par le fait qu'elle peut aboutir à la restitution presque *ad integrum* des fonctions pulmonaires. On soupçonne l'intervention de substances dotées d'un pouvoir mitogénique négatif pour les fibroblastes : c'est le cas du TGF- β , de l'IFN γ , de l'héparine ou encore de la PGE₂ dont les effets négatifs sur la réplication des fibroblastes sont bien connus (Junod, 1991).

Le problème posé est donc de comprendre pourquoi dans certaines circonstances, le processus de cicatrisation aboutit, alors que dans d'autres, il dégénère en affectant négativement la structure et la fonction pulmonaire.

1.3.2.2. L'athérosclérose

Outre l'accumulation de lipides dans l'intima, l'athérosclérose se caractérise par une prolifération anormale des cellules musculaires lisses de l'intima mais aussi par un dépôt excessif de tissu conjonctif et une augmentation anormale de macrophages, lymphocytes et de cellules spongieuses. La théorie cellulaire de l'athérosclérose fait intervenir aujourd'hui au moins 4 types de cellules : les cellules musculaires lisses elles-mêmes, les cellules endothéliales, les plaquettes et les macrophages activés. Toutes ces cellules sont capables de produire et/ou de libérer du PDGF. Puissant facteur de croissance, le PDGF pourrait donc jouer un rôle dans la prolifération myo-intimale (Bryckaert *et al.*, 1991). On a d'ailleurs montré des différences d'expression du PDGF entre tissu artériel normal et athéromateux. En effet, Barret *et al.* (1987) ont mis en évidence une expression importante de *c-sis* codant pour

la chaîne B du PDGF au niveau des macrophages alors que les chaînes A seraient produites par les cellules musculaires lisses dans les plaques d'athérosclérose. Ces résultats suggèrent que les cellules musculaires lisses peuvent être stimulées de façon autocrine et paracrine par le PDGF.

Un modèle d'action du PDGF dans la formation des plaques d'athérosclérose a été proposé: l'épithélium artériel, lorsqu'il est endommagé, induit l'infiltration des monocytes circulants dans le tissu. Différenciés en macrophages, ils sécrètent du PDGF. Les cellules endothéliales lésées en produisent également. Si la lésion est importante, les plaquettes sanguines s'y agrègent et y libèrent leur contenu. Une quantité importante de PDGF est ainsi libérée. Chémo-attractant puissant, il attire les cellules musculaires lisses de la média vers l'intima et les stimule. Activées, elles sont elles aussi capables de sécréter du PDGF, induisant ainsi, par mode autocrine, leur propre prolifération.

1.3.2.3. Les transformations néoplasiques

La transformation néoplasique peut être considérée comme un dérèglement du système de signalisation qui contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire. Toute anomalie (gène cellulaire muté, transformation virale,...) aboutissant à l'activation constitutive d'un composant quelconque de ce système peut potentiellement être à l'origine d'une croissance non contrôlée et d'une tumeur.

Le lien entre le PDGF et les transformations malignes se base sur plusieurs observations. D'une part, le gène codant pour la chaîne B du PDGF est l'homologue cellulaire de l'oncogène *v-sis* du Simian Sarcoma Virus (SSV). Ce rétrovirus injecté chez des singes est responsable de l'apparition de glioblastomes et de fibroblastomes (Waterfiel, 1989). Les cellules de mammifères transformées par ce type de virus sont capables de produire un facteur biologiquement actif, similaire à l'isoforme BB du PDGF.

D'autre part, pour les cellules tumorales dérivant de certains cancers spontanés, on a montré une production d'une ou plusieurs isoformes du PDGF mais l'importance pathogénique de ce signal autocrine reste difficile à prouver. Des surexpressions de récepteur au PDGF ont également été observées dans certaines tumeurs par rapport aux tissus sains correspondants. Le fait que des cellules tumorales, bien que n'exprimant pas de récepteur au PDGF, produisent et libèrent ce facteur de croissance, plaide en faveur d'une fonction paracrine du PDGF dans les processus de tumorigénèse (pour une revue, voir Westermarck et Heldin, 1993). Bien entendu, les transformations néoplasiques sont des phénomènes multifactoriels, et le PDGF ne constitue qu'un acteur parmi bien d'autres.

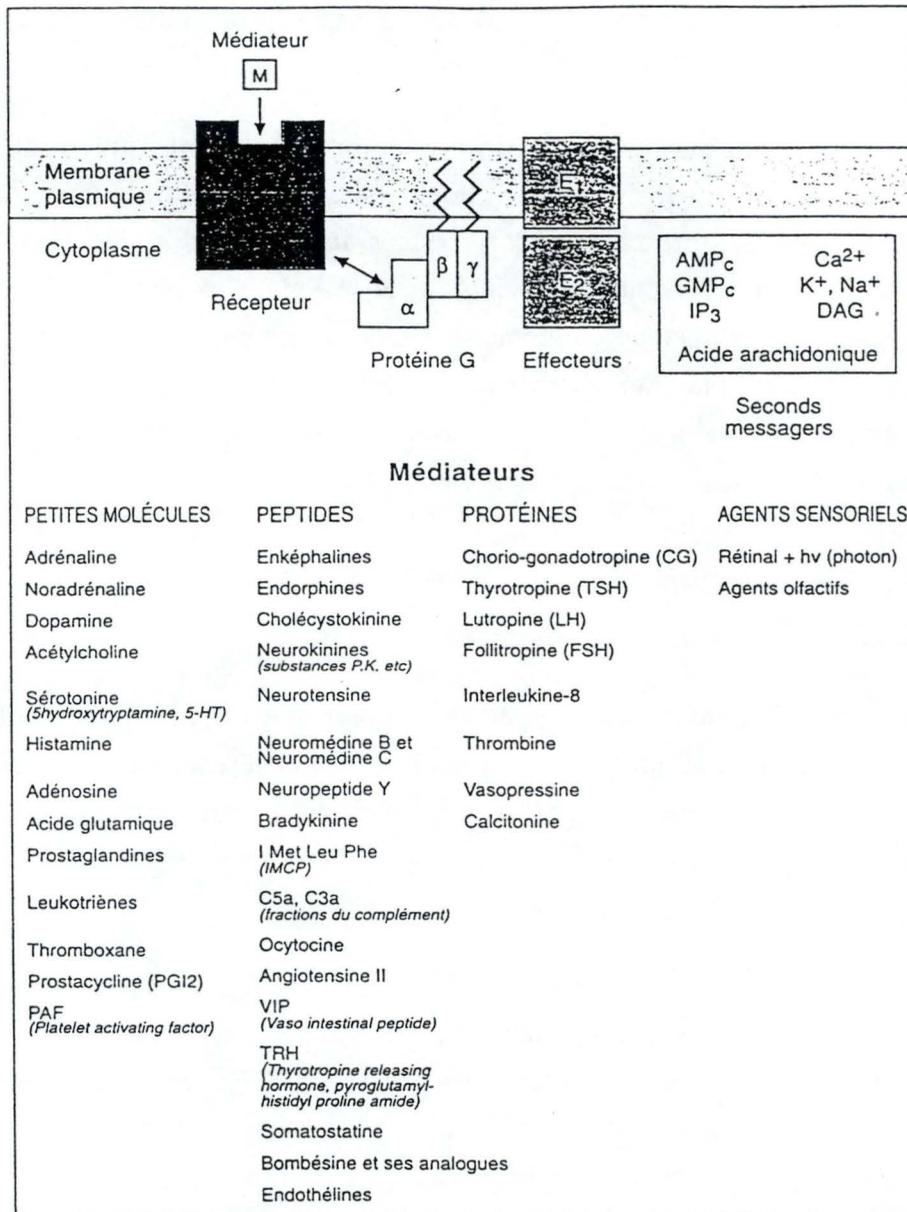


Figure I.7. : Représentation schématique du système médiateur-récepteur-protéine G-effecteur et quelques exemples de médiateurs (d'après Hibert *et al.*, 1993).

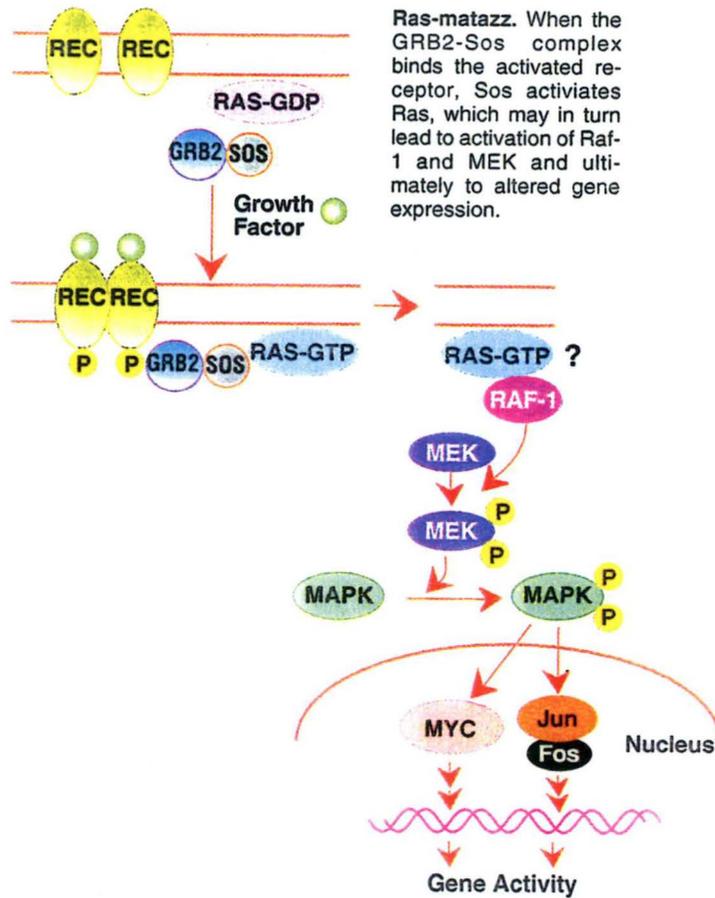


Figure I.8. : Représentation de la voie de transduction du signal mitogénique, depuis le récepteur membranaire jusqu'à la machinerie transcriptionnelle de la cellule (d'après Marx, 1993).

2. TRANSDUCTION DU SIGNAL DU PDGF

Les cellules des organismes pluricellulaires, afin de maintenir une harmonie globale, communiquent entre elles par l'intermédiaire de signaux chimiques. La plupart d'entre eux, ne pouvant traverser la membrane plasmique de par leurs propriétés physico-chimiques, nécessitent des mécanismes de transduction, transformant des signaux externes en signaux internes à la cellule.

La propagation d'un signal généré en membrane au travers de la cellule peut se faire par deux mécanismes principaux. L'un fait intervenir des messagers secondaires dont la diffusion permet une transmission rapide du signal. Dans ce cas, les signaux externes se fixent à des récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique, entraînant leur activation. Le récepteur ainsi activé, transmettra l'information reçue par l'intermédiaire de protéines G trimériques, à des enzymes amplificatrices, capables de générer des messagers secondaires. Ces derniers, en diffusant, vont relayer le message à d'autres enzymes et d'autres protéines intracellulaires. Les messagers secondaires les plus importants sont représentés par l'adénosine 3', 5' monophosphate cyclique (AMPc) et par des molécules dérivées du phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PIP₂) : l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) (Fig I.7.).

Pour d'autres ligands, le récepteur une fois activé se caractérise par une activité enzymatique propre qui déclenche une cascade de réactions de phosphorylations assurant la transmission du signal depuis le récepteur jusqu'au cœur de la cellule. C'est principalement par ce mode de transduction que les facteurs de croissance tels que le PDGF, le NGF ("nerve growth factor"), l'EGF ("épithélium growth factor") et l'insuline activent leurs cellules cibles (Fig I.4. et I.8.).

Les facteurs de croissance représentent une large famille de protéines impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation d'un grand nombre de types cellulaires. En se liant à leurs récepteurs membranaires spécifiques, ils génèrent au niveau cytoplasmique une ou plusieurs cascades de transduction du signal. Ces voies cytoplasmiques aboutissent au sein même du génome où a lieu la régulation de l'expression de gènes impliqués dans les réponses mitogéniques ou de différenciation, comme représenté à la Figure I.8.. Nous allons maintenant passer en revue les étapes successives de cette cascade.

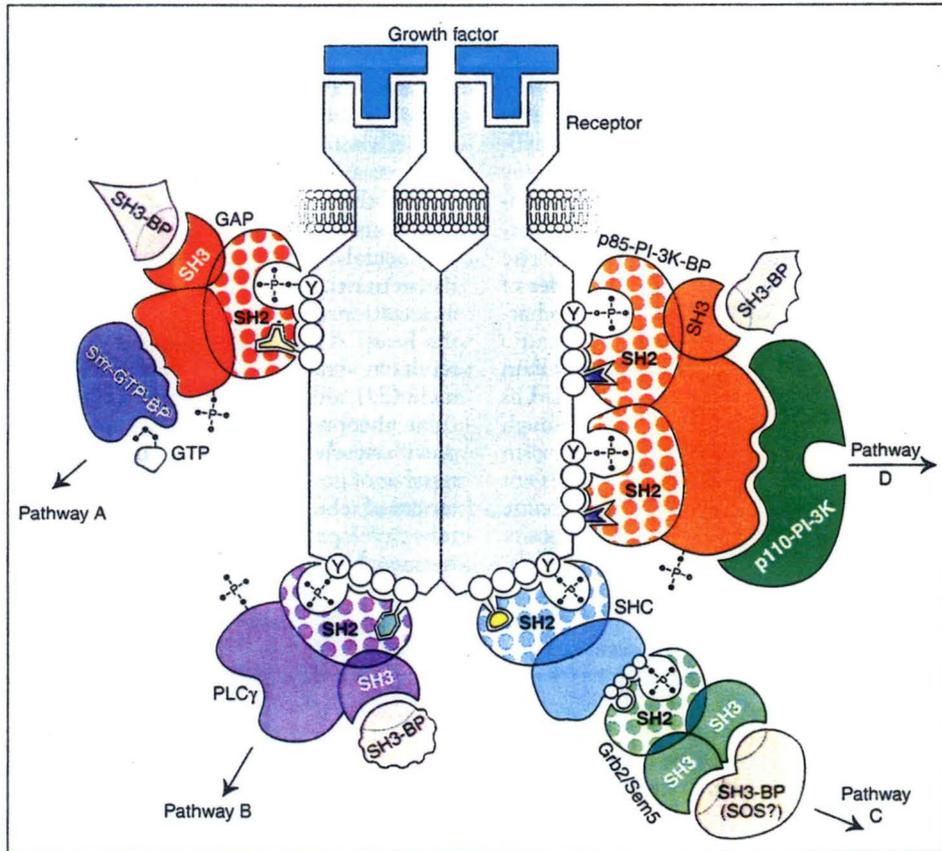
2.1. REVUE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DU PDGF

2.1.1. LES RECEPTEURS DU PDGF

Les effets du PDGF sont médiés par des récepteurs transmembranaires que nous avons déjà décrits au Point 1.2 et qui se caractérisent par une activité tyrosine kinase intrinsèque au niveau de leur domaine catalytique (Ullrich et Schlessinger, 1990). La liaison du PDGF à son récepteur va induire sa dimérisation et son autophosphorylation sur plusieurs de ses résidus tyrosines. On a localisé plusieurs sites de phosphorylation dont l'un sur la tyr 751 de la région inter-kinasique et l'autre sur la tyr 857 du deuxième domaine tyrosine kinase (Figure I.9.). Ces sites phosphorylés sont des sites pour lesquels les domaines SH2 (src homology 2) des protéines ont une grande affinité (Benito et Lorenzo, 1993). Ces domaines de plus ou moins 100 acides aminés, homologues de la région catalytique de la protéine proto-oncogénique c-src, sont caractéristiques des protéines établissant une liaison avec une protéine tyrosine kinase (Fantl *et al.*, 1993). Par l'intermédiaire de ces domaines, le récepteur tyrosine kinase (RTK) va recruter et phosphoryler toute une série de protéines cytoplasmiques impliquées dans diverses voies de transduction intracellulaires (Figure I.10.). Parmi ces protéines, certaines ont une activité enzymatique. Dans ce cas, le recrutement va rapprocher l'enzyme de son substrat tandis que la phosphorylation va moduler son activité catalytique (Brugge, 1993). D'autres n'ont pas d'activité enzymatique apparente et constituent un lien entre le récepteur et une enzyme membranaire ou cytoplasmique. C'est ce que l'on appelle les "adaptateurs".

2.1.2. PROTEINES RECRUTEES PAR LE RECEPTEUR ACTIVE

Ce sont les résidus phosphorylés du récepteur tyrosine kinase (RTK) ainsi que les acides aminés qui les entourent qui déterminent la spécificité des interactions RTK-protéines (Fantl, 1993). La séquence incluant la tyr 751 est spécifique du domaine SH2 de la phosphatidylinositol 3' kinase (PI3K) (Figure I.11.). Cette enzyme est constituée de deux sous-unités de 85 et 110 kDa respectivement. La sous-unité de 85 kDa contient les deux domaines SH2 qui médient sa liaison au récepteur, cependant, elle est dépourvue de toute activité catalytique. Une fois liée au récepteur activé, la PI3K est phosphorylée via l'activité



Recruitment of signaling proteins to growth factor receptors. The binding of a growth factor (for example, platelet-derived growth factor) to its receptor causes receptor dimerization and activation of the tyrosine protein kinase activity of the receptor. These events lead in turn to autophosphorylation at several sites on the receptor. The phosphorylated sites serve as binding sites for proteins with SH2 domains [shown are p21^{ras} guanosine triphosphatase-activating protein (GAP), p85 phosphatidylinositol 3' kinase (PI-3K) binding protein, SHC, and phospholipase C- γ (PLC- γ)]. Each of these proteins has a modular structure, consisting of several protein domains. In some cases, the phosphorylation sites on these SH2-containing proteins serve as binding sites for further SH2-binding interactions (for example, for Grb2/Sem5 binding to SHC). The SH3 domains of these proteins presumably contain sites for distinct binding proteins [SH3-binding proteins (BP); (2)].

SCIENCE • VOL. 260 • 14 MAY 1993

Figure I.11. : Rôle des domaines SH2 et SH3 dans le recrutement par le récepteur activé au PDGF, de protéines cytoplasmiques impliquées en amont dans la transduction du signal du PDGF (Brugge, 1993).

kinasique du récepteur, ce qui lui confère son activité kinasique propre sur la sous-unité catalytique. La PI3K ajoute alors un phosphate au phosphatidylinositol en position D3, induisant ainsi la formation de nouveaux phosphoinositides phosphorylés en position 3 : le phosphoinositol-3-phosphate (PIP₃), le phosphoinositol biphosphate (PIP₂) ainsi que l'inositol triphosphate (IP₃). Leurs fonctions exactes ne sont pas encore bien établies mais ils interviendraient dans le réarrangement des filaments d'actine (Wymann et Arcaro, 1994), réarrangement nécessaire à l'activité chémoattractante des fibroblastes, en réponse au PDGF.

Un deuxième substrat de l'activité tyrosine kinase du récepteur au PDGF est la phospholipase C γ (PLC γ) (Figure I.11.). Phosphorylée sur sa tyrosine 783 (Benito et Lorenzo, 1993), elle catalyse la dégradation du PIP₂ en IP₃ et en diacylglycérol (DAG), responsables respectivement de la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique et de l'activation de la PKC. Daniel et Kumjian (1992) ont montré dans les cellules BALBc/3T3 que la PLC γ interviendrait pour 60 % dans la transmission du signal suite à une stimulation au PDGF. Depuis, d'autres études ont montré l'importance de la PLC γ ainsi que celle de la PI3K dans la cascade mitogénique induite par le PDGF (Vallus et Kazlauskas, 1993; Rodriguez *et al.*, 1994).

Le récepteur activé recrute encore d'autres enzymes : il s'agit de p120^{GAP} dont nous parlerons au point 2.1.3., des protéines tyrosine phosphatases dont les PTP1C et PTP1D et des protéines src, que nous aborderons au point 2.1.6.

Mais le récepteur activé recrute également des protéines sans activité enzymatique, appelées "adaptateurs". C'est le cas de la protéine Grb2 (Growth Factor Receptor Binding Protein 2). Cette protéine jouera un rôle clé dans l'activation de Ras dont le rôle sera précisé au point 2.1.3.. Grb2 fait partie d'une famille de molécules, à domaines SH2 et SH3 (src homology 2 et 3). Les premiers assurent une interaction spécifique avec les séquences incluant une tyrosine phosphorylée, les seconds jouent probablement un rôle dans les interactions spécifiques protéines/protéines (Kahn, 1992).

Grb2 est une protéine cytosolique qui possède deux domaines SH3 et un domaine SH2. Elle ne présente aucune activité enzymatique apparente. Sa fonction principale est de "fixer", au voisinage de la membrane plasmique, la protéine Sos ("Son of sevenless"). Sos est une autre protéine cytoplasmique qui comprend un domaine SH3 riche en prolines et un domaine proche du domaine cdc25 de la levure. La protéine cdc25 est une ser/thr-tyr (sérine/thréonine-tyrosine) phosphatase spécifique de la protéine cdc2 cycline dépendante.

Dans les cellules non stimulées, ces deux protéines forment par l'intermédiaire de leurs domaines SH3, un complexe stable, libre dans le cytoplasme (Figure I.12.). Des études récentes ont montré que des peptides synthétiques, riches en prolines tels que PPPVPPRR

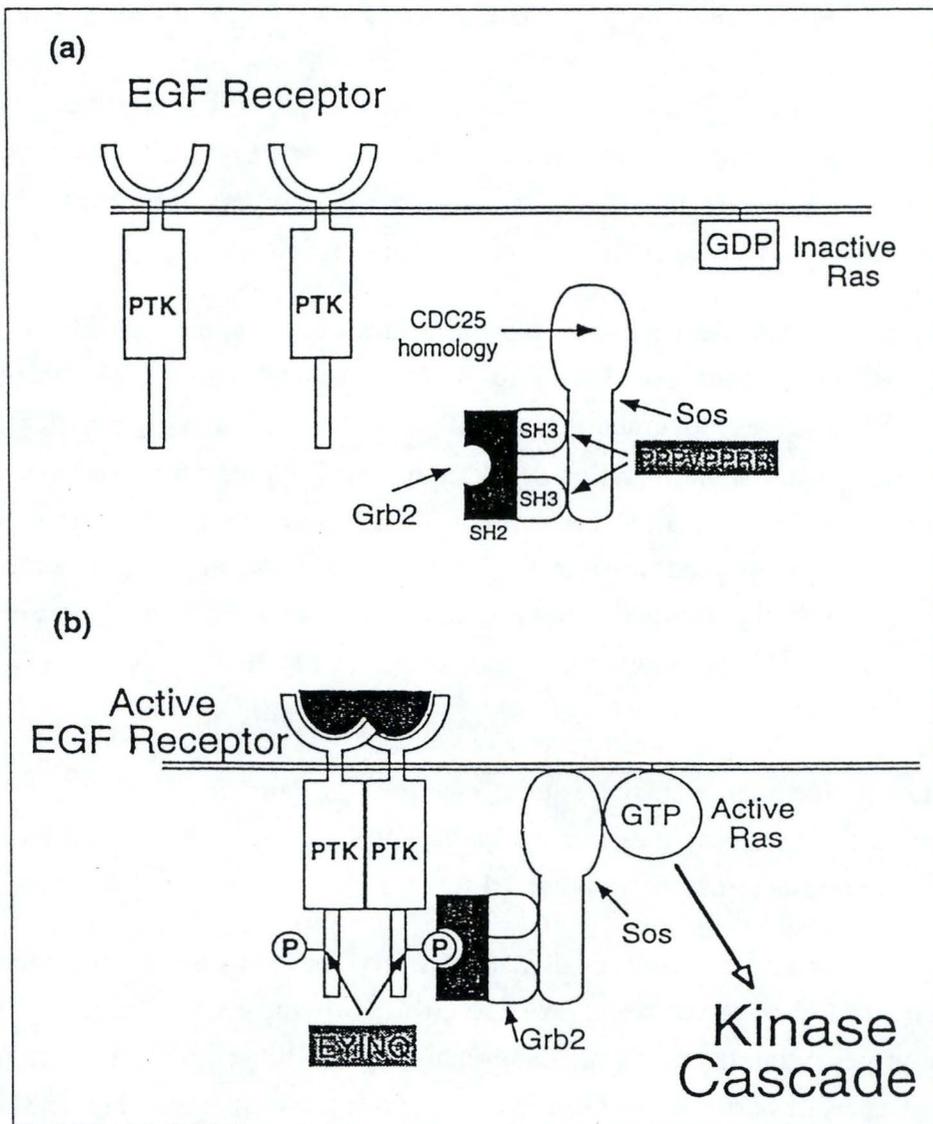


Figure I.12. : Recrutement par les récepteurs à l'EGF et au PDGF activés des complexes Grb2-Sos présents dans le cytoplasme. L'ancrage du complexe au récepteur via le domaine SH2 de Grb2 permet à Sos, constitutivement actif d'interagir avec sa cible, c'est-à-dire la protéine Ras-GDP inactive, ancrée au niveau de la membrane plasmique (d'après Schlessinger, 1994).

bloquent l'interaction de ces deux protéines (Schlessinger, 1993).

La liaison du ligand (PDGF, EGF,...) à son récepteur induit l'activation de son domaine cytoplasmique tyrosine kinase : le récepteur s'autophosphoryle sur plusieurs de ses résidus tyrosine. Un de ces sites, la tyrosine 1068 constitue un site de haute affinité pour le domaine SH2 de Grb2. Le récepteur va ainsi recruter, par l'intermédiaire du domaine SH2, le complexe cytoplasmique Grb2-Sos. Cette translocation amène Sos au niveau de la membrane plasmique où sont localisées les protéines Ras. Sos peut dès lors interagir avec sa cible c'est-à-dire, catalyser la dissociation du GDP et induire la formation du complexe Ras-GTP actif, par échange nucléotidique (voir point 2.1.3.). Grb2 joue donc simplement le rôle de translocateur : en se liant au récepteur activé, il déplace Sos constitutivement actif, du cytosol vers la membrane plasmique, véhiculant ainsi le signal mitogène du RTK vers les protéines Ras (Figure I.12.).

2.1.3. LES PROTEINES RAS

La famille des proto-oncogènes *ras* humains comprend 3 gènes, structurellement très proches et hautement conservés : Ha (Harvey)-*ras*, Ki (Kirsten)-*ras* et N (Neuroblastoma)-*ras*. Ils codent pour de petites protéines (189 acides aminés) de 21 kDa, les p21^{ras}, associées à la face interne de la membrane plasmique (Lowy, 1993).

Les propriétés des protéines p21^{ras} sont assez semblables à celles d'une protéine G monomérique, ce qui suggère que p21^{ras} est normalement impliquée dans la transduction de signaux contrôlant la croissance et la prolifération cellulaire (Rawn, 1989).

Les protéines p21^{ras} codées par les proto-oncogènes cellulaires *ras* sont des protéines qui fixent les nucléotides guanyliques (GDP et GTP). A l'égal des protéines G, c'est la forme liée au GTP qui est la forme active (Figure I.13.).

Les p21^{ras} sont régulées de manière positive par les "guanine nucleotides releasing factors" (GRFs) qui catalysent la substitution du GDP par le GTP (Maruto et Burgess, 1994); les GRFs sont encore appelés GEFs (pour GDP-GTP exchange factors) par d'autres auteurs (Mc Cormick, 1994; Daum *et al.*, 1994) (Figure I.14.). Parmi ces GEFs, nous avons déjà signalé la protéine Sos 1, associée à Grb2. Mais il en existe d'autres : la p140^{GRF} exprimée essentiellement dans les tissus du cerveau, la protéine Vav dans les lymphocytes T et la protéine Sos 2 exprimée dans tous les types cellulaires (Figure I.14.). Les mutants oncogéniques de Ras ne dépendent évidemment plus de ces GRFs pour leur activation.

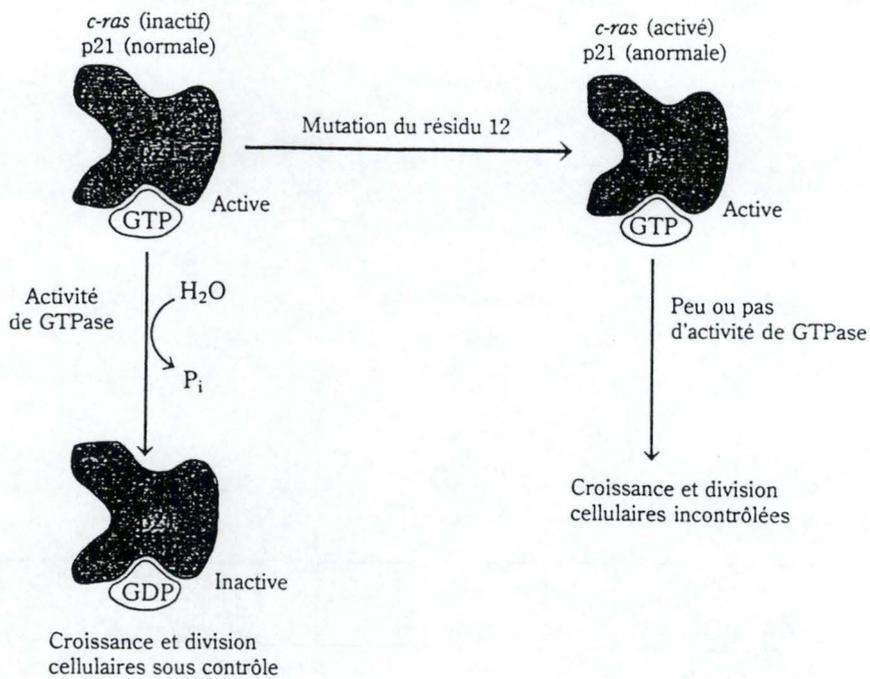


Figure I.13. : Représentation des mécanismes d'activation-inactivation de la protéine proto-oncogénique ras dans la cellule normale. Des mutations du résidu 12 activent de manière constitutive la protéine Ras et contribuent à une croissance cellulaire non contrôlée (d'après Rawn, 1989).

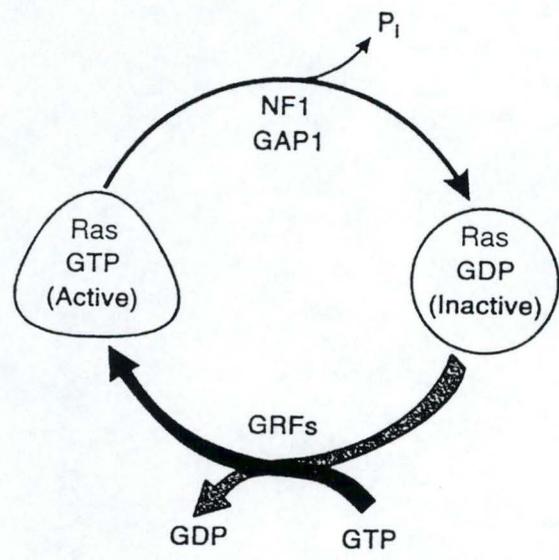


Figure I.14. : Rôle des GRFs et des protéines GAP dans la régulation de l'activité de Ras (d'après Szeberenyi et Erhardt, 1994).

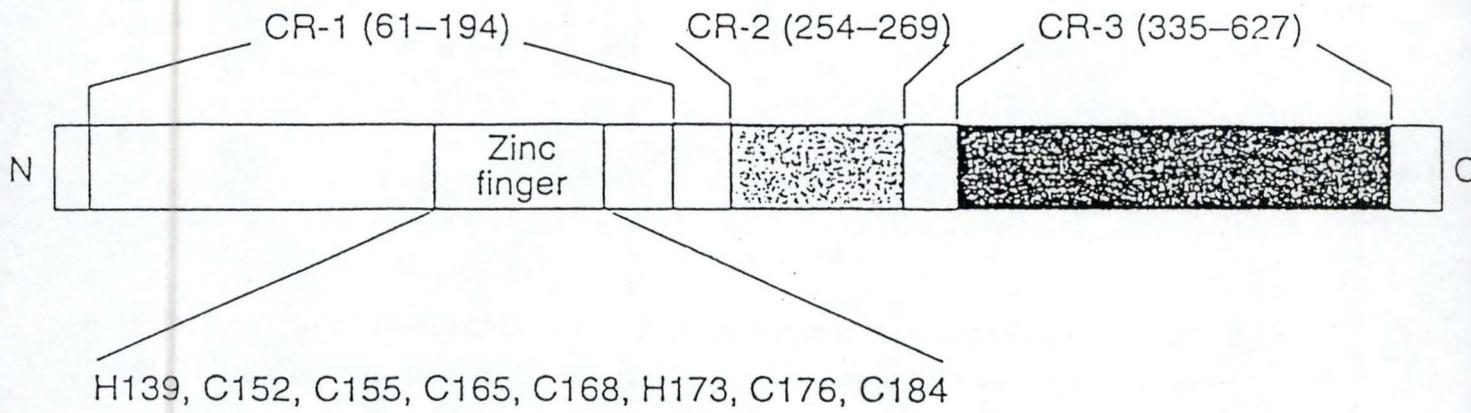


Figure I.15. : Représentation schématique de la structure protéique de Raf (Avruch et Kyriakis, 1994).

Les p21^{ras} sont régulées de manière négative via des protéines régulatrices qui stimulent l'activité GTPasique intrinsèque des protéines Ras, qu'on appelle GAPs (pour GTPase activating proteins) : c'est le cas de p120^{GAP}, recrutée par le récepteur activé du PDGF et de la neurofibromine (ou NF1), produit du gène de la neurofibromatose 1 (Szeberenyi, 1994). L'activation de p120^{GAP} par le récepteur activé du PDGF constitue donc un mécanisme naturel de feed-back négatif (Figure I.14.).

Dans les protéines oncogéniques Ras, caractérisées par la substitution des acides aminés en position 12 et 61, le GTP est toujours fixé, mais l'activité GTPasique est totalement ou fortement perdue, et les protéines restent donc constitutivement activées, ce qui contribue à une croissance cellulaire non contrôlée (Figure I.13.). Des mutants oncogéniques de Ras sont associés à 40% de tous les cancers humains.

Une variété de stimuli extracellulaires comme le PDGF, l'insuline et le nerve growth factor (NGF), qui agissent via des récepteurs tyrosine kinase, requièrent la protéine p21^{ras} pour exercer leurs effets, un argument de plus en faveur de l'implication de Ras dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. En fait, il est rapidement apparu que l'activation de Ras jouait un rôle clé dans l'activation d'une sérine/tréonine kinase, appelée Raf.

2.1.4. LES PROTEINES RAF

La famille des protéines Raf est formée de trois protéines cytosoliques à activité Ser/Thr kinase : c-Raf-1, A-Raf et B-Raf, de respectivement 74, 68 et 73 kDa (Rapp, 1991). c-Raf-1, homologue cellulaire de l'oncoprotéine virale v-Raf (murine sarcoma virus) (Li et Sevidy, 1993) est exprimé de façon ubiquiste par rapport aux deux autres qui présentent un pattern d'expression plus restreint. On trouve A-Raf en grande quantité dans les cellules du tractus uro-génital tandis que B-Raf est principalement exprimé dans les cellules du système nerveux central et des gonades (Szeberenyi, 1994).

Chacune de ces protéines comprend trois domaines hautement conservés dans la famille des Raf kinases : CR1, CR2 et CR3 (Figure I.15.).

- Le domaine CR3 localisé dans la partie carboxy-terminale de la séquence est le domaine catalytique.

- Le domaine régulateur CR1, riche en cystéines est localisé dans la partie NH2-

terminale. Dans les cellules quiescentes, ce domaine interfère avec le domaine effecteur CR3 et l'inactive. Sa délétion rend la protéine constitutivement active.

- Le domaine CR2 est le domaine phosphorylé lors de la réponse mitogénique : c'est le domaine régulateur positif.

2.1.4.1. Rôle de Ras dans l'activation de Raf

Plusieurs auteurs ont mis en évidence sur base d'un système "two-hybrid" une interaction directe des protéines Ras et Raf (Van Aelst, 1993; Warne, 1993). Une partie de l'extrémité régulatrice de Raf -1 correspondant aux résidus 51-131, se lie directement à la forme active Ras-GTP. Cette séquence de 81 aa, hautement conservée parmi les 3 isozymes de Raf, constitue le "Ras Binding Domain" (RBD).

La liaison de Ras à Raf représente un premier pas dans l'activation de Raf. Cependant, son activation complète nécessite d'autres facteurs. Le motif en doigt de zinc présent dans la partie amino-terminale de Raf (aa 139-184) présente une homologie avec le domaine régulateur (phorbol ester/DAG binding site) de la PKC. Raf -1 pourrait donc être activé par un messenger secondaire de nature lipidique (Li *et al.*, 1991). L'interaction de Raf -1 avec Ras induit son activation par un mécanisme qui pourrait impliquer la protéine kinase C α (PKC α). En effet, celle-ci est capable de phosphoryler Raf et de l'activer. (Daum *et al.*, 1994).

Le modèle d'activation de Raf qui émerge de ces observations récentes est le suivant (Figure I.16.) : dans les cellules quiescentes, la partie NH₂-terminale de la protéine Raf réprime son activité kinasique en interférant avec son domaine catalytique CR3. Dans les cellules stimulées, Ras activé agit en tant que "recruteur" de Raf. Une fois au niveau de la membrane plasmique, Raf est partiellement activé par un composant de celle-ci. Ce cofacteur lipidique, de nature encore inconnue, induit un changement conformationnel qui libère le domaine catalytique de Raf. La phosphorylation de ce domaine par la PKC ou par d'autres protéines kinases rend la protéine Raf complètement active.

2.1.4.2. Régulation de Raf par les mécanismes de phosphorylation-déphosphorylation

Comme ce modèle le laisse entendre, l'activation maximale de Raf requiert sa phosphorylation. *In vivo*, la protéine Raf est constitutivement phosphorylée sur plusieurs résidus (Daum *et al.*, 1994).

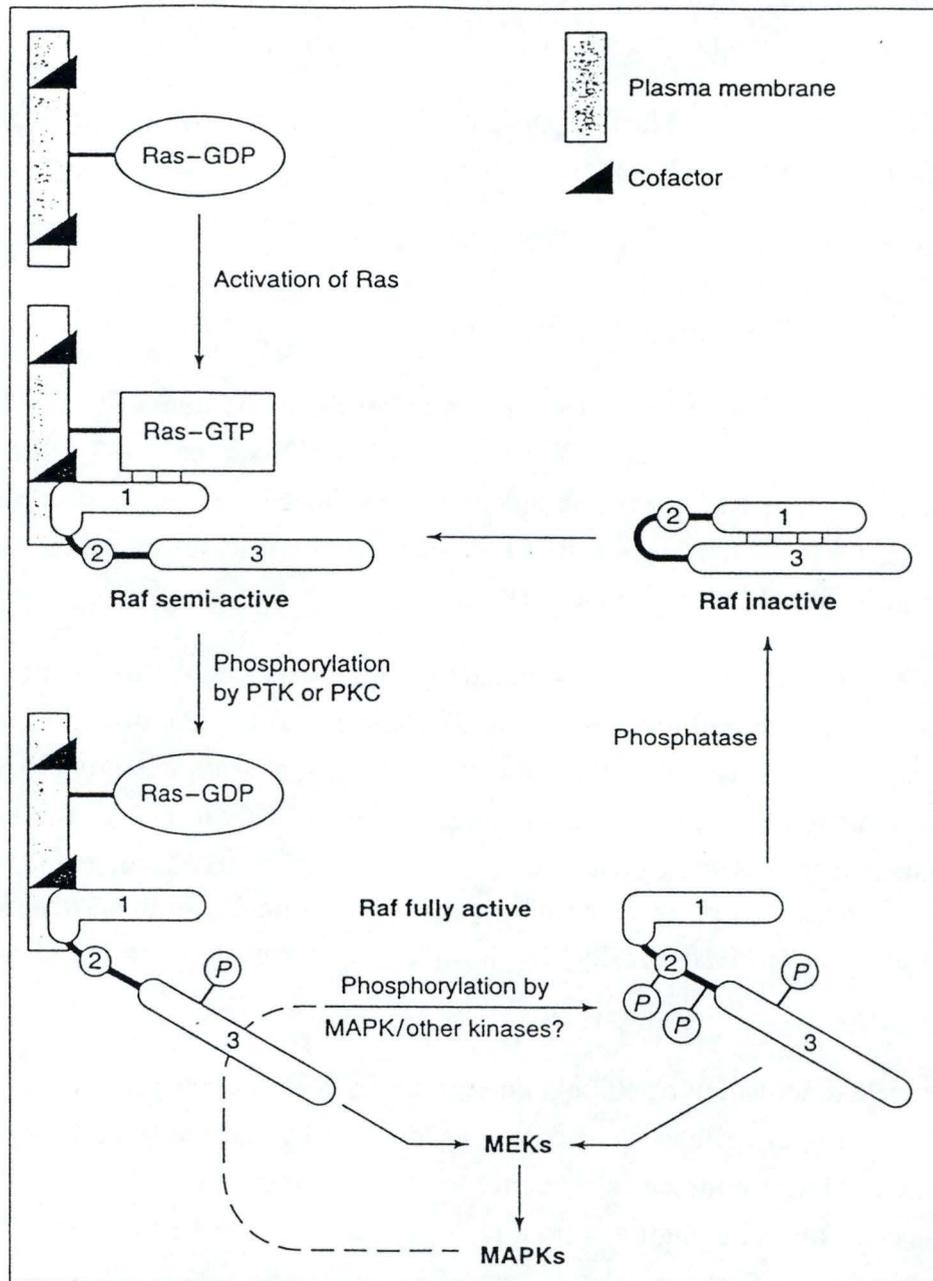


Figure I.16. : Modèle d'activation de Raf. Recrutée en membrane par la protéine Ras activée, elle subit un changement conformationnel qui la rend partiellement active. Son activation complète nécessite sa phosphorylation par des kinases de type PTK et PKC (d'après Daum *et al.*, 1994).

Morisson *et al.* (1993) ont identifié, sur la protéine Raf isolée de cellules NIH3T3 stimulées au PDGF, 3 principaux sites de phosphorylation : Ser 43, Ser 259 et Ser 621. Ce dernier résidu est aussi phosphorylé dans les cellules quiescentes. Sa phosphorylation résulte donc plutôt d'une modification post-traductionnelle. Il constitue un site de régulation négatif puisque sa déphosphorylation rend la protéine active. Quant aux 2 autres résidus, leur phosphorylation est directement impliquée dans l'activation de Raf.

Des sérine/thréonine kinases de la famille des PKC interviennent également dans l'activation de Raf. Dans les fibroblastes stimulés aux esters de phorbol, la PKC α en particulier phosphoryle Raf sur deux de ses résidus sérines : Ser 499 et Ser 259.

Dans les cellules lymphocytaires CTLL-2, l'incubation de Raf en présence de phosphotyrosine phosphatases inactive complètement la protéine. Dans ces cellules, 2 autres sites de phosphorylation ont été identifiés : la Tyr 340 et la Tyr 341.

Outre les phosphorylations activatrices et celles qui interfèrent avec l'activation de Raf, il existe un troisième type de phosphorylation, celles qui n'ont pas d'effet sur l'activité kinasique de la protéine. La phosphorylation de Raf par les MAP kinases, dont nous parlerons par la suite, en est un exemple, elle pourrait simplement dissocier la protéine Raf activée de la membrane (Figure I.16.).

2.1.4.3. Les substrats de Raf

Actuellement, MEK 1 et MEK 2 sont les seuls substrats connus de Raf. La phosphorylation de deux de leur résidus sérines, Ser 218 et Ser 222, induit leur activation.

Ensemble, les protéines Raf, les "mitogen-activated protein kinases" ou MAPKs (aussi connues sous le nom d'"extracellular regulated kinases" ou ERKs) et les MAPK/ERK kinases (MEKs) forment une cascade de kinases cytoplasmiques (Figure I.17.). Raf (encore appelée MAPKKK ou MEKK) phosphoryle et active MEK (MAPK), qui à son tour phosphoryle et active MAPK (ou ERK).

L'implication de Raf dans l'activation de cette cascade de kinases a été démontrée dans plusieurs types cellulaires par des approches aussi variées que l'expression de mutants dominants négatifs, l'utilisation d'ARN antisens ou la microinjection d'anticorps (Daum *et al.*, 1994).

Nous allons maintenant passer en revue ces kinases situées en aval par rapport à Raf.

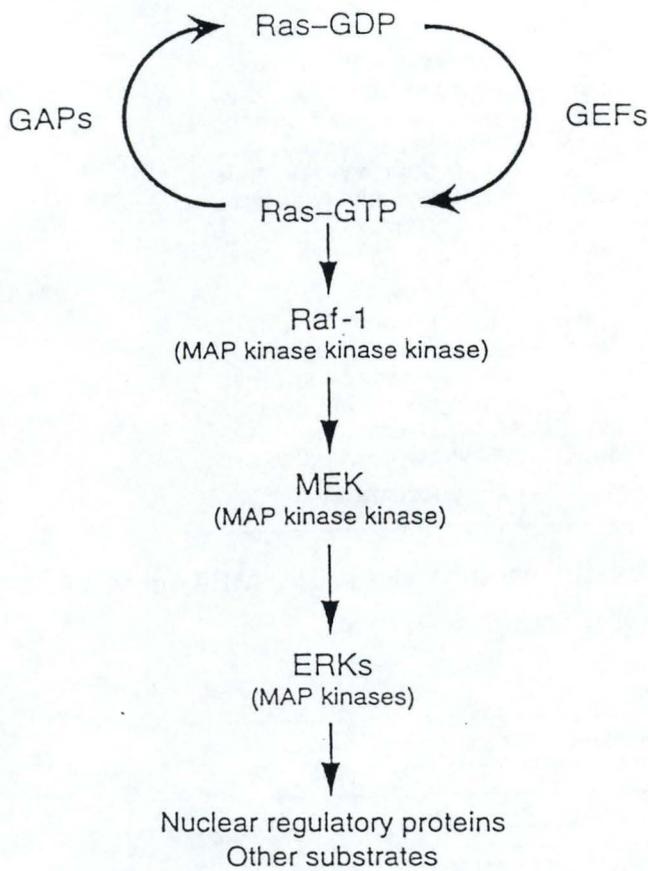


Figure I.17. : Représentation schématique de l'agencement des différents composants permettant l'activation des kinases cytoplasmiques dans la transduction du signal liée au PDGF (Mc Cormick, 1994).

