



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Modulation de l'activation du facteur de transcription NF-KB par le potentiel antioxydant des cellules

Bougelet, Catherine

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.



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

**MODULATION DE L'ACTIVATION
DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF- κ B
PAR LE POTENTIEL ANTIOXYDANT DES CELLULES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques**

**BOUGELET Catherine
Décembre 1994**

IL-1RTII	: récepteur à l'interleukine 1 de type II
IL-2R	: récepteur à l'interleukine
IL-6	: interleukine 6
IOD	: intégration de la densité optique
IP ₃	: inositol triphosphate
kDa	: kilodalton
LIFR	: leukemia inhibitory factor receptor
LPS	: lipopolysaccharides bactériens
MAPK	: mitogen activated protein kinase
MDA	: malondialdéhyde
MEM+HLA	: minimum essential medium + hydrolysats de lactalbumine
mRNA	: messenger ribonucleic acid
MS	: mercaptosuccinate
NAC	: N-acétyl-cystéine
NADH	: nicotinamide dinucléotide réduit
NADPH	: nicotinamide dinucléotide phosphate réduit
NFκB	: nuclear factor κB
NK	: natural killer
NLS	: nuclear localizing sequence
PA	: phosphatidic acid
PAF	: platelet-activating factor
PBS	: phosphate buffer saline
PDE	: phosphodiesterase
PDGF	: platelet-derived growth factor
PDTC	: pyrrolidinedithiocarbamate
PGE ₂	: prostaglandine E ₂
PI	: phosphatidyl inositol
PIP ₂	: phosphatidyl inositol biphosphate
PKA	: protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	: protéine kinase C
PKCξ	: isoforme ξ de la protéine kinase C
PLA ₂	: phospholipase A ₂
cPLA ₂	: phospholipase A ₂ cytoplasmique
sPLA ₂	: phospholipase A ₂ sécrétée
PLC	: phospholipase C
PMA	: phorbol myristate acétate
PMN	: polymorphonucléaire
PS	: phosphatidyl sérine
Π*2p	: orbitale Π 2p anti-liante
RE	: réticulum endoplasmique
RNA	: ribonucleic acid
ROI	: reactive oxygen intermediates
Se	: sélénite de sodium
SB	: sérum bovin
SM	: sphingomyéline
SMase	: sphingomyélinase
SOD	: superoxyde dismutase
TBHP	: tertiobutylhydroperoxide
TF2A, 2B, 2D, 2E, 2F	: transcription factor 2A, 2B, 2D, 2E, 2F
TNFα	: tumor necrosis factor α
UV	: ultraviolet
WI-38	: Western Institute 38 fibroblast
XD	: xantine déshydrogénase
XO	: xantine oxydase

AA	: acide arachidonique
AC	: adénylate cyclase
ADNc	: adénosine désoxyribonucléique cyclique
AMP	: adénosine monophosphate
AMPc	: adénosine monophosphate cyclique
AP-1	: activator protein 1
ATA	: aminotriazole
ATP	: adénosine triphosphate
BCNU	: bis-chloroéthyl-nitrosourée
BSA	: albumine de sérum bovin
BSO	: buthionine sulfoxymine
Cer	: céramide
Cer 1-P	: céramide 1 phosphate
CKII	: caséine kinase II
CMV	: cytomegalovirus
COX-1	: cyclooxygénase 1
COX-2	: cyclooxygénase 2
CREB	: cAMP responsive element binding
CSF	: colony stimulating factor
CTR	: carboxy-terminal region
DAG	: diacylglycérol
DMSO	: diméthylsulfoxyde
DO	: densité optique
DTT	: dithiotréitol
E. Coli	: Escherichia coli
EGF	: epidermal growth factor
EGF-R	: epidermal growth factor receptor
ELISA	: enzyme linked immuno sandwich assay
EMSA	: electrophoretic mobility shift assay
EPDR	: récepteur à l'érythropoïétine
FAD	: flavine adénine dinucléotide
G-CSF	: granulocyte colony stimulating factor
GDP	: guanosine diphosphate
Gi α	: sous-unité G inhibitrice α
Gi $\beta\alpha$: sous-unité G inhibitrice $\beta\alpha$
GM-CSF-R	: granulocyte and macrophage colony stimulating factor
G6PD	: glucose-6-phosphate-déshydrogénase
GPx	: glutathion peroxydase
G réd	: glutathion réductase
Gs	: sous-unité G régulatrice
Gs α	: sous-unité G régulatrice α
GSH	: glutathion réduit
GSSG	: glutathion oxydé
GTP	: guanosine triphosphate
HLA	: hydrolysat delactalbumine
HRP	: peroxydase de raifort
HSP27	: heat-shock protein 27 kDa
ICE	: IL-1 β converting enzyme
IFN- β	: interféron β
I κ -B	: sous-unité inhibitrice κ B
IL-1	: interleukine 1
IL-1 α	: interleukine 1 α
IL-1 β	: interleukine 1 β
IL-1RTI	: récepteur à l'interleukine 1 de type I

Modulation de l'activation du facteur de transcription NF- κ B par le potentiel antioxydant des cellules.

BOUGELET Catherine

Résumé

Les dérivés actifs de l'oxygène (ROI) sont considérés actuellement comme des seconds messagers pouvant médier les effets de différents agents dont les cytokines. Ces ROI seraient impliqués dans l'activation d'au moins un facteur de transcription, appelé NF- κ B, contrôlant un grand nombre de gènes tels que le gène codant pour l'IL-6, mais aussi le récepteur à l'IL-2 et bien d'autres.

Principalement étudié dans les cellules du système immunitaire, nous voulions étudier le mécanisme d'activation du facteur NF- κ B stimulé par l'IL-1 dans les fibroblastes humains transformés. En utilisant la technique de retard sur gel, nous avons d'abord vérifié que le NF- κ B était activé par l'IL-1 dans ces cellules et que cette activation était inhibée en présence d'antioxydants.

Nous nous sommes alors demandé si des modulations des principales enzymes antioxydantes de la cellule affecteraient l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1. Dans la première approche, différents inhibiteurs, spécifiques à chacune des enzymes, furent testés sur l'activation du NF- κ B induit par l'IL-1. Dans la seconde approche, le comportement de ces cellules a été comparé à celui d'un clone de cellules surexprimant le gène de la glutathion peroxydase. Ces cellules s'avèrent moins sensibles à l'IL-1.

Par ces expériences, nous avons ainsi pu montrer qu'une modulation du potentiel antioxydant enzymatique et plus particulièrement celle de l'activité de la glutathion peroxydase, affecte directement et l'activation du facteur NF- κ B et la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-1.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : M. Raes

Co-promoteur : J. Remacle

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Remacle pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Ma profonde reconnaissance s'adresse à Martine pour sa grande compétence et ses conseils judicieux

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Patsy pour m'avoir guidée et aidée tout au long de ce mémoire et en particulier pour le rush final

Je pense aussi à toi, Isa pour tous les bons moments partagés durant ces cinq années en espérant qu'il y en ait beaucoup d'autres.

Merci aussi à Andrée pour m'avoir initiée aux cultures cellulaires, aux photos!...et, pour son bic à quatre couleurs...

Je n'oublierai pas le dévouement de François et d'Edouard ainsi que ses précieux conseils pour les électrophorèses

Merci encore à tous ceux sans qui ce mémoire ne serait pas : Barbara, Mumu, Nathalie, Fred, Marie, Noëlle, Marc, Isabelle, Dédé, Bruno, et tous les autres...

Une pensée toute particulière est dédiée à mes parents, Nathalie, Géraldine, Jessica et bien sûr à Marraine pour m'avoir encouragée tout au long de mes études

Merci à toi Phil car sans toi je n'y serais pas parvenue

Table des matières

I. INTRODUCTION.....	1
1. L'INTERLEUKINE-1.....	1
1.1. LES CYTOKINES.....	1
1.2. L'INTERLEUKINE-1.....	2
1.2.1. EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-1.....	2
1.2.2. STRUCTURE DU GENE ET PROTEINE.....	3
1.2.3. LES RECEPTEURS.....	4
1.2.4. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL.....	5
1.2.4.1. Les messagers secondaires.....	5
A) L'AMPc	5
B) Le calcium et la voie des phosphoinositides....	6
C) Autres médiateurs lipidiques.....	7
D) Dérivés actifs de l'oxygène.....	10
E) Kinases induites par l'IL-1.....	10
2. LES DERIVES ACTIFS DE L'OXYGENE.....	13
2.1. DEFINITION.....	13
2.2. LES DERIVES ACTIFS DE L'OXYGENE.....	13
2.2.1. L'ANION SUPEROXYDE.....	14
2.2.2. LE PEROXYDE D'HYDROGENE.....	14
2.2.3. LE RADICAL HYDROXYLE.....	15
2.3. FORMATION.....	15
2.3.1. LES SOURCES INTRACELLULAIRES.....	15
2.3.1.1. LES REACTIONS ENZYMATIQUES.....	15
2.3.1.2. LES MOLECULES CHIMIQUES.....	16
2.3.1.3. LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE....	16
2.3.1.4. LES PEROXYSOMES.....	16
2.3.1.5. LE CYTOCHROME P450.....	17
2.3.1.6. LES METAUX DE TRANSITION.....	17
2.3.2. LES SOURCES EXTRACELLULAIRES.....	17
2.3.2.1. L'IRRADIATION.....	17
2.3.2.2. LA PHAGOCYTOSE.....	17
2.3. ROLES BIOLOGIQUES DES DERIVES	
OXYGENES.....	18
2.3.1. EFFETS TOXIQUES.....	18
2.3.1.1. DEGATS OXYDATIFS SUR LES ACIDES	
NUCLEIQUES.....	18
2.3.1.2. DEGATS OXYDATIFS SUR LES ACIDES	
AMINES.....	19
2.3.1.3. DÉGATS OXYDATIFS SUR LES	
LIPIDES.....	19
2.3.2. EFFETS NON TOXIQUES.....	20
2.4. LES SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LES	
DERIVES OXYGENES.....	20
2.4.1. LES SYSTEMES DE DEFENSE ENZYMATIQUES...	20

2.4.1.1.	LA SUPEROXYDE DISMUTASE.....	20
2.4.1.2.	LA CATALASE.....	21
2.4.1.3.	LA GLUTATHION PEROXYDASE.....	22
2.4.1.4.	LA GLUTATHION REDUCTASE.....	22
2.4.1.5.	LA GLUCOSE 6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE.....	23
2.4.2.	LES SYSTEMES DE DEFENSE CHIMIQUES.	23
2.4.2.1.	LE GLUTATHION.....	23
2.4.2.2.	LA VITAMINE E.....	24
2.4.2.3.	LA VITAMINE C.....	24
3.	LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF-κB.....	26
3.1.	LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION.....	26
3.2.	LE FACTEUR NF- κ B.....	27
3.2.1.	FAMILLES NF- κ B/rel ET I κ B.....	28
3.2.2.	ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B	29
3.2.2.1.	MECANISMES MOLECULAIRES D'ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B.....	30
A.	In vitro.....	30
B.	In vivo.....	31
B.1.	Implication de la PKC dans l'activation du facteur NF- κ B.....	31
B.2.	Implication des MAP kinases dans l'activation du facteur NF- κ B.....	31
B.3.	Implication des PKA dans l'activation du facteur NF- κ B.....	32
B.4.	Importance de la protéolyse dans l'activation de facteur NF- κ B.....	32
3.2.2.2.	ROI ET ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B	33
A.	Arguments généraux	33
B.	Hypothèse moléculaire.....	34
4.	OBJECTIFS DU MEMOIRE.....	36

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES..... 38

1.	CULTURE CELLULAIRE.....	38
1.1.	CELLULES :.....	38
1.2.	SOLUTIONS :.....	38
1.3.	METHODE :.....	39
1.3.1.	REPIQUAGE :.....	39
1.3.2.	CONGELATION ET DECONGELATION DES CELLULES :.....	40
1.3.2.1.	Congélation :.....	40

2. TESTS DE CYTOTOXICITE.....	41
2.1 MATERIEL :.....	41
2.2 METHODE :.....	42
2.3 RESULTATS :.....	43
3.DOSAGES ENZYMATIQUES.....	44
3.1. DOSAGE DE LA GLUTATHION PEROXIDASE	
(GPx) :.....	44
3.1.1. PRINCIPE :.....	44
3.1.2. REACTIFS :.....	44
3.1.3. MIXTURE :.....	45
3.1.4. METHODE :.....	45
3.2. DOSAGE DE LA CATALASE :.....	46
3.2.1. PRINCIPE :.....	46
3.2.2. REACTIFS :.....	46
3.2.3. MIXTURES :.....	47
3.2.4. METHODE :.....	47
3.3. DOSAGE DE LA GLUTATHION REDUCTASE :.....	48
3.3.1. PRINCIPE :.....	48
3.3.2. REACTIFS :.....	48
3.3.3. MIXTURE : (à 25 °C).....	48
3.3.4. METHODE :.....	49
4. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE 6 (IL-6).....	49
4.1. MATERIEL :.....	49
4.2. METHODE :.....	50
4.2.1. CULTURE DE CELLULES :.....	50
4.2.2. PRINCIPE DU DOSAGE ET METHODE :.....	50
5. EMSA.....	51
5.1.MATERIELS :.....	52
5.1.1.POUR LA STIMULATION DES CELLULES :.....	52
5.1.2.POUR L'EXTRACTION :.....	52
5.1.3.POUR LE MARQUAGE DE LA SONDE :.....	53
5.1.4. POUR LA LIAISON SONDE-PROTEINE :.....	54
5.1.5.POUR L'ELECTROPHORESE :.....	55
5.1.6. POUR LA REVELATION :.....	55
5.2.METHODE:.....	55
5.2.1.CULTURE DE CELLULES :.....	56
5.2.2. EXTRACTION DES PROTEINES :.....	56
5.2.3. MARQUAGE DE LA SONDE :.....	56
5.2.4. LIAISON SONDE-PROTEINES :.....	57
5.2.5. ELECTROPHORESE :.....	58
5.2.6. REVELATION DU FILM :.....	58
5.2.7. QUANTIFICATION :.....	58