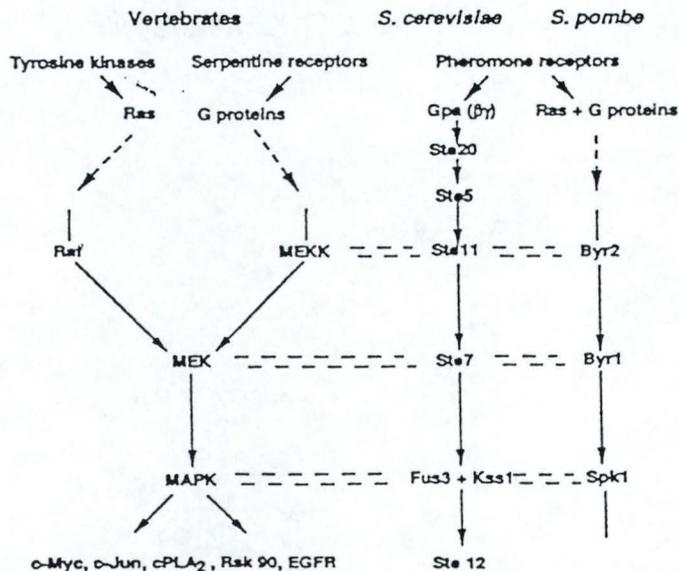


Figure I.18. : Alignement des cascades de protéines kinases aboutissant à l'activation de la MAP kinase chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* et les vertébrés, sur base des séquences protéiniques (d'après Lange-Carter *et al.*, 1993).

MAPK			* *
Human	JNK1	RTAGT'SFMMPYVVTTRYRAPE	
Human	p38	LARHTDDEMTGYVATRWRYPE	
Human	ERK1	PEHDHTGFLETVATRWRYPE	
Yeast	MPK1	NPVENSQFLTEYVATRWRYPE	
Yeast	FUS3	SRETLVGFMTTEYVATRWRYPE	
Yeast	KSS1	EPTGQQSGMTEYVATRWRYPE	
Yeast	HOG1	LARIQDPQMTGYVSTRYRAPE	
Yeast	SMK1	CHSTVQPHITNYVATRYRAPE	
MAPKK			* *
Human	MEK1	SGQLIDSMANSFVGTRSYMSPE	
Human	MEK2	SGQLIDSMANSFVGTRSYMAPE	
Yeast	STE7	SGQLIDSMANSFVGTRSYMSPE	
Yeast	PBS2	SGNLVASLAKTNIGCQSYMAPE	
Yeast	MKK1	SGEAVNSLATFTGTSTFYMAPE	

Subdomain VIII

Figure I.19. : Localisation des sites phosphorylés par les MEKs chez les protéines de la famille des MAP kinases (d'après Davis, 1994).

Isoform	Alternative names	Size (kDa)	MonoQ elution (M)
p40 ^{hera}		40	~0.6
p42 ^{mapk}	ERK2, ERT1, MAP2 kinase, p42 ^{mpk1} , MBP kinase E3, RSK kinase I	42	~0.32
p44 ^{erk1}	p44mapk, ERK1, ERT2, MBP kinase E4, RSK kinase II	44	~0.33
p44 ^{mpk}	MBP kinase	44	~0.32
p46 ^{erk4}		46	~0.45
p54	54 kDa MAP2 kinase	54	~0.4

Table I.2. : Différentes isoformes de la famille des ERK kinases (d'après Pelech et Sanghera, 1992).

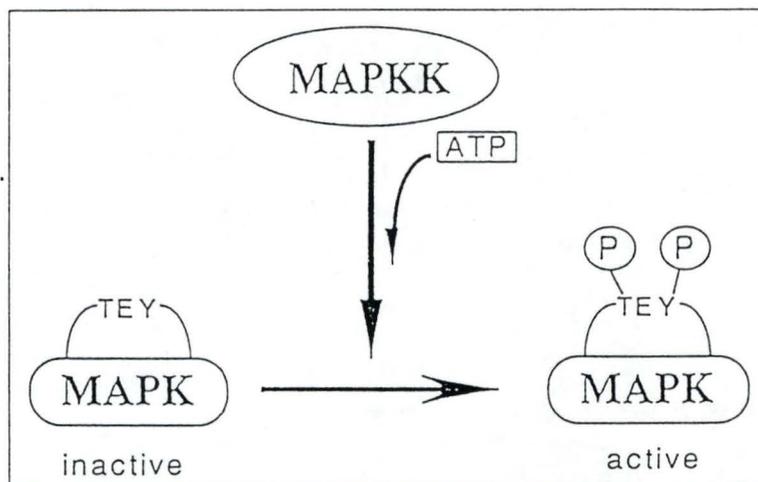


Figure I.20. : Rôle de la MAPKK dans l'activation de la MAPK située en aval (d'après Nishida et Gotoh, 1993).

2.1.5. LES MAPKK OU MEK

Les MEK sont des protéines kinases de 45kDa uniques dans le sens où elles présentent une double spécificité d'action. Elles ont à la fois une activité tyrosine kinase et une activité ser/thr kinase (Nishida et Gotoh, 1993). La phosphorylation de deux de leurs résidus sérines, la ser 218 et la ser 222, par Raf induit leur activation. Des études récentes ont mis en évidence l'existence d'autres kinases susceptibles d'activer MEK 1 et MEK 2 : une MEKK différente de Raf et un homologue de la kinase STE 11 chez *Saccharomyces cerevisiae* et c-Mos (Figure I.18.). Activées, les MEKs phosphorylent directement les kinases situées en aval dans la cascade, soit les MAP kinases.

2.1.6. LES MAP KINASES

Les "Mitogen-Activated Protein Kinases" (MAPK) sont des ser/thr kinases de 40 à 54 kDa, rapidement activées en réponse à toute une série de stimuli (Figure I.19.). Elles se répartissent en 3 sous-groupes : les ERKs ("extracellular-regulated kinases", reprises dans la Table I.2.), les JNK (pour "c-jun NH₂-terminal kinases") et la p³⁸MAPK. Pour être actives, les MAP kinases doivent être phosphorylées sur un résidu Thr ainsi que sur une Tyr. Ces deux acides aminés sont séparés par une Glu chez les ERKs, une Pro chez les JNK et une Gly chez la p³⁸MAPK, tous localisés en amont de la séquence Ala-Pro-Glu (Figure I.19.) (Nishida et Gotoh, 1993; Davis, 1994). Par exemple, pour la ERK 2, il s'agit respectivement de la Thr 183 et de la Tyr 185.

Les isoformes de 42 et de 44 kDa (aussi appelées ERK2 et ERK1) font partie de la cascade mitogénique induite par les facteurs de croissance tels que l'EGF, le PDGF, le NGF ou l'insuline. Elles constituent les substrats directs de MEK1 et MEK2 (Figure I.20.).

Quant aux protéines kinases JNK, p46^{jnk} et p55^{jnk}, leur activation est induite par des stimuli aussi variés que les rayons UV, les cytokines dont l'IL-1 ou le TNF, ou les agents stressants. La p38^{mapk}, quant à elle, est activée en réponse aux lipopolysaccharides des bactéries Gram négatives. Contrairement aux protéines ERKs, la cascade de kinases aboutissant à leur activation n'est pas encore connue (Davis, 1994) (Figure I.21.).

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux MAPK ERK2 et ERK1 que nous appellerons par la suite p42^{mapk} et p44^{mapk}.

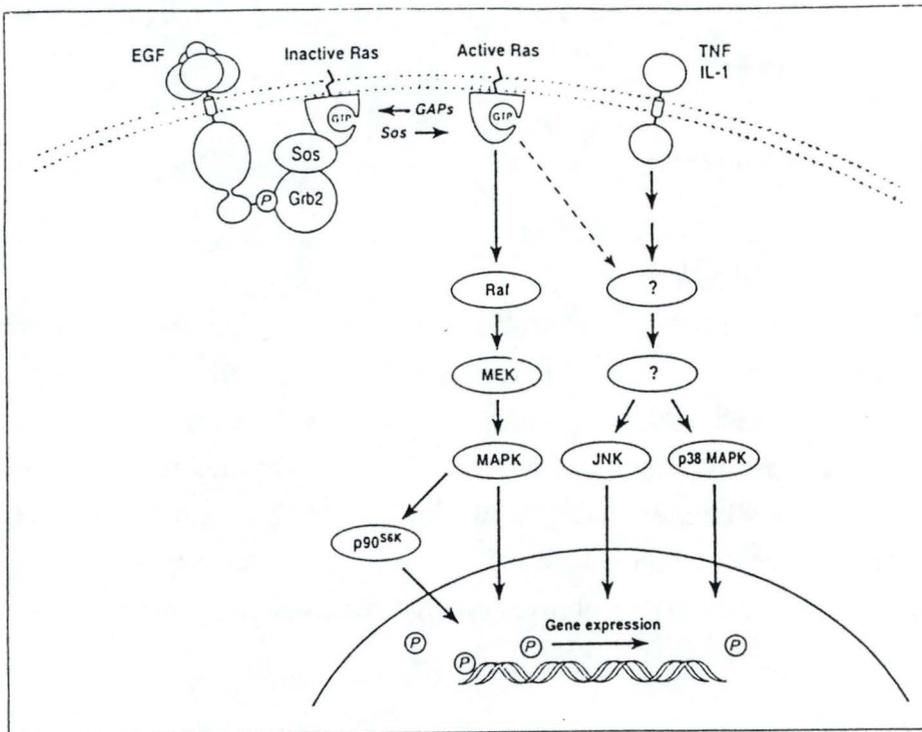


Figure I.21. : Implication des 3 types de MAP kinases dans les voies d'activation cellulaire (d'après Davis, 1994).

Table 1. Phosphorylation substrates for MAPK, Rsk90 and CaMKII involved in growth and differentiation.

MAPK substrates	Rsk90 substrates	CaMKII
Transcription factors	Transcription factors	Transcription factors
c-Myc	SRF	SRF
c-Jun	c-Fos	Ets-1
c-Fos	c-Jun	CREB
NF-IL6	Nur77	
Elk-1		
TAL1		
ATF2		
	Nuclear protein	
	Histone H3	
Protein kinases		
EGF receptor		
Rsk90		
MAPKAP		
Raf-1		
MEK-1		
Cytoskeleton		
Tau		
MAP-2		
Other		
cPLA ₂		
Tyrosine hydroxylase		

Table I.3. : Substrats actuellement connus des MAP kinases et de la protéine kinase p90^{rsk} (d'après Johnson et Vaillancourt, 1994).

Contrairement à Raf et à MEK, p42^{mapk} et p44^{mapk} activent une large gamme de molécules reprises dans la table I.3., parmi lesquelles, des protéines structurales, d'autres sérines/thréonines kinases, des facteurs de transcription et une phospholipase.

2.1.6.1. Les substrats des MAP kinases

La prolifération cellulaire requiert l'expression de gènes bien spécifiques. Les proto-oncogènes des familles *myc*, *fos* et *jun* font partie des gènes dits "immédiat précoces", rapidement induits par les facteurs de croissance, indépendamment de toute synthèse protéique. On n'est donc pas surpris de trouver parmi les nombreux substrats des MAPK des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de ces gènes (Table I.3.). Ces facteurs de transcription ainsi que leur mécanisme d'activation seront décrits au point 3.

La MAPK peut aussi phosphoryler d'autres protéines kinases situées soit en amont (par exemple Raf et MEK), soit en aval (par exemple, la MAPKAP-2 Kinase et la RSK90 kinase) dans la cascade de transduction:

- La protéine kinase RSK90 de 90 kDa ou p90^{rsk}, dont la phosphorylation induit l'activation. Dans les cellules quiescentes, la répartition de cette protéine dans la cellule est tout à fait homogène. La stimulation de la cellule induira, comme c'est le cas pour les MAPKs, sa translocation vers le noyau. Parmi les cibles de cette protéine, on trouve tout d'abord la protéine ribosomale 6S ainsi que toute une série de facteurs de transcription impliqués dans les réponses mitogéniques : c-Fos, c-Jun, Nur 77..., ainsi que des protéines nucléaires : les histones H3. On suspecte également la phosphatase PP1 d'être un substrat potentiel de la p90^{rsk}, ce qui ne serait pas surprenant quand on sait que l'activité "DNA-binding" de nombreux facteurs de transcription est stimulée par déphosphorylation (Ruderman, 1993).

- La MAPK associated protein kinase 2 (MAPKAP 2) qui, phosphorylée, active la glycogène synthase, elle même impliquée dans l'activation transcriptionnelle de *c-jun*. Nous en parlerons plus en détail au point 3.

- La MAPK peut aussi phosphoryler deux de ses activateurs directs ou indirects : Raf et MEK. La phosphorylation de Raf n'affecte en rien son activité kinasique, quant à la phosphorylation de MEK, elle semble constituer un mécanisme de régulation négative. Nous aborderons ce mécanisme dans le point 2.1.6.

Un des substrats récemment identifiés de la MAP kinase est la phospholipase cytoplasmique A₂ (cPLA₂). *In vitro*, la MAPK phosphoryle la cPLA₂ sur le résidu sérine

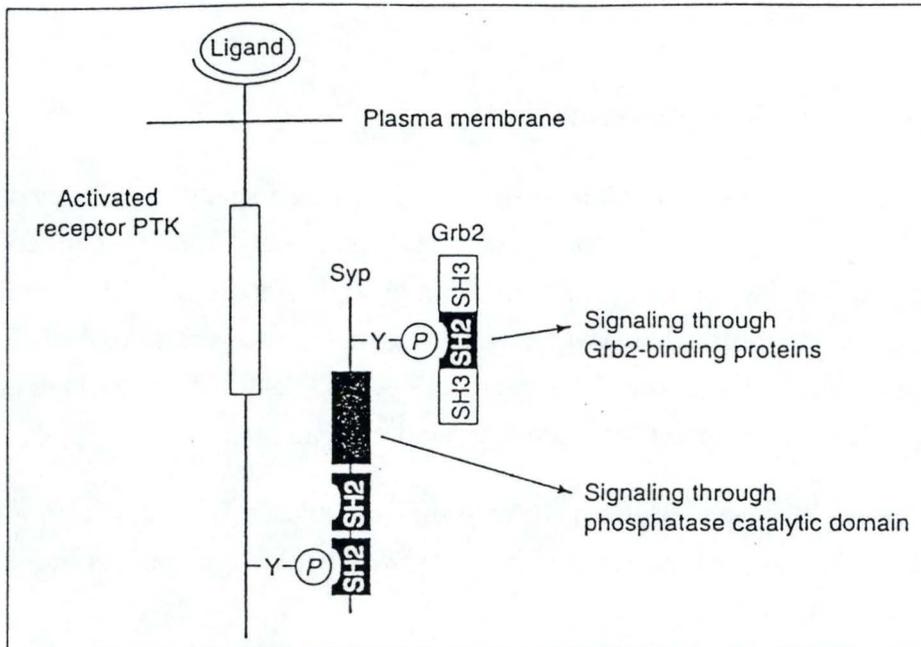


Figure I.22. : Rôles de la protéine tyrosine phosphatase Syp dans la transmission du signal mitogénique. Par l'intermédiaire de son domaine catalytique ou par son association à la protéine cytoplasmique Grb2, elle contribue à la propagation du signal de prolifération (d'après Sun et Tonks, 1994).

505 (Davis, 1994). Son activation induit sa translocation vers la membrane où elle hydrolyse le groupement 2-acyl des phospholipides, provoquant ainsi la libération de lysophospholipides et d'acide arachidonique (AA). Ce dernier peut être métabolisé suivant deux voies enzymatiques distinctes : la voie dite cyclooxygénasique qui donnera lieu à l'ensemble des prostaglandines et au thromboxane tandis que la voie lipoxygénasique induit la synthèse de leukotriènes et d'acides monohydroxyéicosatétraénoïques (Gualde, 1986).

Parmi les substrats de la MAPK, on trouve également des éléments du cytosquelette : MAP2 et la protéine Tau (τ). Il s'agit de deux protéines associées aux microtubules qui en interagissant avec la tubuline, jouent un rôle dans l'organisation du cytosquelette. Signalons que des formes hyperphosphorylées de Tau sont présentes dans les plaques neurofibrillaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

La séquence préférentiellement reconnue par la ser/thr kinase p42^{mapk} a été identifiée: Pro- X_n -Ser/Thr-Pro (X représentant n'importe quel acide aminé neutre ou basique, n = 1 ou 2) (Davis, 1994). Cette séquence consensus est un outil précieux dans l'identification d'éventuels autres substrats de cette MAPK.

2.1.7. REGULATION DE LA CASCADE DES KINASES CYTOPLASMIQUES

L'état de phosphorylation sur les tyrosines d'une molécule ne reflète pas seulement l'activité des protéines tyrosine kinases (PTKs) qui catalysent cette phosphorylation, elle reflète aussi l'activité de protéines tyrosine phosphatases (PTPs) responsables de la déphosphorylation de ces mêmes résidus (Sun et Tonks, 1994). Dans la cascade mitogénique décrite ci-dessus, les PTKs et les PTPs coordonnent leurs effets en vue de contrôler au mieux la réponse de prolifération.

La protéine Syp (aussi appelée PTP1D), exprimée dans toutes les cellules, est une PTP qui coopère avec les PTKs. Par l'intermédiaire de son domaine SH2, elle peut se lier au résidu phosphotyrosine 1009 du récepteur au PDGF. Cette liaison stimule son activité phosphatase (Figure I.22.). Les substrats de Syp ne sont pas encore connus, cependant les protéines src, kinases qui seraient également recrutées par les PTKs, constituent des substrats potentiels. Les protéines src se caractérisent par la présence d'un site phospho-tyrosyl inhibiteur dans leur domaine carboxy-terminal. L'inhibition résulte de l'association intramoléculaire entre le site phosphorylé et le domaine SH2 de la kinase. La déphosphorylation de ce résidu inhibiteur par la protéine Syp activée induit leur activation. Lié au récepteur, Syp est en plus phosphorylée sur sa tyrosine 542. Ce résidu fait partie d'une séquence

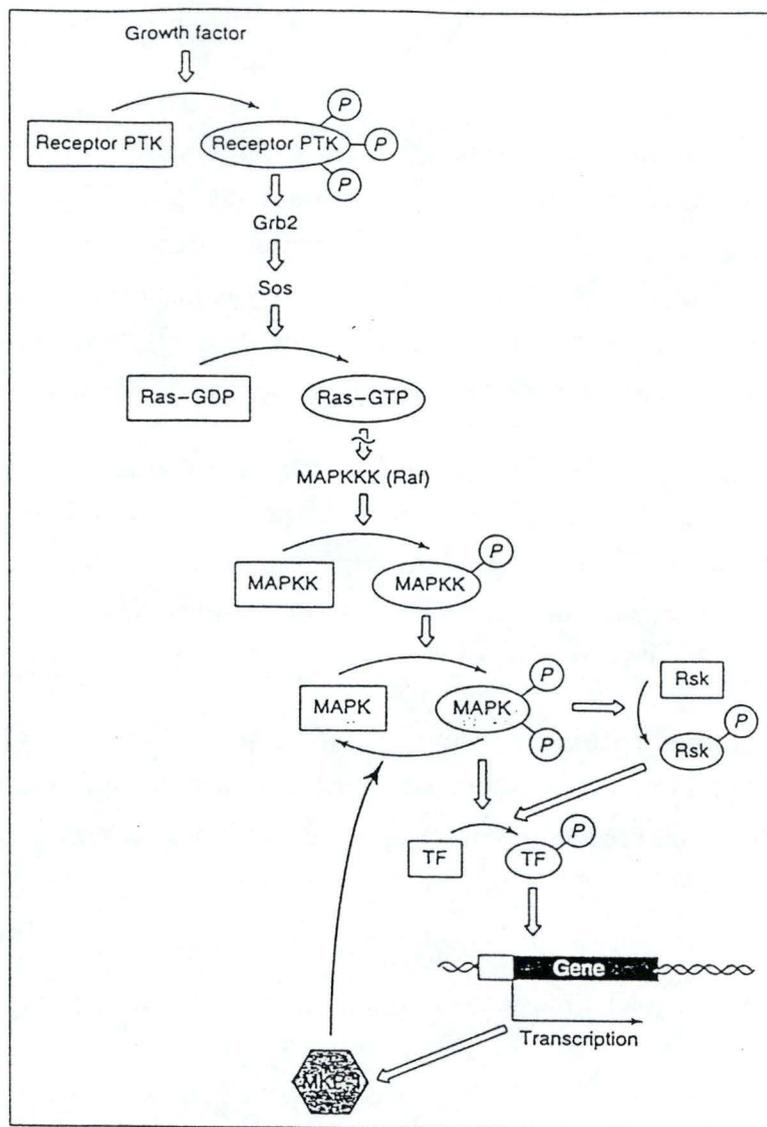


Figure I.23. : Rôle de la protéine phosphatase MKP-1 dans la régulation de la cascade cytoplasmique (Sun et Tonks, 1994).

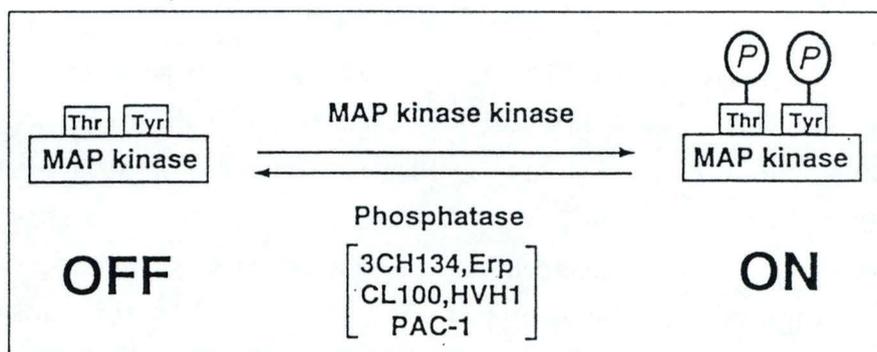


Figure I.24. : Représentation schématique des effets antagonistes induits par les kinases et les phosphatases dans la régulation de l'activité de la MAP kinases (Nebrada, 1994).

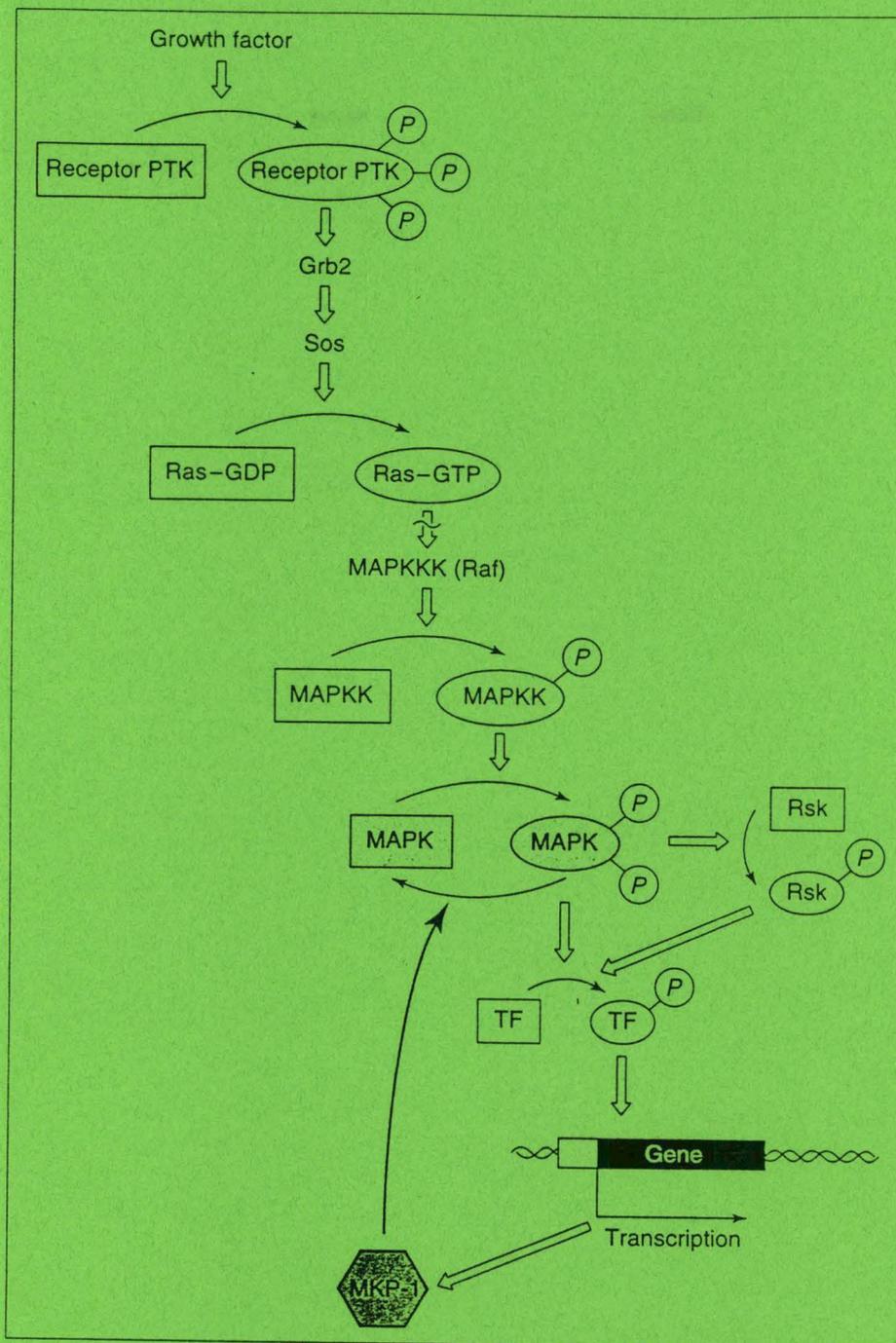


Figure 4

A brief summary of our current appreciation of the cellular responses to activation of a growth factor receptor protein tyrosine kinase (PTK) binding to its cognate ligand. Autophosphorylation of the receptor creates docking sites that recruit the adaptor protein Grb2, leading to activation of Sos, the GDP-GTP exchanger for Ras. Then a cascade of phosphorylation is triggered, leading to activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). MAPK in turn phosphorylates transcription factors (TF), either directly or through activation of another Ser/Thr kinase, Rsk, thus promoting the transcription of genes required for the growth response. One of the genes induced by growth factor stimulation, presumably through the MAPK pathway, encodes a MAPK phosphatase (MKP-1). As denoted by the filled arrow, MKP-1 may feed back on the pathway by dephosphorylating and inactivating MAPK, thus attenuating the signaling response.

Représentation schématique de la cascade de transduction du signal lié au PDGF montrant le couplage entre le récepteur à activité protéine tyrosine kinase (PTK) et la cascade des kinases cytoplasmiques, dont les MAP kinases (MAPK). Celles-ci activent entre autres plusieurs facteurs transcriptionnels (TF). Les principales étapes de phosphorylation sont également représentées (d'après Sun et Thonks, 1994).

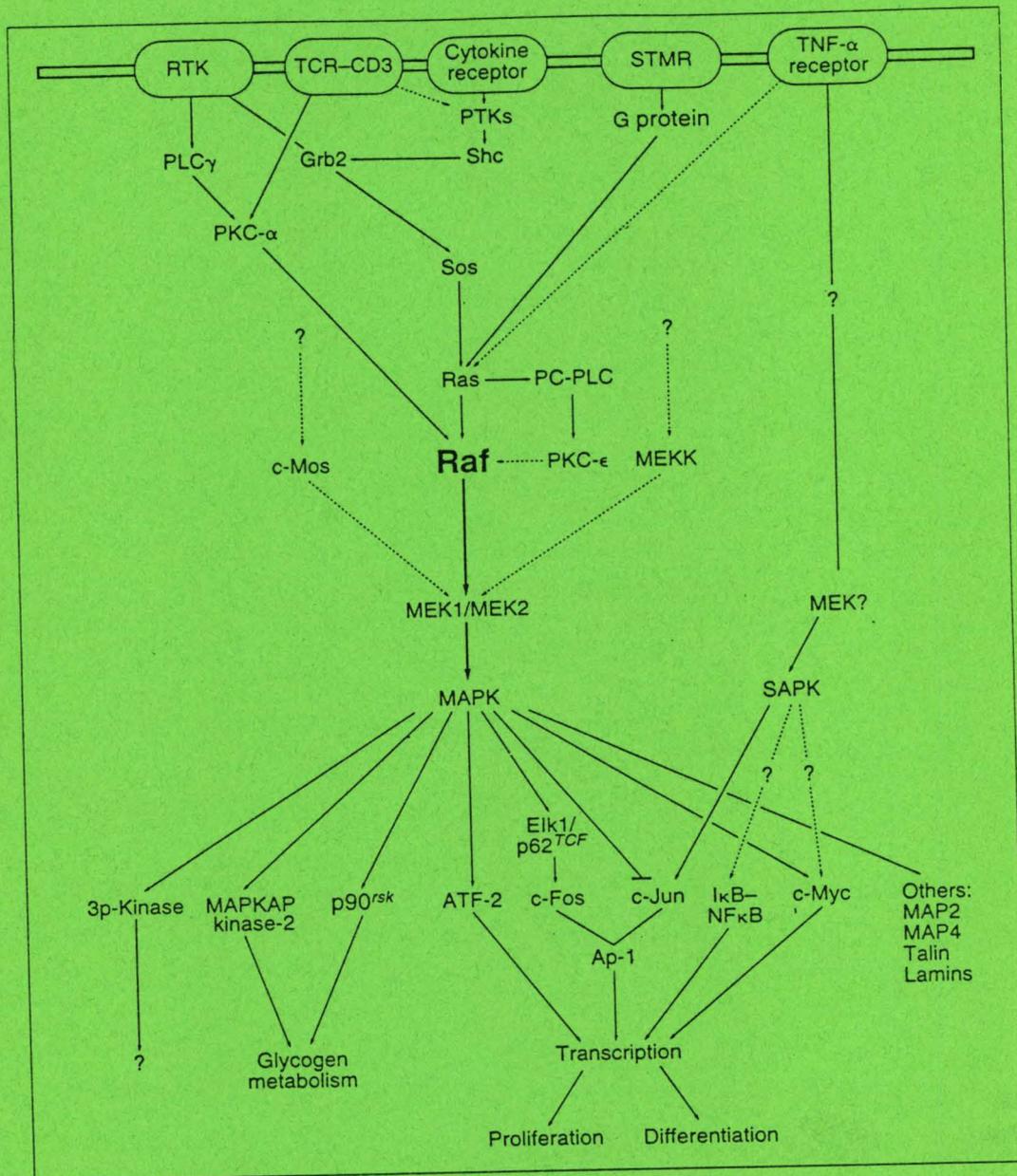


Figure 3

Raf-dependent signal transduction. For clarity, additional pathways, such as JAK/STAT-mediated signalling, are omitted, as are feedback phosphorylation reactions. Raf is activated upon stimulation of a variety of receptors. Together with MAP/ERK kinase (MEK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK; also known as extracellular-receptor-activated protein kinase, ERK) it forms the highly conserved cytoplasmic kinase cascade. MAPK acts on numerous effector molecules, such as other serine/threonine kinases or transcription factors, which finally determine the cellular response. See text for details. The 3p-kinase is a novel protein kinase that is encoded by a gene on the short arm of chromosome 3, and is related to MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAP kinase-2; G. Sithanandam, pers. commun.). To indicate connections between different signal transduction pathways, tumour necrosis factor α (TNF- α) signalling, including stress-activated protein kinases (SAPKs)³⁹, is illustrated.

Représentation schématique des diverses voies d'activation des MAP kinases (MAPK) par le PDGF, via son récepteur (RTK) et par d'autres agents stimulateurs telles les cytokines. Le schéma résume également les principaux substrats actuellement reconnus des MAP kinases et leur implication éventuelle dans les réponses cellulaires telles que la prolifération (d'après Daum et al., 1994).

consensus (YTNI) reconnue par le domaine SH2 de la protéine Grb2. Syp participe donc aussi en tant qu'adaptateur à la transduction du signal de prolifération.

Il existe d'autres phosphatases qui contrebalancent ce système, notamment les protéines HCP (pour hematopoietic cell PTP, aussi appelée PTP1C). Munies d'un domaine SH2 dans leur partie amino-terminale, elles s'associent aux RTKs activés, les déphosphorylent, eux ou les protéines qui y sont associées, interrompant ainsi la voie d'activation (Sun et Tonks, 1994).

Un des gènes induit au terme de la cascade des MAP kinases est le gène 3CH134. Ce gène "immédiat précoce" identifié chez les fibroblastes de souris, code pour une MAPK phosphatase spécifique tant pour les résidus thréonines que les résidus sérines, la MKP-1 (MAP Kinase Phosphatase-1). Elle inactive la MAP kinase en déphosphorylant ses deux sites régulateurs (Thr 185 et Tyr 183) (Sun et Tonks, 1994). Dans ce cas, les MAPK régulent par une boucle de rétro-action négative leur propre voie d'activation (Figure I.23.). D'autres Tyr/Thr phosphatases impliquées dans la régulation des MAPK ont été identifiées (CN100, un homologue humain de la MKP-1 induite lors de stress oxydatifs; PAC-1; HVH-1) (Nebrada, 1994) (Figure I.24.)

D'autres phosphatases moins spécifiques peuvent contrecarrer les effets des PTKs. C'est le cas de la protéine phosphatase 2A (PP2A), une Ser/Thr phosphatase et la protéine CD45 qui déphosphoryle sélectivement les résidus tyrosine.

L'intervention de phosphatases n'exclut pas la possibilité d'autres mécanismes de contrôle. La MAP kinase elle-même est capable de phosphoryler plusieurs composants de la cascade : le récepteur à l'EGF, le nucléotide exchange factor Sos, Raf ainsi que son propre activateur MEK. La MAPK active est capable de phosphoryler MEK à la fois *in vitro* et *in vivo*, sur deux résidus thréonine (thr 292 et thr 386), c'est-à-dire sur des sites différents de ceux phosphorylés par Raf. La comparaison *in vivo* de l'activité de la forme normale et de la forme mutée, non rétrophosphorylable de MEK montre que cette rétro-phosphorylation constitue un mécanisme de régulation négative (Brunet, 1994).

En conclusion, la transduction du signal du PDGF et la cascade des kinases qui lui est associée sont d'une grande complexité moléculaire (Figure I.25.). Si les grandes étapes commencent à être bien connues, il n'en demeure pas moins que c'est un domaine de la biologie cellulaire qui reste en évolution permanente, surtout en ce qui concerne les mécanismes de régulation et les interférences avec les autres voies d'activation cellulaire.

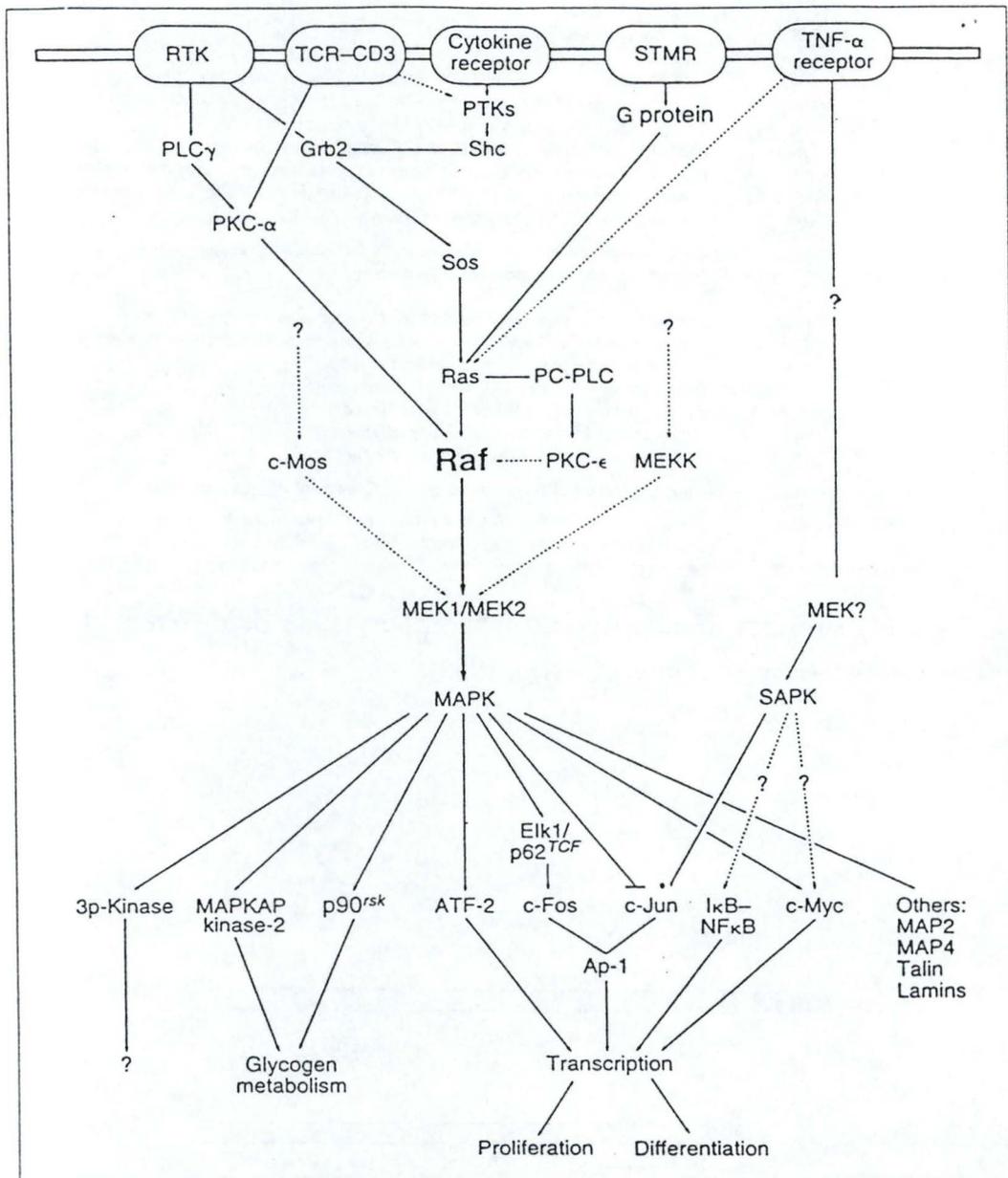


Figure I.25. : Représentation schématique de la cascade de transduction du PDGF à partir des RTKs. Mise en évidence des interconnexions possibles avec d'autres voies de transduction intracellulaires, correspondant à d'autres signaux activateurs, tels que les cytokines (d'après Daum *et al.*, 1994).

Table 1. Mechanisms of Transcription Factor Regulation by Phosphorylation

Mechanism of Regulation	Protein	Effect of Phosphorylation
Regulation of nuclear translocation	SWI5	Cdc28 phosphorylation of Ser-552, Ser-646, and Ser-664 in SWI5 inhibits nuclear import
	NF- κ B	Phosphorylation of κ B regulatory subunit triggers nuclear import
	C/EBP β	?
	NF-AT	?
Regulation of DNA binding	ISGF3	Tyrosine phosphorylation of ISGF3 α
	Inhibition of binding	
	c-Myb	CKII phosphorylation of Ser-11/12 inhibits binding to low affinity sites
	c-Jun	Phosphorylation of one or more sites in Thr-231–Ser-249 by GSK-3 or CKII inhibits binding
	Max	CKII phosphorylation of Max inhibits Max dimer binding
	Myogenin	PKC phosphorylation in DNA-binding domain inhibits binding
	Oct1	Phosphorylation of Ser-385 in DNA-binding domain inhibits binding in mitosis
Stimulation of binding	GHF-1/Pit1	Phosphorylation of Thr-220 by PKA or PKC inhibits binding to some response elements
	Ets-1	Ca ²⁺ -dependent phosphorylation may inhibit DNA binding
	SRF	CKII phosphorylation of sites upstream of DNA-binding domain increases binding on/off rate
Regulation of transactivation	E2F and E4F	Phosphorylation may increase DNA binding
	Stimulation of transactivation	
	CREB	Phosphorylation of Ser-133 by PKA (or CAM kinases I or II) stimulates transactivation
	c-Jun	Phosphorylation of Ser-63/73 in response to mitogens/oncoproteins stimulates transactivation
	c-Myc	Phosphorylation of Ser-62 stimulates transactivation
	C/EBP β	Phosphorylation of Ser-276 stimulates transactivation
	GAL4	Phosphorylation may stimulate transactivation
	Yeast HSF	Phosphorylation may stimulate transactivation
	STE12	Phosphorylation may stimulate transactivation
	Stimulation of transrepression	c-Fos
Inhibition of transactivation	v-ErbA	Phosphorylation of Ser-16/17 by PKA or PKC needed for repression of c-ErbA activity
	ADR1	Phosphorylation of Ser-230 by PKA inhibits transactivation

Table I.4. : Mécanismes de régulation par phosphorylation de différents facteurs de transcription (d'après Hunter et Karin, 1992).

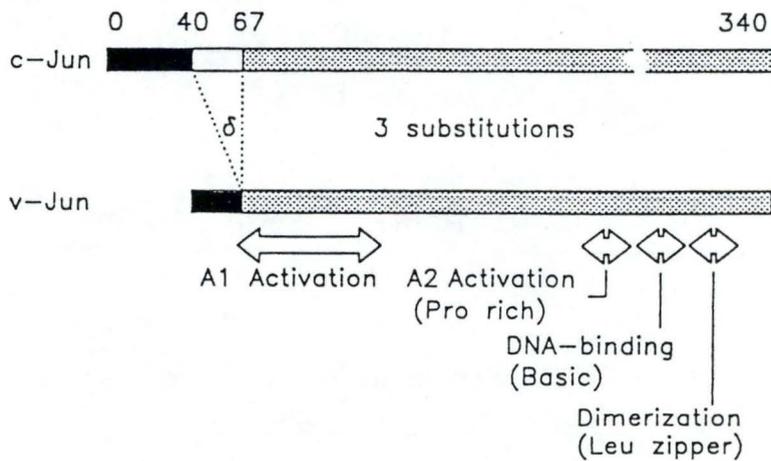


Figure I.26. : Comparaison de la séquence protéique de la protéine c-Jun et de son homologue oncogénique viral (d'après Lewin, 1991).

3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Une cellule est capable de réguler différemment l'expression de ses gènes, en fonction des stimuli environnementaux qu'elle perçoit ; c'est d'une importance vitale pour la survie, la croissance et la différenciation cellulaire (Karin, 1991).

L'initiation de la transcription d'un gène par la RNA polymérase II est contrôlée par les facteurs de transcription régulateurs des facteurs trans. Ceux-ci, en se liant aux éléments cis du promoteur d'un gène régulent sa transcription (Jackson, 1992).

L'activité de ces régulateurs transcriptionnels est elle-même régulée. Bien que les facteurs de transcription puissent être modifiés par le jeu des glycosylations et des déglycosylations, diverses expériences ont montré que la phosphorylation est la voie la plus fréquemment utilisée : d'une part, de nombreux facteurs de transcription voient leur activité modulée suite à une phosphorylation, d'autre part, les voies de transduction du signal influençant l'activité des facteurs passent souvent par une cascade de protéines kinases (Jackson, 1992).

La phosphorylation est un mécanisme de régulation rapide et réversible qui peut modifier l'activité d'un facteur de transcription à plusieurs niveaux (Hunter, 1992):

- Certains facteurs de transcription de par leur association à d'autres protéines sont séquestrés dans le cytoplasme ; leurs cibles ne leur sont donc pas accessibles. La phosphorylation du facteur de transcription lui-même ou d'une protéine associée va induire sa translocation vers le noyau et, par là, son activité. C'est le cas du facteur NF- κ B qui sera détaillé au point 3.2.

- La phosphorylation peut réguler positivement ou négativement l'activité du domaine de liaison au DNA du facteur de transcription (DBD ou DNA Binding Domain).

-Enfin, la phosphorylation peut aussi moduler dans les deux sens l'activité du domaine transactivateur du facteur (TAD ou Transactivation Domain).

La liste des facteurs transcriptionnels s'allonge régulièrement (Table I.4.). Parmi ceux-ci, nous nous focaliserons plus particulièrement sur le facteur AP-1 et le facteur NF- κ B. Le premier est généralement reconnu pour jouer un rôle dans les réponses cellulaires induites par les facteurs de croissance (Angel *et al.*, 1987). Le second est plus particulièrement impliqué dans la transduction du signal de l'IL-1. Au laboratoire, Raes *et al.* (1994) ont montré que l'IL-1 activait bien le facteur NF- κ B dans le modèle de fibroblastes de poumon.

Nous vérifierons donc si le PDGF peut également l'activer, d'autant plus que Olashaw *et al.*, 1992. ont montré que le PDGF, sur un modèle de fibroblastes Balb C3T3, induisait une activation modérée de facteur NF- κ B.

3.1. LE FACTEUR AP-1

Un des principaux facteurs de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire est le facteur AP-1 (Activator Protein 1). Ce facteur recouvre toute une série d'homo- et d'hétérodimères, qui résultent de la combinaison de protéines appartenant à deux familles : fos (quatre gènes : *c-fos*, *fos B*, *fra-1*, *fra-2*) et jun (3 gènes : *c-jun*, *jun B*, *junD*). *c-jun* et *c-fos* sont les gènes dont l'étude est la plus avancée car ils ont été les premiers identifiés en tant que proto-oncogènes : leur traduction sous forme tronquée ou remaniée, soit par des rétrovirus, soit accidentelle dans les cellules eucaryotes (suite à une mutation, délétion, activation par translocation ou duplication chromosomique, ...) leur confère un pouvoir oncogénique pour certains types cellulaires. Les sites de fixation du facteur AP-1, appelés sites AP-1, ont été identifiés initialement dans le promoteur des gènes de collagénases, de la stromélysine et dans le promoteur précoce du virus SV-40 (Herbomel, 1993). Le motif consensus de ce site "TGACTCA", est également appelé TRE (TPA response element) parce qu'il médie aussi l'induction de gènes par le TPA (ou 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate, encore appelé phorbol 12-myristate 13-acétate ou PMA).

3.1.1. *c-JUN*

c-jun est un gène sans intron codant pour une protéine de 314 acides aminés et d'un poids moléculaire de 34 kDa. La protéine v-Jun rétrovirale (présente dans l' "avian sarcoma virus" 17, ASV17) diffère de son homologue c-Jun proto-oncogénique par trois substitutions ponctuelles, la Gly 185, Ser 226 et Cys 252 qui remplacent respectivement une Arg, une Phe et une Ser, ainsi que par l'absence à l'extrémité N-terminale d'une région supplémentaire de 27 acides aminés appelée région δ (Castellazzi, 1993) (Figure I.26.). Les protéines de la famille Jun sont toutes des activateurs transcriptionnels bien que d'une efficacité variable. Elles sont homologues à plus de 95 % dans le domaine C-terminal. Ce domaine comprend une région riche en acides aminés basiques (Lys, Arg) : c'est le domaine de liaison au DNA qui contacte directement et spécifiquement les sites AP-1. Ce domaine est contigu à une région de

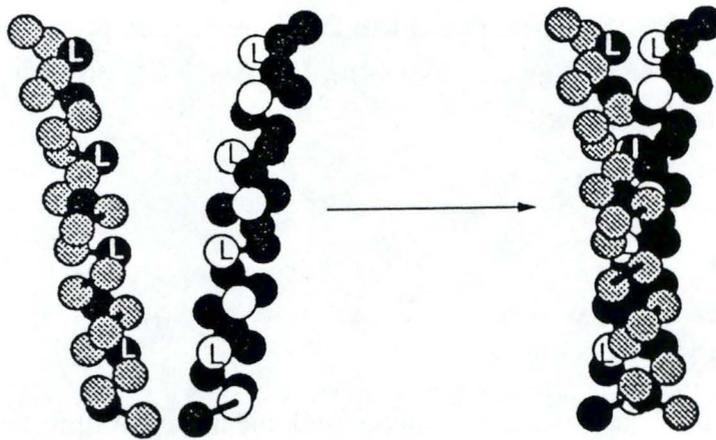


Figure I.27. : Représentation schématique de la structure "coiled-coil" du "leucine zipper" (d'après Latchman, 1992).

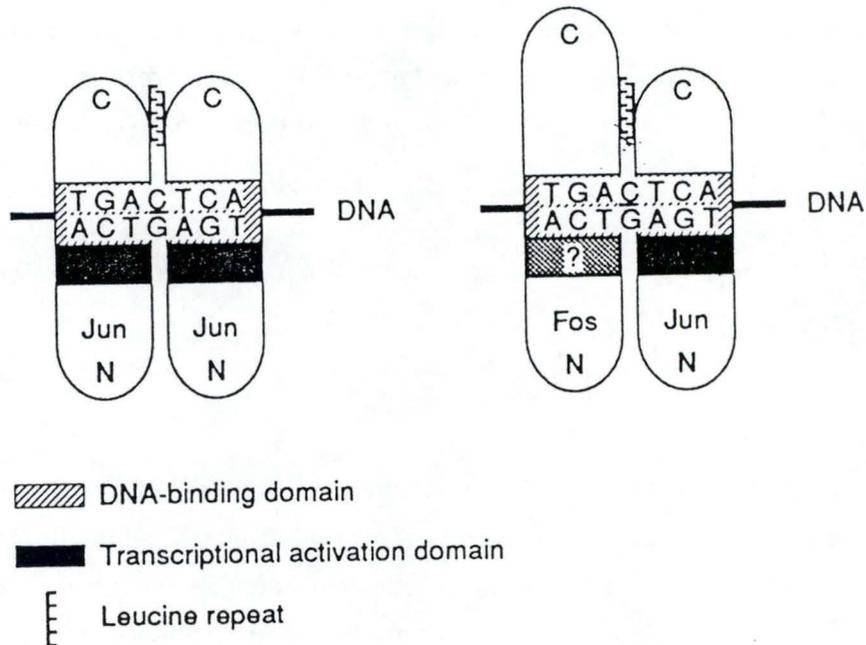


Figure I.28. : Modèle de liaison à l'ADN de l'homodimère Jun-Jun et de l'hétérodimère Fos-Jun (Latchman, 1992).

dimérisation caractérisée par une répétition de leucines tous les 7 acides aminés et qui adopte une structure en hélice α . On appelle ce motif structural de dimérisation le leucine zipper (ZIP). La fixation à l'ADN de Jun ne peut se faire que sous forme dimérique. Les hélices α de deux monomères se torsadent l'une autour de l'autre, faisant interagir leur face hydrophobe. Les deux hélices α associées en dimères adoptent ainsi une structure en hélice appelée "coiled-coil", que l'on traduit en français par "dimère en hélice" (Castellazzi, 1993) (Figure I.27.). La dimérisation a pour effet d'agencer les domaines basiques des deux monomères de façon appropriée pour leur interaction concertée avec l'ADN (Figure I.28.).

Le grand intérêt de ces motifs de dimérisation relativement standardisés, c'est qu'ils rendent possible la formation d'hétérodimères variés entre protéines comprenant ce même motif ZIP (Herbomel, 1993) (Figure I.29.).

La transcription de *c-jun* est stimulée par de nombreux signaux extracellulaires tels que des facteurs de croissance, des cytokines, le TPA, les rayons ultraviolets et d'autres agents génotoxiques. L'activation transcriptionnelle de *c-jun* est un processus en deux étapes. Les protéines Jun préexistantes sont d'abord modifiées par phosphorylation/déphosphorylation, à la suite d'une cascade impliquant différentes kinases et une ou plusieurs phosphatases. Ensuite, les protéines Jun activées stimulent la transcription de leur propre messenger et participent à la modulation de l'expression d'autres gènes AP-1-dépendants (Castellazzi, 1993).

L'activation de la PKC par le TPA induit la déphosphorylation de la thréonine 239 et des sérines 243 et 249 situées à proximité du domaine basique via une phosphatase encore non identifiée (Figure I.30.). Cette déphosphorylation coïncide avec une augmentation de l'affinité des homodimères c-Jun/c-Jun pour les sites AP-1. *In vitro*, des expériences ont montré que la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et la caséine kinase II (CKII) pouvaient phosphoryler spécifiquement ces résidus (Papavassilio, 1993). Le modèle qui émerge est le suivant : Jun est présent en quantité réduite dans les cellules épithéliales et fibroblastiques, et dans ces cellules, la protéine est phosphorylée sur deux ou trois sites, Thr 239, Ser 243 et Ser 249. La phosphorylation constitutive de ces acides aminés par CKII et la GSK3, inhibe partiellement la fixation de Jun à l'ADN *in vitro* et pourrait rendre compte de la faible activité basale de AP-1 *in vivo*.

La microinjection de pseudosubstrats bloquant l'activité de la CKII induit l'expression de *c-jun* et conduit à une activation efficace de la transcription (Castellazzi, 1993). L'injection intranucléaire de CKII inhibe à la fois l'activation induite par le TPA ainsi que l'activité basale de Jun (Lin, 1993). Ceci suggère que le traitement des cellules par le TPA activerait une phosphatase qui en déphosphorylant un ou plusieurs de ces acides aminés augmenterait l'affinité de la protéine Jun pour les motifs AP-1. On ne connaît pas encore la

	Domaine basique	Leucine zipper
Fos	LSPEEEKRRIRRRERNKMAAAK	RNRRELTDTQAETDQDEKSAQTEIANLKEKEKEFILAAH
Fra 1	LSPEEEERRRVRRRERNKLAALK	RNRRELTDQQAETDKDEKSGQREIEEQKQKERELVLEAH
Fos B (Fra 3)	LTPEEEKRRRVRRRERNKLAALK	RNRRELTDQQAETDQDEEKAEQSEIAEQKEKEREFVLVAH
Jun	PPLSPIDMESQERIKAEKRRMRNRIAASK	RKRKLERIARDEEKVKTAKAQNSEASTANMREQVAQKQKVMNH
Jun B	PPVSPINMEDQERIKVERKRLRNRLAATK	RKRKLERIARDEKVKTKAENAGSSAAGLREQVAQKQKVMTH
Jun D	PPLSPIDMDTQERIKAEKRLRNRIAASK	RKRKLERISRDEEKVKTAKSQNTEASTASLREQVAQKQKVLSH

Figure I.29. : Similarité au sein des séquences dans la région du leucine zipper des divers membres des familles Fos et Jun. En noir dans le domaine basique, la cystéine dont l'état de réduction est essentiel à la fixation du dimère sur l'ADN (d'après Blanchard, 1992).

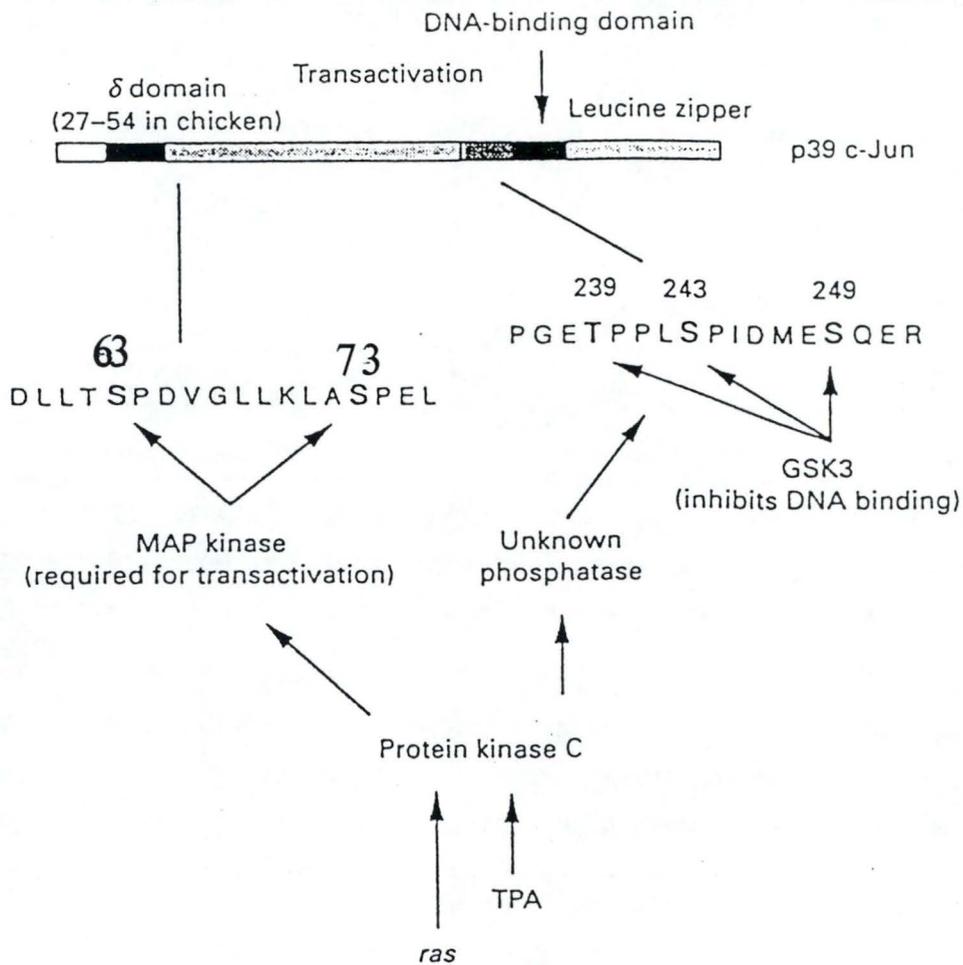


Figure I.30. : Schéma illustrant le mode d'activation de la protéine c-Jun. La voie de la PKC (partie droite) aboutit à la déphosphorylation du "DNA-binding domain" tandis que la voie des MAP kinases induit la phosphorylation du domaine responsable de la transactivation (d'après Meek et Street, 1992).

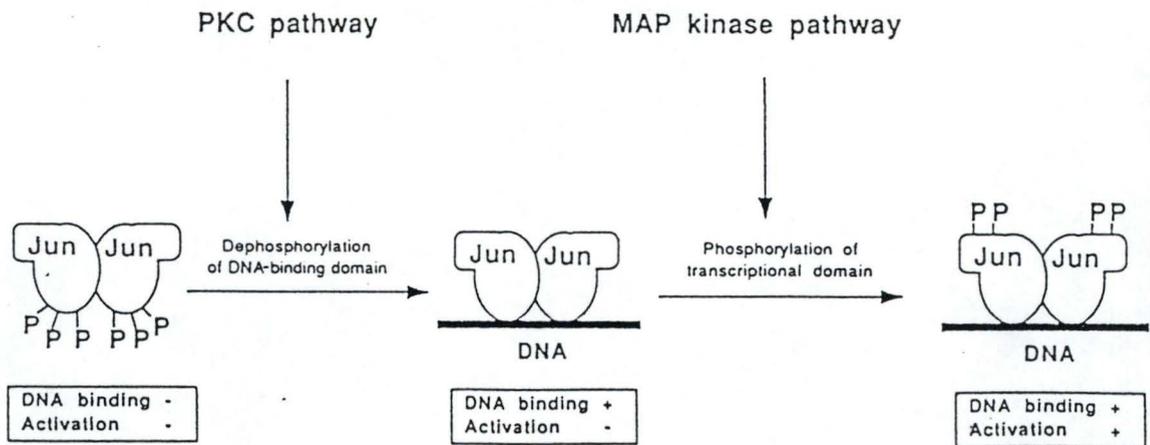


Figure I.31. : Mécanisme de régulation du facteur transcriptionnel Jun-Jun par les mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation (d'après Jackson, 1992).

phosphatase responsable de cette activation et on ne sait pas si elle est activée directement par la kinase C ou via une enzyme intermédiaire.

La réponse aux facteurs de croissance comme le PDGF ou l'EGF ne se limite pas à ces effets, sans doute parce que leur récepteurs, par leur activité tyrosine kinase, n'activent pas seulement la voie de la PKC mais aussi d'autres voies, en phosphorylant directement des kinases, comme nous l'avons précédemment décrit dans l'introduction (Herbomel, 1993).

On suspecte la cascade des MAP kinases de jouer également un rôle dans la régulation positive de Jun. En effet, une augmentation de l'activité transcriptionnelle de c-Jun est aussi induite par la surexpression d'oncogènes transformants *Ha-ras*, *v-src* (Castellazzi, 1993). La protéine oncogénique Ha-Ras affecte la phosphorylation de Jun en augmentant la phosphorylation de sa région N-terminale, ce qui a pour effet d'augmenter son potentiel transactivateur. Ha-Ras induit aussi la déphosphorylation des sites phosphorylés par la CKII, ce qui augmente aussi sa fixation à l'ADN. Les sites phosphorylés en réponse à l'expression de *Ha-ras* sont les sérines 63 et 73 situés à proximité du domaine d'activation transcriptionnelle (Castellazzi, 1993) (Figure I.30.).

Les effecteurs terminaux de Jun sont encore mal connus. Cependant, deux kinases, les MAPK p54 et p42/44 phosphorylent spécifiquement les ser 63 et 73 *in vitro* (Pulverer, 1991) et font figure de candidats potentiels (Figure I.30. et I.31.).

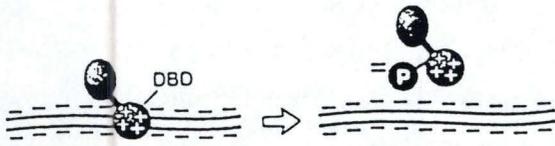
D'autres mécanismes de régulation sur le niveau de phosphorylation de Jun ont été décrits :

- Une protéine appelée IP-1 (Inhibitory Protein 1) présente dans le cytoplasme et le noyau de différents types cellulaires bloque la fixation à l'ADN du complexe AP-1, mais uniquement sous sa forme déphosphorylée (Jackson, 1992). Incubée en présence de PKA, elle est rapidement inactivée.

- La fixation de Jun sur l'ADN est aussi régulée, au moins *in vitro*, par l'état d'oxydo-réduction de la cystéine localisée dans le domaine basique (Figure I.29.). La réduction de cette cystéine stimule la fixation de Jun sur les séquences AP-1 *in vitro*, et est induite par des agents réducteurs ainsi que par une protéine nucléaire, appelée ref-1, elle-même soumise à une régulation d'oxydo-réduction puisque son activité est augmentée par la thiorédoxine (Castellazzi, 1993). Il est intéressant de noter que cet acide aminé est remplacé dans la protéine oncogénique rétrovirale v-Jun par une sérine, ce qui élimine toute possibilité de régulation par l'oxydo-réduction.

Rappelons enfin que le domaine transactivateur de c-Jun est également phosphorylé en réponse aux ultraviolets. Comme nous l'avons signalé au point 2.1.6., c'est la MAP kinase

a



b

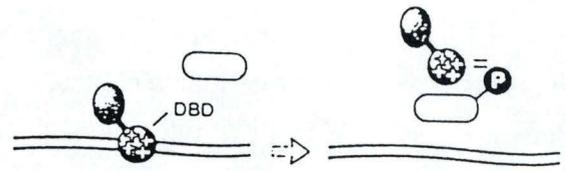
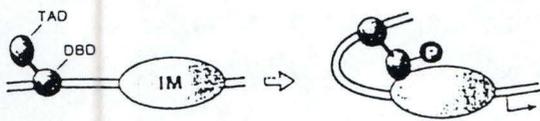


Figure I.32. : Mécanismes possibles d'inactivation du "DNA Binding Domain" (DBD) de Jun par la phosphorylation (d'après Hunter et Karin, 1992).

a



b

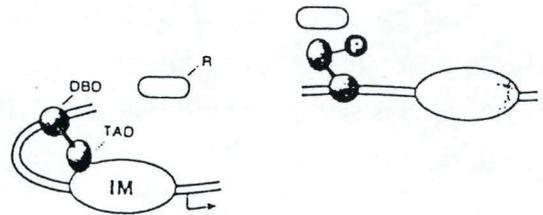
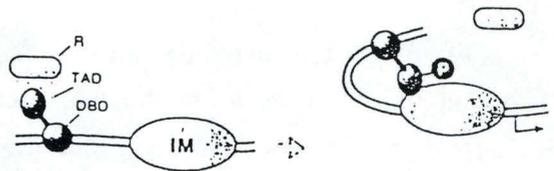


Figure I.33. : Mécanismes possibles de régulation du "Transactivating Domain" (TAD) de Jun par la phosphorylation (R = repressor protein, IM = initiation machinery) (d'après Hunter et Karin, 1992).

JNK1 ("c-Jun NH2-terminal kinase 1") qui en est responsable. Signalons que Ha-Ras active partiellement JNK1 et potentialise ainsi l'activation cellulaire induite par les ultraviolets (Dérijard *et al.*, 1994).

Les mécanismes par lesquels la phosphorylation inhibe l'activation du DBD de Jun ne sont pas encore bien clairs. Cependant, plusieurs modèles ont été proposés :

- Si les sites de phosphorylation sont localisés dans ou à proximité du domaine DBD (comme c'est le cas pour c-jun) leur phosphorylation induit une répulsion électrostatique entre les groupements phosphates de la protéine et les phosphates du DNA (Hunter, 1992) (Figure I.32a.).

- Si les sites sont relativement loin du DBD, leur phosphorylation induit une modification conformationnelle qui altère l'activité du DBA.

- On a également émis l'hypothèse que la phosphorylation pouvait affecter la stabilité du dimère formé (Figure I.32b.).

Quant aux mécanismes par lesquels la phosphorylation module l'activité du TAD, ils sont eux aussi très spéculatifs :

- La phosphorylation pourrait augmenter ou diminuer l'affinité du TAD pour un composant de la machinerie transcriptionnelle ou pour une protéine qui médie son interaction avec celle-ci (Figure I.33a.).

- La phosphorylation pourrait aussi induire la dissociation ou l'association du TAD avec une protéine inhibitrice (Figure I.33b.).

3.1.2. *c-FOS*

Le gène *c-fos* appartient à une famille multi-génique dont plusieurs membres très voisins (*c-fos*, *fos B*, *fra-1*, *fra-2*) ont été décrits chez l'homme, la souris, le rat ou le poulet. Ces protéines présentent une homologie de séquence (70 à 80 %) localisée principalement dans la région centrale qui est responsable de l'interaction avec l'ADN ainsi que de la dimérisation (Figure I.34.). Les protéines Fos interagissent avec la région régulatrice de nombreux gènes, pouvant y exercer des interactions soit positives (gènes de la collagénase et de kératine), soit négatives par exemple pour le proto-oncogène *c-myc*.

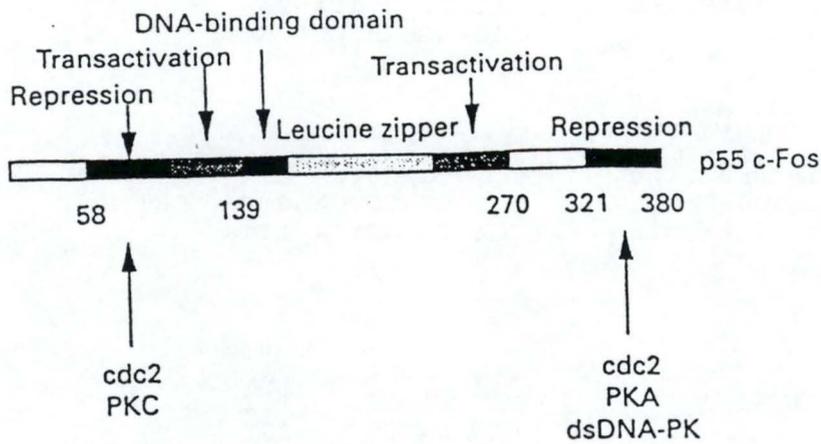


Figure I.34. : Phosphorylation de la protéine Fos observée *in vitro* avec des kinases purifiées. Les 2 domaines représentés en noir exercent une action négative sur la transcription. Le domaine carboxy-terminal, riche en sérines, est indispensable à l'autorépression du gène *c-fos*. DNA-PK est une protéine ser/thr kinase nucléaire capable de phosphoryler hsp 90, Sp 1, ou la p53 après fragmentation de l'ADN (d'après Meek et Street 1992).

	c-Jun	JunB	JunD	c-Fos	FosB	Fra1	Fra2
c-Jun	+	+	+	+	+	+	+
JunB	+	+	+	+	+	+	+
JunD	+	+	+	+	+	+	+
c-Fos	+	+	+	-	-	-	-
FosB	+	+	+	-	-	-	-
Fra1	+	+	+	-	-	-	-
Fra2	+	+	+	-	-	-	-

c-Jun	IARLEEKVKTLKAQNSLSTANMLRQVAQLKQKVM									
	*		*		*		*		*	
	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3

Figure I.35. : Dimérisation des protéines bZIP de type Fos et Jun. Combinaison des dimères possibles (+) ou non (-) *in vitro* (d'après Castellazzi et Sergeant, 1993).

AP-1/TRE

SV40	TGC TGAC TAA TTG
Collagénase	GTC TGAC TCA TGC
Stromelysine	AAC TGAC TCA TAA
c-Jun	GGG TGACATCA TGG

CREB/CRE

Fibronectine	CCG TGACGTCA CCC
Somatostatine	TCC TGACGTCA GCC
Gonadotropine	CCA TGACGTCA ATT

ATF/CRE

E4	AAA TGACG	TAA
HTLV-1 I	CTC TGACG	TCT
II	CCC TGACG	TGT
III	CGT TGACG	ACA

Figure I.36. : Comparaison des séquences d'ADN fixant les facteurs de transcription AP1, CREB et ATF. Les séquences contactées directement par les différentes protéines sont représentées en gras (d'après Castellazzi et Sergeant, 1993).

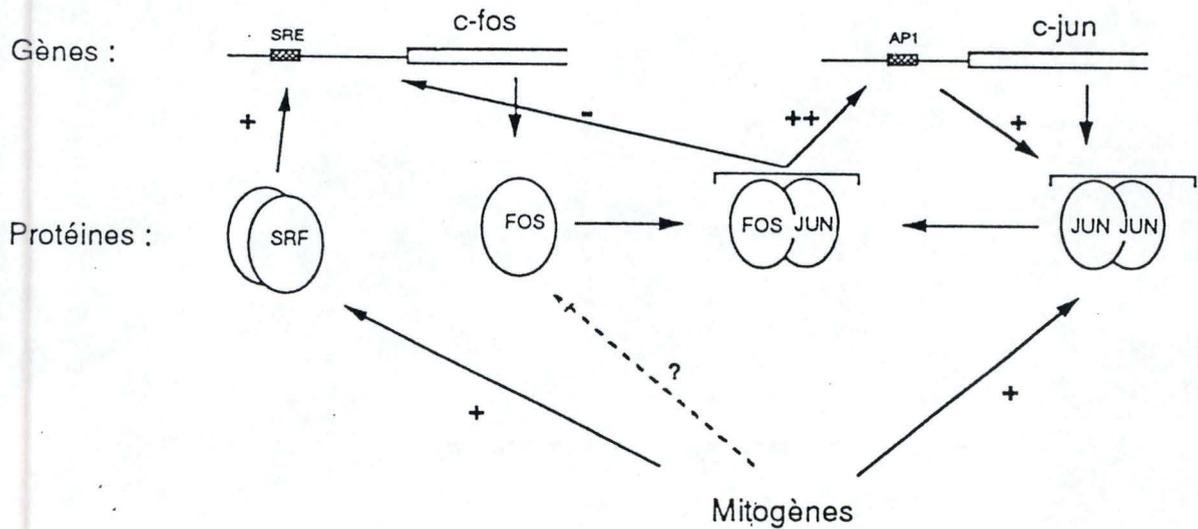


Figure I.37 : Rôle de l'autorégulation des gènes *fos* et *jun* par leurs produits dans la première phase de la réponse cellulaire aux mitogènes (d'après Herbomel, 1993).

Les stimuli qui induisent la transcription de *c-fos* affectent l'activité du "Serum Response Factor" (SRF) qui se fixe au "Serum Response Element" (SRE) présent dans le promoteur du gène *c-fos*. L'activité du SRF est régulée par un mécanisme post-traductionnel puisqu'il est déjà présent dans la cellule lors de la stimulation. Cependant, les mécanismes exacts par lesquels les signaux extracellulaires contrôlent son activité ne sont pas très clairs. Bien que SRF soit une phosphoprotéine, les effets de la phosphorylation sur son activité ne sont pas encore établis (Jackson, 1992; Lin, 1993). La protéine c-Fos va alors réguler la transcription de son propre gène. L'activation de la PKC stimule la phosphorylation de c-Fos, sur des résidus localisés dans la région carboxy-terminale, celle-là même qui contient un domaine transrépresseur (Lin, 1993) (Figure I.34.). c-Fos ainsi phosphorylée inhibe la transcription de son propre gène. L'homologue oncogénique rétroviral de *c-fos*, *v-fos*, est délété dans sa partie carboxy-terminale et n'est plus réprimé transcriptionnellement (Meek, 1992).

Tout comme *c-jun*, *c-fos* appartient à la famille des gènes dits de réponse précoce. Il est en effet parmi les nombreux gènes qui s'expriment quand une cellule quiescente en G₀ est restimulée par l'addition de sérum ou de facteurs de croissance (Blanchard, 1992).

3.1.3. LE COMPLEXE AP-1

Toutes les combinaisons dimériques entre les diverses protéines Jun peuvent se former et se fixer sur l'ADN au site AP-1. Quant aux protéines Fos, leur structure est telle que l'homodimérisation Fos-Fos n'a pas lieu, à cause de la présence d'acides aminés chargés au voisinage de la zone de dimérisation de Fos. Les protéines Fos ne forment que des hétérodimères avec Jun, ces dimères Fos/Jun reconnaissent d'ailleurs le site AP-1 avec une affinité plus grande que les dimères jun/jun. Tous les hétérodimères possibles entre les différents membres des familles Jun et Fos sont représentés à la figure I.35.. Cette combinatoire s'étend à d'autres familles de facteurs de transcription de type bZIP, les facteurs ATF/CREB/CREM qui interviennent dans la réponse de la cellule à l'AMPc en se fixant au motif TGACGTCA, et les facteurs c/EBP ("CAAT Enhancer Binding Protein") qui reconnaissent la séquence CCAAT (Figure I.36.). Ces hétérodimères inter-familles ont des spécificités de fixation et de modulation transcriptionnelle différentes des homo- et hétérodimères intra-familles.

Lorsque les fibroblastes sont mis en présence d'un mitogène, le facteur SRF est modifié de telle façon qu'il vient activer le gène *c-fos*, dont la transcription atteint un

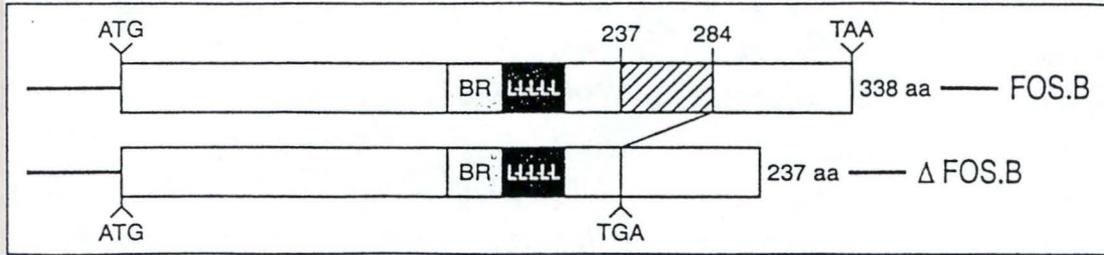


Figure I.38. : Structure comparée des ADNc de Fos et ΔFosB montrant comment, à partir d'un épissage alternatif au niveau de l'exon 4, un codon stop est introduit et conduit à une forme naturellement tronquée de FosB (d'après Blanchard, 1992).

Target gene	κB motif	Reference		
Viruses	HIV-1	a G G G A C T T T C C b G G G A C T T T C C	98	
	cytomegalovirus	a G G G A C T T T C C b G G G A C T T T C C c G G G G A T T T C C	117	
		adenovirus	a G G G A C T T T C C b G G G A A G T A C C	146
		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 *Δ G G G A G A T T C C	10, 80	
		MHC Class I (H-2K ^b)	a G G G G A T T C C C 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	8, 60
β ₂ -microglobulin		G G G A C T T T C C *Δ G G G A A A G T C C	60	
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 *Δ G G G A A A G C C C b G G G A A T T C A C	20, 123	
		lymphotoxin (TNF-β)	G G G G G C T T C C 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	95
	proenkephalin	G G G A C G T C C C	108	
	angiotensinogen	Δ G G G G A C G T C C G G G A T T T C C C * G G G A A A T C C C	111, 112	
	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 half site		G G G R N N (Y Y C) C A B		

Table I.5 : Gènes cibles du facteur NF-κB et leurs motifs de liaison (d'après Baeuerle, 1992)

maximum au bout de 15 minutes, puis décline rapidement du fait que la protéine c-Fos réprime son propre gène. La cinétique d'induction de la transcription du gène *c-jun* n'est pas aussi rapide, mais elle dure plus longtemps (2 à 3 heures) : elle provient de changements de l'état de phosphorylation de la protéine c-Jun, qui la rendent plus active et de son hétérodimérisation avec la protéine c-Fos nouvellement synthétisée, qui ensemble viennent activer le gène *c-jun* via un site AP-1 qui se trouve juste en amont de la boîte TATA du promoteur et d'une série d'autres gènes AP-1 dépendants. Leur induction rapide est aussi transitoire, les protéines Fos et Jun ayant un turn-over relativement rapide (Figure I.37.).

La protéine Δ FosB, générée par épissage alternatif du gène *fosB* (Figure I.38.), pourrait aussi participer au caractère transitoire de l'induction des gènes à motif AP-1. En effet, issue du même gène que *fosB* et sans doute un peu plus stable, elle persiste plus longtemps, devenant majoritaire quelques heures après la stimulation mitogénique. Elle inhibe l'activité des dimères Jun/Fos en formant des dimères Jun/ Δ FosB qui se fixent sur l'ADN mais qui l'activent peu ou pas (Herbomel, 1993).

3.2. NF- κ B

Le NF- κ B a d'abord été identifié en tant que facteur de transcription spécifique des lymphocytes T différenciés, indispensable pour la transcription des chaînes κ des immunoglobulines, par sa fixation au motif κ B localisé dans le "enhancer" de ces gènes (Herbomel, 1993). Par la suite, on a montré qu'il était impliqué dans la régulation de plusieurs autres gènes cellulaires, dont les gènes codant pour des cytokines (l'IL-2, l'IL-6, le GM-CSF) et leur récepteur (Table I.4.). Une caractéristique commune des protéines codées par ces gènes est leur implication dans les processus immédiats de la réponse immune et de l'inflammation. Le NF- κ B participe également à l'activation du domaine "enhancer" de plusieurs virus dont les virus SV40, VIH, ... (Hiscott *et al.*, 1992).

Le NF- κ B est un hétérodimère formé de 2 protéines, p50 et p65, très similaires surtout dans leur moitié N-terminale. Cette région homologue de plus ou moins 300 acides aminés porte les fonctions de fixation à l'ADN et de dimérisation. On la retrouve dans d'autres protéines comme celles codées par le proto-oncogène *c-rel* et par le gène dorsal de la drosophile. Ces protéines sont regroupées en une même famille nommée "Rel/dorsal" (Figure I.39.). *In vitro*, différentes possibilités de dimérisation existent entre les membres de cette famille : p50, tout comme p65, peut se fixer à la protéine c-rel, p50 peut également former des homodimères. Les complexes ainsi formés présentent une spécificité d'interaction avec l'ADN ainsi que les capacités activatrices un peu différentes, ce qui permettrait à la cellule de

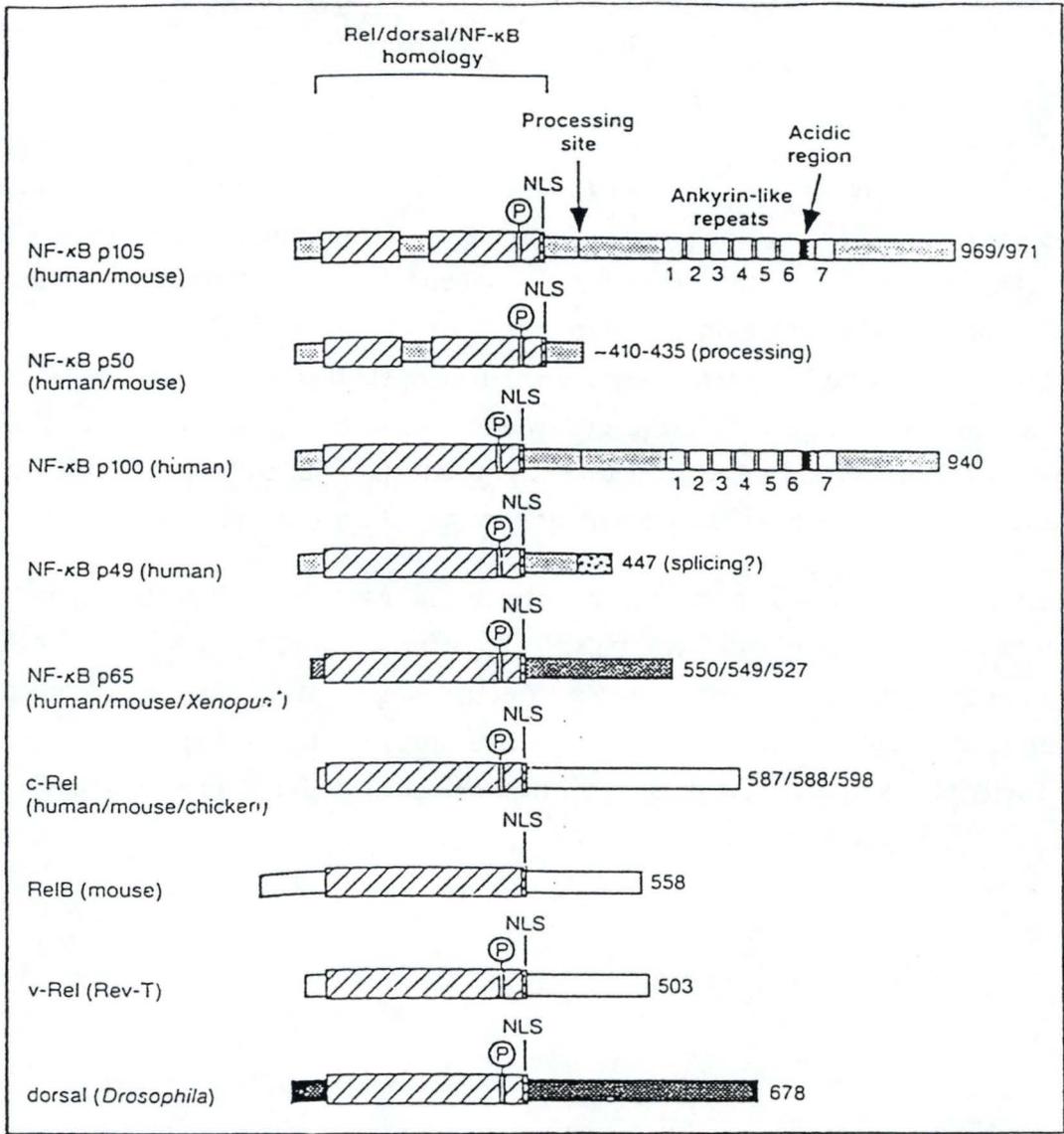


Figure I.39. : Famille des protéines Rel / dorsal (d'après Volker, 1992).

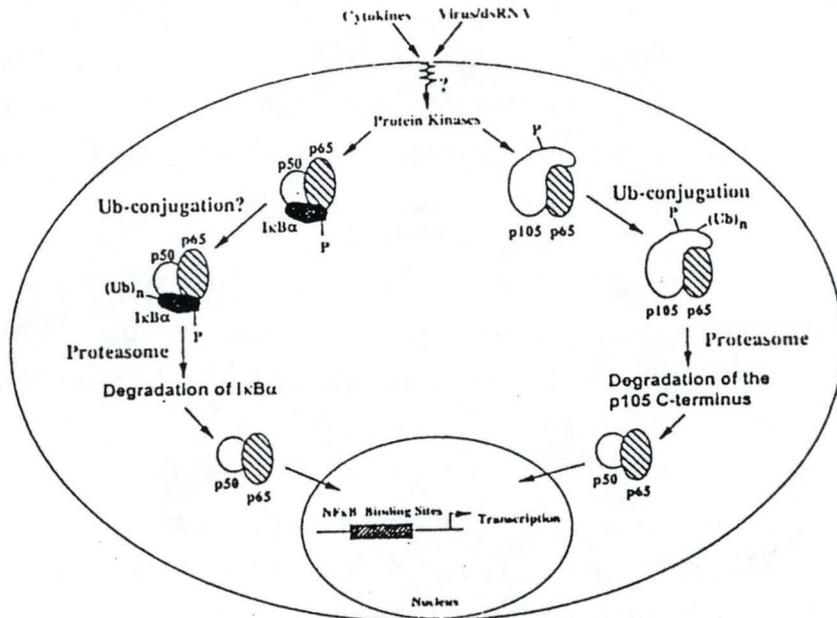


Figure I.40. : Rôle des protéasomes dans l'activation du facteur NF- κ B (d'après Palombella *et al.*, 1994).

spécialiser ses réponses à différentes voies d'activation (Blank *et al.*, 1992 ; Herbomel, 1993).

Dans le cytoplasme, NF- κ B est inactif et sous forme d'un trimère p50-p65-I- κ B. La sous-unité p50 est responsable de la liaison du facteur à l'ADN. Quant à p65, c'est elle qui fixe la troisième sous-unité, inhibitrice celle-là, I- κ B. Celle-ci, en se fixant au dimère le confine dans le cytoplasme, inhibant par là la liaison du facteur à l'ADN (Urban et Baeuerle, 1990).

La séquence génomique reconnue spécifiquement par le dimère p50-p65, nommée site κ B est la suivante : 5' GGGACTTTCC 3'. Des agents chélateurs comme l'EDTA diminuent fortement la liaison du NF- κ B à l'ADN, suggérant l'importance de Zn^{++} pour cette liaison.

L'induction du NF- κ B semble essentiellement se produire au niveau post-traductionnel. En effet, la phosphorylation de I- κ B, induite par la PKA comme par certaines isoformes de la PKC, du moins *in vitro*, produit sa dissociation du complexe et la translocation du dimère vers le noyau (Hiscott *et al.*, 1992). Des travaux récents ont également mis en évidence le rôle tenu par l'ubiquitine et les protéasomes dans l'induction du facteur (Palombella *et al.*, 1994). En plus d'un phosphate, une molécule d'ubiquitine est transférée sur la sous-unité I κ B du complexe. Celle-ci la renseigne au protéasome S26 comme une protéine à dégrader. Sa protéolyse libère le dimère p50-p65 et induit sa translocation (Figure I.40.).

La protéine p105 est le précurseur de la sous-unité p50. La dégradation de sa partie carboxy-terminale par ce même processus d'ubiquitination/protéolyse est un autre mode d'induction du complexe NF- κ B (Palombella *et al.*, 1994) (Figure I.40.).

Les cytokines (dont l'IL-1 et le TNF), les esters de phorbol, une infection virale et d'autres agents mitogènes peuvent induire l'activation du NF- κ B (Table I.5.). Considérant le nombre de stimuli capables d'induire ce facteur, il est probable qu'il existe plusieurs voies d'activation du complexe protéique en fonction du type cellulaire (Hiscott *et al.*, 1992).

Des études ont montré que certains dérivés actifs de l'oxygène, dont le peroxyde d'hydrogène, peuvent induire l'activité de fixation à l'ADN et donc reproduire les effets de l'IL-1 et du TNF sur ce facteur (Shreck *et al.*, 1991). Par la suite, d'autres équipes ont testé l'effet de molécules anti-oxydantes telles la N-acétyl-L-cystéine (NAC) sur l'activation du facteur dans des lignées de lymphocytes T (cellules Jurkat); elles se sont avérées capables d'inhiber l'activation induite par l'IL-1 de gènes sous contrôle du NF- κ B (Figure I.41.). Ces données ont été confirmées au laboratoire sur les fibroblastes utilisés dans le cadre de notre travail (Raes *et al.*, 1994) et sur les fibroblastes WI38 transformées par le virus SV40 (Bougelet, 1994); ce qui semble confirmer le rôle des dérivés actifs de l'oxygène dans

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.6. : Agents activateurs du facteur NF- κ B (d'après Baeuerle, 1990).

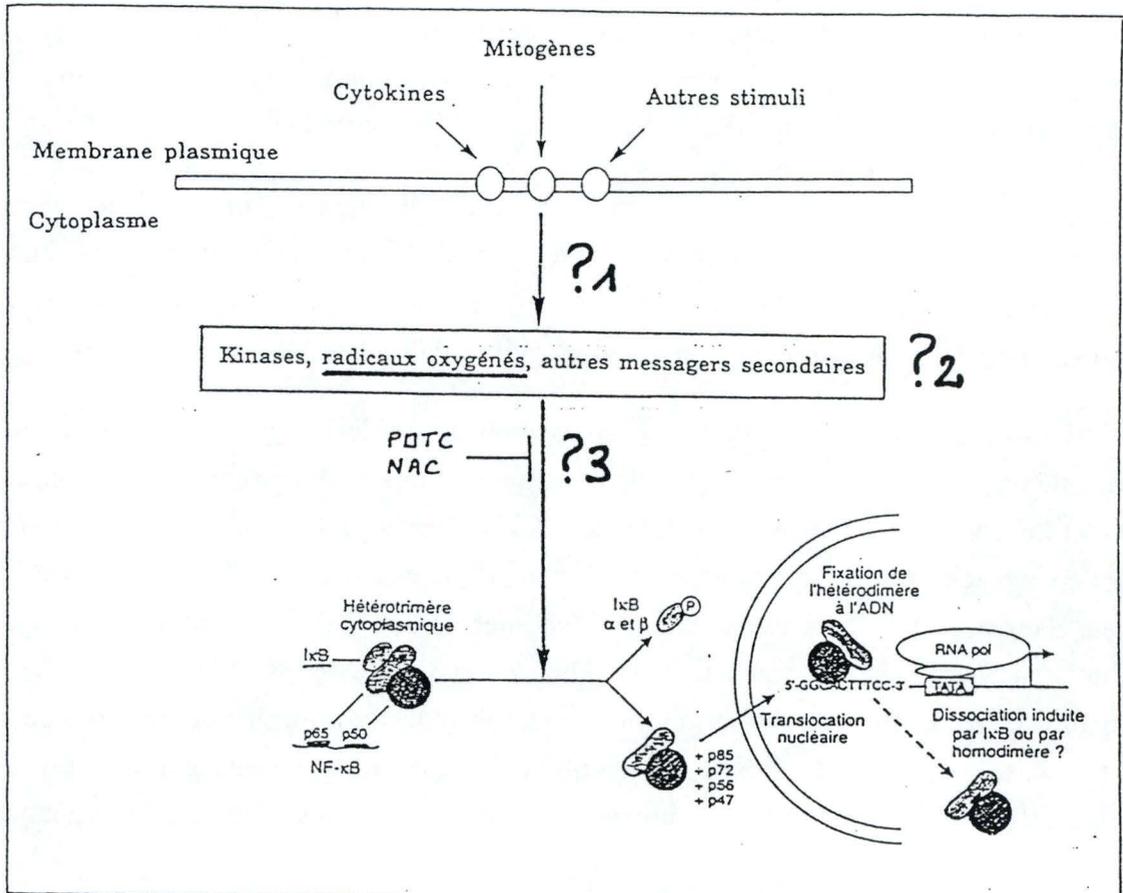


Figure I.41. : Schéma illustrant la voie d'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B (d'après Hiscott *et al.*, 1992, modifiée selon Renard, 1992).

l'activation du facteur.

Plusieurs molécules clés de la voie d'activation du facteur ont donc déjà été identifiées (Figure I.40.). Mais les mécanismes moléculaires par lesquels ces médiateurs interagissent pour transmettre le signal activateur jusqu'au complexe cytoplasmique sont encore méconnus. En particulier, ni la (ou les) kinase(s) responsable(s) de la phosphorylation de I-kB, ni les mécanismes moléculaires aboutissant à son activation, n'ont été identifiés *in vivo* à l'heure actuelle (Fig I.41.).

4. EFFET DE L'AMPC SUR LA PROLIFERATION INDUITE PAR LE PDGF DANS UN MODELE DE FIBROBLASTES HUMAINS EN CULTURE.

Depuis quelques années, le laboratoire de biochimie cellulaire s'est intéressé à la prolifération cellulaire induite par le PDGF, dans un modèle de fibroblastes pulmonaires humains en culture. La prolifération est mesurée, soit par des méthodes d'incorporation de thymidine tritiée, soit par des méthodes colorimétriques (test à l'hexosaminidase).

Etant donné qu'une prolifération excessive de fibroblastes peut aboutir *in vivo* à plusieurs pathologies, comme nous l'avons signalé au début de cette introduction, une recherche a été lancée en vue de mettre en évidence d'éventuels régulateurs négatifs de la prolifération induite par le PDGF. Dans un premier temps, divers dérivés de l'acide arachidonique ont été testés, car ces métabolites étaient reconnus dans la littérature pour moduler la croissance cellulaire. Parmi ceux-ci, seules les prostaglandines E₂ (PGE₂) contrecarraient clairement les effets du PDGF.