III. RÉSULTATS

1. CARACTERISATION DES MODELES CELLULAIRES UTILISES DANS CE TRAVAIL...	61
1.1. ORIGINE DES CELLULES.....	61
1.2. DESCRIPTION DES CELLULES.....	61
1.3. DOSAGE DES ENZYMES ANTIOXYDANTES.....	62
2. EFFET DE LA DIMINUTION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT SUR L'ACTIVATION PAR L'IL-1.....	62
2.1. INHIBITION DES ENZYMES ANTIOXYDANTES..	62
2.1.1. Effet du mercaptosuccinate sur l'activité de la glutathion peroxydase.....	63
2.1.2. Effet de la bischloroéthylnitrosourée sur l'activité de la glutathion réductase.....	63
2.1.3. Effet de l'aminotriazole sur l'activité de la catalase.....	64
2.2. EFFET DES INHIBITEURS D'ENZYMES ANTIOXYDANTES SUR L'ACTIVATION PAR L'IL-1.....	65
2.2.1. Effet des inhibiteurs sur l'activation du facteur NF- κ B induit par l'IL-1.....	65
2.2.1.1. Effet du MS sur l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1.....	66
2.2.1.2. Effet de la BCNU sur l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1.....	66
2.2.1.3. Effets de l'ATA sur l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1.....	67
2.2.2. Effet des inhibiteurs sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.....	67
2.2.2.1. Effet du MS sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.....	68
2.2.2.2. Effet du BCNU sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.....	68
2.2.2.3. Effet de l'ATA sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.....	69
3. EFFET D'UNE AUGMENTATION DU POTENTIEL ANTI-OXYDANT SUR L'ACTIVATION PAR L'IL-1.....	69
3.1. EFFET DU PDTC SUR L'ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B PAR L'IL-1 DANS LES WI-38 VA13 ET LES WI-38 MT08.....	69
3.2. EFFET DU PDTC SUR LA LIBERATION D'IL-6 INDUITE PAR L'IL-1 DANS LES WI-38 VA13 ET LES MT08.....	70

IV. DISCUSSIONS GENERALES ET PERSECTIVES..... 83

V. BIBLIOGRAPHIE 87

I. Introduction

1. L'INTERLEUKINE-1.

1.1. LES CYTOKINES.

Les cytokines regroupent des protéines régulatrices sous des noms aussi variés que lymphokines, monokines, interleukines et interférons.

Ces protéines sont généralement glycosylées et de nature non immunoglobulinique. Leur poids moléculaire est inférieur à 30 kDa. Les cytokines ne sont généralement pas produites de manière constitutive mais sont néosynthétisées suite à un processus d'activation.

Ces médiateurs solubles agissent souvent localement de façon autocrine ou paracrine. Leur action localisée peut s'expliquer entre autres par leur courte demi-vie. Il est à noter que dans certaines conditions pathologiques, des cytokines telles que l'interleukine-1, le tumor necrosis factor- α ou l'interleukine-6 peuvent manifester des effets systémiques les rapprochant des médiateurs endocriniens. (Cavaillon 1992)

Toujours présentes en faible quantité, elles médient leur action en se liant spécifiquement à des récepteurs sur les cellules cibles. Le nombre de récepteurs cytokiniques par cellule est 100 à 1000 fois inférieur à celui des récepteurs hormonaux ; cette densité de récepteurs étant bien évidemment modulable.

L'abondance des effets décrits a longtemps empêché l'établissement d'une classification claire de plusieurs cytokines, et ce pour plusieurs motifs :

- plusieurs activités peuvent être la manifestation d'une seule et même cytokine ; on parle de pléiotropie.
- un même type cellulaire peut synthétiser de nombreuses cytokines différentes.
- il existe un phénomène de redondance : plusieurs cytokines peuvent médier le même type d'effet.
- les cytokines peuvent influencer mutuellement leur production en une véritable cascade cytokinique.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisants et l'approche génétique du gène "knock-out" ont permis de clarifier quelque peu le réseau complexe des cytokines.

Immunologic Properties

- T-cell activation; synergy with IL-6 for IL-2 synthesis
- Increased IL-2R expression
- B-cell activation via induction of IL-6; synergy with IL-4
- Natural killer activity; synergy with IL-2 and IFN
- Lymphokine gene expression

Pro-Inflammatory Properties

- Fever, sleep, anorexia, neuropeptide release
- Gene expression for complement; suppression of P450 synthesis
- Endothelial cell activation
- Neutrophilia
- Increased adhesion molecule expression
- Neutrophil priming, eosinophil degranulation
- Hypotension, myocardial suppression, shock, death
- Neutrophil tissue infiltration (via IL-8)
- Beta islet cell cytotoxicity
- Amino acid turnover; hyperlipidemia
- Cyclooxygenase and lipoxygenase gene expression
- Synthesis of collagenases and collagens; osteoblast activation

Protective Effects

- Malaria
- Bacterial infections
- Lethal radiation
- Early stem cell
- Hyperoxia
- Inflammatory bowel disease
- Histamine release

Table I.1. : Effets biologiques de l'IL-1. (Dinarello, 1991).

HEPATOCYTES--ACUTE PHASE PROTEINS

- ↑ Serum amyloid A and P
- ↑ Complement factor B
- ↑ Haptoglobin
- ↑ Alpha-2 macroglobulin
- ↑ Ceruloplasmin
- ↓ Transferrin
- ↓ Albumin

SYNOVIAL CELLS

- ↑ Collagenase
- ↑ PGE₂
- ↑ Hyaluronate

CHONDROCYTES

- ↑ Proteoglycans
- ↑ PGE₂
- ↑ Collagenase

FIBROBLASTS

- ↑ Proliferation
- ↑ Interleukin 6

ENDOTHELIAL CELLS

- ↑ Proliferation
- ↓ Procoagulant activity
- ↓ Plasminogen activator
- ↑ PAF, PGE₂, PGI₂
- ↓ Protein C
- ↑ IL-1, GM-CSF
- ↑ MHC antigens
- ↑ Adhesiveness

INFLAMMATORY: e.g. LPS, Immune complexes STIMULI

MONONUCLEAR PHAGOCYTES

TNF = IL-1

BRAIN

- Fever
- Neuroendocrine hormones

T LYMPHOCYTES

- Chemotaxis
- Co-mitogenesis

B LYMPHOCYTES

- Chemotaxis
- Co-mitogenesis
- ↑ MHC antigens

GRANULOCYTES

- ↑ Free radicals
- ↑ ADCC
- ↑ Phagocytosis
- ↑ Chemotaxis
- ↑ Degranulation

OSTEOBLASTS

- ↓ Bone synthesis

OSTEOCLASTS

- ↑ Bone resorption

Figure I.1. : Actions pléiotropiques de l'IL-1 et du TNFα . (Larrick, 1988).

1.2. L'INTERLEUKINE-1.

Identifiée depuis longtemps sous le couvert d'activités très diverses, l'IL-1 est actuellement reconnue comme médiateur-clef de toute réponse inflammatoire. Dès 1940, on a mis en évidence que l'injection d'un exsudat inflammatoire aigu à un animal engendrait une forte poussée de fièvre ; cette substance fut nommée "pyrogène endogène". Par la suite, celle-ci s'est vue attribuer d'autres activités : "médiateur endogène leucocytaire", induisant une augmentation de la synthèse protéique hépatique, ou encore "leucocyte activating factor" intervenant comme co-activateur des lymphocytes T activés. Ces multiples noms attribués à l'IL-1 reflètent sa pléiotropie (Kelso 1989).

C'est après un aperçu général des effets de l'IL-1 que nous entamerons ses caractéristiques structurales ainsi que celles du récepteur. Nous en viendrons alors aux voies d'activation cellulaire où plusieurs mécanismes interviennent.

1.2.1. EFFETS BIOLOGIQUES DE L'IL-1.

Avant de passer en revue les manifestations biologiques de l'IL-1, il est important de souligner sa capacité à induire sa propre production et celle d'autres cytokines ainsi que des médiateurs non-immuns (telles que les prostaglandines, le platelet activating factor (PAF),...) qui pourraient médier indirectement une partie des actions attribuées à l'IL-1.

La table I.1. reprend les différents effets biologiques de l'IL-1 (Dinarello 1991). On peut distinguer parmi les manifestations de l'IL-1 des effets locaux prédominants dans le cas d'infections localisées et des effets systémiques perceptibles lors d'infections aiguës.

Les manifestations locales sont de nature autocrine ou paracrine et les cellules impliquées ici sont de natures très diverses comme le montre la figure I.1. Les cellules du type monocyte/macrophage activé sont la principale source d'IL-1 mais il s'avère que de nombreux autres types cellulaires sont capables de la synthétiser (telles que les lymphocytes B, les fibroblastes,...).

L'IL-1 agit à tous les stades de la réponse inflammatoire. Elle intervient par exemple dans la cascade de l'acide arachidonique en la stimulant, entraînant la production de prostaglandines et de leucotriènes ainsi que de PAF. Ces métabolites jouent des rôles clés dans la réponse inflammatoire. L'équipe de Lin (Lin, Lin et al. 1992) en stimulant des fibroblastes WI-38 avec de l'IL-1 α a montré que l'expression de la cPLA₂ (PLA₂ cytoplasmique de 85 kDa) augmentait ainsi que son degré de phosphorylation. La production de prostaglandine E₂ (PGE₂) augmente en conséquence. Ces modifications du métabolisme

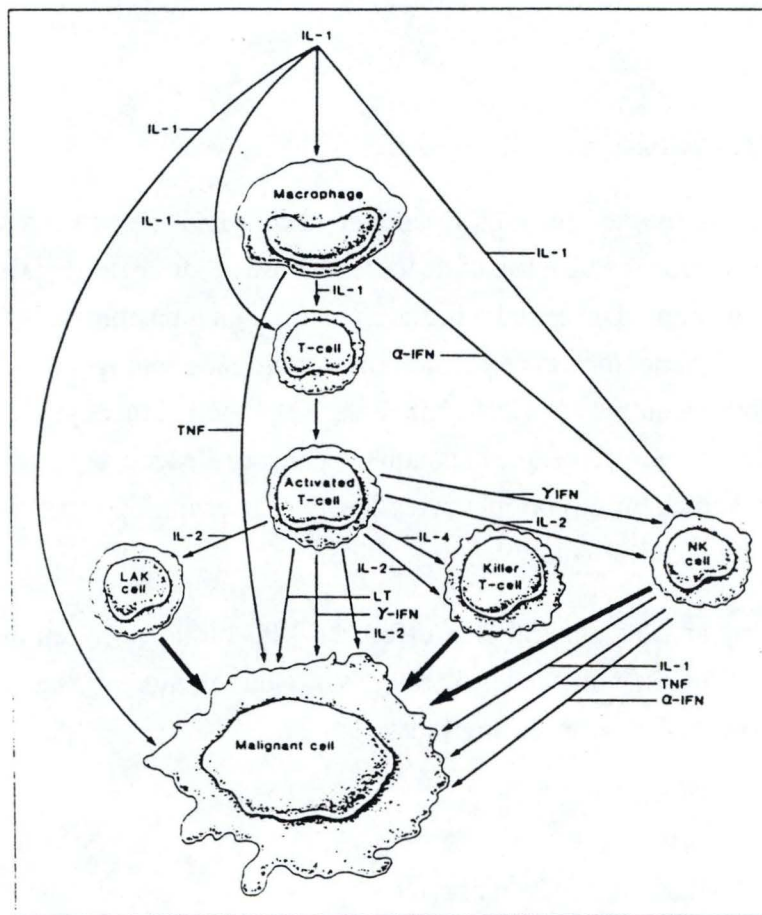


Figure I.2. : Propriétés antitumorales de l'IL-1. (Platanias et Vogelzang, 1990).

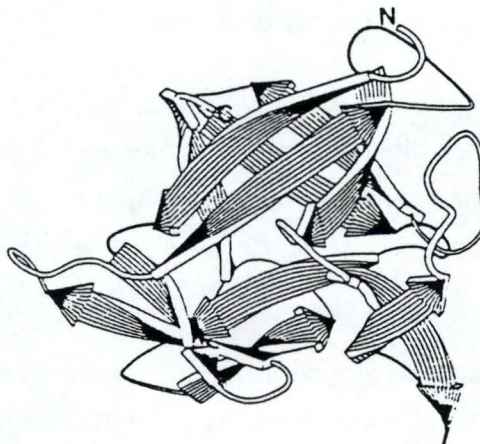


Figure I.3. : Représentation schématique de l'IL-1 β . Les flèches représentent les liens β . Le N et le C indiquent respectivement les extrémités carboxy- et amino-terminales. (Priestle *et al.*, 1990).

des prostaglandine se déroule sans qu'il y ait neosynthèse apparente de cyclooxygénase, l'enzyme principalement impliquée en amont dans la synthèse des prostaglandines ni de sPLA₂, (phospholipase A₂ sécrétée de 14 kDa).

D'autre part, l'IL-1 agit comme co-facteur dans la synthèse d'interleukine-2 (IL-2) par les lymphocytes T et participe aussi aux mécanismes d'activation des cellules immunocompétentes. Finalement, l'IL-1 participe également à l'étape de cicatrisation, stimulant la prolifération des fibroblastes ainsi que la synthèse des collagènes interstitiels. En plus de toutes ces contributions apportées lors de l'inflammation, l'IL-1 possède aussi des propriétés anti-tumorales (figure I.2.) tout comme le "tumor necrosis factor- α " (TNF α) qui partage la plupart des effets non immunologiques de l'IL-1 (Dinarello 1988).

L'IL-1 présente également des manifestations systémiques s'exprimant par de la fièvre, des modifications comportementales et hématologiques caractéristiques de la réponse de phase aiguë (Larrick and Kunkel 1988).