Le PGE₂ agit souvent via l'AMPC. En effet, lorsque le PGE₂ se lie à son récepteur, des signaux provenant du récepteur, convergent vers l'adénylate cyclase qui transforme l'ATP en AMPC. Les protéines G qui assurent ce couplage sont activées par le GTP au début de la réaction et inactivées lorsque le GTP est hydrolysé en GDP, à la fin de la réaction (Figure I.42.). Signalons que s'il existe des récepteurs stimulateurs (R_s), il existe également des récepteurs inhibiteurs (R_i) (Figure I.43.).

Maggi Burton a démontré au laboratoire que les fibroblastes humains incubés en présence de PGE₂ voyaient leur concentration intracellulaire en AMPC augmenter. On a donc essayé de reproduire les effets de la PGE₂ sur la prolifération induite par le PDGF, par le

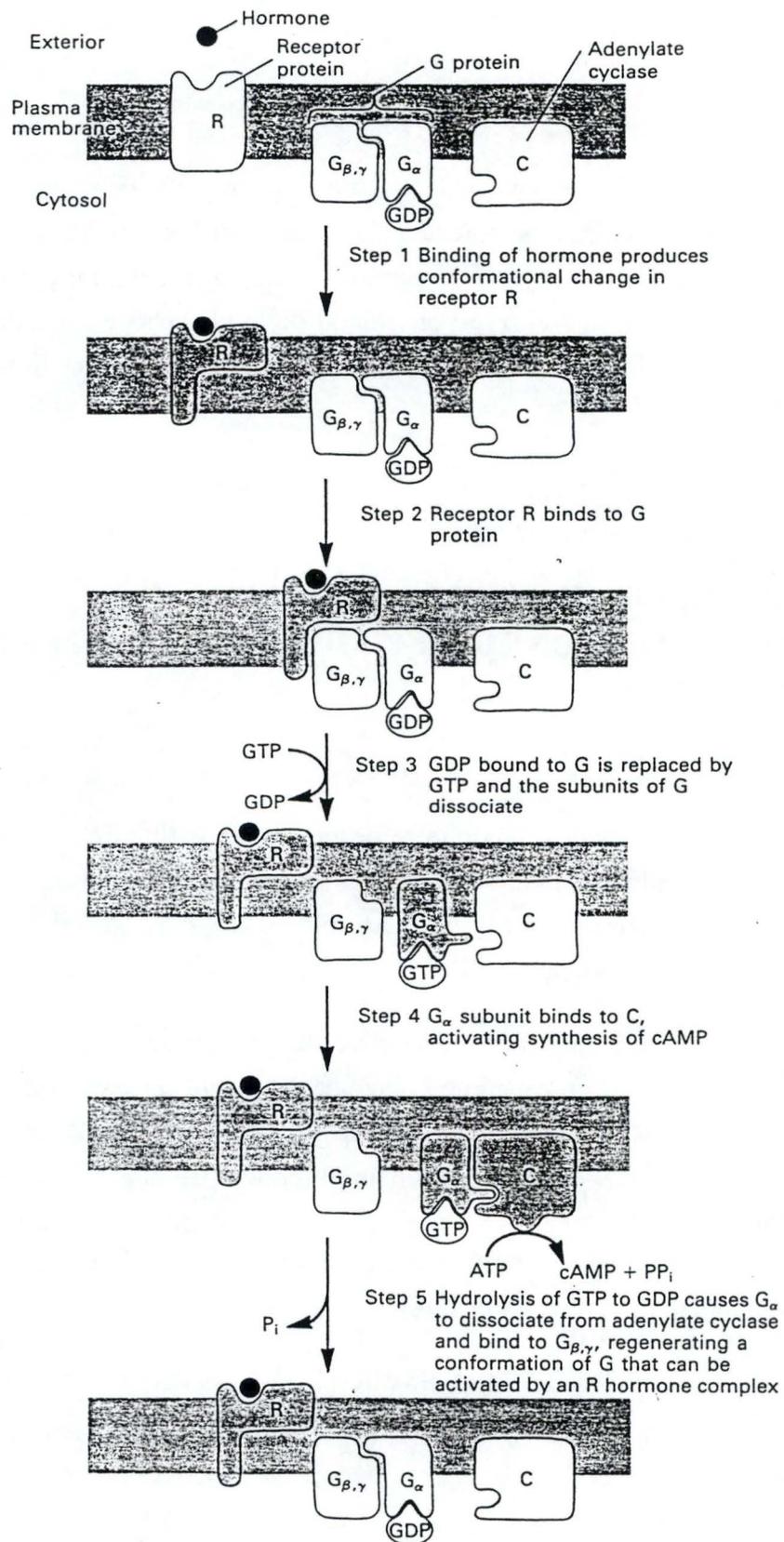


Figure I.42. : Mécanismes moléculaires aboutissant à la formation d'AMPC. Ce mécanisme est notamment activé par la PGE₂ quand elle se lie à son récepteur (d'après Darnel, 1994).

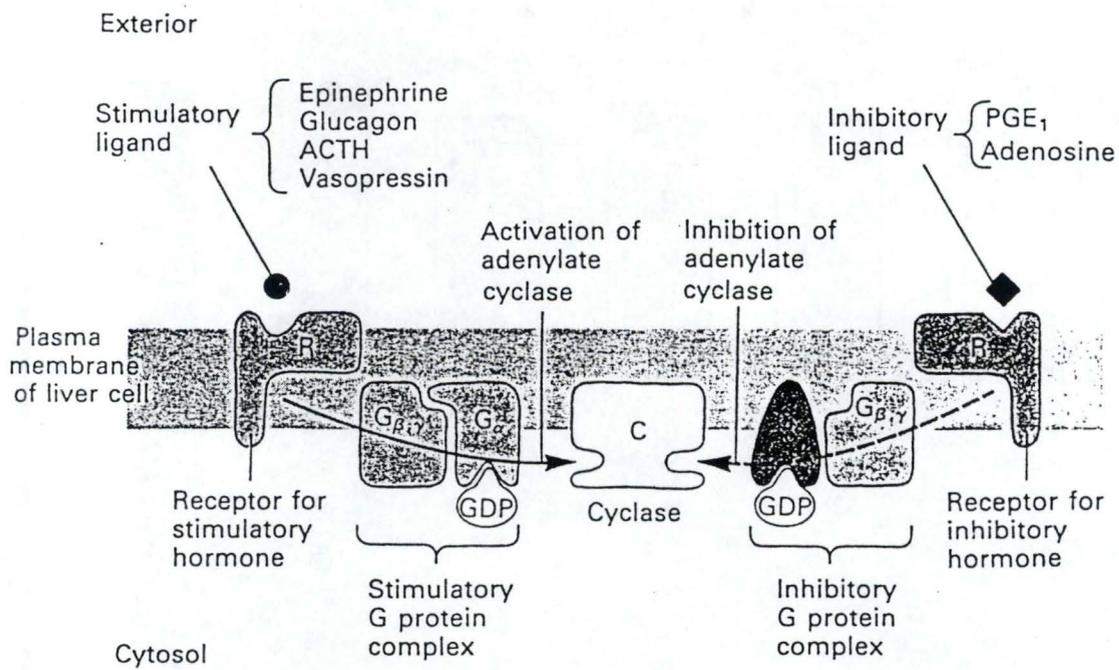


Figure I.43. : Représentation schématique des mécanismes de régulation de l'adénylate cyclase couplée à des récepteurs membranaires (d'après Darnel, 1986).

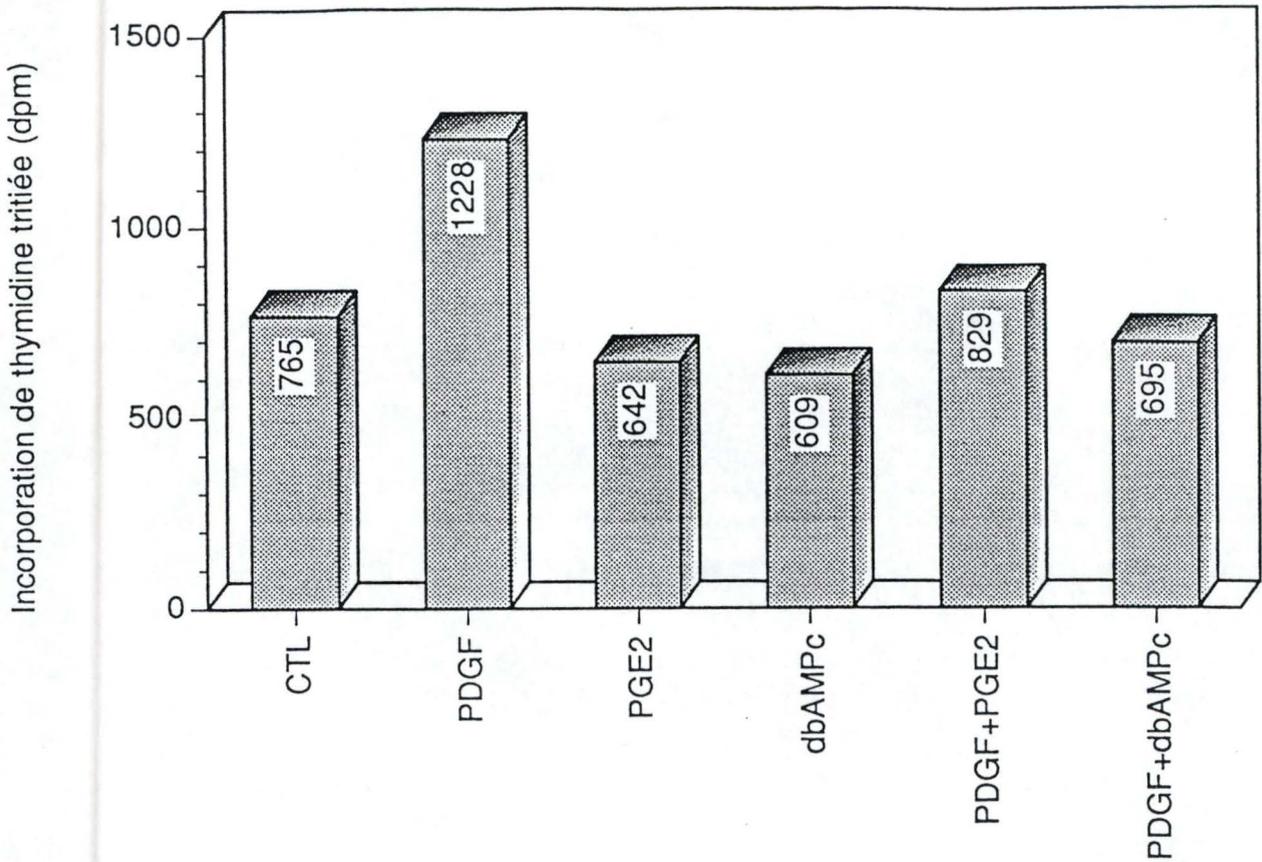


Figure I.44. : Effet de la PGE2 ($10^{-2}M$) et du db-AMPc ($10^{-3}M$) sur l'incorporation de thymidine triciée ($1\mu Ci/ml$) stimulée par le PDGF ($10ng/ml$) pendant 48 heures (d'après Burton *et al.*, sous presse).

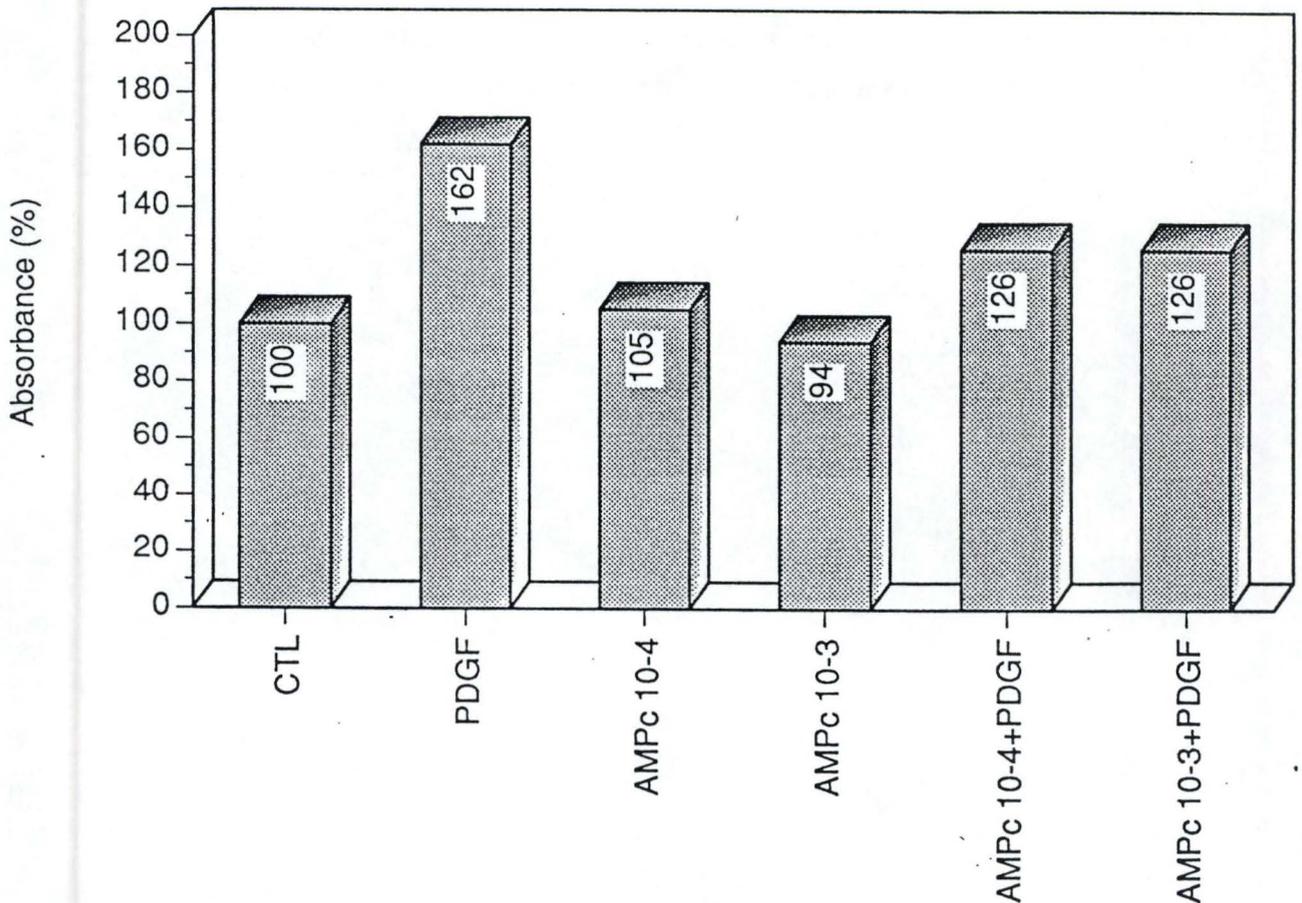


Figure I.45. : Effet de l'AMPc ($10^{-3}M$) sur la prolifération des fibroblastes stimulés au PDGF ($10ng/ml$). Ces effets ont été estimés par le test colorimétrique à l'hexosaminidase (d'après Gillon, 1992).

dibutyryl-AMPC, un analogue de l'AMPC, capable de traverser la membrane plasmique. Comme le montrent les figures I.44. et I.45., on constate que le db-AMPC comme la PGE₂ contrecarrent les effets pro-prolifératifs du PDGF, qu'on suive la prolifération par incorporation de thymidine tritiée (Figure I.44.), ou par le test colorimétrique à l'hexosaminidase (Figure I.45.) qui estime le nombre total de cellules au cours du temps.

L'objectif de ce mémoire se situe donc dans la prolongation de ces expériences : il vise à voir à quels niveaux de la cascade de transduction du signal du PDGF, l'AMPC pourrait exercer son effet inhibiteur. Mais avant de détailler ce point, rappelons le mode d'action de l'AMPC.

L'AMPC agit essentiellement via l'activation de protéines kinases dites AMPC dépendantes, ou PKA. L'AMPC se lie aux sous-unités régulatrices (R) de la PKA dont il libère les sous-unités catalytiques (C) qui peuvent alors phosphoryler les protéines impliquées dans la réponse cellulaire donnée.

Les deux principaux isozymes de la PKA diffèrent au niveau de leurs protomères régulateurs : RI et RII. Les isoformes RI sont essentiellement cytoplasmiques, tandis que les RII sont plutôt localisées dans les membranes, dans les organes subcellulaires ou sur le cytosquelette, fixées à des "anchor proteins" (Spaulding, 1993). La régulation par l'AMPC de ces deux types de kinases est différente puisque la phosphorylation de R active la PKAII tandis qu'elle stabilise PKAI et l'inactive. Les PKA phosphorylent un grand nombre de substrats. On sait depuis longtemps que les PKA régulent les enzymes du métabolisme du glycogène, dont la glycogène synthase, et la glycogène phosphorylase kinase (pour une revue, voir Darnell *et al.*, 1986). On en connaît aujourd'hui bien d'autres, comme résumé dans la table I.6.. Enfin, les PKA sont capables de moduler l'expression génétique des cellules, et ce par phosphorylation de plusieurs facteurs transcriptionnels : c'est le cas notamment de CREB (CAMP Response Element Binding protein), de c-Fos et de c-erbA (codé par le récepteur aux hormones thyroïdiennes). La phosphorylation de CREB induit la transcription des gènes contenant l'élément CRE (CREB Response Element) dans leur promoteur.

5. OBJECTIFS

Nous l'avons rappelé ci-dessus: l'action pro-proliférative du PDGF sur les fibroblastes humains en culture est contrecarrée par la PGE₂ dont les effets sont médiés par l'AMPC. Nous allons approfondir ces études de prolifération en nous intéressant plus particulièrement

TABLE I (continued)

Protein kinase	Phosphorylation site sequence	Protein	Refs. ^a
	L E L S* D D D D E S K	Myosin heavy chain (brain)	56
	D ₂₀ D D D A Y S* D T E T T E	Phosphatase inhibitor-2	71
	E ₁₁₇ Q E S* S* G E E D S D L	Phosphatase inhibitor-2	71
	R ₃ R P R H S I Y S* S* D D D E E D	c-Myb	87
	P ₃₄₃ P T* T* S* S* D S* E E E Q E D E E E	Myc	88
	S ₃₄₄ P R S* S* D T E E N	Myc	88
	S ₉ S S* E S* G A P E A A E E D	Clathrin light chain LC _b	109
	S ₂₆ D E E D E E	Elongation factor 1β	110
	D ₇₄ T* D S E E E I R E	Calmodulin	116
	D ₉₃ G D G Y I S* A A E L R H	Calmodulin	116
	E ₂₈ Q L N D S* S* E E E D E I D	Human papillomavirus E7 oncoprotein (HPV E7)	117
	T ₃₀₁ G S* D D E D E S N E Q	Ornithine decarboxylase ^f	29
	E ₃₄ E S P A S* D E A E E K	High mobility group 14 protein	140
Crystallin kinase(s)	R ₁₁₆ R Y R L P S* N V D	α _A -Crystallin	58
	R ₁₁₇ P F F P F H S* P S R	α _B -Crystallin	59
	P ₁₂₈ A S T S L S* P F Y L R P P	α _B -Crystallin	59
AMP-dependent protein kinase (mammalian) ^g	Y ₇ L R R A S* L V A Q L T	Pyruvate kinase ^f	1
	F ₁ R R L S* I S T	Phosphorylase kinase α chain	1
	Q ₄₂ W P R R A S* C T S	Glycogen synthase site 1a (residue numbers based on human muscle sequence)	1, 150
	G ₇₀₆ S K R S N S* V D T	Glycogen synthase site 1b (residue numbers based on human muscle sequence)	1, 150
	R ₃₁ T K R S G S* V I Y E	Phosphorylase kinase β chain ^f	1

TABLE I (continued)

Protein kinase	Phosphorylation site sequence	Protein	Refs. ^a
	A ₂₉ G A R R K A S* G P P	Histone H1 ^f (residue numbers from bovine sequence)	1
	K ₁₁ A K T R S S* R A	Histone H2A ^f (residue numbers from bovine sequence)	1
	G ₂₈ K K R K R S* R K E S* Y S	Histone H2B ^f (residue numbers from bovine sequence)	1
	E R R K S* K S G A G	cAMP regulated phosphoprotein M _r 21,000 (ARPP-21)	55
	Y ₁ L R R R L S* D S N F	Synapsin I site 1	100
	N ₁₉ Y R G Y S* L G N Y V	Reduced carboxymethylated maleylated (RCMM)-lysozyme	76
	R ₂₇ A S* F G S R G S* G S	Desmin	86
	S ₁₇ R T S* A V P T	Desmin	86
	P ₁ L S R T L S* V S S	Glycogen synthase site 2	1
	A ₁₈ V R R S* D R A	Troponin I (cardiac)	69
	M ₄₀ R R S* V S E A A L	Hormone-sensitive lipase	42
	M ₂₄ R S S* M S G L H L	Acetyl-CoA carboxylase	42
	S ₁₂ Q R R R S* L E P P D	pp60 ^{src}	79
	K ₂₁ R K R K S* S* Q C L V K	c-erbA	134
	K ₁₁ H K R K S* S* Q C L V K	v-erbA	134
	R ₄₅ N T D G S* T D Y G I	RCMM-lysozyme	76
	R ₂₁₂ R K G T* D V	Lipocortin I (p35, calpactin II)	81
	I ₂₉ R R R R P T* P A T	Phosphatase inhibitor-1 ^f	1
	K P R R K D T* P A L	G substrate	1
	K ₁₀₀ R V K G R T W T* L C G T	Autophosphorylation of catalytic subunit	1, 95
	R ₉₉ F D R R V S* V C A	Autophosphorylation of regulatory subunit R ₁₁	1
Yeast	K ₂₁₈ R K Y L K K L T R A S* F S A	ADRI	2

(continued)

Table I.7. : Substrats potentiels de la PKA (d'après Pearson et Kemp, 1991).

aux mécanismes moléculaires de cette régulation négative.

L'objectif de ce travail est de voir à quel(s) niveau(x) de la transduction du signal du PDGF, l'AMPC agit. Comme nous l'avons plus haut, la cascade de transduction du signal lié au PDGF est extrêmement complexe au point de vue moléculaire. Aussi, allons-nous nous focaliser sur 2 niveaux bien précis de la cascade mitogénique : celui de la MAP kinase et celui des facteurs de transcription.

Plusieurs raisons nous poussent à prospecter au niveau de la MAP kinase. D'une part, leur importance dans la transmission des signaux mitogéniques est bien reconnue et elle semble constituer une cible privilégiée de régulation négative (Sturgill et Wu, 1991). D'autre part, la littérature a fourni récemment quelques pistes à ce sujet. En effet, une inhibition de l'activation des MAP kinases par l'AMPC a été mise en évidence sur les fibroblastes NIH3T3 et de Rat-1 stimulés à l'EGF (Cook et Mc Cormick, 1993). Signalons que selon ces auteurs, l'AMPC via la PKA activerait un composant de la cascade situé en amont des MAP kinases. Etant donné que ces données sont relativement préliminaires et que les modèles cellulaires utilisés jusqu'à présent sont généralement des lignées de cellules de rongeurs, nous avons voulu vérifier sur notre modèle de fibroblastes humains stimulés au PDGF si l'AMPC agissait également en amont c'est-à-dire au niveau de la MAP kinase, d'autant plus que les effets de l'AMPC sur la prolifération induite par le PDGF étaient déjà bien caractérisés.

La prolifération cellulaire étant initiée par l'expression des gènes dits "immédiats précoces", nous allons également tenter de voir l'effet de l'AMPC sur l'activation des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de ces gènes. Les effets de l'AMPC seront testés sur 2 facteurs transcriptionnels, AP-1 et NF- κ B.

Mais dans un tout premier temps, ce travail consistera à mettre au point les conditions optimales et les méthodes requises pour la mise en évidence de ces effets.

II. Matériels et méthodes

1. CULTURES DE FIBROBLASTES DE POUMON

1.1. MATERIEL

Les fibroblastes de poumon (AG04432) proviennent d'explants de poumon d'un foetus femelle (avortement thérapeutique) de 15 semaines. Ils sont fournis par le N.I.A. Aging Cell Repository (Corriell Institute for Medical Research, N.J., U.S.A.) à la treizième génération 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'hypoxanthine, de thymidine, de facteurs de croissance et fraîchement enrichi de pyruvate 1 mM, de L-glutamine 2 mM et de mercaptoéthanol 50 μ M. L'addition de pyruvate et de mercaptoéthanol à ce milieu est justifié par leurs propriétés anti-oxydantes (Chen *et al.*, 1987; O'Donnell-Thormey *et al.*, 1987)

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

- M : milieu de rinçage, en l'occurrence, le milieu minimum essentiel MEM (Gibco, Grande-Bretagne)

- T : solution stérile de trypsine à 0,25 % dans un tampon TRIS (Gibco, Grande-Bretagne)

- OPT + DMSO 10% : Diméthylsulfoxyde (12 779 72 Janssen Chimica, Belgique) dilué à une concentration de 10 % dans de l'OPTI-MEM. Le DMSO est utilisé comme cryoprotecteur lors de la congélation des cellules

Les solutions de trypsine et le sérum de veau foetal sont conservées à -20°C et tous les autres milieux à 4°C. Ils sont préchauffés à 37°C avant chaque utilisation.

1.2. METHODE

1.2.1. REPIQUAGE DES FIBROBLASTES PULMONAIRES

Les cellules sont cultivées selon la méthode décrite par Hayflick *et al.*, 1961, dans des boîtes de culture de 75 cm² (Corning, U.S.A.). Lorsque elles sont confluentes (ce qui représente une densité moyenne de 80000 cellules / cm²), elles sont repiquées en 2 ou en 4 c'est-à-dire qu'après les avoir resuspendues dans de l'OPT + SB 10%, on les répartit entre 2 ou 4 boîtes de culture.

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

Lors du repiquage, les cellules sont rincées dans 10 ml de milieu M afin d'éliminer toute trace de sérum, celui-ci contenant des inhibiteurs de protéases. Les cellules sont ensuite traitées à température ambiante avec 2 ml de trypsine et ce jusqu'à observer l'arrondissement et le début du détachement cellulaire au microscope à contraste de phase (c'est-à-dire pendant environ 2 minutes). Une fois la trypsine décantée, la boîte est placée dans une étuve à 37°C pendant une dizaine de minutes afin d'accélérer le processus de détachement des cellules. On ajoute alors 10 ml d'OPT + SB 10%, le sérum inactivant la trypsine. A l'aide d'une pipette pasteur, on rompt les agrégats et on rince la paroi sur laquelle elles étaient attachées. Les cellules sont ainsi resuspendues dans 10 ml d' OPT + SB 10 %.

Pour terminer, on répartit cette suspension cellulaire dans 2 (ou 4) boîtes et on porte le volume de chacune d'elles à 20 ml d'OPT + SB 10 %. On ajuste le pH du milieu en ajoutant aux cellules de l'air contenant 5% de CO₂. Il est également important après quelques jours de réapprovisionner les cellules en éléments nutritifs en changeant le milieu de culture.

1.2.2. CONGELATION ET DECONGELATION DES CELLULES

1.2.2.1. Congélation

Les cellules sont rincées avec du milieu M et trypsinisées suivant la méthode décrite ci-dessus. Après centrifugation, on resuspend le culot ainsi obtenu 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 10 %.

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 alors stockée dans l'azote liquide à -196°C.

1.2.2.2. Décongélation

L'ampoule de cellules stockée dans 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, Allemagne). Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans de l'OPT + SB 10 % avant d'être transféré dans une boîte de culture.

Un test de viabilité peut être réalisé sur les cellules grâce à une solution d'acridine orange et de bromure d'éthidium (Parks *et al.*, 1979). Les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz, Allemagne). Le pourcentage de cellules vivantes après décongélation est supérieur à 95 %.

2. TEST DE PROLIFERATION CELLULAIRE

La méthode choisie pour estimer la croissance cellulaire est celle de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules. Elle est inspirée des travaux de Klagsbrun *et al.*, 1977.

2.1.1. MATERIEL

- Réactifs utilisés pour stimuler les cellules :

- PDGF A/B : "Platelet-derived growth factor A/B" recombinant humain et stérile (1183125, Boehringer Mannheim, Belgique) dilué dans de l'OPT + SAB 0,1 %, à raison de 1 ng / μ l, fractionné et stocké à -70°C

- PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate (P-8139, Sigma Chemical Co, USA) dissout dans de l'éthanol à raison de 1 mg / ml, aliquoté et stocké à -70°C
- Dibutyryl AMPc (dbAMPc) : solution saline de Na N⁶ 2'-O-dibutyryl adénosine-3' 5'-monophosphate cyclique (D-0627, Sigma Chemical Co, USA). Une solution stock de 10⁻² M dans de l'OPT + HLA 0,2 % est à préparée et filtrée le jour même.
- OPT + SB 10 %, milieu M : voir point 1.1 des Matériels et Méthodes
- OPT + SB 0,1 % : milieu OPTI-MEM additionné de 0,1 % de sérum de veau foetal (Gibco, Grande-Bretagne)
- HLA : solution d'hydrolysate de lactalbumine 10 % (Gibco, Grande-Bretagne)
- OPT+HLA 0,2 % : milieu OPTI-MEM additionné de 0,2 % d'hydrolysate de lactalbumine (Gibco, Grande-Bretagne)
- PBS : Tampon phosphate 10 mM, additionné de NaCl 0,9 %, porté à pH 7,6
- Ethanol (Merck, Allemagne)
- [³H]thymidine : [Methyl-³H]thymidine (NET-027X, NEN Dupont, Belgique) dont l'activité spécifique est de 20.0 Ci / mmol. On réalise une solution stock de 1µCi / 5µl d'OPT.
- TCA : acide trichloroacétique (Merck, Allemagne)
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)

2.1.2. METHODE

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont repiquées dans des boîtes de 24 cupules de 2 cm² chacune à raison de 20000 cellules par cupule et par ml de OPT + SB 10 % . Le lendemain, les cellules sont rincées 1 fois avec 1 ml de milieu M puis incubées dans 1 ml d'OPT + SB 0,1 % par cupule et ce afin d'amener les cellules à la phase G₀ de leur cycle cellulaire. Vingt-quatre heures plus tard, on rince chaque cupule avec 1 ml de milieu M puis on ajoute soit 1 ml de l'OPT + HLA 0,2%, soit 1 ml de dbAMPc (10⁻³M) ou 1 ml de PMA (100ng/ml) pendant les différents temps suivants : 2, 4, 6 ou 24 heures. Après ces différents temps de pré-incubation, on rince les cellules avec 1 ml de milieu M puis on les stimule ou non

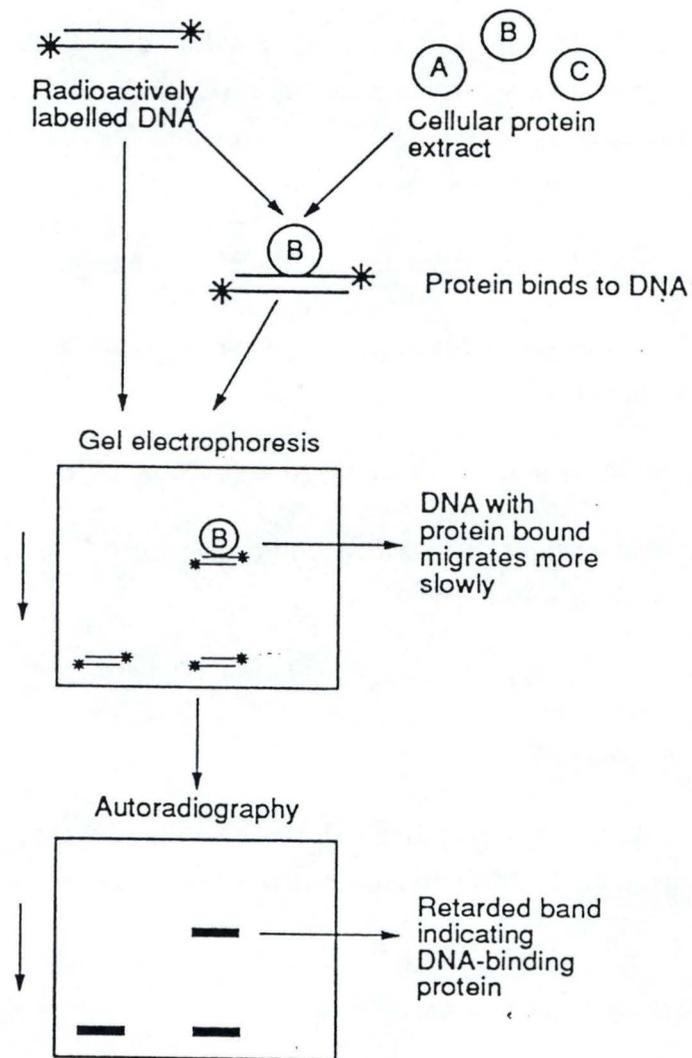


Figure II.1. : Principe de l'"Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA), appelé également "retard sur gel".

avec du PDGF (10 ou 20ng/ml). Pour les cellules qui ont été pré-incubées avec du db-AMPC, on a testé également le PDGF en présence de db-AMPC (10^{-3} M). On ajoute ensuite à chaque cupule la [3 H]thymidine (1 μ Ci/ml soit 5 μ l par cupule). Quarante-huit heures plus tard, on estime l'incorporation de [3 H]thymidine dans l'ADN de la façon suivante :

Les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de milieu M, ce afin d'enlever la [3 H]thymidine qui n'aurait pas été incorporé par les cellules. On ajoute ensuite le TCA 5% (1 ml par cupule) avant d'effectuer un dernier rinçage à l'eau distillée (1 ml par cupule). On récupère ensuite les cellules en ajoutant par cupule 250 μ l de NaOH 0,5N pendant 15 minutes puis en neutralisant par l'ajout de 250 μ l d'HCl 0,5N. On collecte le tout dans une fiole contenant 5 ml d'aqualuma. Enfin, on réalise un comptage du nombre de désintégrations par minute pendant 3 minutes grâce à un compteur à scintillation β (Beckman LS1801, USA).

3. EMSA

Nous avons utilisé la technique décrite par Schreck *et al.* (1991) et adaptée par Patestos *et al.* (1993).

Le principe de l'"Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) est le suivant : une sonde oligonucléotidique comprenant la séquence cible d'un facteur de transcription est marquée et mise en présence d'un extrait cellulaire, avant d'être déposée sur un gel d'électrophorèse. Si le facteur de transcription active est présent dans l'extrait cellulaire, elle se lie à l'ADN marqué (Figure II.1.). La migration du complexe ADN-protéine ainsi formé étant plus lente que celle de la sonde seule, on observe un retard sur le gel. Cette technique permet de mettre en évidence la (non-)liaison d'une protéine avec une séquence génomique.

Elle comporte plusieurs étapes : la culture et la stimulation des cellules, l'extraction des protéines, le marquage de la sonde, la liaison entre les protéines et la sonde marquée, l'électrophorèse, la révélation et pour terminer la quantification des bandes du gel.

3.1. CULTURE ET STIMULATION DES CELLULES

3.1.1. MATERIEL

- Réactifs utilisés pour stimuler les cellules :

- IL-1 β : Interleukine-1 β recombinante humaine (H-7360, Bachem, Suisse) diluée à raison de 100 ng / ml dans de l'OPT + SAB 1 % (albumine de sérum bovin, A-7030, Sigma Chemical Co, USA), aliquotée et congelée à -70°C

- PDGF A/B : "Platelet-derived growth factor A/B" recombinant humain et stérile (1183125, Boehringer Mannheim, Belgique) dilué dans de l'OPT + SAB 0,1 %, à raison de 1 ng / μ l, fractionné et stocké à -70°C

- PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acétate (P-8139, Sigma Chemical Co, USA) dissout dans de l'éthanol à raison de 1 mg / ml, aliquoté et stocké à -70°C

- PGE₂ : Prostaglandine E₂ (P-5640, Sigma Chemical Co, USA), diluée dans de l'éthanol absolu (solution stock de 1 mg / ml) et conservée à -20°C

- Dibutyryl AMPc (dbAMPc) : solution saline de Na N⁶ 2'-O-dibutyryl adénosine-3' 5'-monophosphate cyclique (D-0627, Sigma Chemical Co, USA). Une solution stock de 10⁻² M dans de l'OPT + HLA 0,2 % est à préparer et filtrer le jour même

- OPT + SB 10%, milieu M : voir point 1.1 des Matériels et Méthodes

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

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

- PBS : Tampon phosphate 10 mM, additionné de NaCl 0,9 %, porté à pH 7,6

-Ethanol (Merck, Allemagne).

3.1.2. METHODE

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont repiquées et réparties à partir de chaque boîte de culture de 75 cm² dans 3 boîtes de 25 cm² à raison de 5 ml d'OPT + SB 10 %. Le lendemain, les cellules sont rincées 2 fois avec 3 ml de milieu M puis incubées dans 5 ml d'OPT + SB 0,1 % afin d'éviter une éventuelle activation cellulaire par les constituants du sérum, activation qui interférerait avec la stimulation proprement dite réalisée par après.

Vingt-quatre-heures plus tard, les cellules sont rincées avec 3 ml d'OPT + HLA 0,2 %. Ensuite, en fonction des tests à effectuer, elles sont incubées avec 2 ml d'OPT + HLA 0,2% contenant les médiateurs à savoir le PDGF (20 ng / ml), en présence ou non de db AMPc (10⁻³ M) ou de PGE₂ (10⁻⁶ M) et de PMA (100 ng / ml). Les boîtes contrôles ne reçoivent que 2 ml d'OPT + HLA 0,2%.

3.2. EXTRACTION DES PROTEINES

3.2.1. MATERIEL

- Pour déceler l'activation du facteur NF- κ B, le tampon de lyse (appelé Tampon NF- κ B) utilisé pour extraire les protéines cellulaires est constitué de :

- HEPES 0,02 M à pH 7,5 (17 257 88, Janssen Chimica, Belgique)
- NaCl 0,35 M (1540, Merck, Allemagne)
- Glycérol 20 % (4094, Merck, Allemagne)
- Nonidet P-40 1 % (N-6507, Sigma Chemical Co, USA)
- MgCl₂ . 6H₂O 1 mM (5833, Merck, Allemagne)
- EDTA 0,5 mM à pH 7,5 (Merck, Allemagne)
- EGTA 0,1mM à pH 7,5 (E-4378, Sigma Chemical Co, USA)

Porter à 100 ml, autoclaver et ajouter la leupeptine :

inhibitor	specificity of inhibitors	stock solution	suggested starting concentration**
Antipain-dihydrochloride (1) 3 mg	papain, trypsin, cathepsin A and B	soluble in*** H ₂ O (20 mg/ml) methanol or DMSO	50 µg/ml
APMSF (2) [(4-amidinophenyl)-methanesulfonylfluoride] 1 mg PEFA3L2C	serine proteases	soluble in H ₂ O (20 mg/ml) methanol (1.5 mg/ml) dimethylformamide / acetonitril (1.5 mg/ml)	10 - 40 µg/ml
Aprotinin (3) 0.5 mg	serine proteases	soluble in**** H ₂ O (10 mg/ml)	0.06 - 2 µg/ml
Bestatin (1) 0.5 mg	amino peptidase	soluble in**** HCl, 1 mol/l (20 mg/ml) methanol (5 mg/ml) or NaCl, 0.15 mol/l (1 mg/ml)	40 µg/ml
Chymostatin (4) 1 mg	α-, β-, γ-, δ-chymotrypsin	soluble in*** glacial acetic acid (20 mg/ml) or DMSO	100 µg/ml
E-64 (5) 3 mg	cysteine proteases	soluble in*** H ₂ O / ethanol [1:1, v/v] (20 mg/ml)	0.5 - 1 mg/ml
EDTA-Na ₂ (6) 10 mg	metalloproteases	soluble in*** H ₂ O to 0.5 mol/l at pH 8 - 9	0.2 - 0.5 mg/ml
Leupeptin (4) 0.5 mg	serine and cysteine proteases such as plasmin, trypsin, papain, cathepsin B	soluble in*** H ₂ O (1 mg/ml)	0.5 µg/ml
Pepstatin (4) 0.5 mg	aspartate proteases	soluble in *** methanol (1.5 mg/ml)	0.7 µg/ml
Phosphoramidon (4) 3 mg	metallo endopeptidases. specifically thermolysine	soluble in *** H ₂ O (20 mg/ml)	4 - 330 µg/ml

Table II.1. : Inhibiteurs de protéases.

- Leupeptine* 10 µg / ml (L-2884, Sigma Chemical Co, USA)

Le DTT, le pefabloc et l'aprotinine sont ajoutés fraîchement avant chaque utilisation :

- DTT (dithiothréitol) 5 mM (D-8024, Sigma Chemical Co, USA)

- Pefabloc* 20 µl/ml (236 608, Boehringer Mannheim, Belgique)

- Aprotinine* 10µl / ml (A-6279, Sigma Chemical Co, USA)

La liste des différents inhibiteurs de protéases est illustrée sur la Figure II-2

- Pour les EMSA avec la sonde AP1, nous avons d'abord utilisé le même tampon de lyse que pour NF-κ. On a ensuite utilisé le tampon de lyse suivant, appelé Tampon Totex, recommandé par Baeuerle (communication personnelle) :

- Tris 0,10 M à pH 7,50 (8382, Merck, Allemagne)(appelé tampon totex)

- NaPPi 0,30 M (sodium pyrophosphate, 2059733, Janssen Chimica, Belgique)

- Acide iodoacétique 2 mM (Merck, Allemagne)

- NaCl 0,50 M (1540, Merck, Allemagne)

- NaF 0,50 M (6449, Merck, Allemagne)

- ZnCl₂ 5µM (Merck, Allemagne)

- Triton 1 % (H-0421, Sigma Chemical Co, USA)

- Glycérol 20 % (4094, Merck, Allemagne)

Les inhibiteurs suivants sont ajoutés fraîchement avant chaque utilisation :

- Orthovanadate 100 µM (Na₃VO₄, inhibiteur de tyrosine phosphatase, S-6508, Sigma Chemical Co, USA)

- Leupeptine* 20 µg / ml (L-2884, Sigma Chemical Co, USA)

- Pefabloc* 20 µl/ml (236 608, Boehringer Mannheim, Belgique)

- Aprotinine* 10µl / ml (A-6279, Sigma Chemical Co, USA)

Droite d'étalonnage

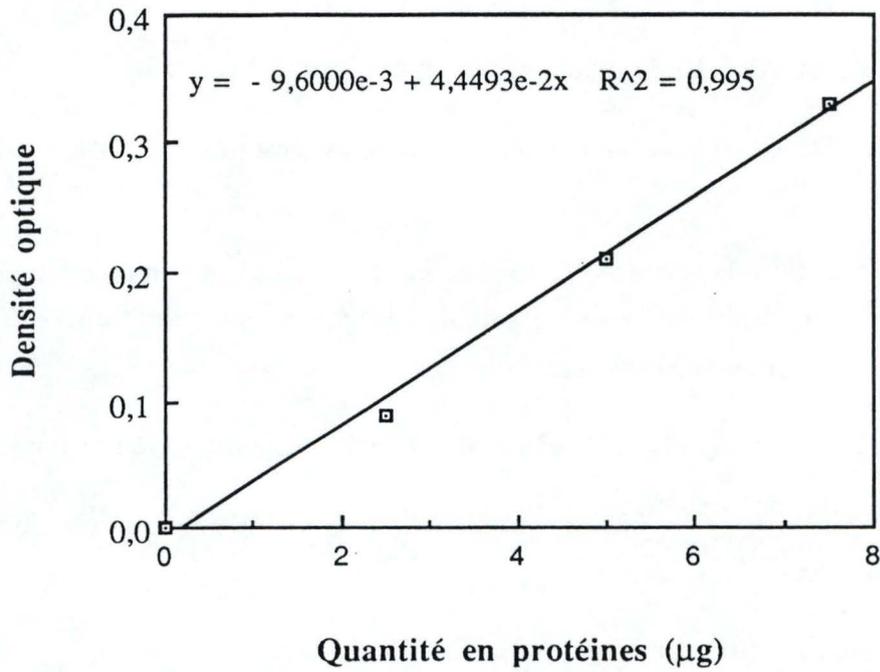


Figure II.2. : Droite d'étalonnage permettant la conversion des valeurs de D.O. obtenues en μg de protéines.

- Pepstatine* 20µg/ml (P-4265, Sigma Chemical Co, USA)

La liste des différents inhibiteurs de protéases est illustrée sur la Table II.1

3.2.2. METHODE

Toutes les opérations d'extraction de protéines sont effectuées à 4°C.

Après stimulation des cellules, les boîtes sont décantées et rincées 2 fois avec 2 ml de PBS froid pour arrêter la réaction. Les cellules sont alors raclées dans 1,5 ml de PBS froid et récoltées dans un eppendorf.

Après une centrifugation de 10 minutes à 1000 rpm (Hettich Universal, Allemagne), le culot est resuspendu dans 150 µl de tampon de lyse. On laisse se dérouler la réaction pendant 10 minutes à 4°C avant de centrifuger à nouveau les eppendorfs mais cette fois à vitesse maximale (13000 rpm, Janetsdi TH13) pendant 20 minutes, toujours à 4°C, afin d'éliminer les débris cellulaires. On récolte ensuite le surnageant. De ce dernier, on prélève quelques microlitres pour effectuer selon la méthode le dosage protéinique de Bradford (1976). Le reste de l'extrait protéinique est aliquoté avant d'être congelé à -70°C.

Le dosage de protéines s'effectue comme suit : pour chaque échantillon à doser, environ 4 % du volume total d'extrait protéinique est dilué dans 3,2 ml d'eau distillée. Le tout est réparti dans 3 tubes à raison de 0,8 ml par tube. On ajoute, de minute en minute, 0,2 ml de colorant (BIO-RAD, USA), puis on lit l'absorbance à 595 nm après exactement 5 minutes de coloration. La cuvette réduite en verre doit être rincée à l'éthanol ou à l'acétone, puis à l'eau entre chaque lecture.

Les valeurs de densités optiques sont converties en µg de protéines grâce à une droite d'étalonnage allant de 2,5 à 7,5 µg de SAB (sérum albumine bovine) (Figure, II.2).

Transcription Factor	Oligonucleotide Sequence	General Characteristic of Factors
AP1 (c-jun)	5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3' 3'-GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT-5'	Forms DNA binding dimers with other members of the AP1 family and Fos through the leucine zipper formation.
NF-κB	5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'	Binds to κ light chain enhancer in B cells and is present in a covert cytoplasmic form in non-B cells.

Figure II.3. : Séquences des sondes oligonucléotidiques utilisées et caractéristiques générales des facteurs de transcription liés par ces séquences.

3.3. MARQUAGE DE LA SONDE

3.3.1. MATERIEL

- Oligonucléotides dont la séquence est illustrée à la Figure II.3. : - AP-1, 1,75 pmoles / μ l (E-3061, Proméga, USA)
- NF- κ B, 1,75 pmoles / μ l (E- 3291, Proméga, USA)
- Tampon Kinase : 10 fois concentré (1465392, Boehringer Mannheim, Allemagne)
- T4 kinase : 10 unités / μ l (174645, Boehringer Mannheim, Allemagne)
- ATP* : [γ - 32 P]Adénosine 5'-triphosphate (NEG-002A, NEN Dupont, Belgique) dont l'activité spécifique est de 3000 Ci / mmol
- EDTA 0,25 M pH 8 (Merck, Allemagne), autoclavé
- Gel Séphadex S-200 (Pharmacia Biotech, Suède)
- Tampon TE : tampon Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, autoclavé
- Mixture réactionnelle : pour 10 μ l, ajouter dans l'ordre :
 - 6,5 μ l d'eau distillée, autoclavée
 - 1 μ l d'oligonucléotide
 - 1 μ l de tampon kinase
 - 1 μ l de T4 kinase
 - 1 μ l d'ATP*
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)

3.3.2 METHODE

On prépare la mixture réactionnelle et on l'incube 15 minutes dans un bain préalablement chauffé à 37°C. On arrête la réaction de marquage en ajoutant, pour 10 µl de solution, 2 µl d'EDTA ainsi que 10 µl d'eau autoclavée.

Ensuite, pour séparer l'oligonucléotide marqué des restes d'ATP radioactif libre, on réalise une purification sur Spin colonne. On coule un gel dans une seringue de 1 ml, on effectue une centrifugation de 2 minutes à 2400 rpm (Jovan B-311, Vel, Belgique). On répète ces deux dernières étapes de façon à ce que le gel atteigne 1 ml.

On dépose alors au centre de la colonne l'échantillon et, après un nombre déterminé de centrifugations (au plus 3 de façon à éluer un maximum de sonde marquée tout en retenant l'ATP libre sur la colonne), on récolte l'oligonucléotide marqué.

3.4. REACTION DE LIAISON ENTRE LA SONDE ET LES PROTEINES

3.4.1. MATERIEL

- Le tampon, permettant la liaison entre l'oligonucléotide et les protéines, se compose de :

- HEPES : 0,01 M pH 7,5 (17 257 88, Janssen Chimica, Belgique)
- Glycérol 20 % : (4094, Merck , Allemagne)
- KCl 300 mM (4934, Merck, Allemagne)
- DTT 10 mM (D-8024, Sigma Chemical Co, USA)

- Poly d(I-C) : (108812, Boehringer Mannheim, USA) 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 des protéines avec la sonde marquée.

- SAB : albumine de sérum bovin sans DNAases (2518, Sigma Chemical Co, USA).

Sa présence dans le mélange permet d'éviter la liaison non spécifique entre la sonde et diverses protéines de l'extrait cellulaire.

- Tampon F :

- Ficoll 20 % (Merck, Allemagne)
- HEPES 100 mM pH 7,5 (17 257 88, Janssen Chimica, Belgique)
- KCl 300 mM (4934, Merck, Allemagne)
- DTT 10 mM (D-8024, Sigma Chemical Co, USA)
- Pefabloc* 20 µl/ml (236 608, Boehringer Mannheim, Belgique)

- Tampon D :

- HEPES 20 mM pH 7,5 (17 257 88, Janssen Chimica, Belgique)
- Glycérol 20 % : (4094, Merck , Allemagne)
- KCl 100 mM (4934, Merck, Allemagne)
- Nonidet P-40 0,25 % (N-6507, Sigma Chemical Co, USA)
- EDTA 0,5 mM à pH 7,5 (Merck, Allemagne)
- DTT 2 mM (D-8024, Sigma Chemical Co, USA)
- Pefabloc* 20 µl/ml (236 608, Boehringer Mannheim, Belgique)

3.4.2. METHODE

Le mélange de réaction contient 4 µl d'eau autoclavée, 4 µl de tampon de liaison, 2 µl de poly d(I-C), 2 µl de SAB (10 mg/ml), un volume de sonde marquée au ³²P tel que chaque test contienne 20000 cpm*, et enfin 25 µg de protéines extraites. Pour les EMSA AP1, nous avons parfois testé d'autres concentrations en poly d(I-C) et nous avons également utilisé un second tampon de liaison composé de 2µl de SAB, 2µl de poly d(I-C), 4 µl de tampon F et 2 µl de tampon D. Les eppendorfs sont centrifugés quelques secondes afin de rassembler tous les constituants au fond des eppendorfs.

On laisse alors incuber ce mélange réactionnel 30 minutes à température ambiante avant d'ajouter dans chaque eppendorf 1 μ l de bleu de bromophénol 0,3% (Janssen Chimica, Belgique) et ce juste avant de déposer les échantillons sur le gel.

* La radioactivité de la sonde doit être réévaluée par comptage avant chaque expérience. A cette fin, on met 1 μ l de la sonde dans une fiole contenant 5 ml d'aqualuma puis on réalise un comptage du nombre de coups par minute (cpm) pendant 3 minutes grâce à un compteur à scintillation β (Beckman LS1801, USA). Notons également qu'il faut également utiliser la sonde assez rapidement après son marquage car la durée de demi-vie du ^{32}P n'est que de 14 jours.

3.5 ELECTOPHORESE ET REVELATION DES FILMS

3.5.1. MATERIEL

- Le tampon d'électrophorèse (TBE 0,5 x) est dilué 20 fois à partir d'une solution stock (TBE 10 x) qui est composée de :

- TRIS 0,9 M (1405082, Janssen Chimica, Belgique)
- Acide borique 0,9 M (12015, Merck, Allemagne)
- EDTA 0,02 M (Merck, Allemagne)

- Le gel d'électrophorèse est composé de, pour 100 ml :

- 14 ml d'une solution stock d'acrylamide 30% / 1 % de N,N'-méthylène bisacrylamide 1%, ce qui donne une concentration finale en acrylamide de 4%
- 5 ml de TBE 10 x, ce qui donne une dilution finale de 0,5x.
- 82,25 ml d'eau distillée
- 50 μ l de TEMED (1610700, Biorad, Belgique); ce qui donne une

concentration finale de 0,005%

- 0,6 ml d'ammonium persulfate: (1610800, Biorad, Belgique), ce qui donne une concentration finale de 0,06%

Le TEMED et le persulfate d'ammonium sont ajoutés en dernier lieu puisque ce sont les agents polymérisateurs.

Tous ces produits proviennent de chez QBRL (USA)

- Films MP: Hyperfilms MP pour isotopes émettants des radiations β et γ (RPN6, Amersham, Belgique).

- Pour révéler les films, on utilise le révélateur Kodak D-19 dilué 5 fois et le fixateur Hypam dilué lui aussi 5 fois.

3.5.2.METHODE

Dans un premier temps, on coule le gel d'électrophorèse et on le laisse polymériser pendant environ 1 heure. Il s'agit d'un gel natif, c'est-à-dire sans SDS de façon à ne pas dénaturer la protéine (en l'occurrence un facteur de transcription) active éventuellement présente dans l'extrait protéique. Lorsque le gel est polymérisé, on le place dans la cuve d'électrophorèse avec le tampon d'électrophorèse (TBE 0,5 x) et on lui fait subir un "pré-run" d'1 h 30 à 100 V. Ensuite, on dépose les échantillons dans les puits et on les laisse migrer durant environ 2 h30 à 3 h à 100V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne les 2 / 3 du gel. Le gel est alors démoulé et séché sous vide à 80°C pendant 1 heure entre un papier Whatman d'un côté et un papier cellophane de l'autre. Ensuite, dans l'obscurité, on dépose le gel dans une cassette d'autoradiographie Kodak en présence d'un film MP "préflashé". Ce n'est que 3 jours plus tard que nous révélons les résultats en chambre noire. A cette fin, on place le film 5 minutes dans le révélateur, puis dans l'eau (30 secondes) et enfin dans le fixateur (4 minutes). Pour terminer, le film est rincé à l'eau distillée avant d'être séché à l'air libre.

3.6. QUANTIFICATION

Pour quantifier l'intensité des 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 x1024 (Videk) et d'un ordinateur comprenant entre autre le 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.).

On demande ensuite 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 mm²) de la bande. Ces données permettent de calculer la proportion de radioactivité présente sur la bande retardée.

4. WESTERN- BLOT

La technique de western-blot permet de détecter une protéine particulière dans un extrait cellulaire. Les principales étapes de cette technique sont les suivantes :

- Séparation des protéines de l'extrait cellulaire par électrophorèse
- Transfert des protéines sur un support solide, en l'occurrence une membrane de nitrocellulose.
- Traitement de la membrane de nitrocellulose afin de limiter la fixation non-spécifique
- Détection de la protéine recherchée par anticorps spécifiques
- Révélation par chémiluminescence, par le système ECL (Enhanced Chemiluminescence).

Avant de détailler ces différentes étapes, nous allons décrire comment nous obtenons,

à partir de cellules stimulées ou non, les fractions cytosoliques sur lesquelles nous avons réalisé le western-blot.

4.1. PREPARATION DE LA FRACTION CYTOSOLIQUE

4.1.1. MATERIEL

- Solution de sucrose 0,25 M (Tirlemont, Belgique), imidazole 3 mM (4716, Merck, Allemagne) tamponné à pH 7,4 à laquelle on ajoute :

- Leupeptine* 10 µg / ml (L-2884, Sigma Chemical Co, USA)
- DTT (dithitréithol) 5 mM (D-8024, Sigma Chemical Co, USA)
- Péfabloc* 5 µl / ml (1429876, Boehringer Mannheim, Allemagne)
- Aprotinine* 10 µl / ml (A-6279, Sigma Chemical Co, USA)

- Orthovanadate, inhibiteur de tyrosine phosphatase, dilué dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 10^{-2} M (S-6508, Sigma Chemical Co, USA)

* ces inhibiteurs de protéases sont décrits à la Table II.1 au point 3.1.1 des Matériels et Méthodes

- PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9%, porté à pH 7,4. Cette solution est conservée à 4°C

4.1.2. METHODE

La méthode de préparation des fractions cytosoliques est inspirée de Remacle *et al.*, 1980.

Après stimulation des cellules (voir point 3.1 des Matériels et Méthodes), les boîtes sont décantées et rincées 2 fois avec 2 ml de PBS froid. Les cellules sont alors raclées dans 1,5

ml de solution sucrose-imidazole (à 4°C) et récoltées dans un eppendorf. Après une centrifugation de 10 minutes à 4°C, à 1000 rpm (centrifugeuse Sovall R.T 6000 B, USA), les cellules sont resuspendues dans 150 µl de sucrose-imidazole avant d'être broyées à l'homogénéiseur de Dounce. Soumises à d'importantes forces de cisaillement, les parois cellulaires éclatent. L'homogénéisat est alors transféré dans des tubes à ultracentrifugeuse. Après une centrifugation de 14 min 8 sec à 4°C, à 39000 rpm (centrifugeuse Beckman L5-65), on récupère le surnageant, à partir duquel on prélève quelques µl pour effectuer un dosage protéinique selon la méthode de Bradford (1976). Le reste de l'extrait est aliquoté avant d'être congelé à - 20°C.

Nous avons également réalisé des western-blot à partir d'extraits protéiniques provenant de lysats cellulaires. L'extraction des protéines dans ce cas se fait exactement de la même manière que pour l'EMSA (point 3.2 des Matériels et Méthodes) si ce n'est que l'on rajoute dans le tampon de lyse fraîchement amélioré de l'orthovanadate 10^{-2} M, inhibiteur de tyrosine phosphatases.

4.2. ELECTROPHORESE

4.2.1. MATERIEL

- Gel séparateur acrylamide 10 % (ce pourcentage est évidemment à ajuster en fonction du PM des protéines que l'on veut mettre en évidence) composé de :

- 14 ml de tampon Tris 2 M, pH 8,8 (8382, Merck, Allemagne) ce qui donne une concentration finale de 0,74 M. La solution stock est à conserver maximum 3 mois à 4°C.
- 12,5 ml d'acrylamide 30 % / N,N'-méthylène bisacrylamide 0,15 %. Cette solution stock se conserve maximum 1 mois et demi à 4°C, à l'abri de la lumière. On l'utilise donc à une concentration finale de 10 %.
- 0,187 ml de SDS 20 % : Dodécylsulfate de Sodium (13760, Merck, Allemagne) ce qui donne une concentration finale de 0,1 %. La solution stock de 20 % se conserve à température ambiante car il précipite à 4°C.
- 10,8 ml d'eau distillée.

Dégazer pendant 5 minutes sous vide (pour éviter une réaction entre l'oxygène et l'ammonium persulfate qui empêcherait la polymérisation).
Ajouter et mélanger délicatement, juste avant de couler le gel :

- 20µl de TEMED (1610700 Biorad, Belgique); ce qui donne une concentration finale de 0,005 %.
- 75µl d'ammonium persulfate de la solution stock 10% préparée le jour même(1610800 Biorad, Belgique). Il est utilisé à une concentration finale de 0,02 %.

Le TEMED et le persulfate d'ammonium doivent être fraîchement préparés.

- Le gel concentrateur est composé de :

- 2,5 ml de tampon Tris 0,5 M, pH 6,8 (8382, Merck, Allemagne) ce qui donne une concentration finale de 125 mM. Il se conserve 2-3 mois à 4°C.
- 1,5 ml d'acrylamide 30 % / N,N'-méthylène bisacrylamide 0,8 %. Cette solution stock se conserve elle aussi à 4°C, pendant 2 mois. La concentration finale en acrylamide est donc de 3 %.
- 50µl de SDS 20 % (13760,Merck, Allemagne); ce qui donne une concentration finale de 0,1 %.

Dégazer pendant 5 minutes sous vide avant d'ajouter :

- 15 µl de TEMED; ce qui donne une concentration finale de 0,015 %.
- 50 µl d'ammonium persulfate 10% (fraîchement préparée). On l'utilise donc à une concentration finale de 0,05 %.

- Le tampon d'électrophorèse est dilué 4 fois avant usage à partir d'une solution stock composée de :

- Tris 0,05 M (8382, Merck, Allemagne) / Glycine 0,38 M (4201, Merck, Allemagne); pH 8,3
- SDS 0,1 % (13760,Merck, Allemagne)

Cette solution stock se conserve à température ambiante, pendant un mois

maximum.

- Le tampon d'échantillon est composé de :

- Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 (8382, Merck, Allemagne)

- SDS 4,6 % (13760, Merck, Allemagne)

- Glycérol 20% (4096, Merck, Allemagne)

- Bleu de bromophénol 0,006% (1513505, Janssen Chimica, Belgique).

On réalise une solution stock de 1% que l'on conserve à -20°C

- β -mercaptoéthanol 10 % (6369 Fluka, Italie) : cette solution est aliquotée en fractions de 1,5 ml qui sont congelées à -20°C.

- Etalon composé de :

- 5 μ l d'étalon (1610304 SDS-PAGE Bio-Rad, Belgique)

- 45 μ l de Tampon Tris 0,5 M, pH 6,8 (ce qui donne une concentration finale de 225 mM)

- 50 μ l de tampon d'échantillon

4.2.2. METHODE

Une fois réalisé le montage des plaques, on coule le gel séparateur entre les plaques de verre (gardées à la verticale de façon à vérifier l'étanchéité du système) et ce jusqu'à environ 1,5 cm en dessous du peigne. On ajoute alors à la surface du gel ainsi coulé de l'isobutanol saturé en eau pour éviter que le gel ne se craque en surface et ne polymérise pas bien à cause de l'oxygène .

Après polymérisation du gel (minimum 60 minutes), l'isobutanol est enlevé en rinçant avec de l'eau distillée. On enlève l'excès d'eau à l'aide d'un papier Whatman (3mm) puis le gel concentrateur est coulé jusqu'au bord des plaques. La polymérisation de ce dernier prend 45 à 60 minutes.

Pendant ce temps, les différents échantillons sont préparés : on dépose une quantité de 10 μ g de protéines par puits. On prélève dans chaque fraction le volume adéquat (c'est-à-dire le

volume contenant ces 10 µg de protéines) et on le dilue 2 fois dans du tampon d'échantillon (volume 1:1). Ensuite, les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 minutes.

Une fois le gel concentrateur polymérisé et les échantillons (dont l'étalon) préparés, on enlève délicatement le peigne ainsi que les pinces puis on place le gel dans la cuve à électrophorèse avec du tampon d'électrophorèse dilué 4 fois. Ensuite, on dépose les échantillons dans le fond des puits (on veille à déposer un minimum de 20 µl par puit, le maximum conseillé étant de 65 µl) et on les fait migrer pendant 1 h à 30 mA (à travers le gel concentrateur) puis 3-4 h à 45 mA (à travers le gel séparateur).

4.3. TRANSFERT

4.3.1. MATERIEL

- Le tampon de transfert : tampon Tris 0,5 M (8382, Merck, Allemagne), glycine 0,76 M, (4201, Merck, Allemagne) pH 8,3 auquel on ajoute du méthanol 20% final (35175, Janssen Biochemica, Belgique)

- Solution de Bleu de Coomassie, constituée de :

- 500 ml de Méthanol

- 1,6 g de Bleu de Coomassie brillant R (201405, Janssen Chimica, Belgique)

- 100 ml d'acide acétique (1489352, Janssen Chimica, Belgique)

- 500 ml d'eau distillée

- Solution de décoloration du Bleu de Coomassie, constituée de :

- 30% d'éthanol

- 10% d'acide acétique

- 60% d'eau

4.3.2. METHODE

Le transfert (blotting) se réalise en 3 étapes : une étape préliminaire qui consiste à préparer la membrane, l'arrêt de l'électrophorèse et la préparation du système de transfert (système "sandwich").

On utilise pour le transfert une membrane Immobilone (Millipore IPUH00010, membrane en difluorure de polyvinylidène (PVDF, 0,45 μm d'épaisseur) de la grandeur du gel séparateur, que l'on immerge pendant 1 minute dans du méthanol 100 % puis que l'on équilibre avec du tampon de transfert pendant 15 min.

Lorsque le front de migration visualisé par le bleu de bromophénol se trouve à environ 1 cm du bas du gel, on peut arrêter l'électrophorèse. A ce moment, une coloration des différentes bandes de protéines au Bleu de Coomassie peut éventuellement être réalisée. On place le gel dans une solution d'acide trichloroacétique 12% afin de fixer les protéines, puis dans la solution de coloration décrite ci-dessus.

Ensuite, dans un bac en plastique contenant du tampon de transfert, on immerge par ordre et en veillant à éviter les bulles d'air :

- le support en plastique
- le tampon "Scotch Brite" (éponge)
- 2 feuilles de papier Whatman (3mm) de la grandeur du gel
- la membrane d'Immobilone de la grandeur du gel
- le gel séparateur
- 2 feuilles de papier Whatman
- le tampon "Scotch Brite"
- le support en plastique

Après avoir fermement resserré le système "sandwich", on le dépose dans l'appareil de Hoeffer (LKB 2005 Transfor Electroblothing, Pharmacia, Suède) de sorte que le gel soit du côté du pôle négatif et donc la membrane du côté du pôle positif puisque les protéines chargées

négativement (électrophorèse au SDS) doivent migrer du gel vers la membrane. Pour terminer, on rajoute dans la cuve le tampon de transfert (celui-là même qui a servi à la préparation du système sandwich). On réalise le transfert en plaçant le système en chambre froide à 4°C, pendant toute la nuit, à 30 Volt.

4.4. TRAITEMENT ET REVELATION

4.4.1. MATERIEL

- Solution de coloration au Rouge Ponceau : 1g de Rouge Ponceau (0,2% final) (14275, Merck, Allemagne) est dissout dans 75 ml d'acide trichloroacétique 20% (0,3% final, REF). La solution est portée à un volume de 500 ml avec de l'eau distillée.

- Blotto 5% à préparer le jour même :

- PBS 1X final, pH 7,4 dilué à partir d'une solution stock de PBS 10x

- Lait en poudre 5% (Gloria)

- Merthiolate 0,001% (71230, Fluka, Belgique) dilué à partir d'une solution stock de 1 % (conservée à -20°C)

- 0,1 % de Tween 20 (P-1379, Sigma Chemical Co, USA)

- Solution TBS+Tween 20 0,1%, pH 7,4 :

- On prépare une solution stock constituée de : Tris 0,2 M (8382, Merck, Allemagne), NaCl 1,37 M (Merck, Allemagne), pH 7,6

Cette solution se conserve à température ambiante. Le jour de l'expérience, elle est diluée 10x de la manière suivante :

- 300 ml de la solution stock

- 2700 ml d'eau distillée

- 3 ml de Tween 20

De cette solution, on retire 100 ml qui serviront à diluer l'anticorps, avant

d'ajouter aux 2900 ml restant, 2,9 g de lait en poudre 0,1 % (Gloria).

- Anticorps anti-p42^{mapk} (erk 2), anticorps monoclonal de souris (05-157, Upstate Biotechnology Incorporated, USA) fractionné et conservé à -20°C. Il est dissout le jour du blotting à raison de 1,5 µg / ml dans du TBS-T

- Anticorps secondaire anti-souris lié à la peroxydase (NA 931, Amersham, Belgique) conservé à 4°C. La dilution utilisée est de 1:5000.

- Révélateur E.C.L. : Enhanced Chemoluminescence (Amersham, Belgique)

4.4.2. METHODE

Le lendemain matin, on termine le transfert en augmentant le voltage à 50 volt, pendant 30 minutes, puis on colore la membrane au Rouge Ponceau, 5 minutes sous agitation. On la rince ensuite 2 à 3 fois avec de l'eau distillée pour repérer et on marque au crayon les protéines étalon. Cette coloration aspécifique est une méthode simple pour visualiser toutes les protéines présentes sur le gel et transférées sur la membrane. Elle permet donc d'apprécier directement l'efficacité du transfert et de connaître la position des marqueurs de taille qui permettront d'identifier les protéines.

On décolore ensuite la membrane dans du PBS 1x puis on la place dans un sac plastique dans lequel on ajoute 30 ml de Blotto 5% par membrane et on soude le sac. Le Blotto 5 % va saturer la membrane et donc limiter les liaisons non spécifiques. La membrane, maintenue entre deux plaques de verre va être incubée 1 heure, sous agitation, dans la chambre à 37°C.

On la rince alors 3 fois consécutivement (1 x 15 minutes et 2 x 5 minutes) avec la solution de TBS-T 1x à laquelle on a ajouté 0,1% de lait en poudre.

Pour localiser sur le support la protéine qui nous intéresse, on utilise un anticorps qui reconnaît spécifiquement cette protéine. Il s'agit en l'occurrence un anticorps de souris spécifique de la protéine kinase p42^{mapk} (c'est l'anticorps primaire). Ensuite, comme on a recours à une détection indirecte puisqu'on ajoutera un second anticorps anti-souris qui reconnaît le premier. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase qui va catalyser la réaction de décomposition de l'H₂O₂ en H₂O et O₂⁻. La protéine est alors révélée par chémoluminescence en présence de luminol. Celui-ci est oxydé et va monter dans un état excité. Il ne peut retourner à son état fondamental qu'en émettant de la lumière, ce qui permettra

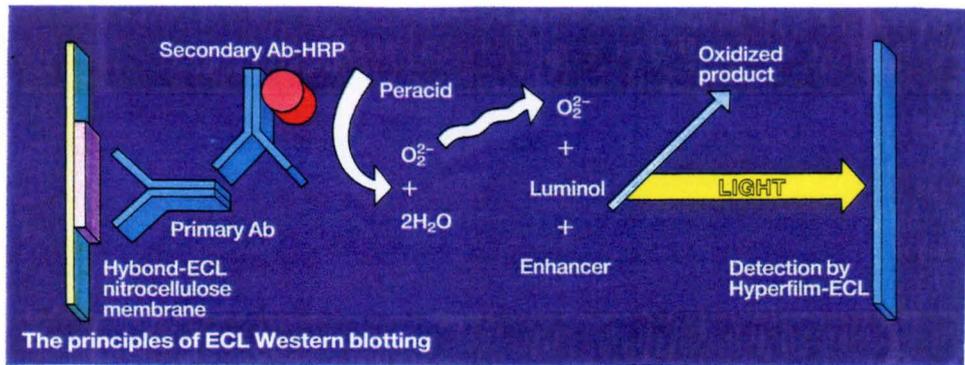


Figure II.4. Principe de détection du système ECL (Enhanced Chemiluminescence).

la détection des complexes formés (Figure II-4).

Ainsi, la membrane est remise dans un sac plastique dans lequel on ajoute l'anticorps p42mapk dilué 750 fois dans le TBS-T sans lait puis elle incube 2h30 à 37°C. Une fois l'hybridation réalisée, il est nécessaire d'éliminer l'anticorps non fixé. La membrane est donc à nouveau rincée 3 x 15 minutes, cette fois avec du TBS-T+ 0,1% de lait préchauffé à 37°C, puis incubée avec 10 ml d' anticorps secondaire, 1 heure, à température ambiante. Cet anticorps, anti-IgG de souris lié à la peroxydase, est dilué à raison de 1 : 5000 dans du TBS-T. Rincée 1 x 15 minutes puis 4 x 5 minutes avec du TBS-T+lait, la membrane est alors mise en présence de liquide de révélation à raison de 0,125 ml / cm², soit environ 10 ml pour une membrane de 14,5 x 12,5 cm et ce pendant 1 minute.

4.5. REVELATION DU FILM

4.5.1. MATERIEL

- Films d'exposition: Hyperfilms MP pour isotopes émettants des radiations β et γ (RPN6, Amersham, Belgique).

- Pour révéler les films, on utilise le révélateur PQ Universal dilué 5x et le fixateur Hypam lui aussi dilué 5x.

- La solution d' Amidoschwartz qui contient :

- 250 mg d'Amidoschwartz (M1167, Merck, Allemagne)
- 200 ml d'éthanol (Merck, Allemagne)
- 50 ml d'acide acétique (1489352, Janssen Chimica, Belgique)
- 50 ml d'eau distillée

4.4.2. METHODE

Après avoir précautionneusement enlevé un maximum de liquide révélateur en

l'absorbant sur du papier Whatmann, on place la membrane dans une cassette d'autoradiographie et, en chambre noire, on dépose un film sur celle-ci. On expose le film 1 minute. Si, après développement, le signal est trop fort, il convient de diminuer le temps d'exposition et, dans le cas contraire, de l'augmenter.

Pour développer le film, on le place dans le révélateur jusqu'à ce qu'apparaissent les bandes, puis dans de l'eau distillée (30 secondes) et enfin dans un bain contenant le fixateur pendant 4 minutes. Pour terminer, le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

Une coloration des différentes bandes de protéines peut être réalisée en plongeant la membrane dans la solution d'Amidoschwartz 5 minutes. Après l'avoir rincée à l'eau, on peut la conserver dans un sac plastique.

4.5. QUANTIFICATION

Voir point 2.6 des Matériels et Méthode.

5. IMMUNOCYTOCHIMIE : IMMUNOFLUORESCENCE

L'immunofluorescence est une technique qui permet de mettre en évidence la localisation d'un composé protéinique particulier dans la cellule grâce à l'utilisation d'anticorps qui lui sont spécifiques.

5.1 CULTURE ET STIMULATION DES CELLULES

Les solutions utilisées pour cultiver et stimuler les cellules sont décrites au point 2.1.1. dans les Matériels et Méthodes.

Les cellules sont repiquées, dans 1 ml d' OPT+SB 10%, à raison de $1,5 \times 10^4$ cellules / cm² dans des boîtes de pétri de 3,5 cm de diamètre (Falcon, USA). Chacune d'elles contient

une lamelle couvre-objet de 2 x 2 cm (Vel, Knittel Glaser, Allemagne). Vingt-quatre heures plus tard, chaque boîte est rincée 2 x avec du milieu M, puis incubée dans 2 ml d'OPT+SB 0,1%. Le lendemain, les cellules sont à nouveau rincées 2 x avec 3 ml d'OPT+HLA 0,2 %, puis stimulées pendant différents temps d'incubation avec 2 ml d'OPT+HLA 0,2 % contenant le médiateur à savoir le PDGF (20 ng / ml).

5.2. IMMUNOFLUORESCENCE

5.2.1. MATERIEL

- Tampon PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de Na Cl 0,9 %, porté à pH 7,4.
- Solution de PBS-SAB 0,1 % : PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (A-6793, Sigma Chemical Co, USA)
- Solution de PBS-Formaldéhyde 1 % (4005, Merck, Allemagne) : on dissout le formaldéhyde en le faisant bouillir, sous hotte aspirante.
- Méthanol pur (Merck, Allemagne)
- Solution de PBS-Triton X-100 0,1% (H-0421, Sigma Chemical Co, USA)
- Solution de PBS-NGS 10% ("Normal goat serum", G-9023, Sigma Chemical Co, USA)
- Anticorps primaire : anticorps anti -erk 2 de lapin polyclonal (sc-154, Santa Cruz, USA)
- Anticorps secondaire : anti-IgG de lapin, marqués à la fluorèscéine, dilués dans du PBS à une concentration finale de 2 µg / ml.
- Solution de PBS-Glycérol (104094, Merck, Allemagne) dans les proportions de 9 : 1, pH 9.

5.2.2. METHODE

Après la stimulation, chaque cupule est rincée précautionneusement 3 x avec du PBS. Ensuite, les cellules sont fixées sur les lamelles d'abord avec le paraformaldéhyde 1 %, à 4°C pendant 90 secondes, puis avec le méthanol, pendant 10 minutes à -20°C. Rincées au PBS, les cellules sont alors perméabilisées avec le Triton X-100 0,2 % pendant 12 minutes afin de permettre l'entrée des anticorps dans les cellules. On réalise ensuite le marquage non spécifique des cellules en les incubant pendant 20 minutes en présence du NGS 10 %.

Pendant cette étape, on prépare la quantité d'anticorps primaires nécessaires pour l'expérience (environ 100 µl d'anticorps primaires par lamelle) et on la centrifuge 10 minutes à 100 rpm (Hettich Universal, Allemagne) de façon à éliminer les anticorps qui seraient dénaturés et qui précipitent avec le NGS. On utilise alors le surnageant pour le marquage, celui-ci se réalise pendant toute une nuit et dans une atmosphère humide.

Le lendemain, les cellules sont rincées 3 x dans du PBS-SAB avant d'être incubées en présence de l'anticorps secondaire pendant 1 à 2 heures, à température ambiante et dans l'obscurité. Après un dernier rinçage au PBS (3 x 3 ml), les lamelles sont montées dans une goutte de glycérol-PBS sur une lame porte-objet lavée à l'alcool. Les lamelles sont scellées au vernis à ongle et le tout est placé dans l'obscurité. On peut alors les observer au microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz, Allemagne).

III. Résultats

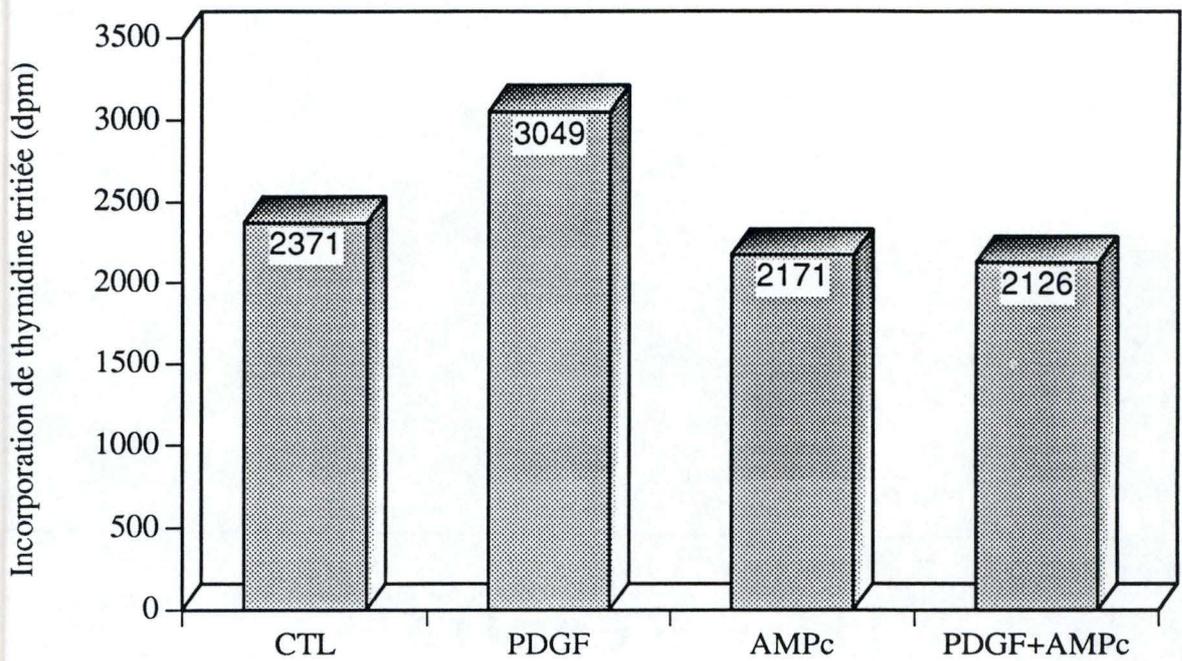


Figure III.1. : Effet du PDGF (20 ng/ml) en présence ou non de db-AMPc (10^{-3} M) sur la prolifération des fibroblastes de poumon humain en 29^{ème} génération. Les cellules sont préincubées dans de l'OPT+SB 0,1% pendant 24 heures avant d'être stimulées dans de l'OPT+HLA 0,2% en présence ou non de ces médiateurs. La prolifération est estimée après 48 heures par la méthode d'incorporation de thimidine tritiée. Les résultats sont exprimés en dpm incorporés. Chaque colonne correspond à la moyenne de deux cupules, sachant qu'il y a 20000 cellules par cupule.

1. MODULATION PAR L'AMPC DE LA PROLIFERATION INDUITE PAR LE PDGF

L'AMPC intracellulaire est depuis longtemps connu pour les effets modulateurs qu'il exerce sur la prolifération de nombreux types cellulaires. En effet, des analogues de l'AMPC comme le dibutyryl-AMPC (db-AMPC) et le 8-bromo-AMPC, ou des agents qui induisent une élévation de la concentration intracellulaire en AMPC comme la forskoline (activateur de l'adénylate cyclase) ou l'IBMX (3 isobutyl - 1 méthylxanthine, un inhibiteur de l'AMPC phosphodiesterase) stimulent la prolifération des cellules épithéliales, des hépatocytes, des cellules Swiss 3T3 et des thyrocytes de chien (Hordijk *et al.*, 1994). Par contre, ces mêmes agents inhibent la prolifération d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules lymphoïdes ou les cellules neuronales (Hordijk *et al.*, 1994). Les effets médiés par l'AMPC vont donc, en fonction du type cellulaire étudié, dans les deux sens : soit ils contrecarrent, soit ils potentialisent les effets pro-prolifératifs induits ou non par les facteurs de croissance.

En ce qui concerne les fibroblastes de poumon humain sur lesquels nous travaillons, nous avons montré au laboratoire qu'une augmentation du taux en AMPC dans la cellule provoquait une inhibition de la prolifération stimulée par le PDGF (Gillon, 1992)

Pour ces expériences, les cellules étaient incubées directement dans du milieu OPT+HLA 0,2 %, en l'absence totale de sérum, parce que l'on dosait également les dérivés de l'acide arachidonique dans les milieux de cultures. Le dosage de ces métabolites est plus fiable en l'absence de sérum. Dans notre travail, nous avons préféré préincuber les cellules en présence de sérum 0,1 %, avant de les stimuler dans le milieu OPT+HLA 0,2 % avec du PDGF ou non ce qui correspond aux conditions classiquement utilisées tant pour les tests de prolifération que pour les tests d'activation des MAP kinases. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si on reproduisait bien les effets de l'AMPC dans ces conditions.

Les fibroblastes de poumon humain ont été pré-incubés pendant 24 heures dans un milieu pauvre en sérum (OPT+SB 0,1 %), de façon à ce que les cellules engagées dans le cycle cellulaire puissent terminer leur mitose (pour les protocoles détaillés, voir le point des Matériels et Méthodes point 2.1.2.). Les fibroblastes ont ensuite été stimulés avec ou sans PDGF (10 ng/ml), avec du db-AMPC (10^{-3} M) et avec les deux médiateurs simultanément. La prolifération est mesurée après 48 heures par la méthode d'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats exprimés en dpm incorporés sont repris à la Figure III.1.. L'effet pro-prolifératif du PDGF est visible après 48 heures, il est de 128,6 % par rapport au contrôle. Cet effet est nettement

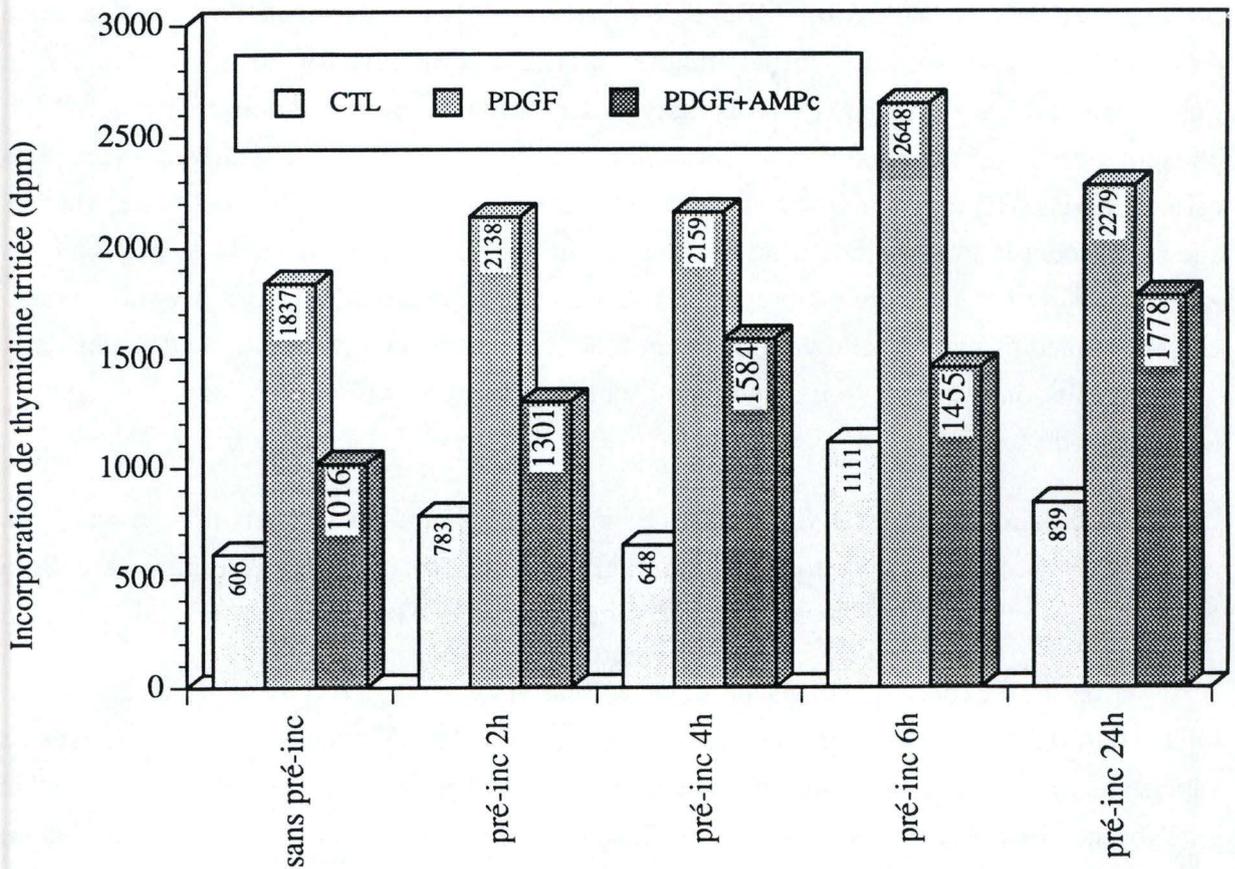


Figure III.2. : Effet d'une pré-incubation de 2, 4, 6 et 24 heures au db-AMPc sur la prolifération de fibroblastes de poumon humain en 34^{ème} génération induite par le PDGF. Les cellules ont été cultivées comme décrit dans les Matériels et Méthodes (au point II.2.1.2.) et incubées pendant 24. heures dans de l'OPT+SB 0,1% avant de réaliser l'expérience. Après un rinçage, elles sont pré-incubées en présence de db-AMPc (10^{-3} M) puis stimulées dans de l'OPT+HLA 0,2% en présence de PDGF (20 ng/ml) et/ou de db-AMPc (10^{-3} M). La prolifération est estimée après 48 heures par la méthode d'incorporation de thimidine tritiée. Les résultats de ces tests sont exprimés en dpm incorporés. Chaque colonne correspond à la moyenne de deux cupules, sachant qu'il y a 20000 cellules par cupule.

contrecarré par le db-AMPC. En effet, la prolifération induite par le PDGF en présence de db-AMPC n'est plus que de 89,7 % par rapport aux cellules contrôles. L'effet inhibiteur du db-AMPC est de 100 %. Ces résultats, obtenus sur des fibroblastes pré-incubés dans le sérum 0,1%, reproduisent donc bien ceux qui avaient été obtenus en l'absence de sérum (Figure I.44.).

Dans un second temps, nous avons voulu voir si on pouvait reproduire les effets inhibiteurs de l'AMPC, en pré-incubant les cellules en sa présence, avant de réaliser la stimulation au PDGF. L'expérience suivante a été réalisée : les cellules ont été pré-incubées en présence ou non de db-AMPC (10^{-3} M) pendant 0, 2, 4, 6 et 24 heures dans l'OPT+HLA 0,2 %. Suite à cela, elles ont été stimulées ou non par du PDGF (20 ng/ml), du db-AMPC (10^{-3} M), ou en présence des deux médiateurs simultanément. Si l'on regarde après 48 heures (Figure III.2.) les effets induits par ces différents médiateurs sur la prolifération, on constate que :

sans pré-incubation :

- les effets pro-prolifératifs induits par le PDGF sont bien marqués par rapport au contrôle rapporté arbitrairement à 100%.

- ces effets sont clairement inhibés par le db-AMPC : le pourcentage d'inhibition est en effet de 63 %.

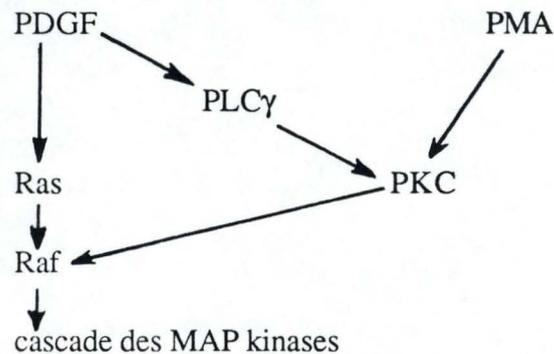
avec pré-incubation :

- les cellules répondent toujours au PDGF. En effet, avec préincubation en présence de db-AMPC, on n'observe pas de différence significative entre les cellules traitées au PDGF sans pré-incubation et celles traitées au PDGF avec pré-incubation quelque soit le temps considéré. Cependant l'AMPC ajouté pendant la stimulation au PDGF exerce toujours son effet inhibiteur.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes moléculaires de la régulation négative de l'AMPC sur la prolifération induite par le PDGF, mécanismes actuellement encore peu connus. Nous allons tenter de voir à quel(s) niveau(x) de la cascade de transduction du signal du PDGF, l'AMPC qui agit vraisemblablement par l'intermédiaire de la PKA, inhibe le signal mitogène induit par le PDGF.

Etant donné le rôle capital que semble avoir la cascade des MAP kinases (MAPK) dans la transmission des signaux mitogènes des facteurs de croissance et ce depuis leur récepteur jusqu'au coeur de la cellule, nous avons testé l'effet du dibutyryl-AMPC (db-AMPC) sur l'activation de la p42^{mapk} induite par le PDGF.

Nous testerons également un second signal mitogénique, le PMA, qui court-circuite le système ras-raf et active la cascade cytoplasmique des MAPK, via l'activation de la protéine kinase C (PKC) selon le schéma représenté ci-dessous :



2. MODULATION PAR L'AMPC DE L'ACTIVATION DES MAP KINASES INDUITE PAR LE PDGF

Mais avant d'étudier la régulation des MAPK stimulées par le PDGF, il nous fallait tout d'abord mettre au point les conditions de détection de ces protéines par western-blot puis de préciser les conditions d'activation des MAPK dans les fibroblastes de poumon humain stimulés au PDGF.

2.1. EFFET DU PDGF SUR LA PHOSPHORYLATION DES P42^{MAPK}

2.1.1. MISE AU POINT DU SYSTEME DE DETECTION DES P42^{MAPK}

Comme les MAPK sont des protéines cytoplasmiques dont la phosphorylation se fait dans le cytosol, nous avons choisi de travailler pour cette première expérience sur des fractions cytosoliques isolées à partir des fibroblastes de poumon humain.

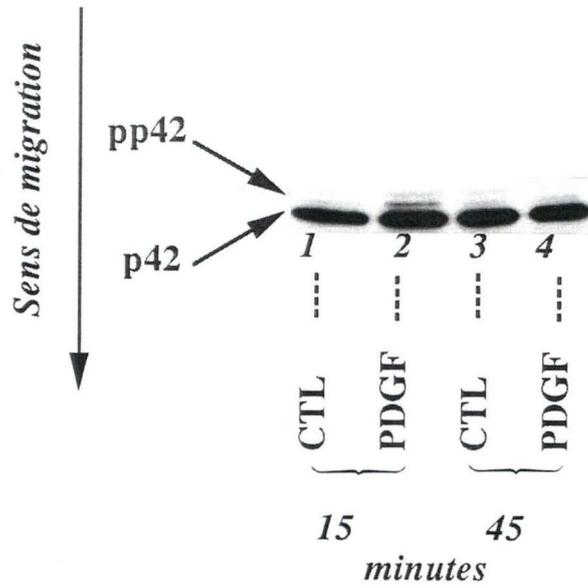


Figure III.3. : Effet du PDGF sur la phosphorylation des p42^{mapk} des fractions cytosoliques obtenues à partir de fibroblastes de poumon humain en 28^{ème} génération. Les cellules ont été stimulées avec 20 ng/ml de PDGF. La quantité de protéines cytosoliques déposées par puits sur le gel d'électrophorèse (acrylamide 15%) est de 10 µg. La présence des p42^{mapk} a été mise en évidence par western-blot grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la p42^{mapk}. Les positions des formes phosphorylées ou non sont respectivement indiquées par pp42 et p42 et ont été confirmées par la position des étalons de poids moléculaire qui ont migré en même temps que les échantillons.