1.2.2. STRUCTURE DU GENE ET PROTEINE.

Il existe deux types d'IL-1 codées chacune par un gène différent du chromosome 2 : l'IL-1 α et l'IL-1 β . Ces deux molécules diffèrent par leur structure primaire et par leur point isoélectrique : 7,2 pour l'IL-1 β et 5,3 pour l'IL-1 α . Malgré cela, elles ont la même activité biologique et se fixent sur le même récepteur (O'Neill 1992).

Les deux formes d'IL-1 sont d'abord synthétisées sous forme d'un précurseur inactif de 31 kDa (pro-IL-1) qui présente la particularité d'être dépourvu de séquence signal, ce qui, pour une molécule devant être sécrétée, est exceptionnel. Ce précurseur subit ensuite un processus de maturation par des protéases en une molécule active de 22 kDa ou de 17 kDa (Fenton 1992). La forme de 22 kDa serait associée à la membrane et principalement composée de l'IL-1 α , tandis que le peptide de 17 kDa est sécrété dans le milieu cellulaire. L'IL-1 β a été cristallisée et sa structure tertiaire représente un tétraèdre avec 12 brins β maintenus par des ponts hydrogènes (figure I.3.). Les acides aminés exposés à la surface de la molécule et les chaînes latérales hydrophobes en composant l'intérieur sont particulièrement bien conservés.

Signalons également que l'enzyme responsable du clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β mature active, l'ICE (pour "IL-1 β converting enzyme") a été clonée pour l'espèce humaine et sa structure cristalline déterminée (Walker, Talanian et al. 1994). Il s'agit d'une cystéine protéase cytoplasmique isolée en premier lieu à partir de cellules monocytaires. Elle clive le précurseur au niveau du lien peptidique Asp116-Ala117. Cette enzyme ne semble pas

INTERLEUKIN-1 AND INTERLEUKIN-1 ANTAGONISM

Schematic representation of the two IL-1 receptors. The numbers in and above the bars represent the number of amino acids in each portion of the molecules. The areas marked extracellular, transmembrane, and cytosolic are approximations.^{132,147}

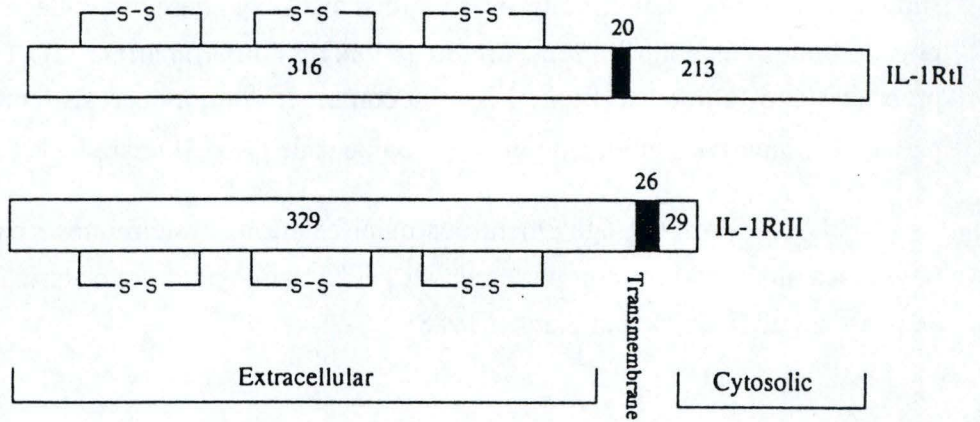


Figure I.4. : Représentation schématique des deux récepteurs à l'IL-1. (Dinarello, 1991).

présenter de relation avec les protéases déjà caractérisées.

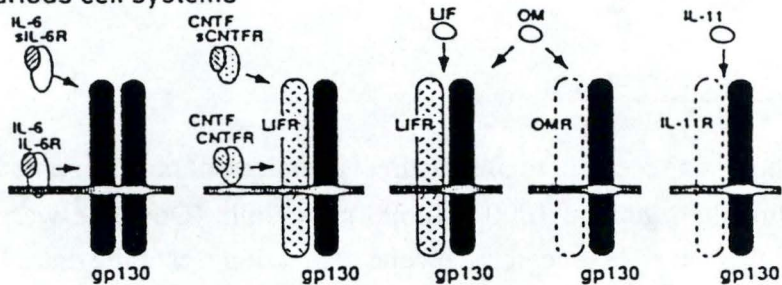
1.2.3. LES RECEPTEURS.

L'IL-1 se lie à son récepteur membranaire, généralement présent en nombre réduit à la surface des cellules (en général 1000 à 10000 par cellule (Dower, Qwarnstorm et al. 1990). Lors de la liaison avec le récepteur, aucune distinction n'est faite entre l'IL-1 α ou β . Il y aurait deux récepteurs à l'IL-1 codés par des gènes distincts : un de 80 kDa présent sur les lymphocytes T et les cellules cibles non-immunitaires de l'IL-1, et un autre de 68 kDa exprimé de manière prédominante sur les lymphocytes B, les monocytes et les polymorphonucléaires (PMN).

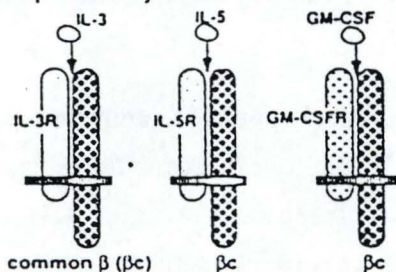
Le récepteur de 80 kDa est appelé l'IL-1 Rt I (pour récepteur de type I) et celui de 68 kDa, l'IL-1 Rt II. Les récepteurs de type I et II sont tous deux membres de la superfamille des immunoglobulines. Ces deux récepteurs représentés à la figure I.4. sont tous deux divisés en trois segments dont les plus homologues sont les segments transmembranaires et les plus différents sont les segments cytoplasmiques. Dans le cas de l'IL-1 Rt II, la portion cytoplasmique est tronquée par rapport à l'IL-1 Rt I, ce qui explique son poids moléculaire plus faible. Toutefois, seul le récepteur de type I semble impliqué dans la transduction du signal. La fonction biologique du récepteur de type II reste inconnue. Colotta et al. (1993) ont suggéré que le récepteur de type II pourrait jouer le rôle de "piège moléculaire" pour l'IL-1, sur des cellules myélomonocytaires telles que les PMN (Colotta, Re et al. 1993). En effet, ces cellules expriment de manière prédominante le récepteur de type II, mais répondent à l'IL-1 via le récepteur de type I. L'IL-1 prolonge la survie des PMN *in vitro*, en inhibant l'apoptose. En présence d'IL-4 ou de dexaméthasone, l'expression des récepteurs de type II augmente et l'IL-4 abolit quasi complètement la survie prolongée induite par l'IL-1. Selon, ces auteurs, le récepteur de type II serait donc un "decay receptor" ou récepteur-leurre, au dépend du récepteur de type I, actif quant à la transduction du signal.

Enfin, la plupart des récepteurs des cytokines et "CSF" (colony stimulating factor) font partie d'une famille de récepteurs appelées, récepteurs de cytokines hématopoïétiques : elle comprend les récepteurs IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, le récepteur à l'érythropoïétine (EPDR), G-CSFR, GM-CSF-R et LIFR (leukemia inhibitory factor receptor) (pour une revue voir (Kishimoto, Taga et al. 1994)). Par contre, les récepteurs à l'IL-1 et à l'IL-8, bien qu'identifiés moléculairement n'appartiennent pas à cette famille et restent mal compris au niveau des premières étapes de transduction du signal (figure I.5.).

Various cell systems



Hemopoietic system



Lymphoid system

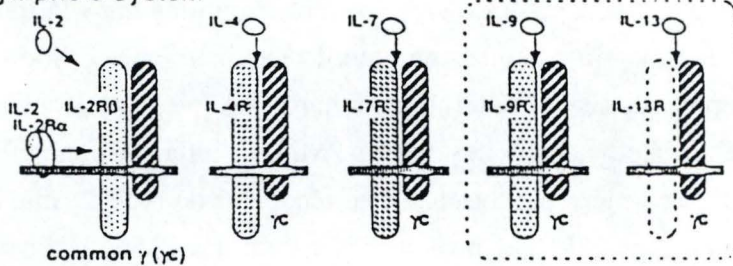


Figure I.5. : Récepteurs des cytokines hématopoïétiques. (Kishimoto *et al.*, 1994).

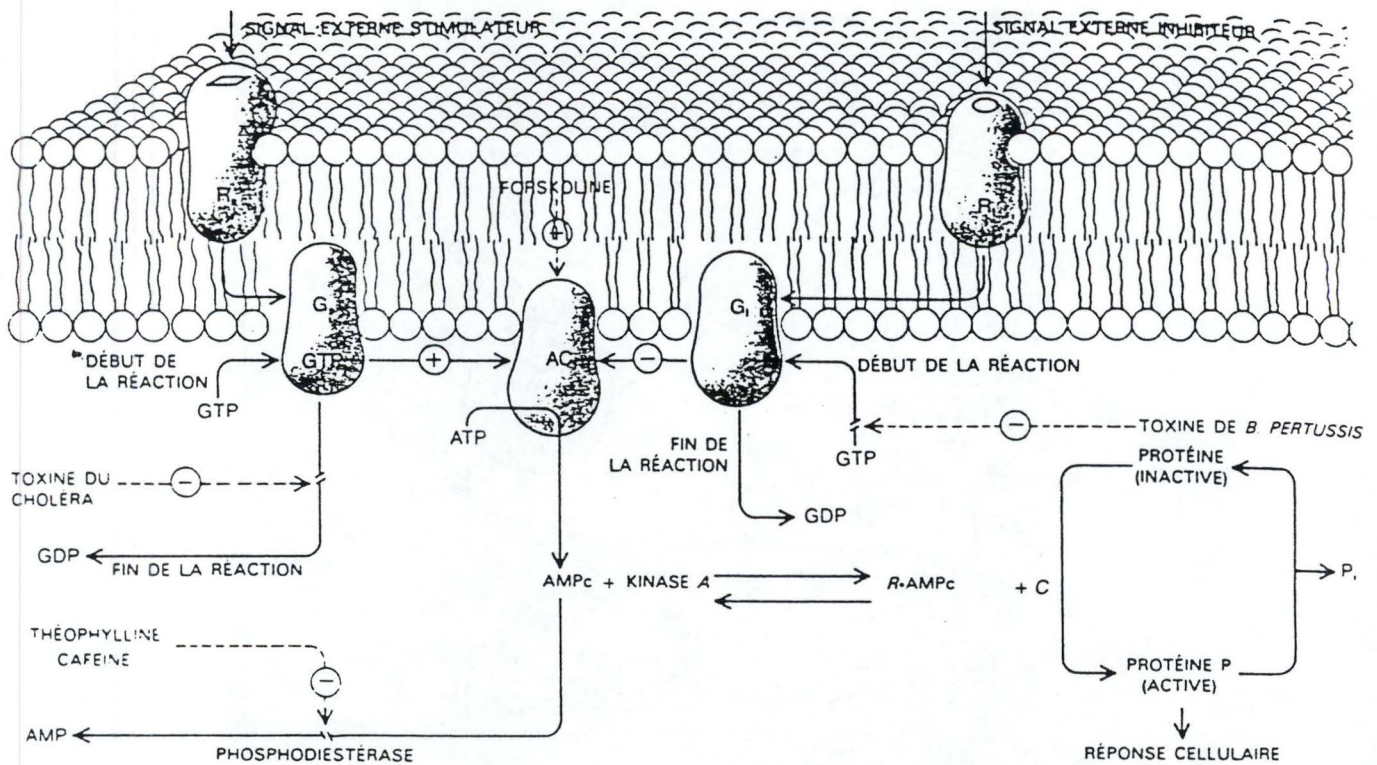


Figure I.6. : Transmission du signal externe par voie de l'AMPC. Les signaux provenant des récepteurs stimulateurs (Rs) ou inhibiteurs (Ri) convergent vers l'adénylate cyclase qui transforme l'ATP en AMPc. Les protéines G, qui assurent ce couplage, sont activées par le GTP (début de la réaction) et inactivées lorsque le GTP est hydrolysé en GDP (fin de la réaction). Quant à l'AMPc, il se lie à la sous-unité de régulation (Rs) de sa protéine kinase dont il libère la sous-unité catalytique (c), qui peut alors phosphoryler des protéines responsables d'une réponse cellulaire donnée. (Berridge, 1985).