2.1.1.1. Résultats obtenus à partir des fractions cytosoliques

Les fibroblastes de poumon humain ont été stimulés ou non par le PDGF (20 ng/ml) pendant 15 ou 45 minutes puis raclés et centrifugés de manière à obtenir les fractions cytosoliques correspondantes. Pour mettre en évidence la phosphorylation des MAPK, nous avons choisi la technique du western-blot. Les protéines cytosoliques migrent dans un premier temps sur un gel d'électrophorèse 15 % en acrylamide, en présence de SDS. Elles sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et mises en présence d'un anticorps monoclonal anti-MAPK. L'anticorps que nous avons utilisé reconnaît majoritairement les MAP kinases de 42 kDa et dans une moindre mesure les MAP kinases de 44 kDa. C'est pourquoi, nous nous sommes spécialement intéressés à l'activation des MAP kinases de 42 kDa (aussi désignée p42^{mapk} ou ERK 2), activation qui nécessite la phosphorylation de deux de ses résidus: la tyrosine 185 et la thréonine 183 (Nishida et Gotoh, 1993). L'anticorps reconnaît l'enzyme qu'elle soit phosphorylée ou non.

Comme le montre la Figure III.3., le PDGF semble induire la phosphorylation des p42^{mapk} après 15 minutes. En effet, on observe l'apparition d'une seconde bande correspondant aux formes phosphorylées des p42^{mapk} qui, étant de poids moléculaire plus élevé, migrent plus lentement sur le gel d'électrophorèse que les bandes non phosphorylées. Cet effet de PDGF sur l'activation des p42^{mapk} ne semble pas maximal puisque l'intensité de la bande correspondant aux p42^{mapk} reste faible par rapport à celle des p42^{mapk} non phosphorylées. On remarque que la bande correspondant aux p42^{mapk} phosphorylées disparaît après une incubation de 45 minutes en présence de PDGF.

Discussion

Nous avons mis en évidence un effet stimulateur du PDGF (20 ng/ml) sur la phosphorylation des p42^{mapk} dans les fractions cytosoliques de fibroblastes de poumon humain et ce pour un temps de stimulation très court (15 minutes). Ces premiers résultats obtenus sur l'activation des MAP kinases confirment les données de la littérature puisque Burgering *et al.* (1993) ont également montré une phosphorylation des p42^{mapk} sur des fibroblastes NIH-3T3 et Rat-1 stimulés au PDGF bien que dans ce cas, l'effet stimulateur du PDGF était maximal. En effet, ils ont observé la présence d'une bande unique correspondant à

la forme phosphorylée des p42^{mapk} dans les lysats de fibroblastes stimulés pendant 40 minutes à une concentration de 40 ng/ml en PDGF.

En ce qui concerne la technique de détection des p42^{mapk} utilisées sur les fibroblastes de poumon humain, nous pouvons dire que :

- La quantité de protéines cytosoliques déposée sur le gel (10 µg/piste) semble adéquate. Elle sera donc maintenue dans les expériences ultérieures.

- D'après les résultats obtenus, résultats d'ailleurs confirmés par les données de la littérature, la phosphorylation des MAP kinases est une des premières réponses cellulaires induites par le PDGF. Nous nous focaliserons donc sur des temps de stimulation relativement courts, de l'ordre de 10 minutes.

- Les conditions du western-blot, à savoir les conditions de saturation de la membrane avec du lait en poudre, les quantités d'anticorps primaires et secondaires, les différents temps d'incubation et de lavage et la révélation ECL (voir Matériels et Méthodes, point 4.4.) conviennent parfaitement bien pour la détection de cette protéine dans les extraits protéiques des fibroblastes de poumon.

Cependant, afin d'optimiser les conditions de détection des p42^{mapk} chez les fibroblastes de poumon stimulés au PDGF, nous avons procédé aux quelques modifications suivantes :

1. Afin d'améliorer la séparation des bandes phosphorylées et non phosphorylées, nous diminuerons le pourcentage en acrylamide / bisacrylamide du gel séparateur : de 15 %, nous passerons à 10 %.

2. Dans cette expérience préliminaire, nous avons récolté et fractionné les cellules dans du PBS à 4°C. Nous allons par la suite récupérer la fraction cytosolique dans une solution de sucrose-imidazole (celle-ci assure une plus grande stabilité enzymatique) enrichie en inhibiteurs de protéases (DTT, PMSF, Leupeptine, Aprotinine) et en inhibiteur de tyrosine-phosphatases (orthovanadate 10⁻² M).

3. D'après la littérature, la plupart des personnes qui s'intéressent à la régulation de l'activité des MAP kinases travaillent sur les lysats cellulaires plutôt que sur les fractions cytosoliques. Nous allons donc tester et comparer les effets du PDGF sur la phosphorylation des p42^{mapk} provenant soit des lysats cellulaires soit des fractions cytosoliques.

2.1.1.2. Comparaison des fractions cytosoliques et des lysats cellulaires

Les fibroblastes de poumon humain sont été stimulés pendant 10 minutes avec du PDGF à une concentration de 40 ng/ml puisque c'est à ces conditions que Burgering *et al.* (1993) ont observé un effet stimulateur maximal du PDGF sur la phosphorylation des p42^{mapk} des fibroblastes NIH-3T3 et Rat-1. Les cellules ont été raclées, puis soit lysées soit centrifugées de manière à obtenir des fractions cytosoliques (voir Matériels et Méthodes point II.4.1.2.). 10 µg de protéines cytosoliques et de protéines provenant de lysats cellulaires ont été déposées sur un gel d'électrophorèse d'acrylamide 10 % puis soumises à un western-blot utilisant un anticorps anti-p42^{mapk}.

Au niveau technique, signalons tout d'abord que la migration des protéines sur gel d'acrylamide 10 % nous a permis d'obtenir une meilleure séparation des p42^{mapk} phosphorylées ou non (Figure III.4.), et ce par rapport au gel obtenu précédemment où le pourcentage en acrylamide était de 15 % (Figure III.3.). Nous utiliserons donc dorénavant un gel séparateur de 10 % d'acrylamide.

Pour ce qui est des résultats proprement dits, la bande correspondant aux p42^{mapk} phosphorylées semble plus importante dans les fractions cytosoliques que dans les lysats cellulaires obtenus à partir des fibroblastes stimulés au PDGF (Figure III.4.A). Cependant, pour les fractions cytosoliques, nous observons également une bande correspondant aux p42^{mapk} phosphorylées des cellules contrôles, bande qui est à peine visible dans les lysats des cellules contrôles. Une quantification des différentes bandes obtenues sur le gel par le système d'analyse d'image (voir Matériels et Méthodes au point II.3.6.) nous a donc semblé nécessaire afin de connaître avec précision la proportion ou le pourcentage des p42^{mapk} phosphorylées par rapport à la quantité totale de MAP kinases présentes dans les deux types de préparations cellulaires. Comme le montre la Figure III.4.B , la proportion de protéines phosphorylées est en moyenne 4 fois plus importante dans les cellules stimulées que dans les cellules contrôles et cela que ce soit pour les lysats ou pour les fractions cytosoliques. En effet, on passe de 24 % à 76 % de protéines phosphorylées pour les fractions cytosoliques et de 8 % à 33 % pour les lysats cellulaires, ce qui correspond respectivement à 380 % et à 420 % de stimulation de phosphorylation de p42^{mapk} lorsque les contrôles sont rapportés à 100 %. Cependant, bien que la stimulation de la phosphorylation des p42^{mapk} par le PDGF soit comparable dans les deux types de préparations cellulaires , on remarque que pour une quantité totale de p42^{mapk} identique fixée arbitrairement à 100 %, ce qui diffère, c'est la quantité de p42^{mapk} phosphorylée. En effet, dans les lysats cellulaires, on ne recueille que 33 % de p42^{mapk} phosphorylées contre 76 % dans les fractions cytosoliques pour les cellules stimulées au PDGF et respectivement 8 % contre 24 % dans les cellules contrôles. Cette expérience a été réalisée deux fois, avec des résultats comparables.

On peut donc conclure que lorsque l'on travaille avec la fraction cellulaire entière, on

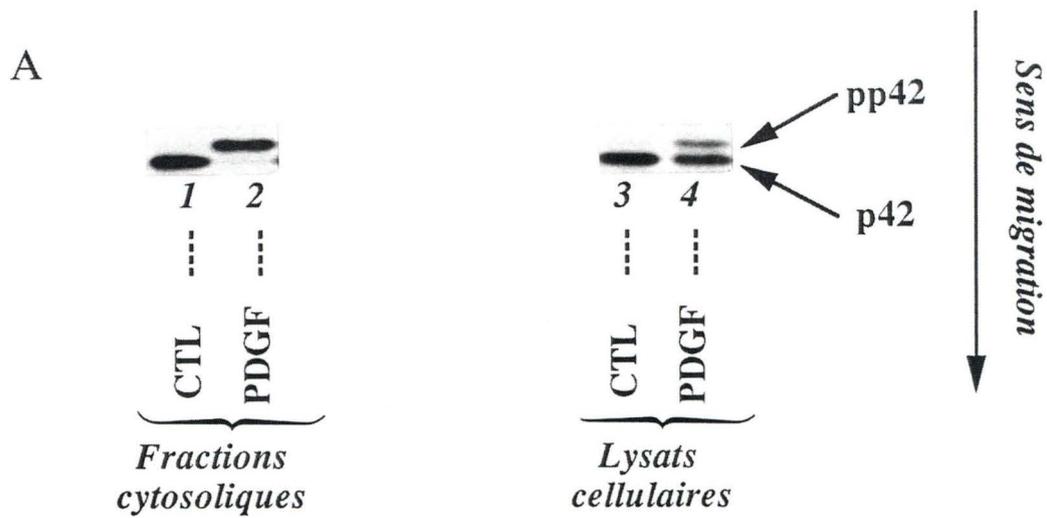


Figure III.4. : Comparaison de l'effet du PDGF sur la phosphorylation des $p42^{\text{mapk}}$ à partir des fractions cytosoliques et des lysats cellulaires de fibroblastes de poumon humain en 30^{ème} génération. Les cellules ont été stimulées ou non pendant 10 minutes avec 40 ng/ml de PDGF dans de l'OPT+HLA 0,2%. La présence des $p42^{\text{mapk}}$ a été mise en évidence par western-blot grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la $p42^{\text{mapk}}$.

A : Mise en évidence des $p42^{\text{mapk}}$ par western-blot. Les positions des formes phosphorylées ou non sont respectivement indiquées par pp42 et p42 et ont été confirmées par des étalons de poids moléculaires qui ont migré en même temps que les échantillons. Il s'agit d'un gel d'acrylamide à 10%.

B

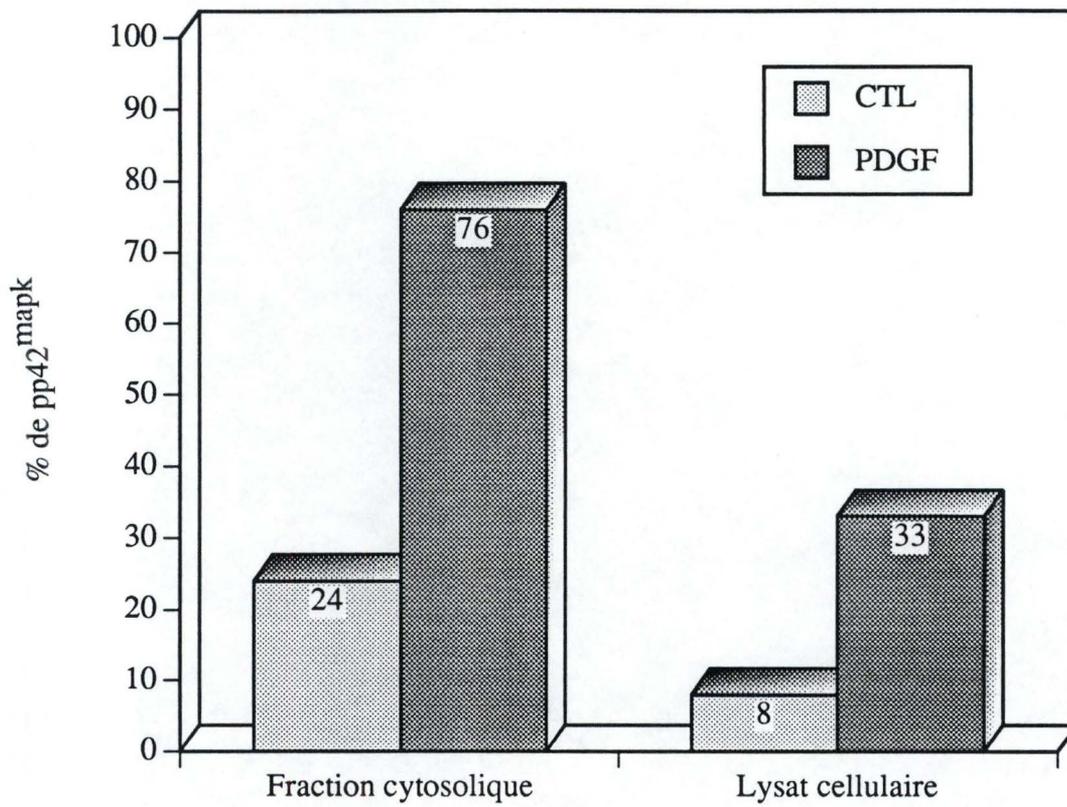


Figure III.4.B : Quantification par le système d'analyse d'images comme décrit dans les Matériels et Méthodes (au point II.3.6). Les bandes ont été converties en IOD (Integrated Optical Density) respectivement pour la forme phosphorylée et non phosphorylée. Les résultats sont exprimés en % de la bande phosphorylée par rapport à la somme des IOD pour les deux bandes, ce qui donne une estimation de la proportion de la forme phosphorylée.

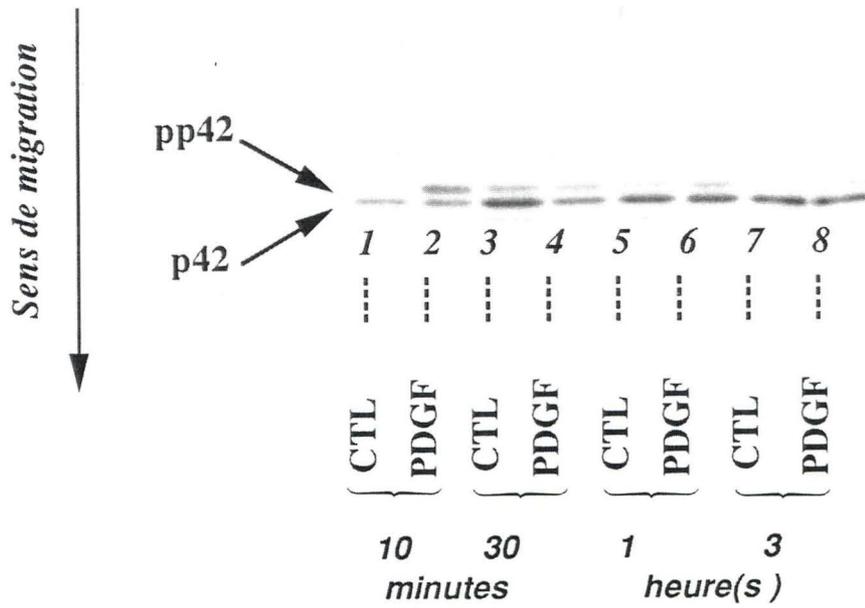


Figure III.5. : Effet du PDGF sur la phosphorylation des p42^{mapk} au cours du temps. Les fractions cytosoliques sont obtenues à partir de fibroblastes de poumon humain en 31^{ème} génération. Les cellules ont été stimulées pendant 10, 30, 60 ou 180 minutes avec 40 ng/ml de PDGF. La quantité de protéines déposées par puits sur le gel d'électrophorèse est de 10 µg.

perd spécifiquement de la forme phosphorylée. Ceci pourrait s'expliquer entre autre par une adsorption éventuelle de ces protéines chargées négativement sur les constituants nucléaires. Comme cette perte spécifique de la forme phosphorylée dans les lysats cellulaires rend sa détection plus difficile, nous avons décidé de travailler dans la suite des expériences sur les fractions cytosoliques.

Les conditions d'extraction des protéines cellulaires et de détection des p42^{mapk} ainsi fixées, nous avons voulu mieux décrire notre modèle d'activation et préciser les conditions d'activation des MAP kinases dans les fibroblastes de poumon humain stimulés au PDGF et ce en faisant varier les deux paramètres suivants : le temps de stimulation en présence de PDGF et la concentration en PDGF.

2.1.1.3. Effet du PDGF en fonction du temps

Les cellules ont été stimulées pendant 10, 30, 60 et 180 minutes avec du PDGF à une concentration de 40 ng/ml. La présence de p42^{mapk} phosphorylée ou non a ensuite été détectée par western-blot sur les fractions cytosoliques comme décrit précédemment.

Comme le montre la Figure III.5., la bande des p42^{mapk} phosphorylées la plus marquée, correspond aux p42^{mapk} phosphorylées des cellules stimulées au PDGF pendant 10 minutes. Si on la compare avec celle du contrôle correspondant, elle est beaucoup plus intense, ce qui n'est pas le cas pour les temps de stimulation au PDGF plus longs. Nous n'avons pas pu préciser nos observations par l'analyse du gel au système analyseur d'images, ce dernier étant défectueux. La phosphorylation de la p42^{mapk} est donc maximale après 10 minutes d'incubation en présence de PDGF. Après 30 minutes, la bande des p42^{mapk} phosphorylées semble comparable à celle du contrôle.

Cette cinétique de phosphorylation de la p42^{mapk} par le PDGF correspond à la cinétique d'activation de la p42^{mapk} obtenue par Lubinus *et al.* (1994) sur les fibroblastes de peau humaine. L'activité de cette kinase, mesurée par phosphorylation d'un de ses substrats, la "myelin basic protein" (MBP) est en effet maximale après 10 minutes.

Nous avons également stimulé des cellules au PDGF pendant 10 minutes, puis nous les avons incubées ou non dans de l'OPT+HLA 0,2 % sans PDGF pendant 30 minutes et nous avons analysé le pattern électrophorétique de la p42^{mapk} par western-blot (Figure III.6.A). Dans ces conditions, on observe un retour de la bande phosphorylée vers la sonde non phosphorylée pour les cellules "post-incubées en présence d'OPT+HLA 0,2 % (30 minutes) (piste 3) par rapport aux cellules uniquement stimulées au PDGF (10 minutes) (piste 2). Ces observations ont été quantifiées (Figure III.6.B). Ces résultats sont tout à fait comparables à

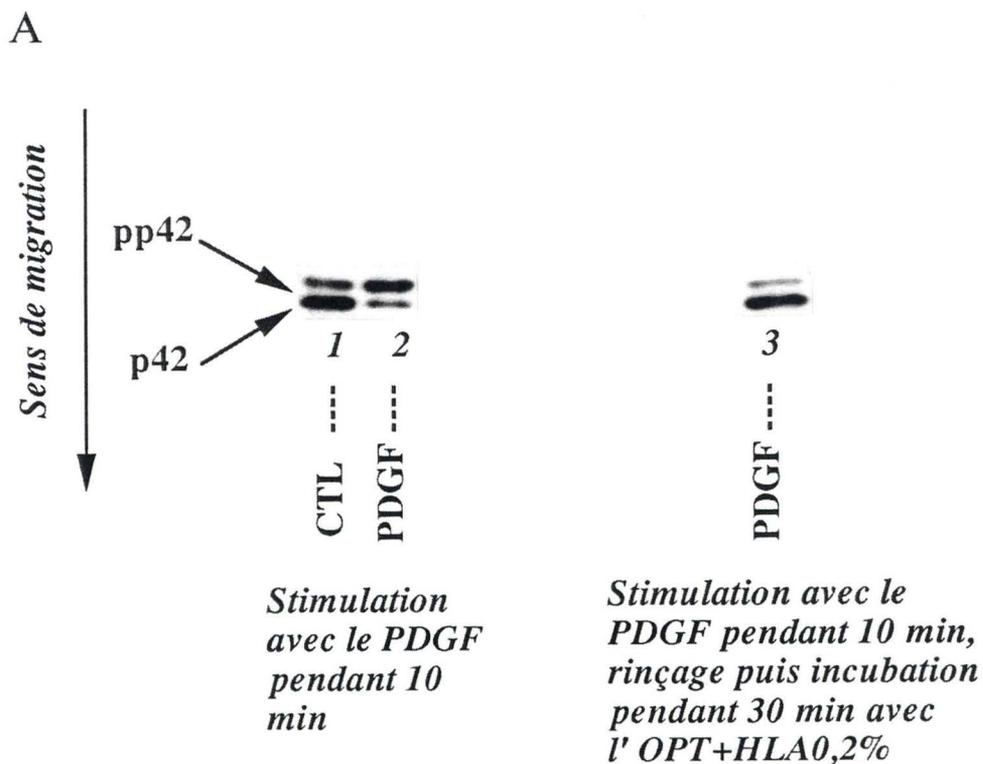


Figure III.6. : Comparaison de l'effet induit par le PDGF sur la phosphorylation des p42^{mapk} selon que le PDGF reste présent dans le milieu de stimulation ou pas. Les fractions cytosoliques sont obtenues à partir de fibroblastes de poumon humain en 31^{ème} génération. Les cellules ont été stimulées pendant 10 minutes avec 40 ng/ml de PDGF avant d'être ou non incubées 30 minutes dans de l'OPT+HLA. La quantité de protéines déposées par puits sur le gel d'électrophorèse est de 10 µg.

A : Mise en évidence des p42^{mapk} par western-blot. Les positions des formes phosphorylées ou non sont respectivement indiquées par pp42 et p42 et ont été confirmées par des étalons de poids moléculaires qui ont migré en même temps que les échantillons. Il s'agit d'un gel d'acrylamide à 10%.

B

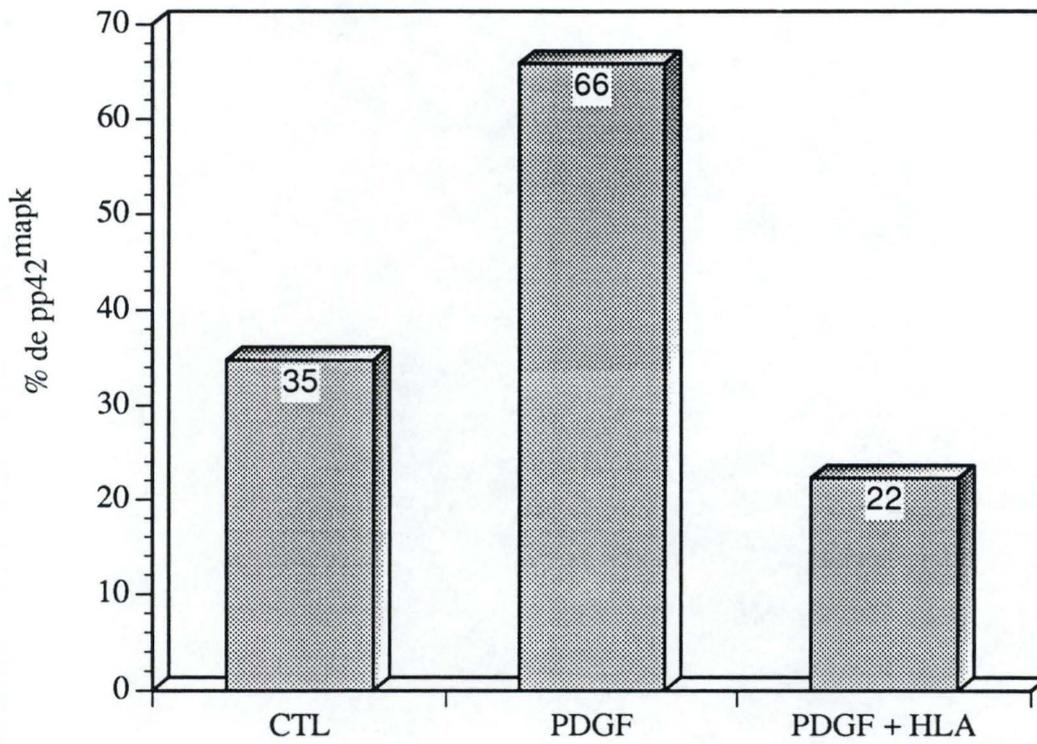


Figure III.6.B Quantification par le système d'analyse d'images comme décrit dans les Matériels et Méthodes (au point II.3.6). Les bandes ont été converties en IOD (Integrated Optical Density) respectivement pour la forme phosphorylée et non phosphorylée. Les résultats sont exprimés en % de IOD de la bande phosphorylée par rapport à la somme des IOD pour les deux bandes, ce qui donne une estimation de la proportion de la forme phosphorylée.

ceux obtenus pour les cellules incubées en présence de PDGF pendant 30 et 60 minutes (Figure III.5.). Ils suggèrent qu'après 10 minutes des mécanismes de régulations négatives se mettent en place, que le PDGF soit présent ou non.

Etant donné que nous avons déterminé un temps d'activation maximal de la p42^{mapk} de 10 minutes, nous allons maintenant tester différentes concentrations en PDGF sur la phosphorylation de ces protéines pour ce temps.

2.1.1.4. Effet du PDGF en fonction de sa concentration

Nous avons observé précédemment que l'effet mitogène du PDGF sur les fibroblastes de poumon était dose-dépendant. En effet, cette stimulation du PDGF se manifestait déjà à partir d'une concentration de 2,5 ng/ml et ne cessait d'augmenter jusqu'à une concentration de 10 ng/ml (Gillon, 1992). C'est à cette concentration de 10 ng/ml que l'on observe en général les effets mitogènes maximum du PDGF (Lubinus *et al.*, 1994). Etant donné le rôle important que semblent jouer les MAP kinases dans les premiers événements de la réponse mitogène aux facteurs de croissance, nous avons voulu savoir si la concentration mitogène maximale de 10 ng/ml en PDGF était suffisante pour induire la phosphorylation des MAP kinases dans les fibroblastes de poumon humain. Les effets du PDGF obtenus en western-blot à cette concentration de 10 ng/ml ont été comparés à ceux obtenus à la concentration de 40 ng/ml puisque nous avons déjà montré auparavant une phosphorylation des p42^{mapk} dans les cellules stimulées à cette concentration en PDGF (Figure III.4.).

Comme le montre la Figure III.7.A, la bande correspondant aux p42^{mapk} phosphorylées semble plus importante que les bandes des p42^{mapk} non phosphorylées pour les cellules stimulées avec 40 ng/ml en PDGF par rapport aux cellules stimulées avec 10 ng/ml. La quantification de ces bandes par le système d'analyse d'image nous permet de confirmer cette observation faite à partir du gel (Figure III.7.B). En effet, nous obtenons respectivement 58 et 73 % de proportion de p42^{mapk} phosphorylées pour les cellules stimulées avec 10 ng et 40 ng/ml de PDGF, ce qui correspond à un effet stimulateur de 166 et 211 %, le pourcentage des p42^{mapk} phosphorylées des cellules contrôles étant rapporté arbitrairement à 100 %.

Discussion

Les résultats obtenus nous révèlent que l'induction de la phosphorylation des p42^{mapk} par le PDGF est plus importante à une concentration de 40 ng/ml que de 10 ng/ml. Cette stimulation observée avec 40 ng/ml se rapproche d'ailleurs des maxima de stimulation

A

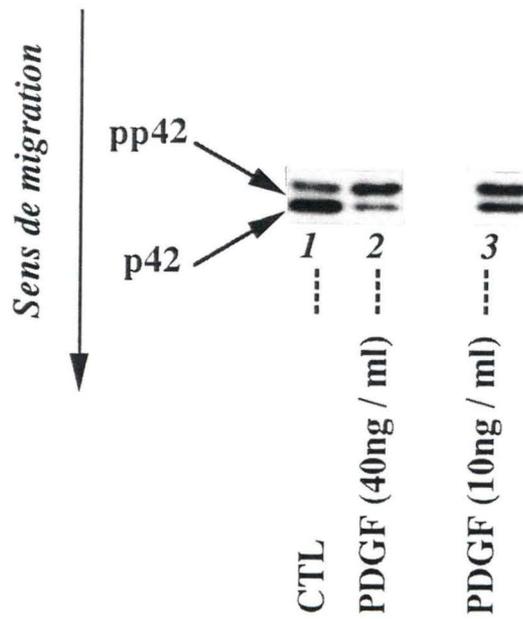


Figure III.7. : Effet de la concentration en PDGF sur la phosphorylation des p42^{mapk} des fractions cytosoliques obtenues à partir de fibroblastes de poumon humain en 31^{ème} génération. Les cellules ont été stimulées ou non pendant 10 minutes avec 20 ng/ml de PDGF

A : Mise en évidence des p42^{mapk} par western-blot. Les positions des formes phosphorylées ou non sont respectivement indiquées par pp42 et p42 et ont été confirmées par des étalons de poids moléculaires qui ont migré en même temps que les échantillons.

B

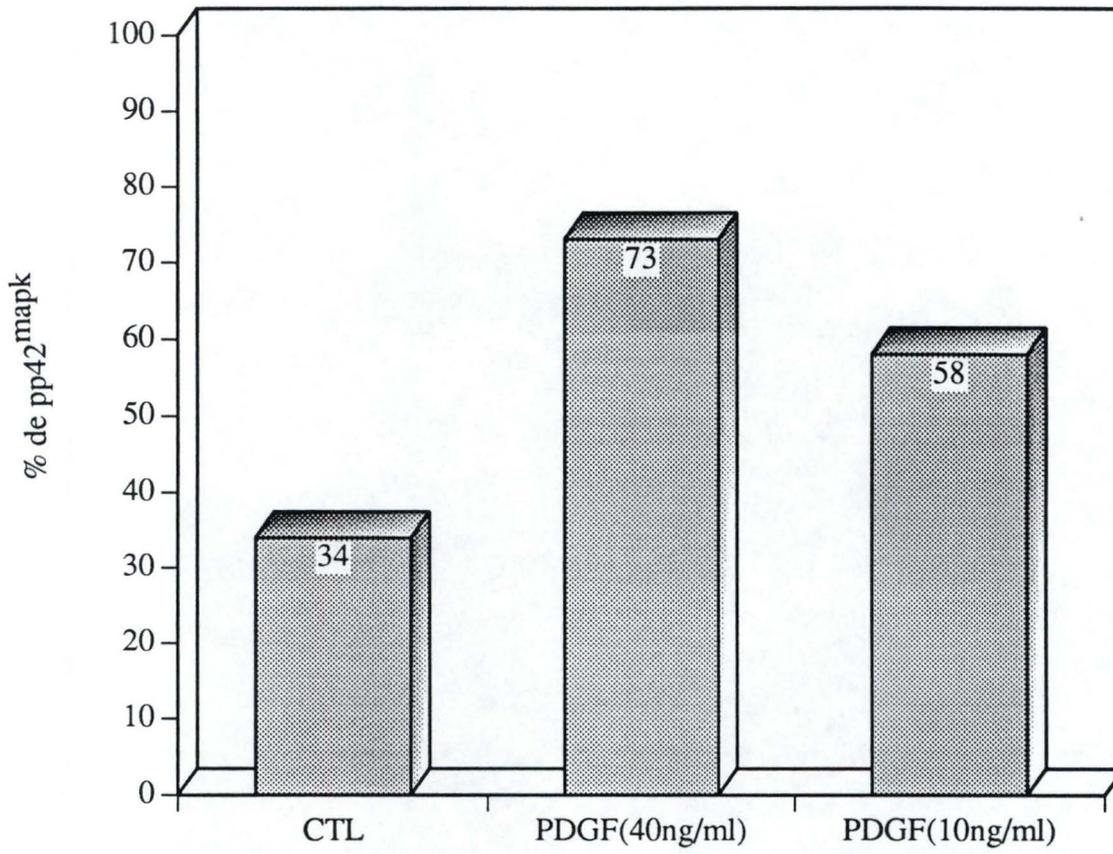


Figure III.7.B : Quantification par le système d'analyse d'images comme décrit dans les Matériels et Méthodes (au point II.3.6). Les bandes ont été converties en IOD (Integrated Optical Density) respectivement pour la forme phosphorylée et non phosphorylée. Les résultats sont exprimés en % de IOD de la bande phosphorylée par rapport à la somme des IOD pour les deux bandes, ce qui donne une estimation de la proportion de la forme phosphorylée.

observables puisque la proportion de p42^{mapk} phosphorylées sur la totalité des p42^{mapk} dans les extraits cytosoliques varient entre 72 et 90 % pour l'ensemble des western-blots que nous avons réalisés au cours du mémoire. Ces résultats confirment les données de la littérature montrant un effet dose-dépendant du PDGF sur la phosphorylation des MAP kinases. Lubinus *et al.* (1994) dosant directement l'activité de la MAPK, observent un effet plateau à partir de la concentration de 20 ng/ml. A une concentration de 2 ng/ml, l'activité obtenue représente 50% de ce plateau. On pourrait donc envisager de refaire ces expériences avec des concentrations en PDGF plus faibles pour mieux mettre en évidence les effets dose-dépendant du PDGF. Pour les expériences ultérieures, nous avons donc opté pour une concentration de 40 ng/ml.

2.2. MODULATION PAR L'AMPC DE LA PHOSPHORYLATION DES P42MAPK INDUITE PAR LE PDGF

Ayant mis au point les conditions optimales de détection des p42^{mapk} et précisé les conditions d'activation, nous allons maintenant tester les effets de l'AMPC sur la phosphorylation des p42^{mapk} induite par le PDGF.

Les cellules ont été pré-incubées ou non pendant 10 minutes ou 2 heures en présence ou non de db-AMPC (10^{-3} M). Elles ont ensuite été stimulées ou non 10 minutes avec du PDGF seul (40 ng/ml) additionné ou non de db-AMPC. En ce qui concerne tout d'abord les cellules n'ayant pas été pré-incubées avec le db-AMPC, on remarque que le db-AMPC, lorsqu'il est ajouté aux cellules en même temps que le PDGF, ne module en rien l'effet stimulateur du PDGF sur la phosphorylation des p42^{mapk} (Figure III.8.A). En effet, on n'observe aucun retour de la bande des p42^{mapk} phosphorylées vers la bande des p42^{mapk} non phosphorylées lorsque l'on ajoute le db-AMPC aux cellules stimulées au PDGF (Figure III-8A, pistes 8 et 10). Remarquons que le db-AMPC seul ne semble pas avoir d'effet sur la phosphorylation des p42^{mapk} (piste 9). Lorsque l'on quantifie les différentes bandes du gel grâce au système d'analyse d'images (Figure 8.B), le pourcentage de p42^{mapk} phosphorylées sur la quantité totale de p42^{mapk} est le même (88%) que ce soit pour les cellules stimulés au PDGF seul ou incubées simultanément avec le db-AMPC. Les effets de l'AMPC divergent donc selon que l'on envisage l'activation des p42^{mapk} ou de la prolifération cellulaire. En effet, le simple fait de stimuler les cellules avec les 2 médiateurs (PDGF+AMPC) simultanément engendrait un effet inhibiteur bien marqué sur la prolifération induite par le PDGF. Nous reviendrons plus loin, dans la discussion générale, sur une possible interprétation de cette différence.

A

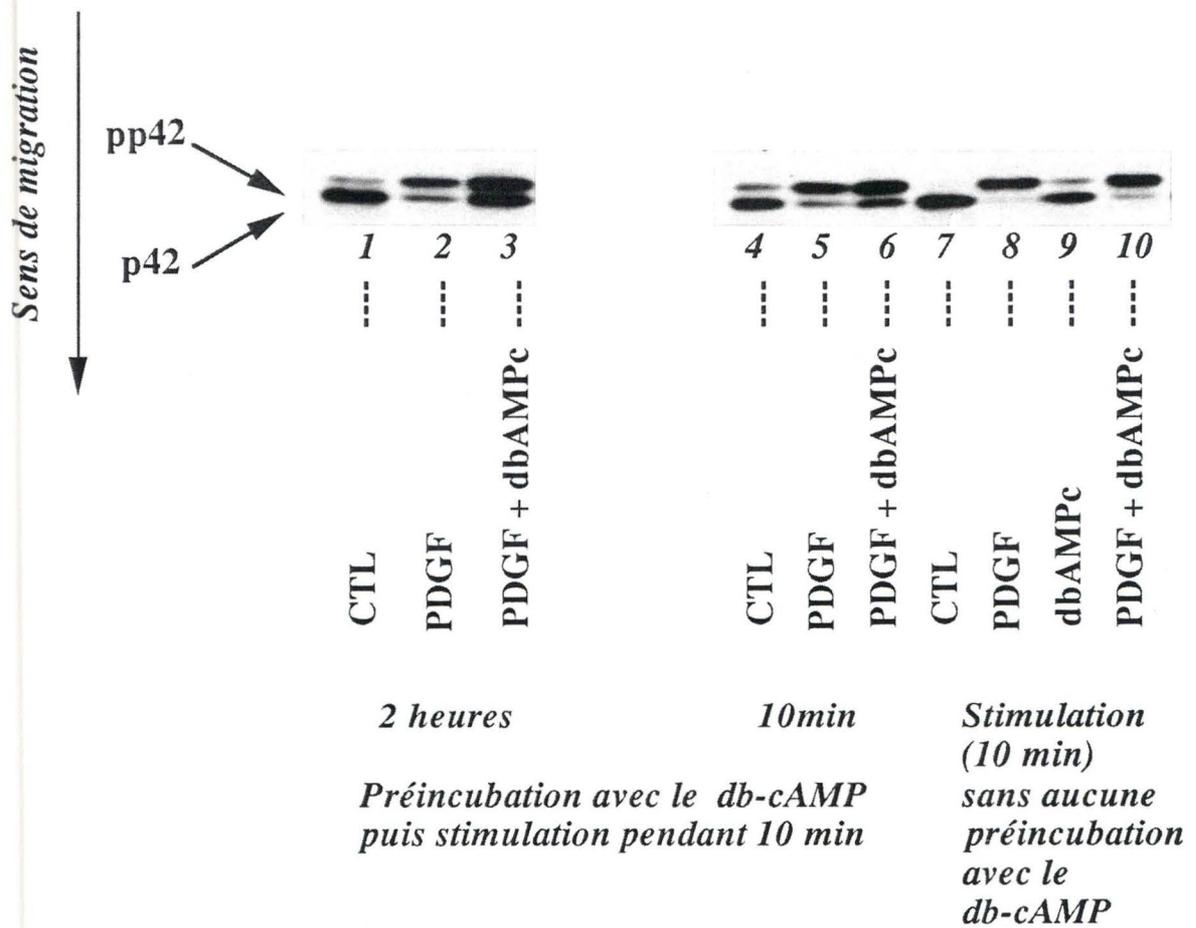


Figure III.8. : Effet d'une pré-incubation au db-AMPc sur la phosphorylation des p42^{mapk} induite par le PDGF. Les cellules ont été cultivées comme décrit dans les Matériels et Méthodes (au point 3.1). Elles sont alors pré-incubées dans de l'OPT+HLA 0,2% en présence ou non de db-AMPc ($10^{-3}M$) pendant 2 heures et 10 minutes. Après rinçage, elles sont stimulées dans ce même milieu en présence ou non de PDGF (40 ng/ml) ou en présence de PDGF et de db-AMPc ($10^{-3}M$) simultanément.

A : Mise en évidence des p42^{mapk} des fractions cytosoliques obtenues à partir de fibroblastes de poumon humain en 30^{ème} génération par western-blot. Les positions des formes phosphorylées ou non sont respectivement indiquées par pp42 et p42 et ont été confirmées par des étalons de poids moléculaires qui ont migré en même temps que les échantillons.

B

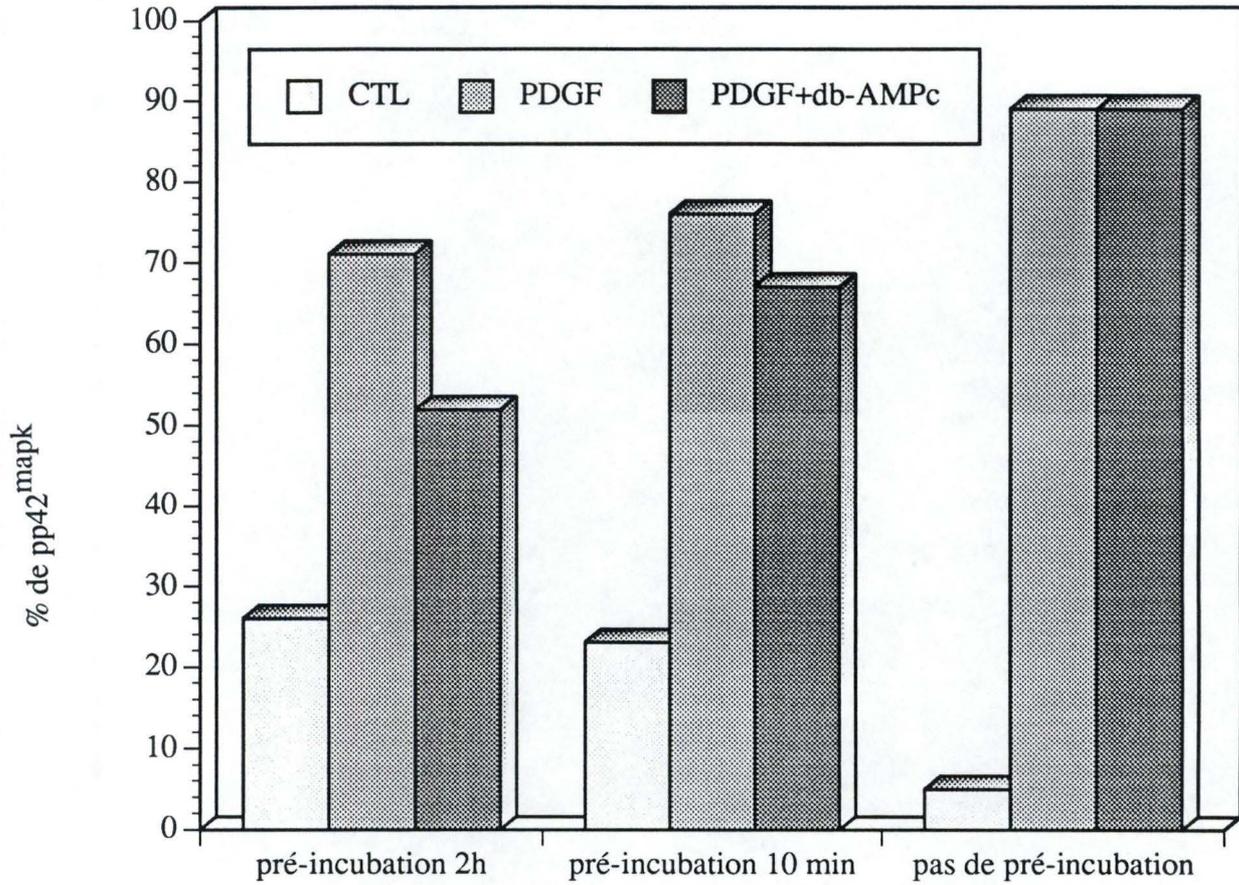


Figure III.8.B : Quantification par le système d'analyse d'images comme décrit dans les Matériels et Méthodes (au point II.3.6). Les bandes ont été converties en IOD (Integrated Optical Density) respectivement pour la forme phosphorylée et non phosphorylée. Les résultats sont exprimés en % de IOD de la bande phosphorylée par rapport à la somme des IOD pour les deux bandes, ce qui donne une estimation de la proportion de la forme phosphorylée.

En ce qui concerne les cellules qui ont été pré-incubées pendant 10 minutes ou 2 heures avec le db-AMPC, on observe un léger retour de la bande des p42^{mapk} phosphorylées vers la bande des p42^{mapk} non phosphorylées dans les cellules incubées en présence de PDGF et de db-AMPC par rapport aux cellules stimulées avec le PDGF seul (Figure III.8A ; piste 2 et 3, 5 et 6). Les pourcentages de p42^{mapk} phosphorylées sur la quantité totale des p42^{mapk} ont été obtenus par quantification des différentes bandes (Figure III-8B). A partir de ces données, on a pu calculer le pourcentage d'inhibition exercé par le db-AMPC selon la formule suivante :

$$100 - ((\% \text{ pp}^{42\text{-PDGF}} - \% \text{ pp}^{42\text{-CTL}}) - (\% \text{ pp}^{42\text{-AMPC}} - \% \text{ pp}^{42\text{-CTL}}))$$

% inhibition = _____

$$\% \text{ pp}^{42\text{-PDGF}} - \% \text{ pp}^{42\text{-CTL}}$$

On observe que pour deux heures de pré-incubation avec le db-AMPC, l'effet inhibiteur exercé par le db-AMPC est plus important. En effet, le pourcentage d'inhibition de phosphorylation de la p42^{mapk} est de 42% pour cette pré-incubation alors qu'il n'est plus que de 17% pour une pré-incubation de 10 minutes (Figure III.8B). Les résultats obtenus nous révèlent également qu'en pré-incubant nos cellules avec le db-AMPC, les effets de PDGF seul sur l'activation de la p42^{mapk} semblent atténués bien que l'activation induite par le PDGF représente encore 269 % par rapport au contrôle (rapporté arbitrairement à 100 %) lorsqu'on les compare aux cellules traitées au PDGF sans pré-incubation.

Nous avons donc mis en évidence une légère inhibition de la phosphorylation des p42^{mapk} induite par le PDGF pour les cellules pré-incubées au db-AMPC, pendant deux heures bien qu'elle ne soit pas totale.

Il faudrait donc répéter cette expérience, en diversifiant les temps de préincubation (10 minutes, 2, 4, 6 et 24 heures, par exemple).

Discussion

Ces résultats nous montrent que le db-AMPC, ajouté en même temps que les PDGF, n'inhibe pas la phosphorylation des p42^{mapk} induite par le PDGF dans les fibroblastes de poumon. Par contre, l'AMPC semble avoir un effet inhibiteur lorsque l'on pré-incube les cellules pendant 10 minutes ou 2 heures en présence de db-AMPC avant de les stimuler au

PDGF.

Lorsque l'on compare ces résultats aux données de la littérature, on peut constater que l'AMPc est souvent décrit comme inhibiteur de l'activation des p42^{mapk} induite par des facteurs de croissance tels que l'EGF, l'acide lysophosphatidique, l'insuline et même le PDGF; cette inhibition a été observée pour des fibroblastes de rat (Rat-1) et des fibroblastes NIH-3T3 pré-incubées 10 minutes en présence d'agents provoquant une accumulation d'AMPc (dont le db-AMPc testé également à 10^{-3} M) et ce avant de réaliser des stimulations de 5 minutes (Wu *et al.*, 1993; Hordijk *et al.*; 1994; Cook *et al.*, 1993; Burgering *et al.*, 1993). Pour tous ces types cellulaires, l'AMPc, ajouté en même temps que le stimulateur, inhibait aussi la prolifération induite par ces différents facteurs. Ces résultats ont été confirmés par Graves *et al.* (1993) sur des cellules musculaires lisses humaines pré-incubées 30 minutes avec la forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) puis stimulées avec le PDGF pendant 5 minutes. Cependant ces auteurs suggèrent également que l'AMPc n'agit pas exclusivement sur la voie des MAP kinases. En effet, ils constatent que l'addition de forskoline quelques heures après la stimulation au PDGF inhibe la synthèse d'ADN. Or à ce moment, la cascade de la MAP kinase a déjà été enclenchée par le PDGF.

Bien que la plupart des ces travaux sont réalisés sur des cellules pré-traitées avec l'AMPc pendant des temps très courts, Burgering *et al.* (1993) quant à eux ont fait varier ces temps de pré-incubation. Ils ont observé sur des fibroblastes NIH-3T3 que le bromo-AMPc (un analogue de l'AMPc) ajouté en même temps que l'insuline (pendant 5 minutes) inhibe totalement la phosphorylation des p42^{mapk}. En faisant varier les temps de pré-incubation, ils constatent que cette inhibition par l'AMPc apparaît déjà pour un temps de pré-incubation de 2 minutes et dure jusque 2 heures de pré-incubation. Il ont également mis en évidence que cet effet de l'AMPc sur les MAPK dépend du type cellulaire. En effet, une pré-incubation avec le bromo-AMPc (réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les fibroblastes NIH-3T3) n'entraîne aucune inhibition de la phosphorylation des p42^{mapk} chez les cellules de phéochromocytome de rat (PC12) stimulées à l'EGF ou au NGF (nerve-growth-factor). Par contre, Frodin *et al.* (1993) ont observé sur ces mêmes cellules un effet stimulateur de l'AMPc synergique de l'effet du NGF ou du PMA.

De plus, sur des thyrocytes de chien pour lesquelles l'AMPc induit la prolifération et la différenciation, Lamy *et al.* (1993) n'ont mis en évidence aucun effet de l'AMPc sur la phosphorylation des p42^{mapk} contrairement à l'EGF et au PMA qui eux stimulent les mapk^{p42}, induisent la dédifférenciation mais stimulent également la prolifération de ces cellules. Le lien AMPc-prolifération et MAPK n'est donc pas évident à établir pour tous les types cellulaires.

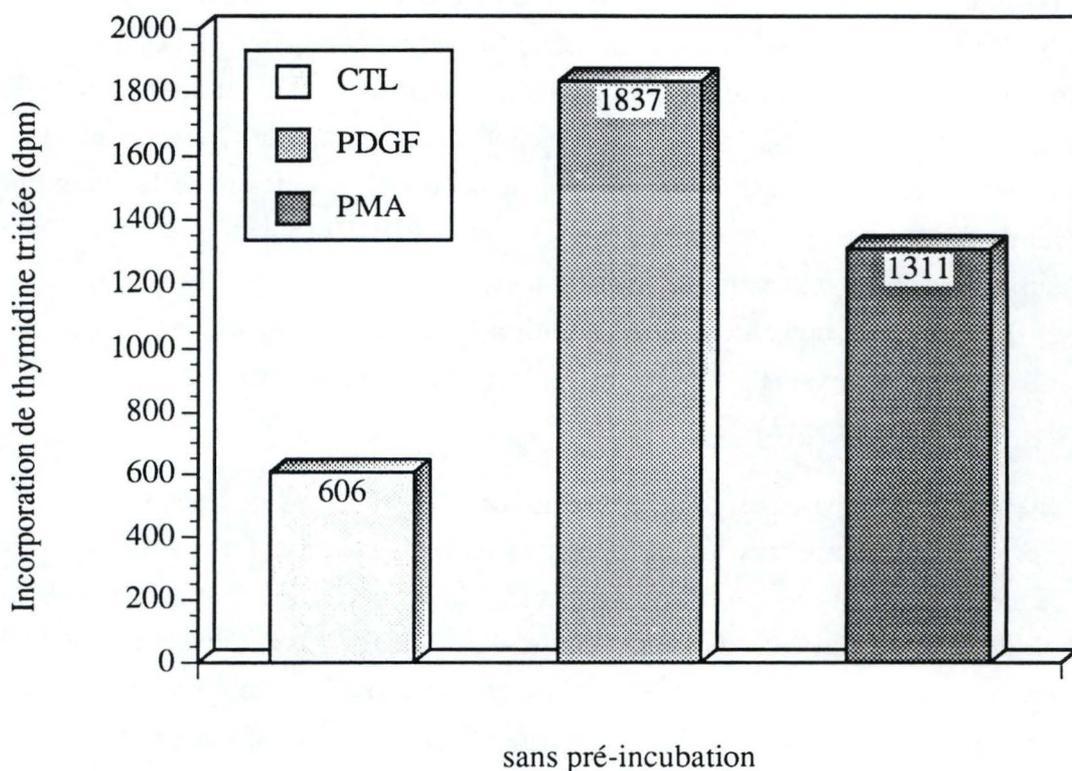


Figure III.9. : Effet du PMA sur la prolifération des fibroblastes de poumon humain en 34^{ème}. génération. Les cellules sont pré-incubées dans de l'OPT+SB 0,1% pendant 24 heures avant d'être stimulées ou non au PDGF (10 ng/ml) ou au PMA (100 ng/ml). La prolifération est estimée après 48 heures par la méthode d'incorporation de la thymidine tritiée. Les résultats des tests sont exprimés en dpm incorporés. Chaque colonne correspond à la moyenne de deux cupules.

3. MODULATION PAR L'AMPC DE L'ACTIVATION DES MAP KINASES INDUITE PAR LE PMA

Avant de tester les effets du PMA et leur régulation par l'AMPC sur la p42^{mapk}, nous avons vérifié les effets du PMA sur la prolifération cellulaire, dans les conditions de culture indiquées au point 1, c'est-à-dire après une pré-incubation des cellules dans l'OPT+SB 0,1%. Comme le montre la Figure III.9., on constate que le PMA à 100 ng/ml stimule bien l'incorporation de thymidine tritiée (216 % par rapport aux cellules contrôles). Cette stimulation est plus faible que celle engendrée par le PDGF dans les mêmes conditions expérimentales (303 % par rapport aux cellules contrôles).

Nous avons ensuite testé le PMA sur l'état de phosphorylation de la p42^{mapk}. Après 10 minutes en présence de PMA, la bande phosphorylée devient majoritaire, et ce aux deux concentrations en PMA utilisées (piste 3 pour les 100 et piste 2 pour les 500 ng/ml) (Figure III.10.).

Lorsqu'on incube simultanément les cellules en présence de PMA (100 ng/ml) et de db-AMPC (10^{-3} M), il semble y avoir un léger retour vers la forme non phosphorylée (piste 4). Malheureusement, ces résultats n'ont pas pu être quantifiés, suite à la déficience du système de quantification.

Lorsqu'on pré-incube les cellules 10 minutes avec le db-AMPC, avant de les stimuler pendant 10 minutes avec le PMA, on observe que les bandes phosphorylées et non phosphorylées sont présentes en quantités similaires (piste 6 et 7 par rapport à la piste 3). Les pistes correspondant aux temps de pré-incubation 2 heures (piste 8,9 et 10) sont difficiles à interpréter vu la diffusion des bandes.

Ces résultats suggèrent que l'AMPC est donc capable de contrecarrer, du moins en partie la voie d'activation de la MAP kinase par le PMA. Ces résultats sont conformes aux données de Burgering *et al.* (1993). Ces auteurs ont montré sur des fibroblastes NIH-3T3 pré-incubés avec du bromo-AMPC (0,5 mM) puis stimulés avec le PMA (100 ng/ml) pendant 5 min, que le db-AMPC inhibait la Raf-kinase, et ce indépendamment de Ras.

4. EFFET DU PDGF SUR LA TRANSLOCATION DES MAP

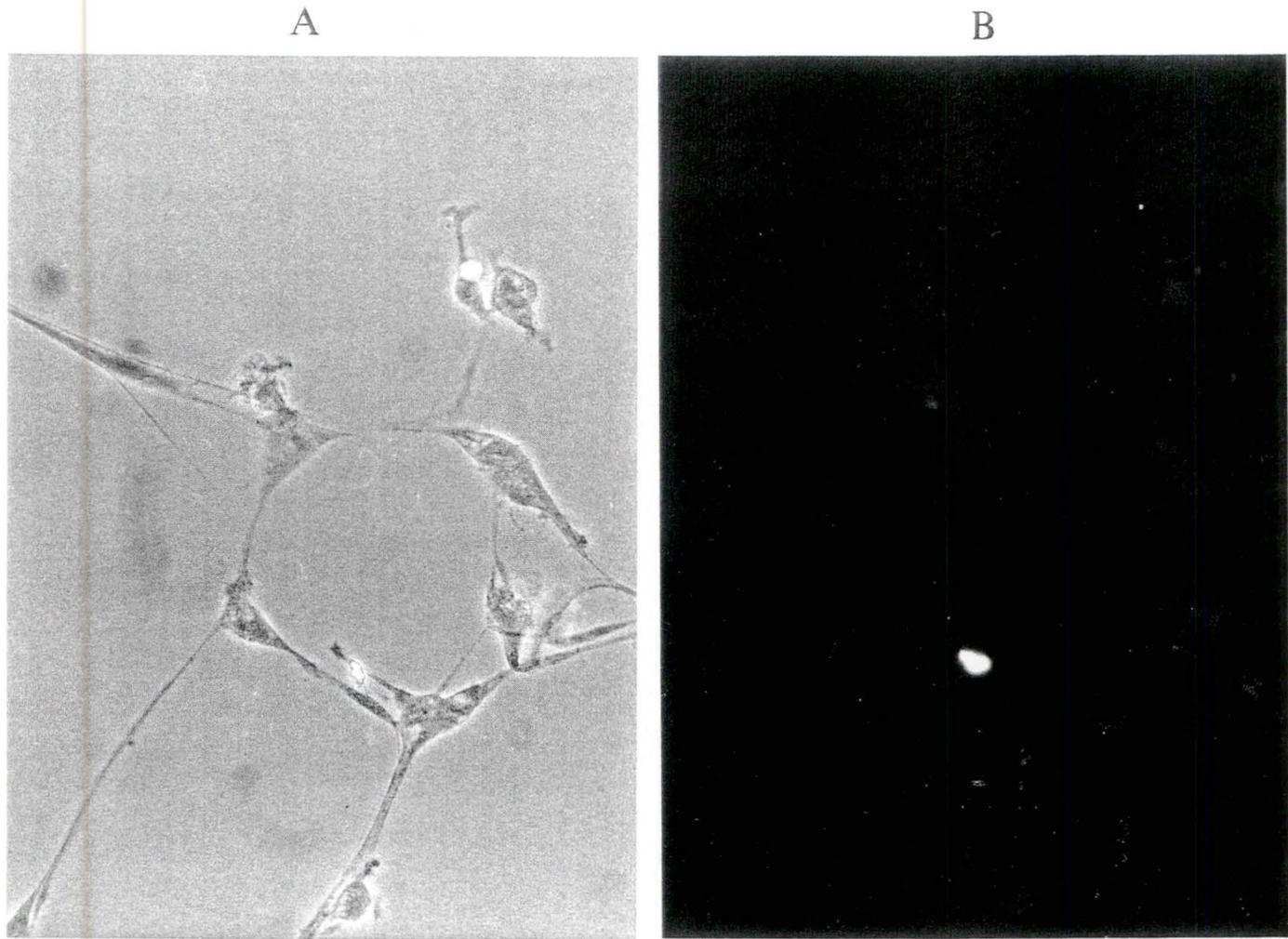


Figure III.11. : Photographies en microscopie à contraste de phase (A) et à fluorescence (B) de fibroblastes de poumon humain incubés en présence de PDGF (40 ng/ml) pendant 30 minutes (grossissement x 1150). Les cellules au lieu d'être incubées en présence de l'anticorps primaire anti-p42^{mapk} ont été mises en présence de sérum de lapin non-immunisé. Elles constituent un contrôle négatif.

KINASES PHOSPHORYLÉES VERS LE NOYAU

La liaison de facteurs de croissance tels que l'EGF ou le PDGF à leurs récepteurs génère au niveau de la membrane plasmique un signal qui, entre autres via la cascade cytosolique des MAP kinases traverse le cytoplasme. *In fine*, ce signal va initier au niveau du noyau une réponse génomique qui engendrera la prolifération et/ou la différenciation cellulaire.

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que la phosphorylation de la p42^{mapk} et de la p44^{mapk} est suivie, plus ou moins rapidement (endéans l'heure), de leur translocation vers le noyau (Chen *et al.*, 1992; Lamy *et al.*, 1993). Ces protéines kinases ne constitueraient donc plus seulement des intermédiaires-clés dans le passage du signal au travers du cytoplasme, elles interviendraient aussi dans la transmission de l'information depuis le cytosol jusqu'à la machinerie transcriptionnelle du noyau.

Nous avons voulu le vérifier sur notre type cellulaire en comparant, par la technique d'immunofluorescence, la distribution des MAP kinases dans des cellules quiescentes et dans des cellules stimulées à rentrer dans le cycle cellulaire grâce au PDGF.

Si la phosphorylation des MAP kinases est un phénomène relativement rapide (elle apparaît en effet après 10 minutes), la translocation semble plus tardive. D'après les données de la littérature (Lamy *et al.*, 1993) elle n'est détectable, chez les thyrocytes de chien stimulés à l'EGF qu'après 1 heure de stimulation et est maximale après 2 heures. Après 4 heures, les MAP kinases sont toujours concentrées dans le noyau. Nous avons donc stimulé ou non nos cellules au PDGF (40 ng/ml) pendant 30, 60 et 240 minutes avant de les incuber en présence de l'anticorps primaire anti-MAP kinases. Des cellules "contrôle", au lieu d'être incubées en présence de l'anticorps primaire, ont été mises en présence de sérum d'un lapin non immunisé, pour vérifier la spécificité du traitement immunologique, et examinées respectivement en fluorescence (Figure III.11.A) et en contraste de phase (Figure III.11.B). Le contrôle s'est révélé tout à fait négatif. Par contre, lorsqu'on examine les cellules incubées en présence de l'anticorps primaire anti-p42^{mapk}, on constate qu'elles sont toutes fluorescentes. Nous avons donc essayé de voir la distribution de la fluorescence dans les cellules stimulées ou non au PDGF, et ce au cours du temps. Dans les cellules non stimulées, on observe, comme attendu, une fluorescence plutôt diffuse, répartie sur l'ensemble du cytoplasme (Figures III.12.A,C,E). Dans les cellules stimulées au PDGF, nous observons exactement la même répartition cellulaire de la fluorescence quel que soit le temps de stimulation au PDGF (Figure III.12.B,D,F). Dans nos conditions, nous n'avons donc pas constaté de translocation de la MAP kinase vers le noyau. Ces résultats divergent donc par rapport à ceux obtenus par Chen *et al.* (1992) et Lamy *et al.* (1993) respectivement sur cellules Hela et les thyrocytes de chien.

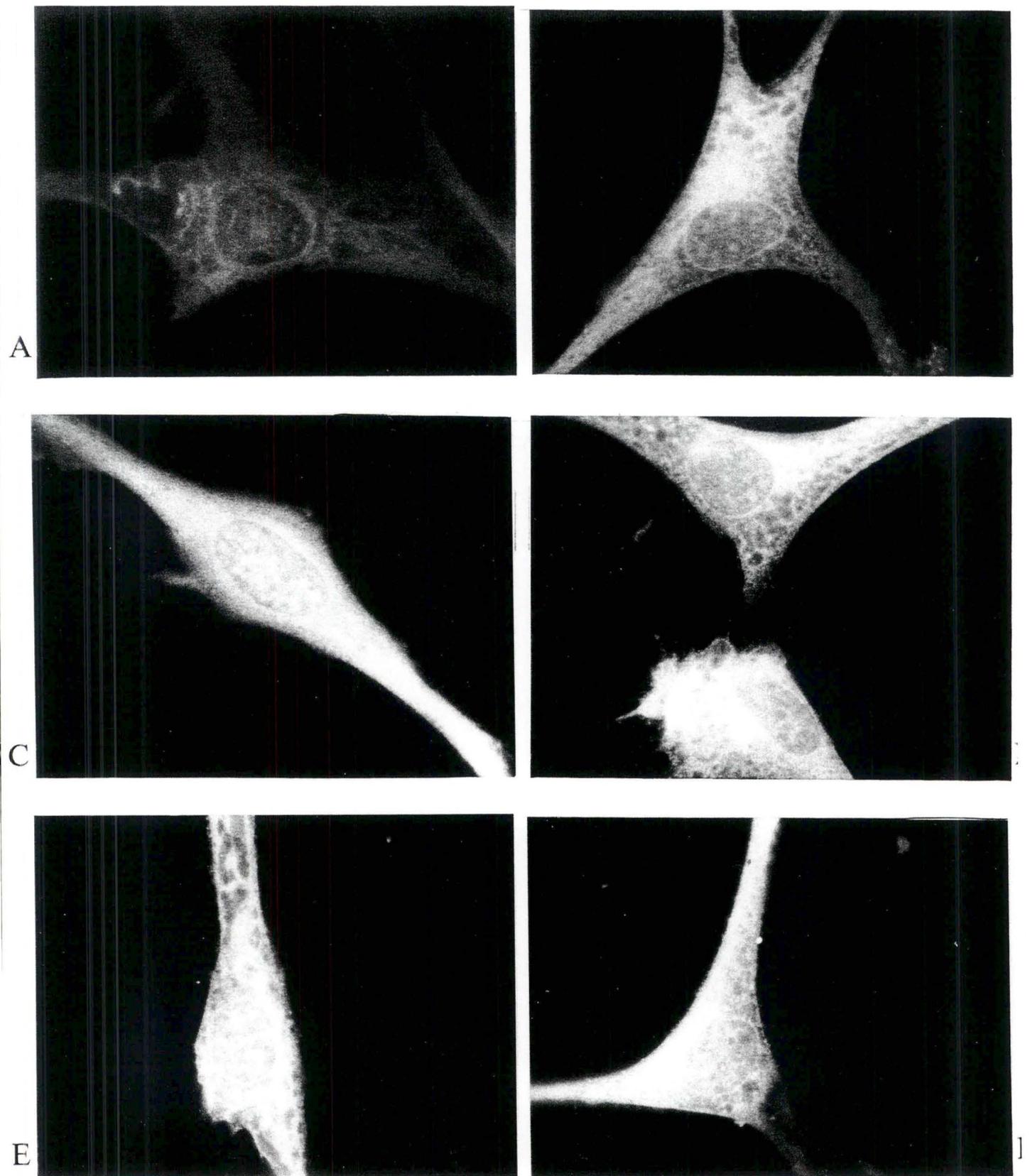


Figure III.12. : Photographies en microscopie à fluorescence de fibroblastes de poumon humain incubés dans de l'OPT+HLA 0,2% pendant 30 (A), 60 (C) et 240 (E) minutes (grossissement x 1150) ou en présence de PDGF (40 ng/ml) pendant 30 (B), 60 (D) et 240 (F) minutes. (grossissement 1150x)

Etant donné que les données de la littérature sur la translocation des MAP kinases sont encore limitées, il est difficile d'expliquer cette divergence. On ne peut exclure ni de différences entre types cellulaires, ni un artéfact dans la méthodologie utilisée, bien que nous nous soyons directement inspirés des protocoles expérimentaux de ces auteurs.

Comme cette approche immunocytochimique se voulait plus une illustration complémentaire qu'une approche explicative, nous n'avons pas estimé utile d'approfondir cette question dans le cadre du mémoire.

5. EFFET DU PDGF SUR L'ACTIVATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AP-1 ET NF-KB. MODULATION PAR L'AMPC

5.1. EFFET DU PDGF SUR AP-1. MODULATION PAR L'AMPC

Dans la plupart des cellules, le facteur transcriptionnel AP-1 contrôle l'expression des gènes impliqués dans la prolifération dont l'oncogène *c-jun*. En effet, dans les cellules stimulées par des signaux mitogènes tels que le PMA, AP-1 est activé et régule l'expression des gènes dits de réponse précoce (Angel *et al.*, 1987; Papavassiliou, 1993). D'autre part, comme nous l'avons vu dans l'introduction, les facteurs transcriptionnels tels que Jun, Fos, Elk-1 et le complexe AP-1 lui-même constituent des substrats directs de la p42^{mapk}, elle-même activée au terme de la cascade cytoplasmique de phosphorylation induite par le PDGF (Pulverer *et al.*, 1991). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du PDGF sur l'activation de ce facteur.

Dans un premier temps, nous avons voulu tester l'effet du PDGF (20 ng/ml) sur l'activation du facteur AP-1 à différents temps (30, 60 et 120 minutes) par la technique de l'EMSA. Rappelons que nous avons utilisé la méthode décrite par Schreck *et al.* (1991) et adaptée par Patestos *et al.* (1993), méthode utilisée et pour le facteur NF-kB et pour le facteur AP-1. Nous n'avons mis en évidence aucune bande retardée sur le gel par rapport à la sonde libre, c'est-à-dire aucun complexe, correspondant au facteur activé lié à sa sonde marquée (résultats non montrés). Nous avons essayé de comprendre les raisons de cet échec. Nous nous sommes focalisés en premier lieu sur la concentration en poly d(I-C) utilisée pendant l'incubation des extraits cellulaires avec la sonde marquée spécifique pour le facteur AP-1. En effet, les fiches techniques de la firme Proméga, fournisseur de cette sonde, signalent que l'efficacité de la liaison entre le facteur AP-1 actif et la sonde dépend de la concentration en poly d(I-C). L'oligonucléotide poly d(I-C) est rajouté à la mixture réactionnelle pour réduire les éventuelles liaisons non spécifiques entre la sonde marquée et d'autres protéines qu'AP-1 présentes dans l'extrait cellulaire. Une trop grande concentration en poly d(I-C) pourrait détourner le facteur activé de sa séquence cible, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus pour cette première expérience.

Comme le PMA est connu pour activer le facteur par la voie de la PKC, nous avons, dans un second temps, testé l'effet du PMA et du PDGF sur l'activation d'AP-1 en variant la

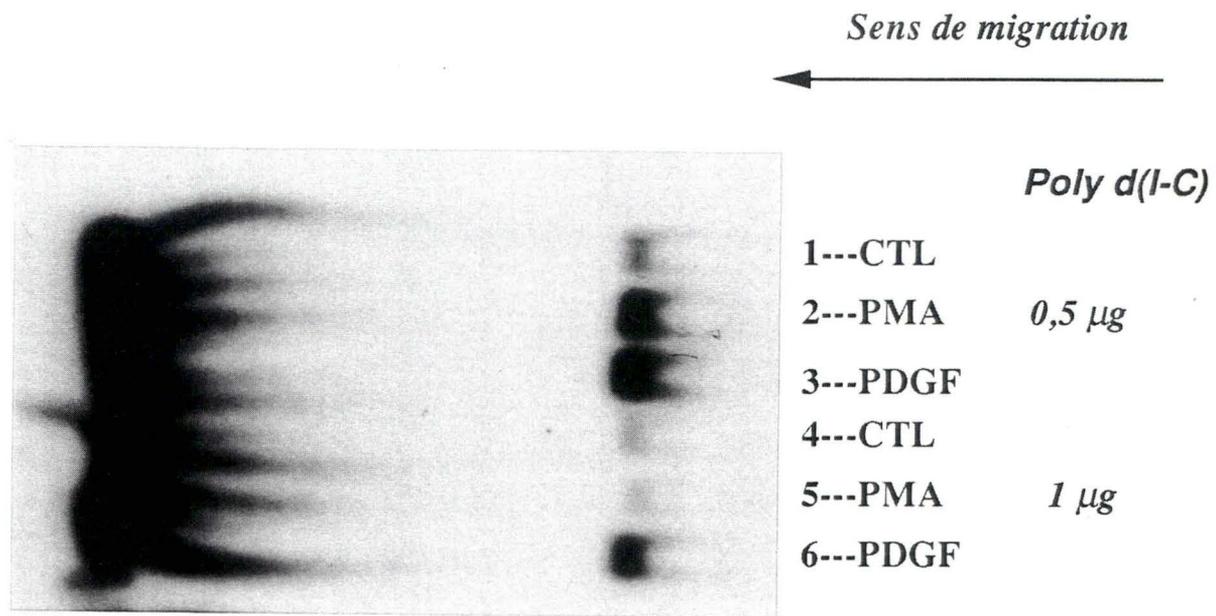


Figure III.13. : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet du PDGF et du PMA sur l'activation du facteur AP-1 en fonction de la concentration en poly d(I-C) dans les fibroblastes de poumon humain en 28^{ème} génération. Les cellules sont stimulées ou non au PDGF (20 ng/ml) et au PMA (100 ng/ml) pendant 60 minutes. 25 µg de protéines obtenues à partir des lysats cellulaires ont été déposés par piste, avec une quantité en poly d(I-C) de 1, 0,5 ou 0,25 µg.

concentration en poly d(I-C), la concentration précédemment utilisée étant de 0,08 mg/ml.

Les fibroblastes de poumon humain ont été stimulés ou non au PDGF (20 ng/ml) et au PMA (100 ng/ml) pendant 60 minutes. Les lysats cellulaires ont été recueillis selon la méthode décrite dans les Matériels et Méthodes au point 3.2.2.. Ensuite, les échantillons contenant 25 µg de protéines, la sonde marquée et une quantité en poly d(I-C) de soit 1 µl, soit 0,5 µl (ce qui correspond respectivement à une concentration de 0,04 et 0,02 mg/ml en poly d(I-C)), ont été déposés sur le gel.

Comme le montre la figure III.13., lorsqu'on examine les pistes 1 (contrôle), 2 (PMA) et 3 (PDGF) , on observe un complexe retardé qui semble plus abondant dans les cellules stimulées au PMA et au PDGF, que dans les cellules contrôles. Pour ces 3 pistes, nous avons utilisés 0,5 µg de poly d(I-C) (soit 0,02 mg/ml). Mais ces résultats ne sont pas confirmés dans les autres pistes, où nous avons utilisés deux fois plus de poly d(I-C) (pistes 3,4 et5) puisque nous n'observons plus d'effet stimulateur du PMA. Nous avons répété cette expérience en diversifiant les temps de stimulation , les concentrations en PDGF et les concentrations en poly d(I-C) (résultats non montrés). Face à ces résultats difficilement interprétables, nous avons contacté le Pr. Baeuerle qui nous a transmis le protocole actuellement utilisé par son équipe pour déceler l'activation du facteur AP-1. Ce protocole a été décrit en détail dans les Matériels et Méthodes au point 3.. Il diffère du précédent sur essentiellement deux points :

- la composition des tampons d'extraction
- la présence de MgCl₂ dans la mixture réactionnelle de liaison entre la sonde et le facteur AP-1.

La concentration en poly d(I-C) recommandée est, comme pour la méthode précédente, de 0,08 mg/ml.

Dans cette expérience, nous avons testé et l'effet du PDGF et l'effet de l'AMPc sur l'activation du facteur AP-1. En effet, comme nous avons testé l'effet du db-AMPc sur la phosphorylation de MAP kinases, nous avons voulu tester l'effet du db-AMPc à un autre niveau de la cascade mitogénique induite par le PDGF, celui des facteurs de transcription et en particulier le facteur AP-1(Figure.III.14.). Pour faire cette expérience, nous avons utilisé pour l'extraction de protéines le tampon NF-κB (pistes 1 à 5) et le tampon Totex (pistes 6 à 9) (voir le point 3.2.1. des Matériels et Méthodes). Par contre pour la liaison entre le facteur AP-1 et la sonde, nous avons utilisé pour tous les échantillons le même tampon de liaison, recommandé par Baeuele (communication personnelle, voir le point 3.3.3. des Matériels et Méthodes). Nous constatons d'abord que ces deux protocoles donnent des résultats très différents. Avec le nouveau protocole, on constate que la sonde retardée est plus nette et moins diffuse qu'avec

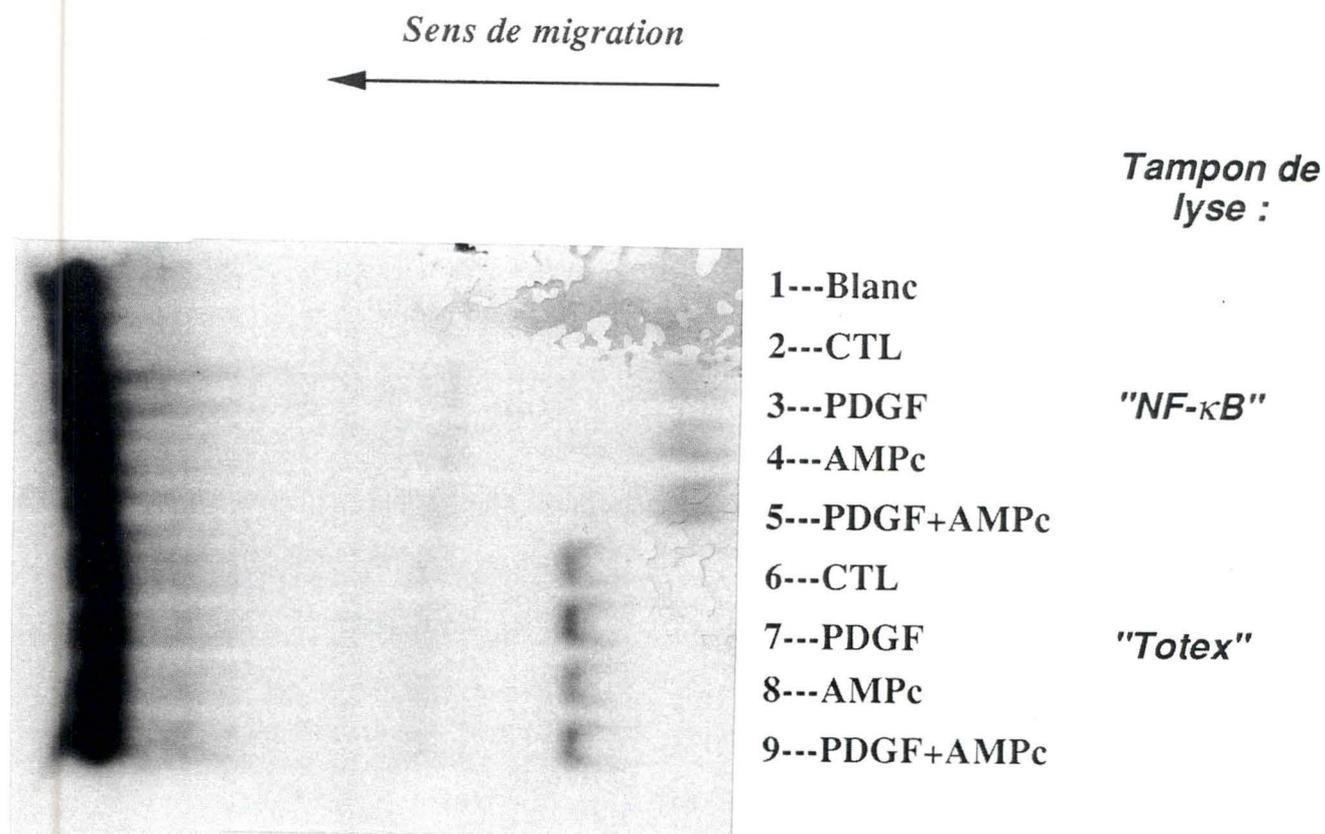


Figure III.14. : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet du PDGF en présence ou non de db-AMPc sur l'activation du facteur AP-1 dans les fibroblastes de poumon humain en 28^{ème} génération. Les cellules sont stimulées ou non au PDGF (20ng/ml), au db-AMPc (10^{-3} M) ou en présence des deux médiateurs simultanément, pendant 60 minutes. L'extraction des protéines a été réalisées soit dans le tampon "NF-κB" soit dans le tampon "Totex". 25 µg de protéines obtenues à partir des lysats cellulaires ont été déposés par piste. Le contrôle négatif (Blanc) représente la migration de la sonde seule.

l'ancien protocole. Le complexe retardé migre également plus avec le nouveau protocole. Si l'on compare maintenant les différentes pistes réalisées avec le nouveau protocole (6 à 9), on peut faire les observations suivantes :

- dans les cellules contrôles, il y a une fraction non négligeable de facteur AP-1 actif (piste 6)
- le PDGF semble favoriser cette activation (piste 7)
- les cellules incubées avec du db-AMPC montrent une bande d'intensité comparable à celle des cellules contrôles (piste 8)
- dans les cellules incubées simultanément avec le PDGF et le db-AMPC (piste 9), il semble que l'intensité de la sonde soit plus faible que pour les cellules stimulées au PDGF (piste 7).

Malheureusement, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et nous n'avons pu réaliser l'analyse quantitative du gel, étant donné que le système d'analyse d'image était défectueux. De plus, les effets observés sont relativement faibles et il faut rester très prudent dans l'interprétation de ces résultats.

En conclusion, nous sommes parvenus à appliquer la méthode du retard sur gel pour suivre l'activation du facteur AP-1. Le PDGF semble favoriser son activation et le db-AMPC semble contrecarrer les effets du PDGF, bien que ces résultats doivent être reconfirmés. Dans l'avenir, une approche complémentaire serait de doser par northern-blot des mRNA correspondants à des gènes régulés par le facteur AP-1.

5.2. EFFET DU PDGF SUR L'ACTIVATION DU "NUCLEAR FACTOR-KB" (NF-KB) ET MODULATION PAR L'AMPC

Le facteur transcriptionnel (NF- κ B) est un facteur qui, en se liant à des séquences spécifiques de l'ADN, désignées I- κ B, contrôle la transcription d'un grand nombre de gènes. Ce facteur de transcription est induit par une grande variété de stimuli (lipopolysaccharides, PMA, IL-1, UV...). Les médiateurs de son activation semblent être eux aussi très variés : il s'agit de protéines kinases, de protéases et de radicaux libres (Schreck et al., 1994). Des données de plus en plus nombreuses de la littérature suggèrent un rôle possible du NF- κ B non seulement dans la prolifération mais également dans l'activation des cellules par le PDGF. En effet, on a observé que l'activation de ce facteur avait lieu en particulier durant le passage de la phase Go-G1 du cycle cellulaire des fibroblastes 3T3 (Finco et Baldwin, 1993). D'autre part, parmi les nombreux gènes induits par le PDGF, certains contiennent les sites κ B

(GGGACTTTCC) reconnus par le NF- κ B. C'est le cas notamment du gène codant pour l'interféron β (IFN- β) (Kohase *et al.*, 1987), et du gène *c-myc* (Kelly *et al.*, 1983; Duyao *et al.*, 1990). Ce dernier est l'un des premiers gènes induits lors de l'entrée en mitose des cellules. Enfin, des kinases telles que certaines isozymes de la PKC et Raf-1 (ou une kinase située en aval de Raf-1) dont on sait qu'elles sont activées entre autre par le PDGF, semblent directement phosphoryler la sous unité inhibitrice I- κ B du facteur NF- κ B. Cette phosphorylation conduit à la dissociation de la sous-unité du facteur et à l'activation de ce dernier. Toutes ces informations suggèrent un lien entre le PDGF et le NF- κ B. C'est pourquoi nous avons voulu tester la capacité du PDGF à activer ce facteur dans les fibroblastes de poumon humain.

Pour déterminer si le PDGF induit la liaison du facteur aux sites I- κ B dans nos fibroblastes de poumon humain, les cellules ont été traitées ou non pendant 60 ou 120 minutes au PDGF (20 ng/ml) et à l'interleukine 1 (5 ng/ml). L'interleukine 1 (IL-1), activateur bien connu du NF- κ B, est utilisé ici comme contrôle positif. Comme le montre la Figure III.III.15.A, le traitement des cellules avec le PDGF induit la formation d'un complexe ADN/protéine qui, sur le gel, migre plus lentement que la sonde κ B libre, et à la même position que le complexe présent dans les cellules traitées à l'IL-1. Ce complexe correspond donc bien au facteur NF- κ B activé et couplé à la sonde. Ce même complexe migre un peu moins loin que le complexe correspondant à la sonde liée à la protéine recombinante p50 (homodimère constitué de 2 sous-unités de 50 kDa) utilisée comme contrôle. Il s'agit probablement de l'hétérodimère p50-p65 puisqu'il est légèrement plus lourd (de 15 kDa). Si l'activation du NF- κ B par l'IL-1 est évidente, l'activation éventuelle du facteur par le PDGF l'est nettement moins, c'est pourquoi une quantification des bandes par le système d'analyse d'images a été réalisée. L'intensité des bandes obtenues est exprimée en IOD (Intégration de la Densité Optique), ce qui correspond à la densité rapportée à une surface définie, identique pour toute les bandes (Figure III.15.B).

L'IL-1 active le NF- κ B en induisant la formation d'un complexe entre la forme activée du NF- κ B et la sonde marquée qui lui correspond, et ce aux temps testés. Une légère activation du facteur semble induite également par le PDGF après 60 minutes. En effet, on obtient un pourcentage d'activation de 145 % par rapport au contrôle ramené arbitrairement à 100 %. Cet effet disparaît après 120 minutes.

Ayant mis en évidence un effet activateur du PDGF sur la liaison du NF- κ B à sa sonde après 60 minutes, nous avons réalisé la même expérience en variant les temps de stimulation. Nous avons incubé nos cellules ou non au PDGF (20 ng/ml) et à l'IL-1 (5 ng/ml) pendant 45, 60 et 75 minutes (Figure I.16.A). Les bandes correspondants aux complexes NF- κ B/sondes sont très intenses, quel que soit le temps de stimulation à l'IL-1. On observe également une

A

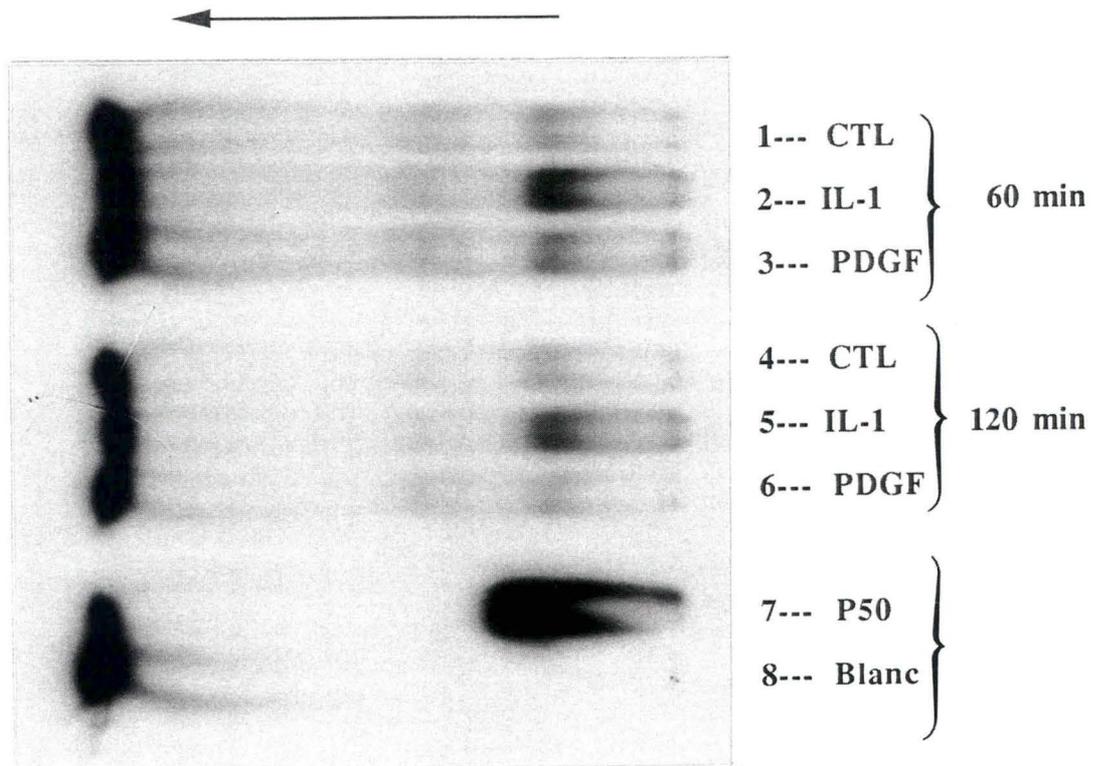
Sens de migration

Figure III.15. A : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet de l'IL-1 et du PDGF sur l'activation du NF- κ B, dans les fibroblastes de poumon humain en 30^{ème} génération. Les cellules sont stimulées ou non au PDGF (20 ng/ml), à l'IL-1 (5 ng/ml) pendant 60 et 120 minutes. 25 μ g de protéines obtenues à partir des lysats cellulaires ont été déposés par piste. Le contrôle négatif (=Blanc) représente la migration de la sonde seule tandis que le positif représente la migration de la sonde en présence de l'homodimère p50-p50 purifié. La quantité de sonde radioactive déposée par piste correspond à 20000 cpm.

B

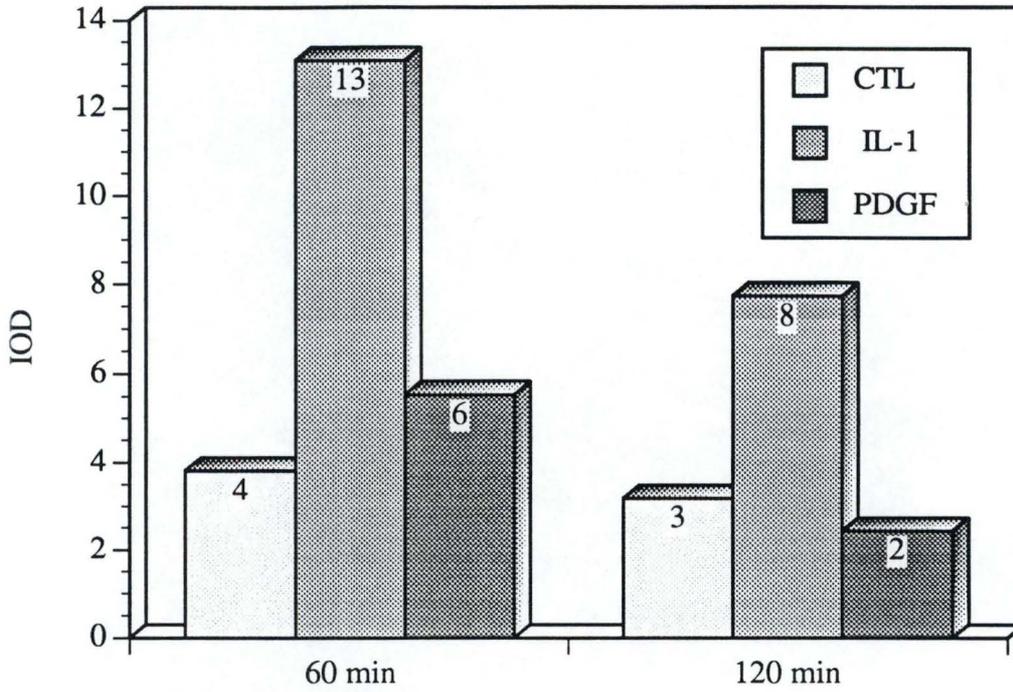


Figure III.15. B : Quantification par le système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en IOD (Integrated Optical Density) en fonction des différents traitements subis par les fibroblastes du poumon humain.

A

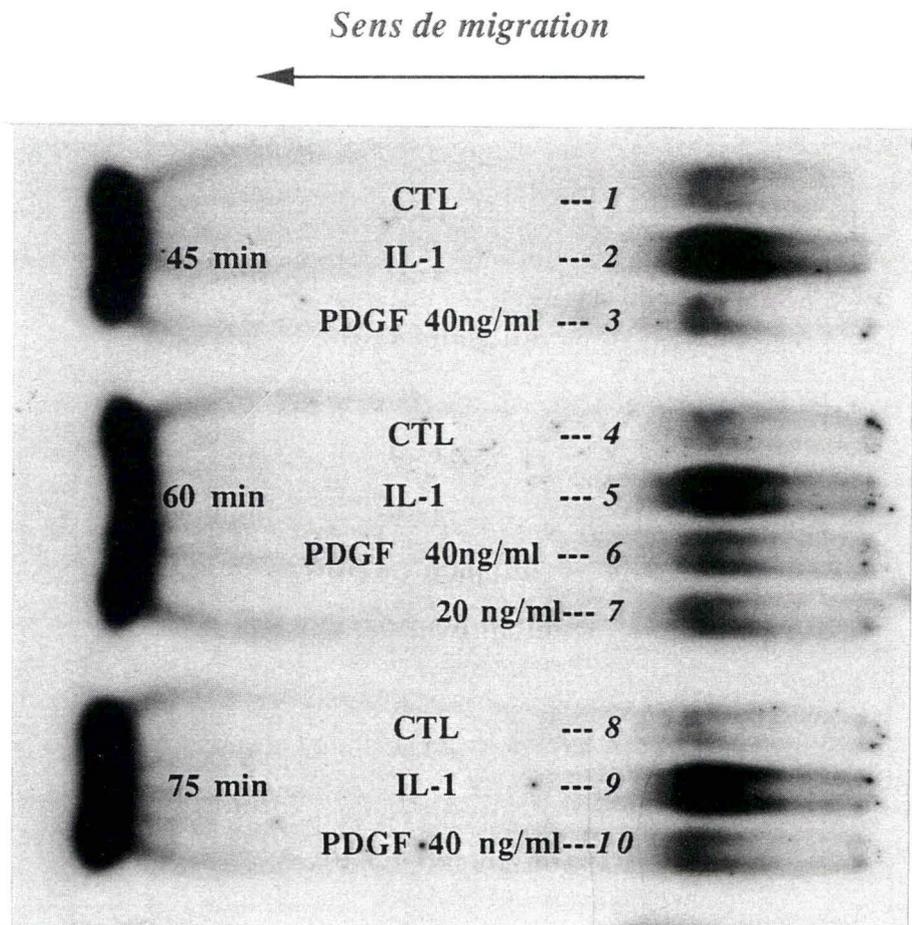


Figure III.16.A : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet de l'IL-1 et du PDGF sur l'activation du NF- κ B, dans les fibroblastes de poumon humain en 28^{ème} génération. Les cellules sont stimulées ou non au PDGF (20 ng/ml), à l'IL-1 (5 ng/ml) pendant 45, 60 et 75minutes. 25 μ g de protéines obtenues à partir des lysats cellulaires ont été déposés par piste. Le contrôle négatif (=Blanc) représente la migration de la sonde seule.