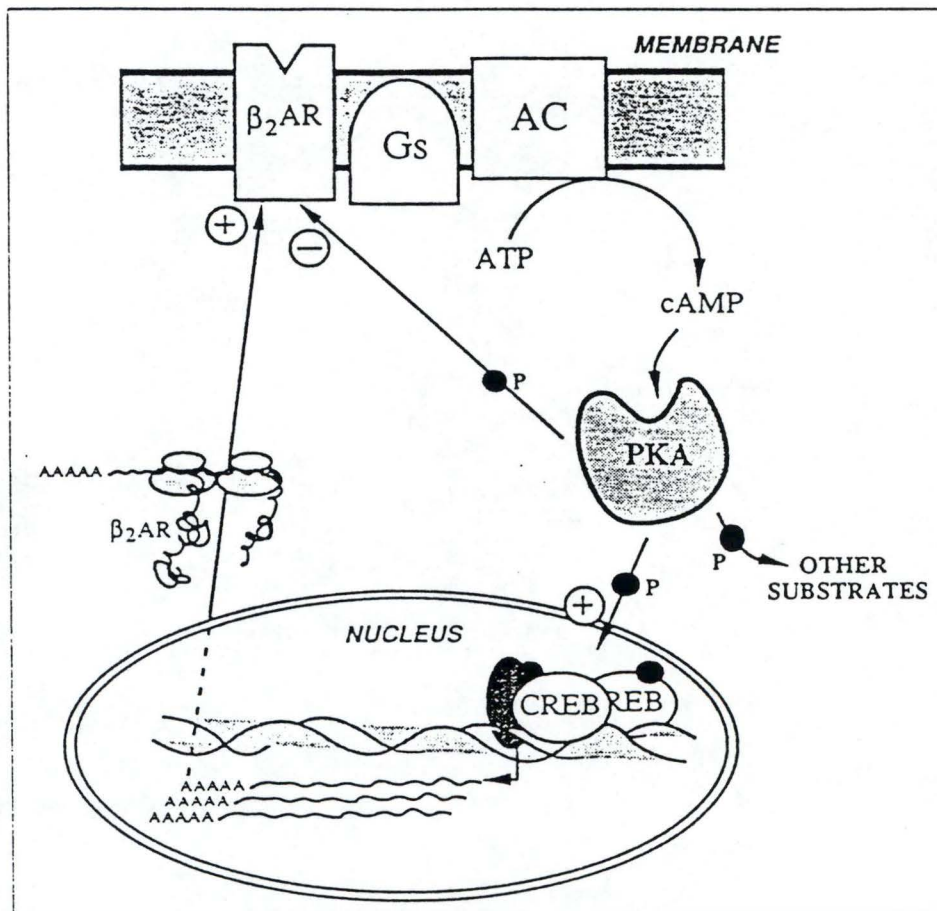


Figure I.7. : Transduction du signal après fixation du ligand sur le récepteur β_2 -adrénergique. L'activation de la protéine kinase A (PKA) active le facteur transcriptionnel CREB qui déclenche la transcription d'un certain nombre de gènes (dont le gène codant pour le récepteur β_2 -adrénergique). En même temps, la PKA inactive le récepteur (Collins *et al.*, 1992).

1.2.4. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL.

Les mécanismes moléculaires de la transduction du signal de l'IL-1 restent très controversés et la plupart des mécanismes de transduction classiquement décrits ont été proposés. Nous allons mentionner ici quelques types de messagers secondaires qui semblent impliqués dans la transduction du signal par l'IL-1, bien qu'il puisse y avoir des différences selon le type de cellule envisagé.

1.2.4.1. Les messagers secondaires.

A) L'AMPc

Rappelons d'abord la voie de l'AMPc en tant que messager secondaire. Ordinairement, le récepteur activé par exemple par le récepteur β_2 adrénergique subit un changement de conformation et capte une protéine Gs (GTP binding regulatory protein) qui, une fois liée au récepteur, libère une molécule de GDP pour en lier une de GTP. La protéine Gs formée de trois sous-unités (α , β et γ), libère la sous-unité α , laissant le complexe $\beta\gamma$. Cette sous-unité $Gs\alpha$ va se lier à l'adénylate cyclase et provoquer son activation (figure I.6.) (Berridge 1985). L'AMPc sera alors produit en grande quantité à partir de l'ATP. On distingue deux sortes de protéines G : les protéines stimulatrices Gs et les protéines inhibitrices Gi. Toutes deux ont besoin du GTP pour être actives et la sous-unité $Gi\alpha$ une fois détachée va inhiber l'adénylate cyclase. Le complexe $Gi\beta\gamma$ peut aussi participer à l'inactivation en bloquant les sous-unités α stimulatrices. Les protéines G sont donc capables de stimuler ou d'inhiber l'enzyme qui produit le messager secondaire, et ce suivant que le récepteur soit inhibiteur ou activateur.

La fonction primordiale de l'AMPc est d'activer une protéine kinase dépendante de l'AMPc, la protéine kinase A (PKA). La PKA est formée de quatre sous-unités : deux régulatrices et deux catalytiques. L'AMPc en se liant aux deux sous-unités régulatrices libère les sous-unités catalytiques qui vont alors phosphoryler d'autres protéines au niveau des sérines et des thréonines, dont le facteur transcriptionnel CREB (figure I.7.) [Collins, 1992]

L'arrêt de cette cascade se fait de diverses manières :

- Le GTP lié par la sous-unité $G\alpha$ va s'hydrolyser, et se dissocier de l'adénylate cyclase pour reformer un complexe G inactif.
- L'AMPc, lui, va être hydrolysé par la phosphodiesterase en AMP.

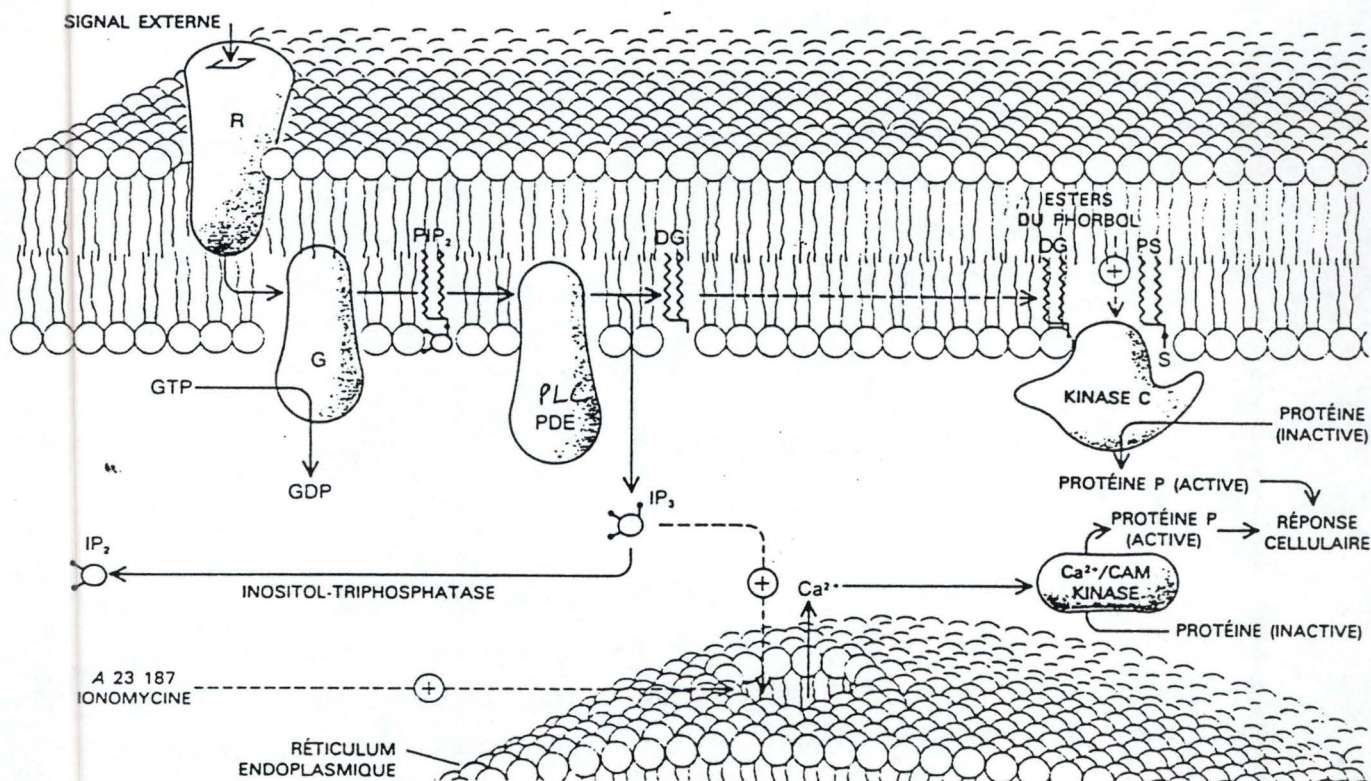


Figure I.8. : Transmission d'un signal externe par l'intermédiaire de la voie des inositols phosphates. Le message externe se lie à des récepteurs (R) qui transmettent l'information par l'intermédiaire d'une protéine G (G) pour activer la phospholipase C ou la phosphodiesterase (PDE). La phospholipase C scinde le PIP₂ en deux messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate ou IP₃. Ce dernier est hydrosoluble et diffuse dans le cytoplasme où il provoque la libération des ions calcium stockés dans le réticulum endoplasmique; les ions calcium libérés stimulent alors une série de réponses cellulaires. De son côté, le DAG reste dans la membrane où il active une protéine kinase C (PKC). Un phospholipide de la membrane, la phosphatidylsérine (PS), est un cofacteur. La PKC phosphoryle alors certaines protéines qui, rendues actives, peuvent initier certaines fonctions cellulaires. (Berridge, 1985).

-Des kinases activées dont la PKA peuvent en retour donc inactiver le récepteur.

Selon certains auteurs, le taux d'AMPc de la cellule augmenterait suite à une stimulation à l'IL-1. Une telle augmentation a déjà été décrite pour plusieurs types cellulaires : thymocytes, lignée lymphocytaire B (70 Z/3), lignée cellulaire YT (NK), fibroblastes 3T3 (Shirakawa, Yamashita et al. 1988) et cellules TH2 (Munoz, Beutner et al. 1990). On a également démontré que l'adénylate cyclase qui est responsable de la synthèse d'AMPc pouvait être activée par l'IL-1 dans des fibroblastes humains (Zhang, Lin et al. 1988). D'autres auteurs, par contre, n'ont détecté aucune variation de la concentration en AMPc avec l'IL-1 dans la lignée lymphocytaire humaine Jurkat (Mary, Aussel et al. 1987) ni dans une lignée de cellules pituitaires murines (Fagarasan, Bishop et al. 1990).

L'augmentation de l'AMPc induit par l'IL-1 semble donc dépendre fortement du type cellulaire étudié.

B) Le calcium et la voie des phosphoinositides.

Les ions calcium sont également reconnus pour jouer un rôle important dans la transduction du signal. Dans les cellules au repos, la concentration en Ca^{++} dans le cytosol est de l'ordre de 50 à 250 nM, selon les cellules. Dans les cellules activées, cette concentration peut monter jusqu'à des valeurs comprises entre 200 nM et 1 mM, soit parce que le récepteur activé est couplé à un canal ionique laissant passer le calcium extracellulaire, soit par libération de calcium intracellulaire principalement stocké au niveau du réticulum endoplasmique. Il semble que la seconde voie soit généralement prédominante.

Lorsque les ligands se lient aux récepteurs, ceux-ci transmettent l'information par l'intermédiaire d'une protéine G pour activer la phospholipase C (PLC) (ou phosphodiesterase (PDE)) qui scinde l'inositol biphosphate (PIP_2) en deux messagers : le DAG et l'inositol triphosphate (IP_3). L' IP_3 est hydrosoluble et diffuse dans le cytoplasme où sa liaison à des récepteurs localisés à la surface du RE provoque la libération de Ca^{++} dans le cytoplasme. (Figure I.8.) (Pour une revue voir Rooney et Thomas [Rooney, 1993 #315]). De son côté, le DAG reste dans la membrane plasmique. Les ions Ca^{++} et le DAG vont activer des protéines kinases C (PKC) en présence de phosphatidyl sérine (PS) qui sert de co-facteur. Les protéines kinases C, appartenant au groupe des ser/thr kinases, ainsi activées, vont phosphoryler d'autres protéines.

De nombreuses équipes ont cherché à savoir si l'IL-1 pourrait induire une augmentation du calcium cytosolique, et si celle-ci était consécutive à une hydrolyse de phosphoinositides membranaires par la phospholipase C.

En parcourant la littérature, on voit que, en général, les cellules répondent à l'IL-1 par une augmentation du calcium cytosolique. Bouchelouche, par exemple a d'ailleurs montré suite à des stimulations avec l'IL-1 α et β recombinantes dans des fibroblastes de peau humains et murins (Bouchelouche, Reimert et al. 1988).

D'autres auteurs, par contr, ne sont pas parvenus à montrer une augmentation de ce calcium cytosolique face à une stimulation à l'IL-1 : Kester a observé une augmentation du taux de DAG sans variation de Ca^{++} (Kester, Simonson et al. 1989).

Welsh observe un relargage d'insuline par les îlots β du pancréas de rat en les stimulant avec de l'IL-1 β et a mis en évidence que le mécanisme impliqué ne dépend pas des changements dans l'activité de la PLC et de la PKC, ni dans la concentration en calcium (Welsh, Nilsson et al. 1989). Signalons également qu'au laboratoire, aucune augmentation du calcium dans les fibroblastes de poumon stimulés à l'IL-1 n'a été observée (Renard 1992).

Wijelath en travaillant sur les macrophages murins stimulés à l'IL-1, observe une augmentation de l'activité de la PLC avec hydrolyse de phosphoinositides (PI) dont l'IP₃ qui a pour principal effet de mobiliser le calcium (Wijelath, Kardasz et al. 1988).

D'autres activations de la PLC sont observées mais cette fois sans hydrolyse de PI : Rosoff, dans la lignée cellulaire humaine Jurkat stimulée à l'IL-1 recombinante purifiée montre une hydrolyse préférentielle de phosphatidylcholine aboutissant à la production de DAG (Rosof, Savage et al. 1988). Un mécanisme similaire a été présenté par Kester dans des cellules mésangiales de rat où, suite à une stimulation à l'IL-1, il observe une hydrolyse préférentielle de phosphatidyléthanolamine (Kester, Simonson et al. 1989).

L'activation cellulaire induite par l'IL-1 peut donc être médiée par différents seconds messagers dont des dérivés de phospholipides. On observe encore une fois pour l'IL-1 une forte variabilité en fonction des modèles cellulaires et des tissus.

C) Autres médiateurs lipidiques.

D'autres types de médiateurs lipidiques tels que les prostaglandines semblent aussi impliqués lors de la stimulation par l'IL-1. En effet, la phospholipase A₂ (PLA₂) responsable de cette production de prostaglandines augmente son activité sous l'action de l'IL-1 (Burch, White et al. 1989). La PLA₂ en clivant les phospholipides membranaires entraîne une libération intracellulaire d'acide arachidonique (AA) qui selon la voie métabolique empruntée engendre des prostaglandines et du thromboxane (voie de la

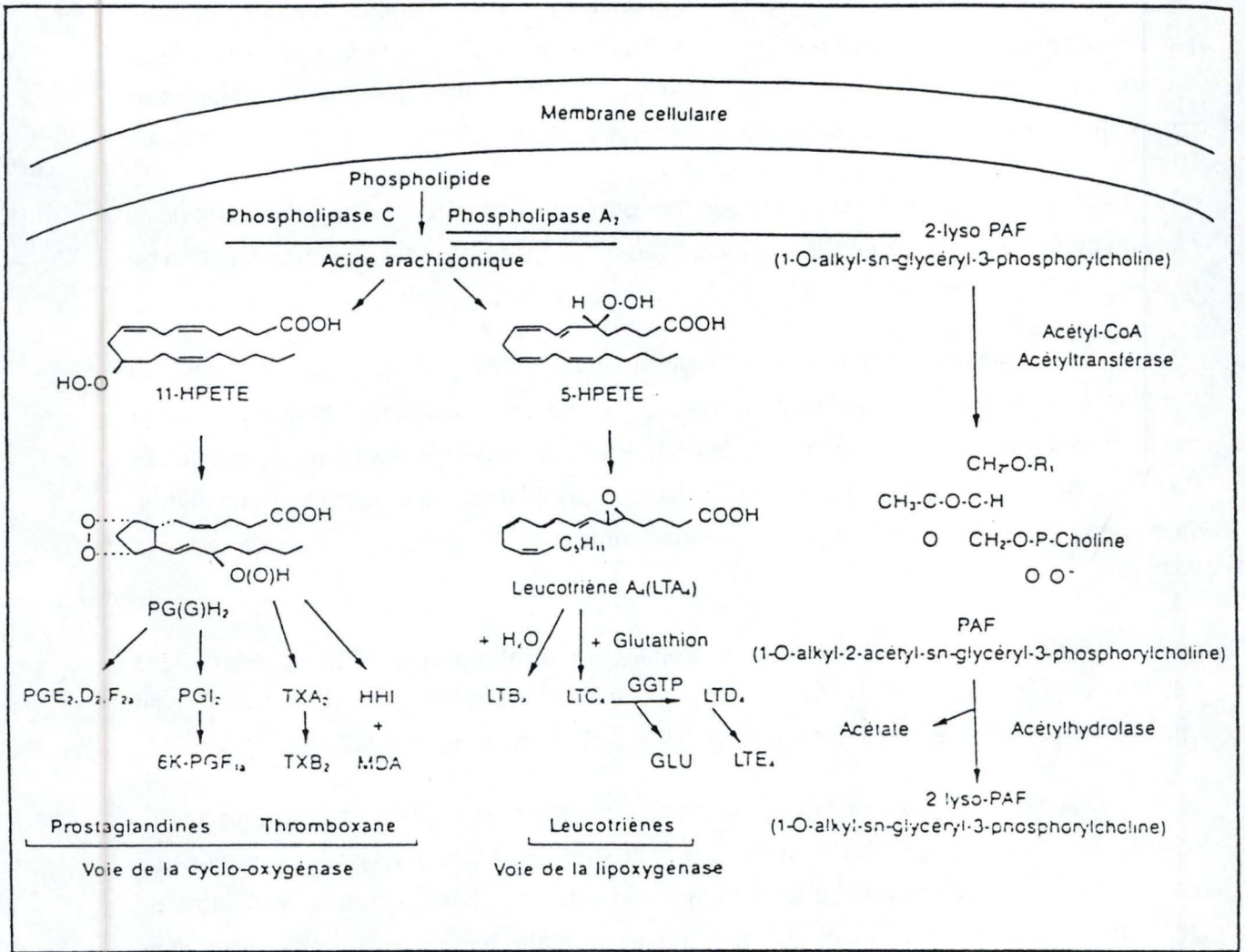


Figure I.9. : Biosynthèse des médiateurs lipidiques de l'inflammation (Dodet, 1989).

cyclooxygénase) ou des leucotriènes (voie de la lipoxygénase). La PLA₂ peut aussi engendrer la libération de PAF et ainsi compléter la libération de médiateurs de l'inflammation (figure I.9.).

De nombreux auteurs ont montré que l'IL-1 induisait un relargage d'acide arachidonique et de prostaglandines, ce qui correspond donc à une activité accrue de PLA₂ et de cyclooxygénase. Plus récemment, il s'est avéré qu'il y avait plusieurs PLA₂ non pancréatiques et plusieurs cyclooxygénases. En effet, on connaît la cPLA₂ (85 kDa) cytosolique, qui, pour être active, doit être phosphorylée et transloquée - entre autre grâce au calcium - jusqu'à la membrane plasmique. La sPLA₂ (14 kDa), ou PLA₂ sécrétée se trouve dans les fluides biologiques tels que le liquide synovial. Une portion non négligeable de sPLA₂ reste cependant associée aux cellules, et en particulier dans les plaquettes où elle est caractérisée depuis longtemps (pour une revue, voir (Mayer and Marshall 1993; Piomelli 1993; Hulkower, Wertheimer et al. 1994). Quant à la cyclooxygénase, elle existe sous deux formes codées par deux gènes différents, COX-1 et COX-2. La plupart des travaux suggèrent que la COX-1 est constitutive, tandis que la COX-2 est inductible, entre autres par l'IL-1 (pour une revue voir Piomelli (Piomelli 1993). Les effets de l'IL-1 sur ces diverses formes de PLA₂ et de cyclooxygénase, ne sont pas toujours clairement établis et pourraient varier selon les modèles cellulaires. Par exemple, Lin et al (Lin, Lin et al. 1992) constatent que lorsqu'ils stimulent des fibroblastes WI-38 humains avec de l'IL-1, il y a expression accrue de la cPLA₂, mais pas d'effet ni sur les cyclooxygénases ni sur la sPLA₂. D'après ces auteurs, l'expression et l'activité augmentées de la cPLA₂ explique à la fois la production accrue d'acide arachidonique et de prostaglandines par ces cellules. D'autres auteurs ont également constaté que l'IL-1 augmentait l'expression et l'activité de la sPLA₂, en particulier dans les cellules articulaires (Gilman, Chang et al. 1988; Kerr, Stevens et al. 1989).

Encore une fois, il semble donc que les effets de l'IL-1 sur la cascade arachidonique soient très tributaires du modèle cellulaire utilisé.

Des céramides provenant de l'hydrolyse de la sphingomyéline ont aussi été proposés comme messagers des signaux TNF α et IL-1 β (Dbaiho, Obeid et al. 1993; Rossi 1993).

La sphingomyéline (SM) est habituellement considérée comme une molécule structurelle présente en majorité dans le feuillet externe de la membrane plasmique des cellules de mammifères. Elle est représentée à la figure I.10. On sait depuis peu que sa voie de dégradation et de resynthèse joue un rôle dans la transduction du signal du TNF α . Le DAG stimule sa dégradation en céramide qui est lui même un précurseur de sphingosine, une base sphingoïde (figure I.11.) Ces bases sphingoïdes se sont avérées capable d'inhiber la PKC. Le DAG pourrait donc dans un premier temps stimuler la PKC et dans un second

Sphingomyéline

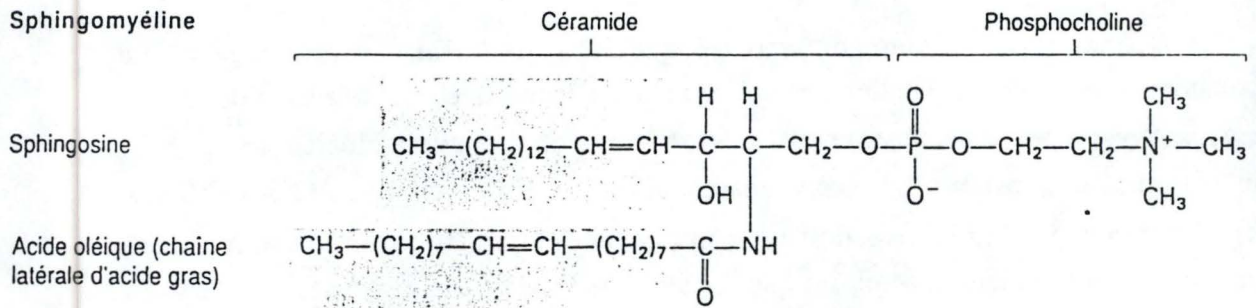
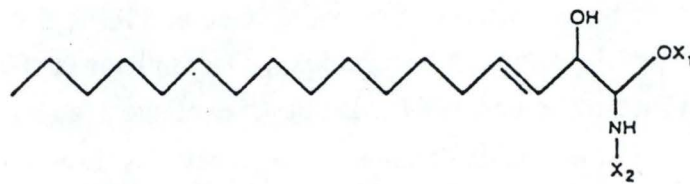


Figure I.10. : Structure typique d'une sphingomyéline (Darnell *et al.*, 1993).



	X_1	X_2
Sphingosine	H	H
Ceramide	H	-COR
Ceramide 1-phosphate	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{POH} \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	-COR
Sphingomyelin	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	-COR

Figure I.11. : Structure des sphingolipides. "-COR" représente une longue chaîne d'acides gras saturés ou monoinsaturés (C16-24). (Kolesnick, 1992).

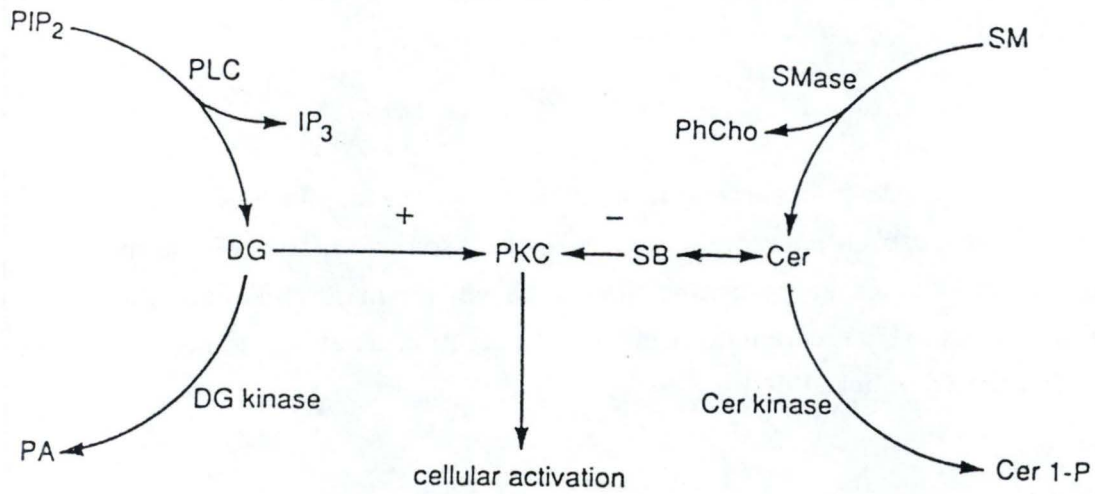


Figure I.12. : Analogies entre la voie des phosphoinositols et de la sphingomyéline. Le phosphoinositol 4,5-biphosphate et la sphingomyéline sont tous deux clivés respectivement par la phospholipase C et la sphingomyélinase. Les produits sont le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP₃) pour l'inositol biphosphate (PIP₂) et le céramide et la phosphocholine pour la sphingomyéline. Le DAG et le céramide agissent tous deux (de manière directe ou indirecte) sur la PKC. Ils peuvent être phosphorylés respectivement en acide phosphatidique (PA) et en céramide 1-phosphate Cer 1-P). (Kolesnick, 1992).

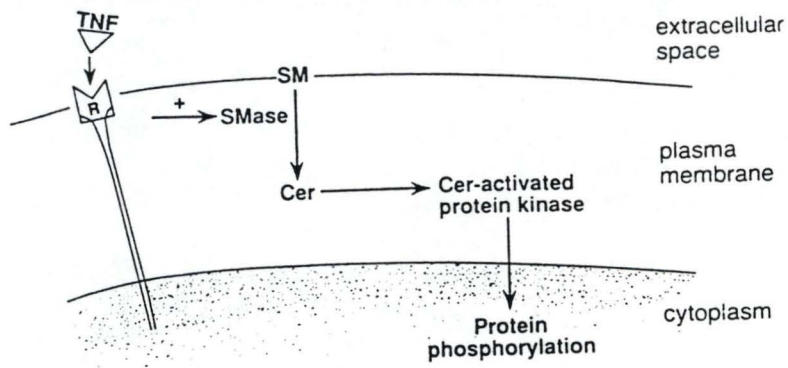


Figure I.13. : Voie de transduction de la sphingomyéline médie le signal du TNF (mécanisme proposé) L'interaction du TNF avec son récepteur (R) active une sphingomyélinase dans la membrane plasmique ce qui mène à l'hydrolyse de la sphingomyéline (SM) en céramide (Cer) et à l'activation de la Ceramide Activated Protein Kinase (Kolesnick, 1992).