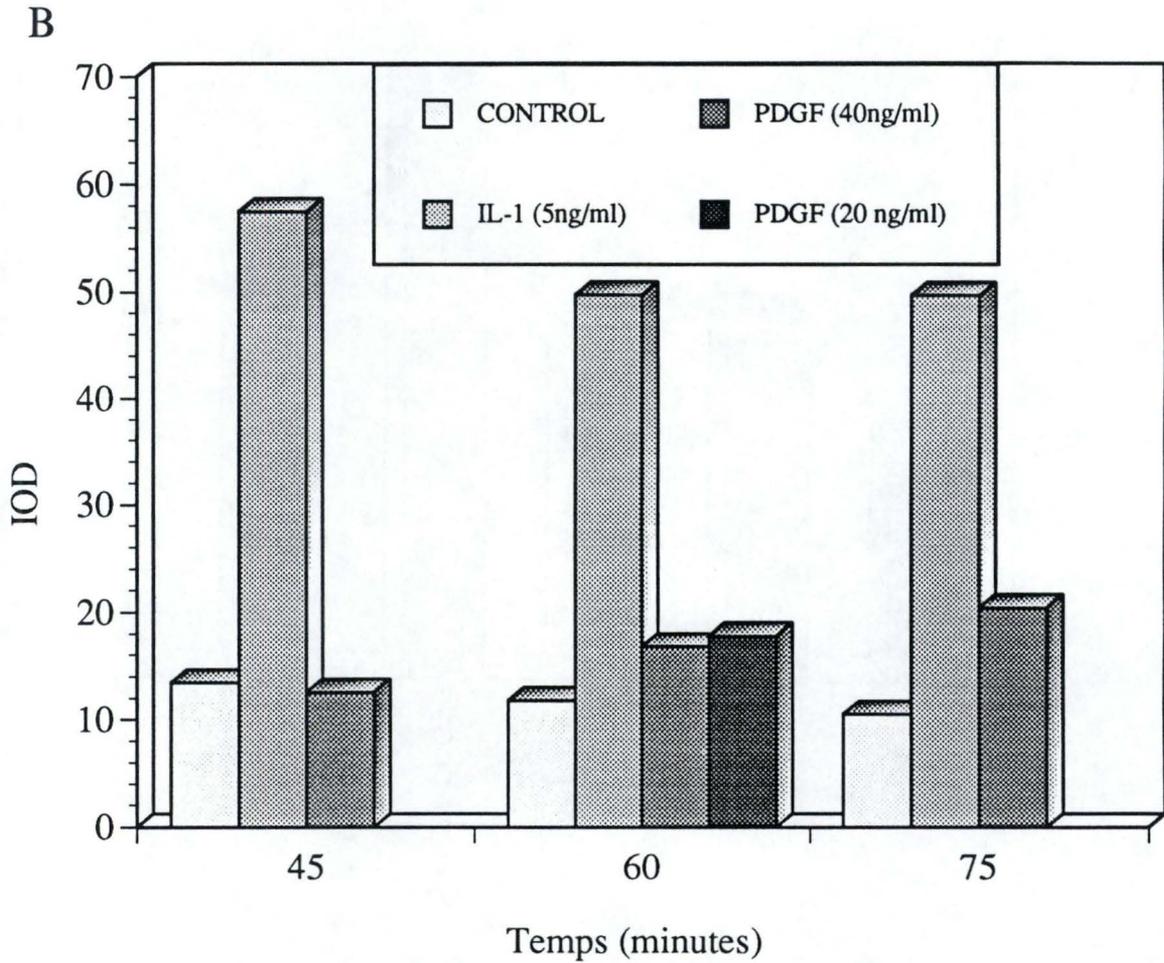


Figure III.16.B : Quantification par le système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en IOD (Integrated Optical Density) en fonction des différents traitements subis par les fibroblastes du poumon humain.

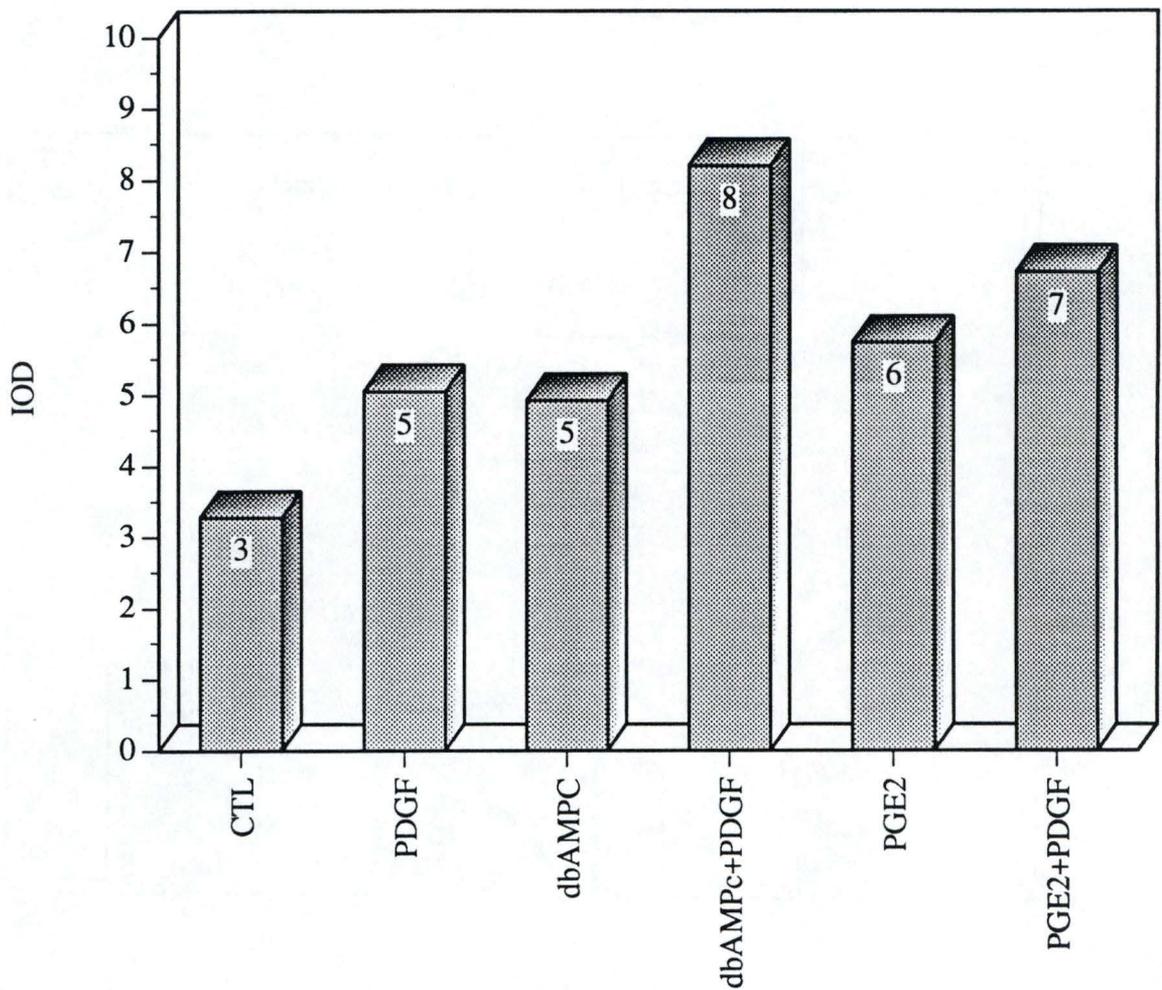


Figure III.17. : Effet du PDGF, de la PGE₂ et du db-AMPC sur l'activation du facteur NF-κB. Les résultats sont exprimés en IOD (intégration de la densité optique) en fonction des différents traitements subis par les fibroblastes de poumon humain en 32^{ème} génération. Les cellules ont été stimulées ou non pendant 75 minutes avec le PDGF (20 ng/ml) , le PGE₂ (10⁻⁶ M) et l'AMPC (10⁻³ M) ou en présence de deux médiateurs simultanément, le PDGF et le db-AMPC ou le PDGF et le PGE₂.

bande retardée pour les cellules stimulées au PDGF. Cependant, il est difficile d'évaluer l'importance de ces bandes par rapport à celles obtenues pour les cellules contrôles. Une analyse quantitative par le système d'image (Figure III.16.B) confirme l'activation du NF- κ B par l'IL-1 observée sur le gel. La stimulation maximale, 471 %, est obtenue par l'IL-1 après 75 minutes d'incubation. Le PDGF active lui aussi le facteur mais dans une moindre mesure. En effet, l'effet activateur du PDGF est de 142 % à 60 minutes et de 194 % après 75 minutes. Signalons que dans cette même expérience, nous avons testé l'effet de deux concentrations en PDGF (20 ng/ml et 40 ng/ml) sur l'induction du facteur après 60 minutes. Pour les deux concentrations utilisées, les pourcentages d'activation sont très proches, ils sont respectivement de 150 et de 142 % pour une concentration en PDGF de 20 ou de 40 ng/ml.

Discussion

Nous avons pu mettre en évidence par la technique du retard sur gel une légère activation du facteur NF- κ B par le PDGF après 75 minutes d'incubation, dans les fibroblastes de poumon humain. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Olashaw *et al.* (1992). Ils ont mis en évidence, dans les fibroblastes de souris Balb c3T3 stimulés au PDGF l'activation du facteur NF- κ B. Le PDGF est connu pour moduler l'expression d'un grand nombre de gènes en régulant l'activité des facteurs de transcription impliqués dans leur activation tels c-Jun et c-Fos. Le NF- κ B pourrait faire partie de ces facteurs régulateurs induits par le PDGF et ainsi jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Puisque nous avons mis en évidence un effet du PDGF sur l'activation du NF- κ B, voyons si nous pouvons moduler cet effet par l'AMPc.

Burton *et al.* (sous presse) ont montré que le PGE₂, dont les effets sont médiés par l'AMPc, contrecarre les effets pro-prolifératifs induits par le PDGF dans les fibroblastes de poumon humain. Nous avons donc voulu tester en plus de l'AMPc les effets de la PGE₂ sur l'activation du facteur.

Pour cela, les cellules ont été incubées avec ou sans PDGF (20 ng/ml), avec la PGE₂ (10⁻⁶M) seule ou en combinaison avec le PDGF, et avec l'AMPc (10⁻³M) seul ou en présence de PDGF). Les effets de ces différents médiateurs ont été étudiés après un temps d'incubation de 75 minutes. Les résultats obtenus sont repris à la Figure III.17. Les effets du PDGF sur l'activation du facteur sont confirmés sur cette expérience par un pourcentage de stimulation estimée par rapport au contrôle à 153 %. On obtient des valeurs très similaires lorsque les cellules sont stimulées à l'AMPc ou à la PGE₂ seuls. On constate que les effets induits par le PDGF sont exacerbés lorsque les 2 médiateurs, PDGF et db-AMPc d'une part et PDGF et

PGE₂ de l'autre, sont ajoutés simultanément. On obtient en effet un pourcentage de stimulation de 271,6 % lorsque les cellules incubées en présence de PDGF et de db-AMPC, ce qui correspond à une activation 1,8 fois plus importante que celle obtenue pour les cellules traitées au PDGF.

Discussion

Les résultats obtenus mettent en évidence un effet potentialisateur du db-AMPC et de la PGE₂ sur l'activation du facteur induite par le PDGF. Ils ne nous permettent donc pas d'expliquer les effets inhibiteurs induits par l'AMPC obtenus sur la prolifération par une action inhibitrice de l'AMPC sur le NF- κ B. Cela peut s'expliquer par le fait que la voie du NF- κ B n'est pas la principale voie intracellulaire par laquelle les effets pro-prolifératifs du PDGF sont médiés. Les résultats que nous avons obtenus mettent plutôt en évidence un effet activateur de l'AMPC et de la PGE₂ sur le facteur. Ils élargissent ainsi à un autre type cellulaire les résultats obtenus par Serkolla et Hurme (1993) sur les cellules myéloïdes humaines. Ces auteurs mettent en évidence une augmentation significative de l'activité du facteur suite à une élévation de la concentration intracellulaire en AMPC dans les cellules. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, l'activation du NF- κ B nécessite sa dissociation de la sous-unité inhibitrice I- κ B, qui pour cela doit être phosphorylée. In vitro, I- κ B est phosphorylée par la PKA (Gosh et Baltimore, 1990). On peut donc penser que les effets induits par le db-AMPC et la PGE₂ sur l'activation du facteur dans nos cellules sont médiés par la PKA. Dans ce cas, le db-AMPC ajouté aux cellules ou l'AMPC induit par la PGE₂ l'activent et induisent ainsi l'activation du facteur.

IV. Discussion générale et perspectives

Le PDGF est un facteur de croissance qui joue un rôle primordial dans la prolifération des fibroblastes de poumon humain. Ses effets sont médiés par une cascade de phosphorylations cytoplasmiques qui assure la transmission du signal mitogénique depuis le récepteur jusqu'à la machinerie transcriptionnelle. En effet, cette cascade de kinases aboutit à l'activation de facteurs transcriptionnels qui contrôlent les gènes de prolifération. Au laboratoire, a été mis en évidence un effet inhibiteur de l'AMPc sur la prolifération induite par le PDGF sur ce modèle cellulaire.

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires de cette régulation négative en essayant de voir à quel(s) niveau(x) de cette voie d'activation l'AMPc agissait. Les constituants cellulaires impliqués dans cette cascade sont nombreux; nous nous sommes spécialement intéressés à la MAP kinase p42 (p42^{mapk}) étant donné son importance dans la transmission des signaux mitogéniques (Sturgill et Wu, 1991), ainsi qu'au facteur transcriptionnel AP-1, directement impliqué dans l'expression de gènes "immédiats-précoces". Dans un premier temps, nous avons vérifié l'effet de prolifération des fibroblastes de poumon humain induit par le PDGF, par des tests d'incorporation de thymidine tritiée. L'AMPc inhibe à 100 % l'effet pro-prolifératif induit par le PDGF. Nous avons également testé différents temps de pré-incubation au db-AMPc sur la réponse proliférative de nos fibroblastes. Dans ces conditions, par contre, nous n'avons pu mettre en évidence aucun effet de l'AMPc.

Dans un second temps, nous avons mis au point les méthodes ainsi que les conditions optimales requises d'abord pour déterminer l'état de phosphorylation de la p42^{mapk} et le degré d'activation du facteur AP-1 dans les cellules stimulées pour mettre en évidence d'éventuels effets inhibiteurs de l'AMPc sur ces deux composants cellulaires.

En ce qui concerne la p42^{mapk}, nous avons d'abord mis au point la méthode pour suivre l'état de phosphorylation de cette kinase par la technique du Western blot. Le pourcentage d'acrylamide initialement utilisé (15%) a été modifié (10%) pour améliorer la résolution des gels. Les résultats les plus reproductibles sont obtenus sur fractions cytosoliques et nous déposons 10µg de protéines sur le gel. Nous avons ensuite défini les conditions maximales de stimulation au PDGF sur le degré de phosphorylation de la p42^{mapk}. Pour ce, nous stimulons les cellules avec du PDGF à 20 ng/ml pendant 10 minutes. En effet, pour des temps de stimulations plus longs, on constate que les processus de déphosphorylation se sont déjà mis en route. Dans ces conditions, nous obtenons jusqu'à 90% de p42^{mapk} sous forme phosphorylées. Contrairement à d'autres modèles d'activation, nous n'avons jamais observé un phénomène de tout ou rien. Hordijk *et al.* (1993), par exemple, en stimulant des cellules avec l'EGF, par contre, n'observent pas de p42^{mapk} phosphorylée dans les

	Prolifération	MAPK
PDGF	+++	+++
PDGF + AMPc	↘ ↘	+++
PDGF + préincubation à l'AMPc	++	↘

Table IV.1. : Tableau récapitulatif reprenant les effets du PDGF et de l'AMPc sur la prolifération cellulaire et l'activation de la p42^{mapk}.

	Prolifération	MAPK
PMA	+++	+++
PMA + AMPc	Non testé	↘
PMA + préincubation à l'AMPc	Non testé	↘

Table IV.2. : Tableau récapitulatif reprenant les effets de l'AMPc sur la prolifération cellulaire et l'activation de la p42^{mapk}.

cellules non stimulées, tandis que dans les cellules stimulées pendant 5-10 minutes, toute la population de p42^{mapk} devient phosphorylée.

Après ces mises au point, nous avons pu tester l'effet de l'AMPC sur la phosphorylation de la p42^{mapk} induite par le PDGF.

Les résultats obtenus nous ont montré que l'AMPC ajouté pendant la stimulation au PDGF ne modulait en rien la phosphorylation de la p42^{mapk} induite par le PDGF. On a cependant mis en évidence un effet inhibiteur partiel de l'AMPC lorsque les cellules étaient incubées en présence de ce médiateur deux heures avant d'être stimulées au PDGF. Le pourcentage d'inhibition observé est de l'ordre de 42%. L'ensemble de ces résultats concernant la modulation par l'AMPC de la prolifération et de l'activation de la p42^{mapk} induite par le PDGF ont été résumés à la Table IV.1..

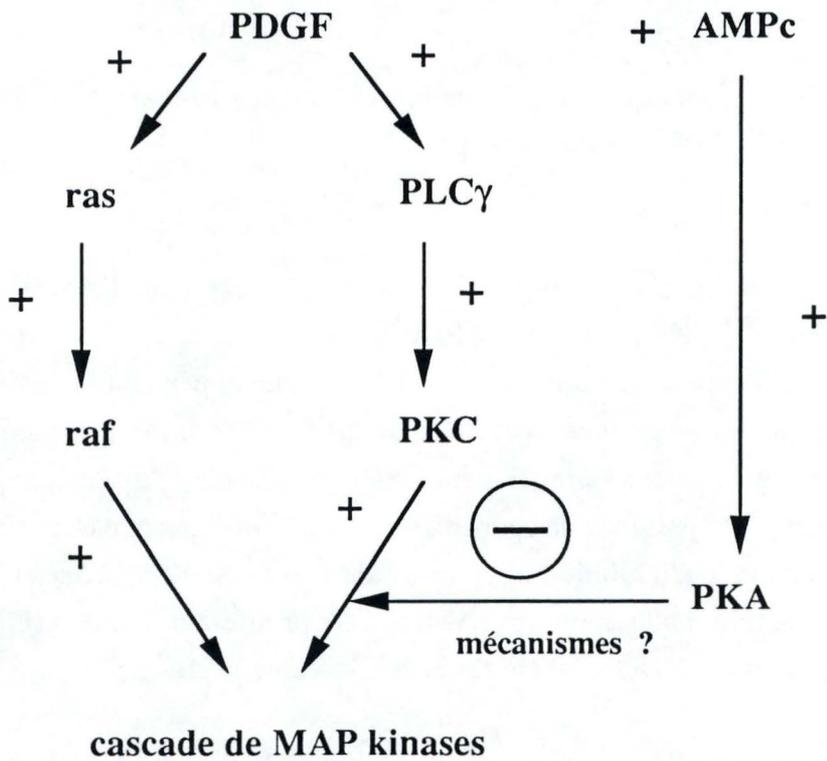
Les effets induits par l'AMPC divergent donc selon que l'on envisage l'activation des p42^{mapk} ou la prolifération. Ils diffèrent de manière significative lorsque les cellules sont incubées simultanément avec les deux médiateurs.

Signalons que dans la littérature, des pré-incubations de dix minutes de dibutyryl-AMPC ou de 8 bromo-AMPC, sont testées pour inhiber l'activation de la p42^{mapk} induite par les facteurs de croissance tandis que l'effet de l'AMPC sur la prolifération est généralement testé sans pré-incubation. Ces auteurs mettent donc en évidence le parallélisme entre les effets inhibiteurs induits par l'AMPC sur la prolifération et l'activation des MAP kinases (Cook et Mc Cormick, 1993), bien que ces conditions d'incubation soient différentes.

Parallèlement à ces expériences, nous avons testé l'effet d'un autre agent mitogène, le PMA sur la prolifération et sur l'activation de la p42^{mapk}. Le PMA, dont les effets sont médiés par la PKC, peut activer la voie des MAP kinases en phosphorylant directement Raf, court-circuitant ainsi le système d'activation Ras-Raf. Nous avons montré par la méthode d'incorporation de thymidine tritiée que le PMA stimulait la prolifération des fibroblastes.

L'effet stimulateur, bien qu' inférieur à celui induit par le PDGF, représente 216 % par rapport aux cellules contrôles (rapportées à 100%). Un effet similaire est induit par le PMA sur la phosphorylation de la p42^{mapk}. Comme pour le PDGF, nous avons enfin testé les effets de l'AMPC sur l'activation de la p42^{mapk} induite par le PMA, avec

A



B

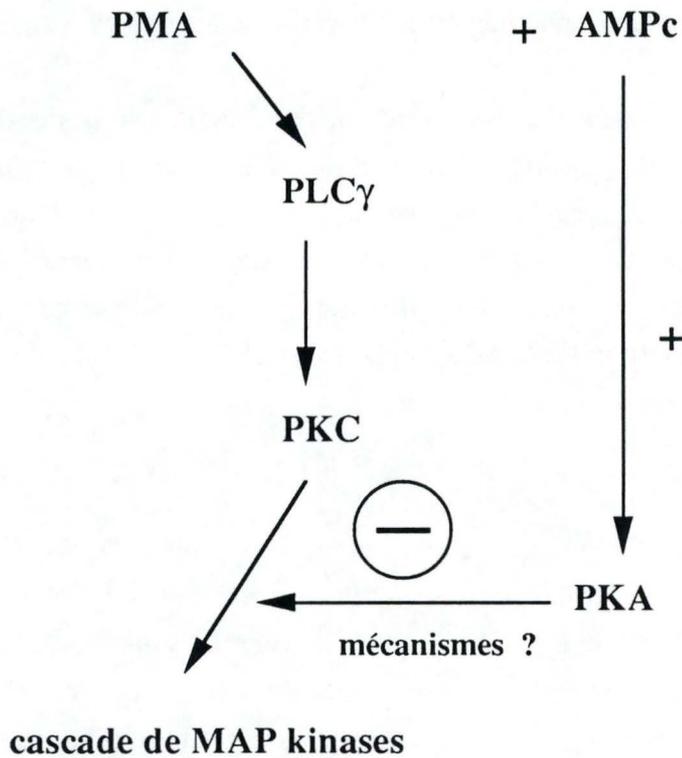


Figure IV.1. : Schéma hypothétique pour expliquer les effets inhibiteurs de l'AMPc sur l'activation de la cascade des MAP kinases induites par le PMA (B). Cette figure explique également (A) pourquoi l'AMPc n'affecte pas l'activation de la cascade des MAP kinases dans le cas du PDGF, la voie ras-raf étant fonctionnelle.

ou sans pré-incubation. Que l'AMPc soit ajouté avant (10 minutes) ou en même temps que le PMA, on a mis en évidence un effet inhibiteur de celui-ci. Ces résultats sont repris dans la Table IV.2..

L'AMPc est donc capable d'inhiber dans une certaine mesure l'activation de la p42^{mapk} induite par les PMA. L'effet inhibiteur n'est cependant pas total.

Ces résultats montrent donc que l'AMPc ajouté en même temps que le signal mitogénique inhibe, du moins en partie, la voie de la PKC induite par la PMA, mais pas la voie d'activation des MAPkinases induite par le PDGF. Dans les cellules stimulées au PDGF, la cascade des MAP kinases étant activée via le système Ras-Raf, et via la voie de la PLC γ , l'effet inhibiteur de l'AMPc sur la voie de l'activation des MAP kinases par la PKC passe probablement inaperçue (Figure IV.1.). On peut également conclure que, dans notre modèle de fibroblastes de poumon humain, la prolifération ne résulte pas uniquement de l'activation de la voie des MAP kinases puisque nous observons une inhibition de la prolifération, alors que l'activation de la MAP kinase par ce médiateur n'est pas du tout modifiée.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons utilisé la technique de retard sur gel ou EMSA, qui nous a permis d'étudier de manière directe l'activation du facteur AP-1, facteur activé en réponse aux facteurs de croissance, tel le PDGF.

Nous avons d'abord voulu tester l'effet du PDGF seul sur l'activation du facteur, cependant, la méthode utilisée, décrite par Schreck *et al.* (1991) et modifiée par Patestos *et al.* (1993), ne semblait pas adéquate. Nous avons alors tenté d'adapter le protocole expérimental en variant la concentration d'un constituant susceptible d'interférer avec la liaison de facteur à sa sonde : le polyd(I-C). Nous n'avons pas abouti à des résultats fiables.

Finalement, sur base d'une autre méthode qui nous a été communiquée personnellement par le Pr. Baeuerle, nous avons pu mettre en évidence l'activation du facteur par l'apparition sur le gel d'un complexe AP-1/sonde marquée retardé par rapport à la sonde libre. Cette activation semble favorisée par le PDGF. Nous avons pu ainsi tester l'effet du db-AMPc incubé en présence du PDGF sur l'activation d'AP-1, et nous avons pu mettre en évidence un léger effet inhibiteur. Cependant, il convient de rester prudent dans l'interprétation de ces résultats puisque ces conclusions se basent sur l'observation des bandes de l'EMSA, la quantification n'ayant pas pu être réalisée. De plus, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

Lorsque l'on compare les effets induits par le PDGF seul d'une part et ceux induits par le PDGF et l'AMPc d'autre part pour la prolifération et pour l'activation du facteur AP-1, on constate qu'ils vont dans le même sens. Ces résultats suggèrent que d'autres voies intracellulaires que celles des MAP kinases seraient impliquées dans la régulation de la prolifération. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le facteur AP-1 directement impliqué dans la régulation des gènes de prolifération est d'ailleurs régulé par d'autres kinases que la p42^{mapk}, telles la PKC, la GSK3 et la CKII. Ces kinases constituent donc également des sites potentiels de régulation par l'AMPc.

Nous avons également testé l'effet du PDGF et de l'AMPc sur un deuxième facteur transcriptionnel : le NFκB. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une activation du facteur par le PDGF, bien que relativement faible par rapport à celle induite par l'IL-1, connue pour activer ce facteur. Cet effet est amplifié par la stimulation simultanée de l'AMPc et du PDGF. On peut donc conclure que le NFκB bien que légèrement activé par le PDGF ne constitue pas la voie principale de régulation de la prolifération et qu'il n'est pas la cible d'une régulation négative par l'AMPc puisque ce dernier semble plutôt favoriser son activation, ce qui confirme les données de la littérature.

Ce travail nous a donc permis de mettre en évidence dans la souche de fibroblastes de poumon humain étudiée que l'effet inhibiteur induit par l'AMPc sur la prolifération de ces cellules s'exerce probablement à d'autres niveaux qu'au niveau de la p42^{mapk} ou de ses activateurs dans la voie de transduction du PDGF.

L'AMPc semble plutôt agir soit en aval de cette kinase au niveau des facteurs transcriptionnels, soit au niveau de la PKC induite par le PMA, soit au niveau d'une autre voie moléculaire d'activation.

Les perspectives ouvertes par ce travail sont cependant encore nombreuses. Dans un premier temps, certains résultats obtenus mériteraient d'être confirmés. C'est le cas de l'expérience concernant l'effet du PDGF et de l'AMPc sur l'activation du facteur AP-1 car nous ne l'avons réalisée qu'une seule fois dans les conditions expérimentales satisfaisantes.

Dans un second temps, il serait intéressant de vérifier les résultats obtenus par la technique de retard sur gel en testant, par Northern blot l'effet du PDGF et de l'AMPc sur l'expression des gènes sous contrôle de ce facteur, tels *c-jun* ou *c-fos*, en dosant les mRNA correspondants.

D'autre part, la technique que nous avons utilisée pour mettre en évidence l'effet

du PDGF et de l'AMPc sur l'activation de la p42^{mapk} nous donnent des résultats qui, bien que quantifiés par le système analyseur d'images, restent semi-quantitatifs. Il serait très intéressant de préciser les résultats obtenus par des dosages directs de l'activité de la MAP kinase, immunoprécipitée à partir de cellules stimulées au PDGF en présence ou non d'AMPc. De tels dosages peuvent être également envisagés pour d'autres kinases de cette cascade tels Raf et la MAP kinase kinase.

En conclusion, ce mémoire avait envisagé entre autres pour vérifier des données récentes de la littérature suggérant que l'AMPc pouvait contrecarrer certains facteurs de croissance, tels l'EGF ou le PDGF, par l'action de la PKA sur le couple Ras-Raf. En essayant de vérifier ces données sur un modèle de fibroblastes humains en culture, nous arrivons donc à la constatation que les mécanismes moléculaires de régulation par l'AMPc peuvent considérablement diverger selon les types cellulaires, l'espèce dont elles proviennent et le système activateur utilisé.

V. Bibliographie

Abate, C., D. R. Marshak, et al. (1991). "Fos is phosphorylated by p34^{cdc2}, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions." Oncogene **6**: 2179-85.

Adams, P. D. and P. J. Parker (1992). "Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase-kinase." J. Biol. Chem. **267**(5): 13135-37.

Ahn, N. G. (1993). "The MAP kinase cascade. Discovery of a new signal transduction pathway." Mol. cell. Biochem. **127/128**: 201-9.

Ahn, N. G. and E. G. Krebl (1990). "Evidence for an Epidermal Growth Factor-stimulated protein kinase Cascade in Swiss 3T3 cells." J. Biol. Chem. **265**(20): 11495-501.

Ahn, N. G., J. E. Weiel, et al. (1990). "Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinase from Swiss 3T3 cells." J. Biol. Chem. **265**(20): 11487-94.

Angel, P., R. C. Imagawa, et al. (1987). "Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor." Cell **49**: 729-739.

Lin A., M. D., T. Smeal, et al. (1993). "Control of AP-1 activity by signal transduction cascades." Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research **28**: 255-260

Antoniades, H. N. (1991). "PDGF : a multifunctional growth factor." Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism **5**(4): 595-613.

Avruch, J., X. Zhang, et al. (1994). "Raf meets Ras : completing the framework of a signal transduction pathway." T.I.B.S. **19**: 279-283.

Balk, S. D. (1971). "Calcium as a regulator of the proliferation of normal , but not of transformed chicken fibroblasts in a plasma containing medium." Proc. Natl. Acad. Sci. **68**: 271-275.

Barret, T. B. and E. P. Benditt (1987). "Sis (platelet-derived growth factor B chain) gene transcript levels are elevated in human arteriosclerotic lesions comparet to normal artery." Proc. Natl. Acad. Sci. **84**: 1099-1103.

Benito, M. and M. Lorenzo (1993). "Platelet-derived growth factor/tyrosine kinase receptor mediated proliferation." Growth Regulation **3**: 172-9.

Blanchard, J.-M. (1992). "Le proto-oncogène c-fos : un "entremetteur" moléculaire." Médecine/sciences **8**: 455-470.

Blank, V., P. Kourislsky, et al. (1992). "NF-kappa B and related proteins : Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats." T.I.B.S. **17**: 135-140.

Blumer, K. J. and G. L. Johnson (1994). "Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways." T.I.B.S. **19**: 236-240.

Bowen-Pope, D. F., C. E. Hart, et al. (1991). "Is PDGF really important, testing the hypotheses." Trends Genet. **7**: 413-418.

Boyle, W. J., T. Smeal, et al. (1991). "Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-jun at sites that negatively regulates its DNA-binding activity." Cell **64**: 573-584.

Brugge, J. S. (1993). "New intracellular targets for therapeutic drug design." Science **260**: 918-918.

Brunet, A., G. Pagès, et al. (1994). "Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK)." FEBS letters **346** :299-303)

Bryckaert, M.-C., M. Fontenay, et al. (1991). "Le PDGF (platelet-derived growth factor) et ses implications en pathologie humaine." médecine/sciences **7**: 478-484.

Burgering, B. M. T., G. J. Pronk, et al. (1993). "cAMP antagonizes p21^{ras}-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mos nucleotide exchange factor." EMBO J. **12**(11): 4211-20.

Burton, M et al. "Inhibitory effects of cyclicAMP and prostaglandin E₂ on PDGF-induced human lung fibroblast proliferation" J. Exp. Clin. Cancer Res. (sous presse)

Campbell, G. S., L. Pang, et al. (1992). "Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts." J. Biol. Chem. **267**(9): 6074-80.

Carré, P. and P. Léophonte (1993). "Cytokines et fibroses pulmonaires." Mal. Resp. **10**: 193-207.

Castellazzi, M. and A. Sergeant (1993). "L'oncoprotéine c-Jun." Bull. Cancer **80**: 757-779.

Chatani, Y., E. Tanaka, et al. (1992). "Mitogen-induced tyrosine-phosphorylated 41- and 43-kDa proteins are family members of extracellular signal-regulated kinases/microtubule-associated protein 2 kinases." J. Biol. Chem. **14**(15): 9911-16.

Chen, R.-H., C. Sarnecki, et al. (1992). "Nuclear localization and regulation of *erk*- and *rsk*-encoded protein kinases." Mol. Cell. Biol. **12**(3): 915-27.

Cook, S. J. and F. McCormick (1993). "Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf." Science **262**: 1069-71.

Daniel, T. O. and D. A. Kumjian (1992). "Platelet-derived growth factor : a multifunctional regulator of normal and abnormal cell growth." Biofactors **1**: 213-17.

Daum, G., I. Eisenmann-Tappe, et al. (1994). "The ins and out of Raf kinases." IBS **19**: 474-479.

Davis, R. J. (1994). "MAPKs: new JNK expands the groups." Tibs **19**: 470-473

Dérijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1 : Pritein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that bind and phosphorylates the c-Jun activation domain." Cell **76**: 1025-1037.

Devary, Y., C. Rosette, et al. (1993). "NF- κ B activation by ultraviolet light not dependant on a nuclear signal." Science **261**: 1442-1445.

Duckett, C. S. "Structure and function of the NF- κ B family of transcription factors." Promega Notes : 40-43.

Edwards, D. J. (1994). "Cell signaling and the control of gene transcription." T.I.B.S. **15**: 239-244.

Eriksson, A., A. Siegbahn, et al. (1992). "PDGF α and β -receptors activate unique and common signal transduction pathways." EMBO J. **11**: 543-50.

Errede, B. and D. E. Levin (1993). "A conserved kinase cascade for MAP kinase activation in

yeast." Curr. Op. Cell Biol. **5**: 254-260.

Fantl, W. J., D. E. Johnson, et al. (1993). "Signalling by receptor tyrosine kinases." Annu. Rev. Bioch. **62**: 453-481.

Gardner, A. M., R. R. Vaillancourt, et al. (1994). "MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase : analysis of phosphopeptides and regulation of activity." Mol. Biol. Cell **5**: 193-201.

Graves, L. M., K. E. Bornfeldt, et al. (1993). "Protein kinase A antagonize platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells." Proc. Natl.acad. Sci. USA **90**: 10300-10304.

Gualde, N. (1986). "La réaction inflammatoire, une défense agressive." La Recherche **17**: 623-635.

Gillon B. (1992) " Activation de la prolifération des fibroblates pulmonaires par le PDGF. Régulation par le système PGE₂/AMPc." Mémoire de licences F.N.D.P.

Hay, R. T. (1993). "Control of nuclear factor- κ B DNA-binding activity by inhibitory proteins containing ankyrin repeats." Biochemical Society Transaction **21**: 926-929.

Hayflick, L. and P. S. Moorehead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp. Cell Res. **25**: 585-621.

Hibert, M. F., J. Hoflack, et al. (1993). "Modèles tridimensionnels des récepteurs couplés aux protéines G." Médecine/science **9**: 31-40.

Hiscott, J., A. Roulston, et al. (1992). "La régulation et l'expression de VIH-1 et l'activation des gènes de cytokines." médecine/sciences **8**: 346-351.

Hordijk, P. L., I. Verlaan, et al. (1994). "cAMP abrogates the p21^{ras}-mitogen-activated protein kinase pathway in fibroblasts." J. Biol. Chem. **269**(5): 3534-38.

Howe, L. R., S. L. Leever, et al. (1992). "Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase Raf." Cell **71**: 335-342.

Hunter, T. and M. Karin (1992). "The regulation of transcription by phosphorylation." Cell **70**: 375-387.

Jackson, S. P. (1992). "Regulation transcription factor activity by phosphorylation." T.I.B.S. **2**: 104-108.

Johnson, G. L. and R. R. Vaillancourt (1994). "Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation." Curr. op. cell biol. **6**: 230-238.

Junod, A. F. (1991). "Biologie et physiologie du syndrome de détresse respiratoire de l'adulte." médecine/sciences **7**: 1016-23.

Karin, M. (1991). "Signal transduction and gene control." Curr. op. cell biol. **3**: 467-473.

Kazlauskas, A., D. Bowen-Pope, et al. (1988). "Different effects of homo- and heterodimers of platelet-derived growth factor A and B chains on human and mouse fibroblasts." EMBO J. **7**(12): 3727-35.

Kelley, J. (1990). "Cytokines of the Lung." Am. Rev. Respir. Dis. **141**: 765-788.

Khachigian, L. M. and C. N. Chesterman (1992). "Platelet-derived growth factor and alternative splicing : a review." Pathology **24**: 280-90.

Khan, A. (1992). "Les protéines Ras et GAP, des relais sur la voie de transmission du signal passant par l'activation des tyrosines kinases." médecine/sciences **8**: 471-475.

Lamy, F., F. Wilkin, et al. (1993). "Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases is involved in the epidermal growth factor and phorbol ester, but not in the thyrotropin/cAMP, thyroid mitogenic pathway." J. Biol. Chem. **268**(12): 8398-8401.

Lange-Carter, C. A., C. M. Pleiman, et al. (1993). "A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf." Science **260**: 315-319.

Leervers, S. J. and C. J. Marshall (1992). "MAP kinase regulation-the oncogene connection." T.I.B.S. **2**: 283-285.

Lewin, B. (1991). "Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors." Cell **64**: 303-312.

Lin, A., T. Smeal, et al. (1993). Control of AP-1 activity by signal transduction cascades. Advances in second messenger and phosphoprotein research Ed. B. L. B. & P. R. M. Dobson. New York, Barry L. Raven Press, Ltd. 255-259.

Liou, H.-C. and D. Baltimore (1993). "Regulation of the NF- κ B/rel transcription factor and I κ B inhibitor system." Curr. Op. Cell Biol. **5**: 477-487.

Lowy, D. R. (1993). "Function and regulation of RAS." Annu. Rev. Biochem. **62**: 851-891.

Lubinus, M., K. E. Meier, et al. (1994). "Independent effects of platelet-derived growth factor isoforms on mitogen-activated protein kinase activation and mitogenesis in human dermal fibroblasts." The journal of biological chemistry **269**(13): 9822-9825.

Marinelli, W. A., V. A. Polunovsky, et al. (1991). "Role on platelet-derived growth factor in pulmonary fibrosis." Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. **5**: 503-504.

Maruta, H. and A. W. Burgess (1994). "Regulation of the Ras signalling network." BioEssays **16**(7): 489-496.

Marx, J. (1993). "Forging a path to the nucleus." Science **260**: 1588-1590.

McCormick, F. (1994). "Raf : the holy grail of Ras biology ?" T.I.B.S. **4**: 347-349.

McKnight, G. S. (1991). "Cyclic AMP second messenger systems." Curr. Op. Cell Biol. **3**: 213-217.

Meek, D. W. and A. J. Street (1992). "Nuclear protein phosphorylation and growth control." Biochem. J. **287**: 1-15.

Meyer, M., R. Schreck, et al. (1993). "H₂O₂ and antioxydants have opposite effects on activation of NF κ B and AP-1 in intact cells : AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor." The EMBO journal **12**(5): 2005-15.

Moodie, S. A., B. M. Willumsen, et al. (1993). "Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase." Science **260**: 1658-61.

- Morrison, D. K., G. Heidecker, et al. (1993). "Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase." J. Biol. Chem. **268**(23): 17309-17316.
- Nebrada, A. R. (1994). "Inactivation of MAP kinases." T.I.B.S. **19**: 1-2
- Nishida, E. and Y. Gotoh (1993). "The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways." T.I.B.S. **18**: 128-131.
- Nister, M., A. Hammacher, et al. (1988). "A glioma-derived PDGF A chain purified from human platelets." Cell **52**: 791-99
- Olashaw, N. E., T. F. Kowalik, et al. (1992). "Induction of NF- κ B-like activity by platelet-derived growth factor on mouse fibroblasts." Mol. Biol. Cell. **3**: 1131-39.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, et al. (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B." Cell **78** : 773-785
- Patestos, N. P., G. Haegeman, et al. (1993). "Activation of the nuclear factor kappa B is not sufficient for regulation of tumor necrosis factor-induced interleukin-6 gene expression." Biochimie **75**(11): 1007-18.
- Payne, M., A. J. Rossomando, et al. (1991). "Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)." EMBO J. **10**(4): 885-892.
- Pearson, R. B. and B. E. Kemp (1991). "Protein kinase phosphorylation site and consensus specificity motifs: tabulations." Methods in enzymology **200**: 62-81
- Pelech, S. L. and J. S. Sanghera (1992). "Mitogen-activated protein kinases : versatile transducers for cell signaling." T.I.B.S. **17**: 233-235.
- Pierce, G., T. Mustoe, et al. (1991). "Role of platelet-derived growth factor in wound healing." J. Cell. Biochem. **45**: 319-26.
- Ping, L., K. Wood, et al. (1991). "Raf-1: a kinase currently without a cause but not lacking in effects." Cell **64**: 479-482.
- Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, et al. (1991). "Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases." Nature **353**: 670-674.
- Rapp, U. R. (1991). "Role of Raf-1 serine/threonine protein kinase in growth factor signal transduction." Oncogene **6**: 495-500.
- Remacle, J. A., A. Houbion, et al. (1980). "Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts comparison between young and old cell." Biochimica et biophysica acta **630**: 57-70.
- Rodriguez-Viciano, P., P. Warne, et al. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." Nature **370**: 527-532.
- Ross, R. (1989). "Platelet-derived growth factor." The Lancet **27**: 1179-82.
- Ross, R., J. A. Glomset, et al. (1974). "A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro." Proc. Natl. Acad. Sci. **71**: 1207-1210.
- Ross, R., E. W. Raines, et al. (1986). "The biology on platelet-derived growth factor." Cell **46**: 155-169.
- Rossomando, A. J., D. M. Payne, et al. (1989). "Evidence that pp42, a major tyrosine kinase

target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase." Proc. Natl. Acad. Sci. **86**: 6940-43.

Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, et al. (1993). "The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1." Nature **363**: 83-85.

Ruderman, J. V. (1993). "MAP kinase activation of quiescent cells." Curr. Op. Cell Biol. **5**: 207-213.

Ruderman, J. V. (1993). "MAP kinase and the activation of quiescent cells." Curr. Op. Cell Biol. **5**: 207-213.

Schlessinger, J. (1993). "How receptor tyrosine kinases activate Ras." T.I.B.S. **18**: 273-274.

Schramm, K., M. Niehof, et al. (1994). "Phosphorylation of c-Raf-1 by protein kinase A interferes with activation." Biochem. Biophys. Res. Comm. **201**(2): 740-747.

Schreck, R., P. Rieber, et al. (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.

Seppä, H., G. Grotendorst, et al. (1982). "Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts." J. Cell. Biol. **106**: 813-819.

Serkkola, E. and M. Hurme (1993). "Activation of NF- κ B by cAMP in human myeloid cells." FEBS Letters **334**(3): 327-30.

Seth, A., F. A. Gonzalez, et al. (1992). "Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase." J. Biol. Chem. **267**(34): 24796-804.

Sevetson, B. R., K. Xianming, et al. (1993). "Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 10305-09.

Shaap, D., J. van der Wal, et al. (1993). "A Dominant-negative mutant of *raf* blocks mitogen-activated protein kinase activation by growth factors and oncogenic p21^{ras}." J. Biol. Chem. **268**(27): 20232-36.

Sorkin, A. and C. M. Waters (1993). "Endocytosis of growth factor receptors." BioEssays **15**(6): 375-382.

Spaulding, S. W. (1993). "The ways in which hormones change cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behavior." Endocrine Review **14**(5): 632-650.

Sturgill, T. W. and J. Wu (1991). "Recent progress in characterization of protein kinase cascade for phosphorylation of ribosomal protein S6." Biochimica et Biophysica Acta **1092**: 350-57.

Sun, H. and N. K. Tonks (1994). "The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling." Tibs **19**: 480-485.

Szeberenyi, J. and P. Erhardt (1994). "Cellular components of nerve growth factor signaling." Bioch. Biophys. Acta **1222**: 187-202.

Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell **61**: 203-12.

Urban, M. B. and P. A. Baeuerle (1990). "The 65kd subunit of NF kappa B is a receptor for

I κ B and a modulator of DNA-binding specificity." Genes **4**: 1975-1984.

Vallus, M. and A. Kasiauskas (1993). "Phospholipase C-g1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal." Cell **73**: 321-334.

Van Aelst, L., M. Barr, et al. (1993). "Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases." Cell biology **90**: 6213-6217.

Van Zoelen, E., W. Van Rotterdam, et al. (1993). "Differential effects of PDGF isoforms on proliferation of normal rat kidney cells." Growth Factors **9**: 329-39.

Warne, P. H., P. Rodriguez-Viciana, et al. (1993). "Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro." Nature **364**: 352-355.

Westermarck, B. and C.-H. Heldin (1993). "Platelet-derived growth factor : structure, function and implication in normal and malignant cell growth." Acta Oncologica **32**(2): 101-105.

Wittinghofer, A. and E. F. Pai (1991). "The structure of Ras protein : a model for a universal molecular switch." TIBS **16**: 382-386.

Wu, J., P. Dent, et al. (1993). "Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5'-monophosphate." Science **262**: 1065-1068.

Wymann, M. and A. Arcaro (1994). "Platelet-derived growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation mediates actin rearrangement in fibroblasts." Biochem.J. **298**: 517-520.