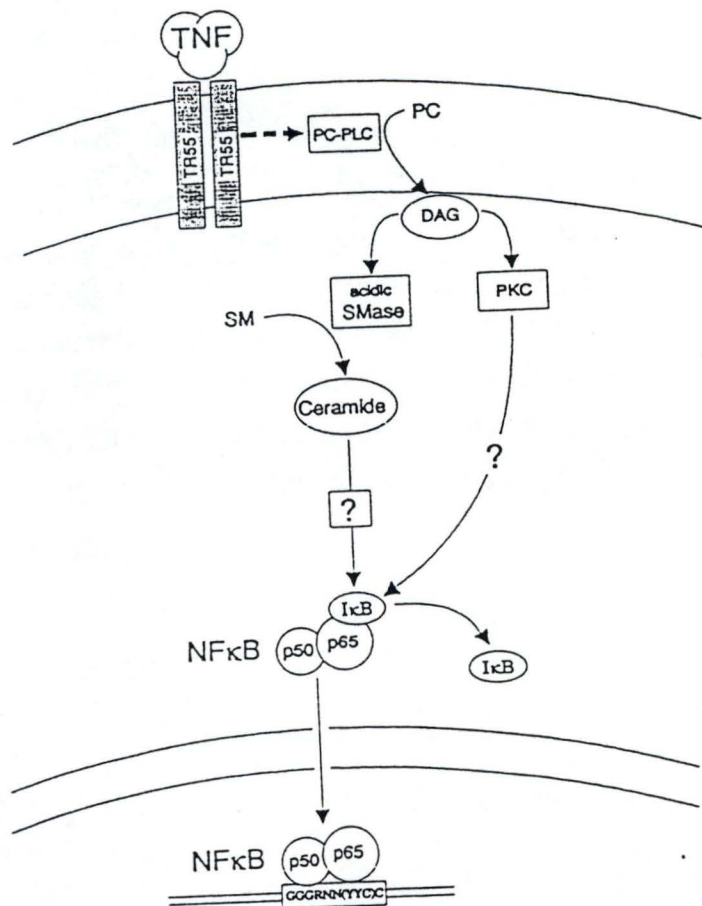


Figure I.14. : Proposition d'une voie d'activation du facteur NF-κB par le TNF. Le TNF active la phospholipase C (PKC). Le DAG produit par cette phospholipase, activerait deux enzymes : la phospholipase C (PKC) et la sphingomyélinase acide. Cette dernière hydrolyserait la sphingomyéline produisant le céramide. La PKC et le céramide interviendraient dans l'activation du facteur par des voies encore inconnues. (Schütze *et al.*, 1992).

temps, l'inactiver par un mécanisme impliquant les sphingolipides. Pour ce faire, le DAG activerait une sphingomyélinase du feuillet externe de la membrane plasmique.

La voie de la sphingomyéline a quelques similarités avec celle des phosphoinositides (figure I.12.)

- Le céramide et le DAG ont des structures similaires (ils servent tous deux de substrat à la DAG kinase de bactérie)

- Les formes phosphorylées de celles-ci (respectivement le céramide 1-phosphate et l'acide phosphatidique) sont aussi structurellement semblables.

- L'enzyme qui initie la voie de la SM ressemble à la PLC qui initie la voie des PI.

Tout ceci en fait un messager idéal.

Les céramides n'activent pas la PKC mais la sphingosine induit cependant la phosphorylation sur une thréonine 669 du récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) dans les cellules humaines A431 d'un cancer de la peau. Cette activité kinase apparait exclusivement liée à la membrane. L'acide palmitique (l'acide gras prédominant du céramide naturel) n'active pas de kinase, ce serait donc le squelette sphingosine du céramide qui jouerait ce rôle. Cette protéine kinase ferait partie de la famille sérine/thréonine kinases mais serait toutefois différente des autres Ser/Thr kinases majeures (PKA, PKC, Ca⁺⁺Calmoduline-dépendante protéine kinase,...) de part la séquence du substrat X-Ser/Thr-Pro-X qu'elle phosphoryle.

Le TNF α génère la formation de céramide dans les monocytes HL-60 par activation de la sphingomyélinase (figure I.13.) et augmente de cette façon l'activité de la protéine kinase (qui est activée par le céramide)(Kolesnick 1992). D'autres auteurs ont montré qu'une Ser/Thr phosphatase était également activée par le céramide (Doborowsky and Hannun 1992). Cette coordination dans l'activation de kinases et phosphatases par le céramide pourrait permettre une régulation précise du signal.

D'après la littérature, il semble que les céramides participeraient aussi à l'activation du facteur NF- κ B par le TNF α dans les cellules Jurkat (figure I.14.) (Schütze, Potthof et al. 1992) ; (Rivas, Golde et al. 1994), dans les cellules HL-60 (Human Leukemia) (Yhang,1993), dans les monocytes (Yanaga and Watson 1994). Notons cependant que Betts n'observe pas d'augmentation du taux de céramide dans ces mêmes monocytes (Betts, Agranoff et al. 1994).

Les céramides constituent donc un nouveau type de médiateurs lipidiques.

D) Dérivés actifs de l'oxygène.

Récemment l'hypothèse que la transduction du signal lié à l'IL-1 et au TNF α pourrait impliquer, des dérivés actifs de l'oxygène a été proposée. Ces ROI pourraient fonctionner comme messagers secondaires, au même titre que l'AMPc, ou les phosphatidyl inositol (Schreck, Rieber et al. 1991).

Des cytokines comme le TNF α et l'IL-1 sont effectivement capables d'induire une production de dérivés actifs de l'oxygène. Ceux-ci pourraient activer le facteur de transcription NF- κ B connu pour contrôler la transcription de cytokines (telles que l'IL-6 et l'IL-2) et nombreux autres gènes [Zhang, 1990]

Nous verrons en détail au point 3.2 que ce facteur de transcription est composé d'homodimères ou d'hétérodimères liés à une sous-unité inhibitrice I κ -B. Celle-ci doit se dissocier du complexe pour le rendre actif et libre de migrer dans le noyau afin de déclencher la transcription de différents gènes. Bien qu'il y ait de fortes chances pour que les esters de phorbol (PMA) active le NF- κ B via la PKC, l'IL-1 pourrait employer d'autres kinases induites, par exemple, par les radicaux libres bien que ces kinases restent à l'heure actuelle non identifiées. (Heffetz and Zick 1989). De nombreux arguments existent en faveur de l'hypothèse des dérivés actifs de l'O₂. Ils seront d'ailleurs détaillés au point 3.2.2. Signalons dès à présent que des molécules antioxydantes bloquent l'activation du facteur de transcription induite par l'IL-1 ou le TNF. A l'opposé les inhibiteurs de PKC inhibent une activation du facteur de transcription induite par la PMA, mais pas par l'IL-1 (Stylianou, L.A. et al. 1992).

E) Kinases induites par l'IL-1.

Lorsque l'on analyse des fibroblastes humains en culture par la technique des gels d'électrophorèse à deux dimensions, les cellules ayant été préalablement incubées en présence de [³²P] orthophosphate, puis stimulées avec de l'IL-1, on peut faire les observations suivantes (Guy, Chua et al. 1991) :

- On observe plus ou moins 450 spots marqués au ³²P.
- Une cinquantaine de spots voient leur degré de phosphorylation doublé par rapport au niveau basal typique des cellules non stimulées.
- Deux spots voient leur degré de phosphorylation augmenté de cinq et douze fois respectivement : il s'agit de protéines appartenant au complexe HSP 27.
- Des observations très similaires peuvent être faites dans les cellules stimulées au

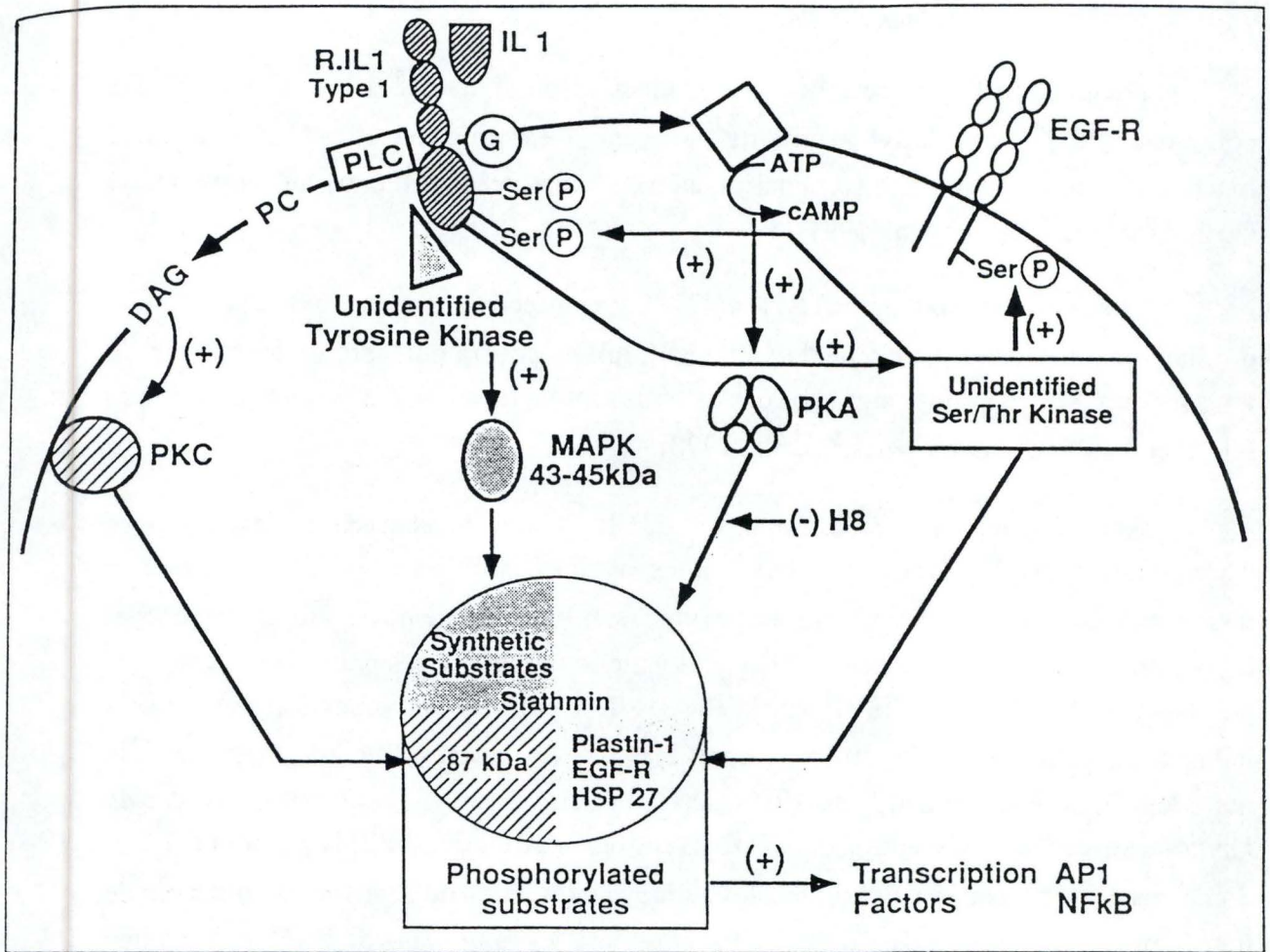


Figure I.15. : Différentes voies de kinases impliquées dans la transduction du signal de l'IL-1. (Rossi, 1993).

TNF α .

Lorsque ces auteurs essaient de préciser la nature des amino-acides phosphorylés, ils constatent une phosphorylation non négligeable sur les résidus tyrosine, ce qui suggère également l'activation de tyrosines kinases. Quatre des phosphoprotéines phosphorylées en tyrosine présentent un poids moléculaire de 42 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire des MAP Kinases p42^{MAPK}. L'IL-1 induit effectivement une augmentation de l'activité MAP Kinase (figure I.15.).

Lorsqu'on essaie d'identifier d'autres phosphoprotéines induites par l'IL-1, on constate qu'elles sont de natures diverses : protéines associées au cytosquelette, récepteurs membranaires, substrats cytoplasmiques (pour une revue, voir (Rossi 1993).

Quant aux kinases impliquées, leur nature reste relativement controversée. On a d'abord pensé aux PKA et PKC, toutes deux Ser/Thr kinases, mais si leur activité semble parfois augmenter dans les cellules stimulées à l'IL-1, il ne semble pas qu'elles jouent un rôle primordial dans la transduction du signal de l'IL-1 (Guy, Chua et al. 1991; Rossi 1993) (fig. I.15.).

Saklatvala et son équipe (Freshney, Rawlinson et al. 1994) ont identifié une cascade de kinases dans une lignée de cellules humaines KB (carcinome de l'épiderme oral) stimulée par l'IL-1 et responsable de la phosphorylation de la protéine HSP 27, l'une des protéines dont la phosphorylation induite par l'IL-1 est la plus marquée. Leur cascade se résume comme suit :

- Un activateur en amont (upstream activator) peu abondant, d'une masse moléculaire de 35 kDa, encore non purifié. Il s'agirait d'une Tyr/Thr kinase qui va phosphoryler une HSP 27 kinase kinase.

- La HSP 27 kinase kinase a une masse moléculaire de 40 kDa. Elle est active une fois phosphorylée sur des résidus Thr et Tyr. Elle fonctionne comme Thr/Ser kinase, phosphorylant la HSP 27 kinase.

- La HSP 27 kinase est une sérine kinase de masse moléculaire de 50 kDa, phosphorylant la HSP 27 sur trois résidus sérine.

Ce modèle est représenté à la figure I.16. et présente encore plusieurs inconnues. Il suggère également les connexions qui semblent exister avec une autre cascade de kinases cytoplasmiques, la cascade des MAP kinases. Celle-ci joue un rôle capital dans la réponse mitogénique aux facteurs de croissance tels que le PDGF (platelet derived growth factor) et l'EGF (epidermal growth factor). Elle serait également activée dans les cellules stimulées à

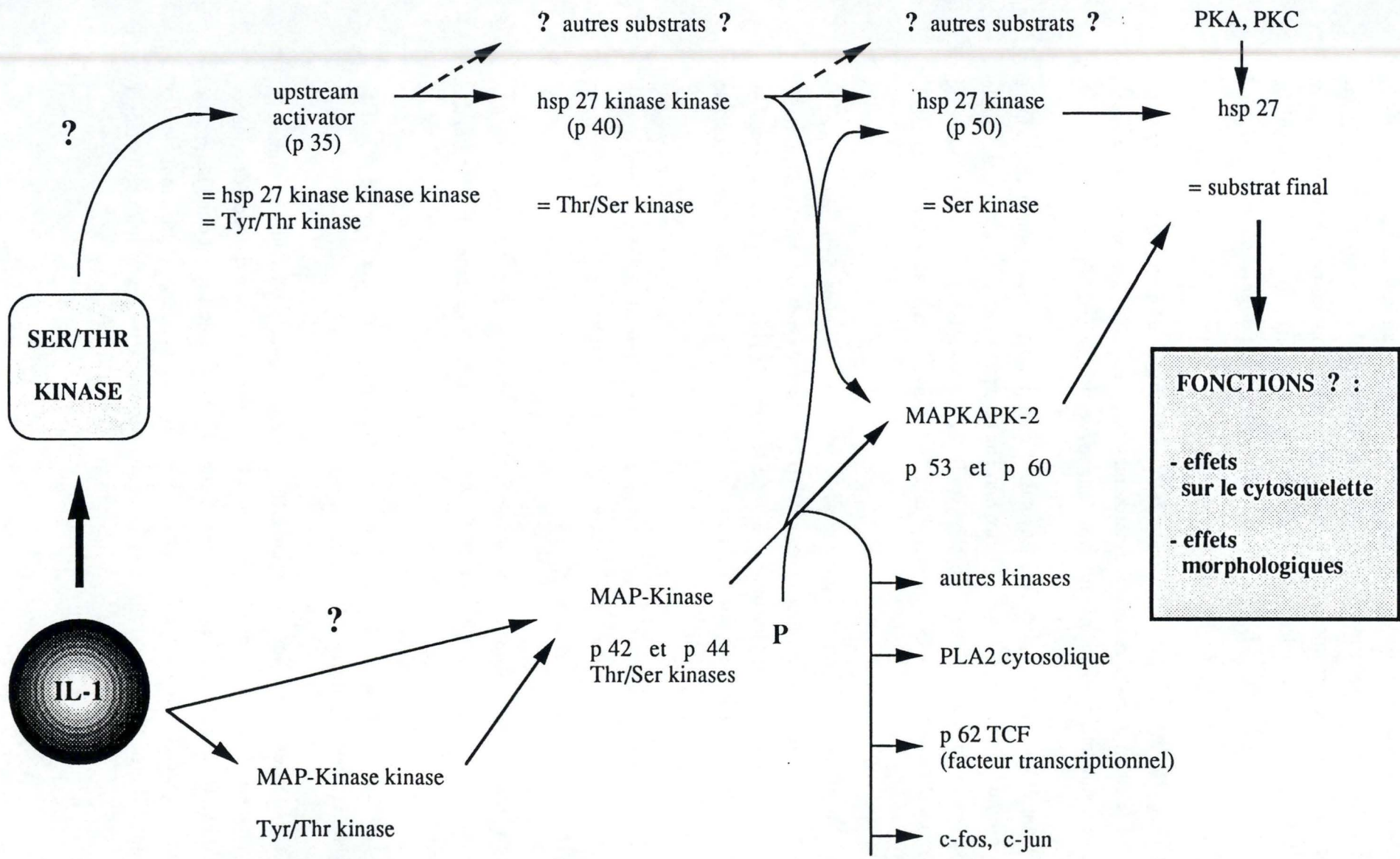


Figure I.16. : Schéma représentant les kinases impliquées dans la traduction du signal de l'IL-1.

l'IL-1, mais l'importance physiologique de cette cascade dans le cas de l'IL-1 reste à prouver.

En conclusion, les mécanismes moléculaires de la transduction du signal de l'IL-1 restent relativement hypothétiques, d'autant plus que selon les modèles cellulaires ou tissus utilisés, des différences considérables apparaissent.

Parmi les différents messagers secondaires cités, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux dérivés actifs de l'oxygène. Il nous a donc semblé utile de rappeler ce que sont les dérivés actifs de l'oxygène, d'où ils proviennent et comment les cellules peuvent se protéger contre ces molécules, dont l'excès est toxique, avant d'étudier leur rôle possible dans la transduction de l'IL-1.

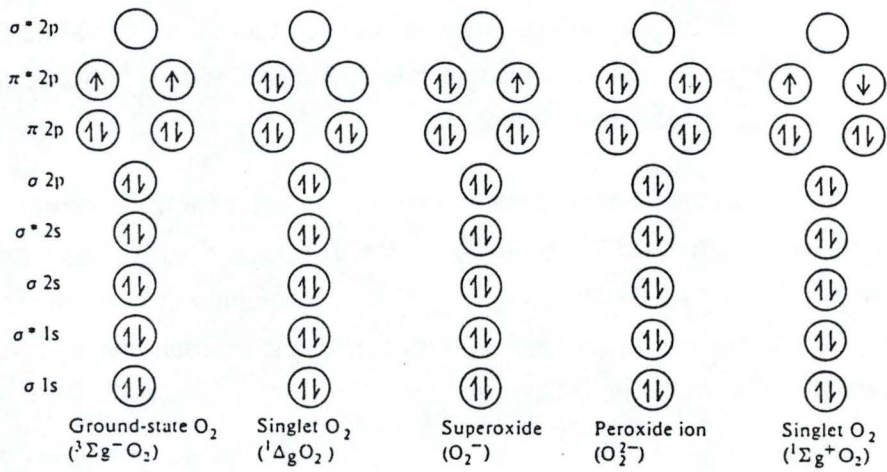


Figure I.17. : Etats électroniques de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 1989).

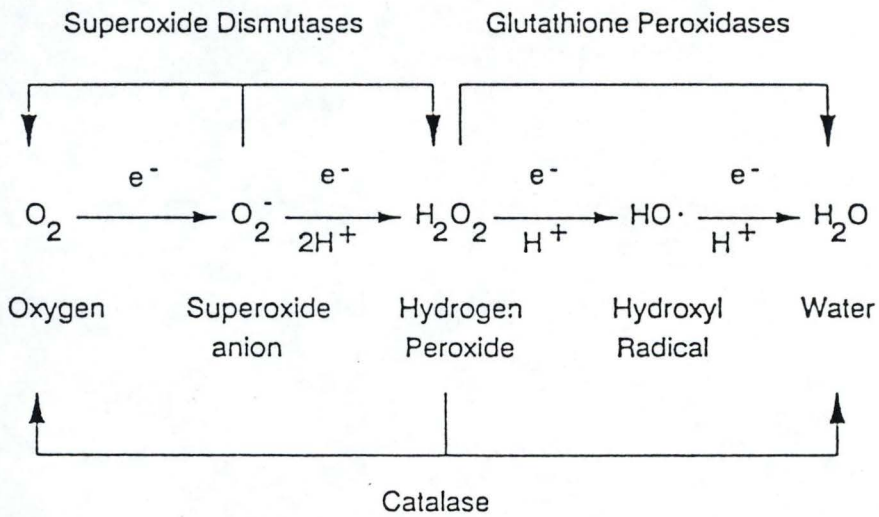


Figure I.18. : Réduction monovalente de l'oxygène et modes d'actions des principales enzymes antioxydantes (d'après Reddy, 1991).

2. LES DERIVES ACTIFS DE L'OXYGENE.

2.1. DEFINITION.

Bien que l'oxygène soit requis pour les organismes aérobies, il les expose à des effets toxiques attribués à la formation de radicaux libres.

Les radicaux libres sont des molécules chimiques capables d'une existence indépendante et qui comportent un ou plusieurs électrons non appariés (Halliwell and Gutteridge 1989). Cet ou ces électrons libres font que les molécules sont très énergétiques et ont une grande réactivité. Avant de détailler l'origine des dérivés actifs de l'oxygène ainsi que leur rôles, nous allons les identifier. Pour ce chapitre nous ferons principalement référence aux ouvrages de B. Halliwell et C. Rice-Evans (Halliwell and Gutteridge 1989; Rice-Evans, Diplock et al. 1991).

2.2. LES DERIVES ACTIFS DE L'OXYGENE.

L'oxygène moléculaire (= O₂) sous sa forme la plus stable possède 16 électrons répartis sur 7 orbitales. La dernière orbitale (la plus éloignée du noyau) est anti-liante, de type Π^*2p avec 2 électrons non appariés et de spins parallèles (fig. I.17.).

Cette molécule étant stable, le changement de son état électronique ne se fera pas spontanément, mais bien avec l'aide de catalyseurs. Un réarrangement des électrons de la dernière orbitale ou l'addition d'électrons génère des dérivés actifs, c'est-à-dire

- Des radicaux proprement dits, tels que l'anion superoxyde et le radical hydroxyle par exemple.

- Des molécules toxiques telles que l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène (Reddy 1991).

Mis à part l'oxygène singulet qui se forme par inversion de spin d'un des électrons non appariés de l'orbitale anti-liante Π^*2p , les différents dérivés actifs de l'oxygène sont obtenus par réduction monovalente de l'oxygène (figure I.18.).

Celle-ci s'effectue en quatre étapes avec à chacune le transfert d'un électron. On obtient alors successivement le radical anionique superoxyde O₂^(o-), le peroxyde

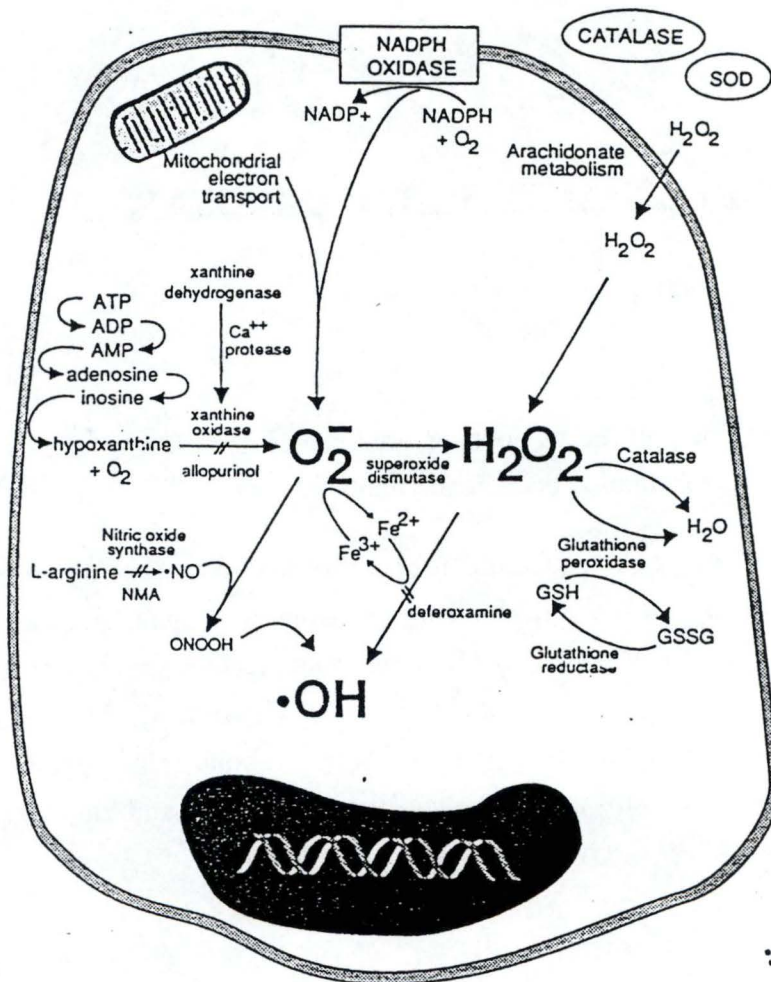


Figure I.19. : Voies intracellulaires potentielles de formation des ROI. (Deforge *et al.*, 1993).

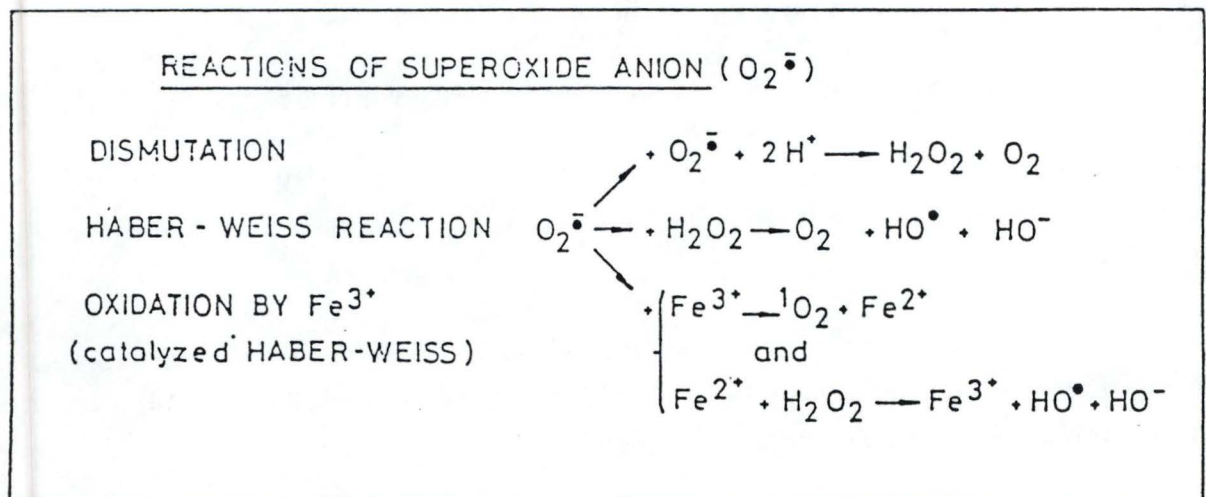


Figure I.20. : Réactions auxquelles participent les $O_2^{\cdot-}$. (D'après Basaga, 1989).

d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^\bullet) (figure I.19.).

2.2.1. L'ANION SUPEROXYDE.

L'anion superoxyde $O_2^{(\bullet-)}$ n'est pas toxique en tant que tel, mais bel et bien parce qu'il engendre d'autres dérivés de l'oxygène encore plus toxiques par des réactions telles que celle de dismutation ou encore celle de Haber-Weiss. Dans le cas de cette dernière, l'anion superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour engendrer des radicaux hydroxyles (HO^\bullet), dotés d'une réactivité de loin supérieure à celle des autres espèces radicalaires.

La réaction de dismutation est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), mais peut se faire spontanément, comme illustré à la figure I.19. La dismutation de l'anion superoxyde accompagnée d'une protonation aboutit à la formation du peroxyde d'hydrogène. Une protonation sans apport d'électrons de l'anion superoxyde engendre le radical HO_2^\bullet qui, grâce à sa neutralité, traverse mieux les membranes cellulaires que l' $O_2^{(\bullet-)}$ obligé de passer par des canaux anioniques.

La réaction d'Haber-Weiss (figure I.20.) fait intervenir un catalyseur métallique (le fer ou le cuivre) à l'état oxydé. L'anion superoxyde cède un électron à l'ion métallique réduisant ce dernier et redevient l' O_2 stable de départ. La deuxième partie de la réaction (réaction de Fenton) peut alors se réaliser : l'ion métallique réduit s'oxyde en donnant un électron au peroxyde d'hydrogène qui formera des radicaux hydroxyles.

2.2.2. LE PEROXYDE D'HYDROGENE.

Comme décrit ci-dessus, il peut être généré entre autres par la réaction de dismutation et participer à l'élaboration de radicaux hydroxyles.

L' H_2O_2 est un agent oxydant faible mais stable diffusant rapidement à travers les membranes. Il peut inactiver directement un petit nombre d'enzymes généralement en y oxydant des groupements thiols.

Notons que le peroxyde d'hydrogène n'est pas une espèce radicalaire au sens strict, puisqu'il ne possède pas d'électron célibataire. Cependant, pour des facilités de langage, nous l'engloberons parmi les dérivés actifs de l'oxygène.

2.2.3. LE RADICAL HYDROXYLE.

Produit par la réaction de Fenton, ou encore par simple fission à partir de H₂O₂ ou H₂O en présence de rayons ultraviolets, le radical HO° est très toxique et très réactionnel. Sa vitesse de réaction est si grande qu'il réagit dans l'environnement immédiat du site où il est produit, en produisant des radicaux secondaires. Avec un temps de demi-vie de 10⁻⁹ secondes, il n'est détecté que très difficilement, surtout dans les fluides biologiques (Lunec 1990). L'HO° est le plus puissant oxydant connu.

2.3. FORMATION.

2.3.1. LES SOURCES INTRACELLULAIRES.

2.3.1.1. LES REACTIONS ENZYMATIQUES.

Plusieurs enzymes oxydo-réductrices produisent au cours de leur réaction catalytique des dérivés actifs de l'oxygène. Ces radicaux peuvent diffuser avant que la réaction d'oxydation ou de réduction ne soit terminée.

- C'est par exemple de cette manière que l'anion superoxyde est produit par la NADPH oxydase membranaire. Celle-ci transfère les électrons du NADPH à travers la membrane cellulaire sur l'O₂ (Forman and Torres 1991).



La xanthine oxydase (X.O.) (qui est une forme altérée de la xanthine déshydrogénase (X.D.)) génère également des anions superoxydes. La X.D. transfère normalement des électrons sur le NAD⁺, alors que la X.O., les transfère sur l'O₂, générant ainsi des O₂^(°-) (Buel 86). Cette forme altérée est produite par protéolyse partielle ou oxydation de certains groupements thiols et constitue ± 10 % de l'enzyme dans un tissu sain.

Réaction de la xanthine déshydrogénase :



Réaction de la xanthine oxydase :



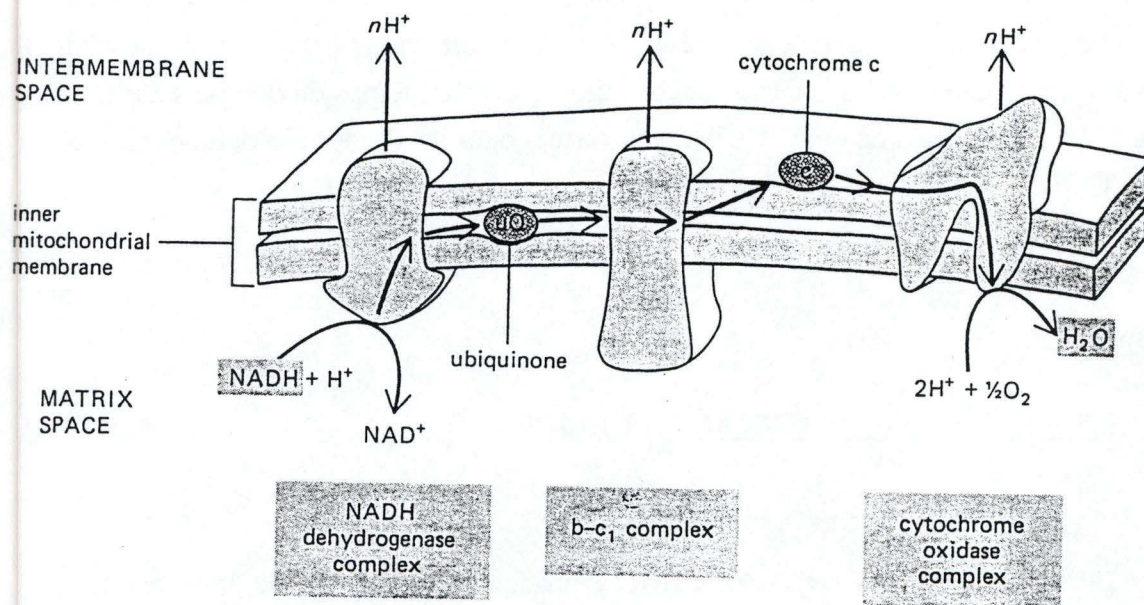


Figure I.21. : Illustration schématique du flux d'électrons à travers les trois complexes enzymatiques majeurs de la respiration, pour le transfert de deux électrons du NADH à l'oxygène. L'ubiquinone (uQ) et le cytochrome C servent de transporteurs entre les complexes (Molecular biology of the cell, 1983).

2.3.1.2. LES MOLECULES CHIMIQUES.

Toute une série de molécules sont capables de s'auto-oxyder en présence d'oxygène et de former ainsi des anions superoxydes. Parmi ces molécules, on trouve des quinones, des flavines, des thiols ainsi que des xénobiotiques (médicaments, polluants, ...)

2.3.1.3. LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE.

La chaîne de transport des électrons au niveau de la membrane mitochondriale interne est représentée à la figure I.21.

Des électrons transitent par des transporteurs (flavoprotéine, coenzyme Q, cytochrome b, c, a et a₃) mais ceux-ci en passant de l'état réduit à l'état oxydé cèderaient des électrons à l'O₂, et des O₂^(o-) seraient formés. Il semble que le site majeur où a lieu cette "fuite" d'électrons, soit le complexe NADH-coenzyme Q réductase et les formes réduites du coenzyme Q lui-même. Un à quatre pourcents de la quantité d' O₂ consommée par la mitochondrie seraient de cette manière transformés en O₂^(o-) puis en H₂O₂. Environ 20 % des O₂^(o-) produits ne seraient pas dégradés par les SOD mitochondriales et traverseraient la membrane mitochondriale par des canaux anioniques pour aboutir dans le cytoplasme. Le phénomène d'ischémie/reperfusion permet ainsi d'augmenter la production de radicaux libres et dans le cytoplasme et dans la mitochondrie. En effet, l'ischémie favorise la protéolyse partielle de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxygénase qui cède alors les électrons de la xanthine à l' O₂. Pendant l'ischémie, il y a également le découplage de la phosphorylation oxydative. En effet, en absence d' O₂ le transport d'électrons s'arrête ainsi que la phosphorylation de l'ADP en ATP. Au moment de la reperfusion, le système des cytochromes ne fonctionnant pas instantanément, l'oxygène est réduit au début de la chaîne des transporteurs en O₂^(o-) et non plus par les cytochromes a et a₃.

2.3.1.4. LES PEROXYSOMES.

Dans ces organites, des oxydases agissent sur des substrats organiques et transfèrent deux atomes d'hydrogène sur l'O₂.



Quelques molécules de peroxyde d'hydrogène traversent la membrane et se retrouvent dans le cytoplasme mais la plupart sont réduites par la catalase grâce aux divers

substrats qu'elle oxyde tels que les phénols, les alcools (méthanol et éthanol),...

La production de radicaux libres par des organites végétaux (chloroplastes, thylacoïdes,...) n'entre pas dans le cadre de ce travail.

2.3.1.5. LE CYTOCHROME P450

Présent dans les membranes du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie, le cytochrome P450 réalise une hydrogénation des composés hydrophobes. Il participe ainsi à la détoxification cellulaire tout en prélevant des électrons au NADPH. Ces électrons seront cédés à l'oxygène au cours des transferts et participeront à la formation d'O₂^(o-).

2.3.1.6. LES METAUX DE TRANSITION

Certains métaux tels que le fer ou le cuivre ont une valence variable leur permettant de changer d'étage d'oxydation Ils peuvent ainsi réagir avec les radicaux comme nous l'avons montré au point 2.2.1. Ils participent aussi à l'initiation des peroxydations lipidiques sous forme de complexes comprenant du fer. Ces peroxydations peuvent, comme nous le verrons plus loin, être arrêtées par des molécules antioxydantes (Roberfroid 1987).

2.3.2. LES SOURCES EXTRACELLULAIRES.

2.3.2.1. L'IRRADIATION.

Des rayonnements tels que les UV, les rayons X et γ , peuvent entraîner la formation de radicaux libres par fission homolytique de l'eau.

2.3.2.2. LA PHAGOCYTOSE.

Les macrophages, les PMN une fois activés augmentent leur consommation en oxygène afin de produire des radicaux en grande quantité. Ceux-ci serviront à éliminer les bactéries apparues lors de blessures ou d'infections.

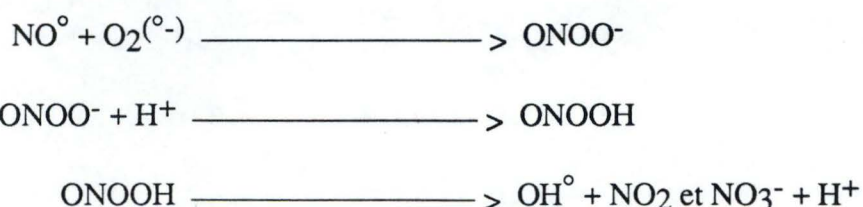
TARGET	DAMAGE	CONSEQUENCE
DNA/RNA	scission of deoxyribose ring; base damage; strand break;	mutations; translational errors; inhibition of protein synthesis
PROTEIN	aggregation & cross-linking; fragmentation & breakdown; modification of thiol groups	modified ion transport; increased calcium influx; modified enzyme activity
POLYUNSATURATED LIPID	loss of unsaturation; formation of reactive metabolites (MDA, 4-HNE)	altered lipid fluidity; altered membrane permeability; effects on membrane-bound enzymes;

Table I.2. : Cibles potentielles des radicaux libres. (Rice-Evans *et al.*, 1991).

Arginine	• Glutamic semialdehyde + NO
Lysine	• 2-Amino adipylsemialdehyde
Proline	• Glutamic semialdehyde → pyroglutamate → glutamate
Histidine	• Histidine endoperoxides
Cysteine	• Aspartate, asparagine • Cys-disulphides mixed-disulphides • Sulphenic acid, sulphinic acid, Sulphonic acid (via alkyl thioradicals)
Methionine	• Methionine sulphoxide Methionine sulphone
Tryptophan	• 5-Hydroxy tryptophan • Kynurenine • <i>N</i> -Formylkynurenine
Tyrosine	• Bityrosine (not in the presence of O ₂ , O ₂ ⁻)
Phenylalanine	• Tyrosine (in presence of [•] OH)

Table I.3. : Produits formés après modifications des acides aminés par les radicaux libres. (Rice-Evans *et al.*, 1991).

L'explosion respiratoire produite par la NADPH oxydase réduit donc l'oxygène en prenant des électrons au NADPH (Ross, 1991). Les macrophages sont aussi connus pour leur NO° synthase utilisant le NADPH et la FAD pour former l'oxyde nitrique (NO°) (Xia, Kannapell et al. 1993; Lancaster, Werner-Felmayer et al. 1994). Les NO° ont un large spectre d'action, ils interviennent dans la vasodilatation, la transmission neuronale et la cytotoxicité (Lancaster, Werner-Felmayer et al. 1994). Le NO° peut aussi réagir avec des O₂(^{o-}) pour former des HO°.(Freeman and Crapo 1982).



Cette réaction ne nécessite pas d'ions métalliques pour se réaliser.

2.3. ROLES BIOLOGIQUES DES DERIVES OXYGENES

Les effets des radicaux libres à l'intérieur de la cellule peuvent être reliés à leur concentration. A dose modérée ils agiraient comme activateurs tandis qu'à forte dose à forte dose ils deviendraient toxiques pour les cellules ou les agents pathogènes. Enfin, produits à faible dose mais de manière continue, ils pourraient également à long terme contribuer au vieillissement cellulaire (**Remacle et al., accepté pour publication**).

2.3.1. EFFETS TOXIQUES.

Comme mentionné plus haut, les radicaux attaquent diverses molécules telles que les acides nucléiques, les acides aminés et les lipides (Sies 1986). Les effets principaux sur les molécules-cibles ainsi que leurs conséquences fonctionnelles sont résumés dans la Table I.2.

2.3.1.1. DEGATS OXYDATIFS SUR LES ACIDES NUCLEIQUES.

La nature des dégâts causés par les différents agents oxydants sur l'ADN est souvent complexe. Ils engendrent des cassures dans les brins d'ADN ainsi que des changements de base en modifiant la structure des acides nucléiques (Pour une revue voir (Dizdaroglu 1991)). Ils provoquent donc des mutations même si les mécanismes de réparation de l'ADN s'avèrent très efficaces.

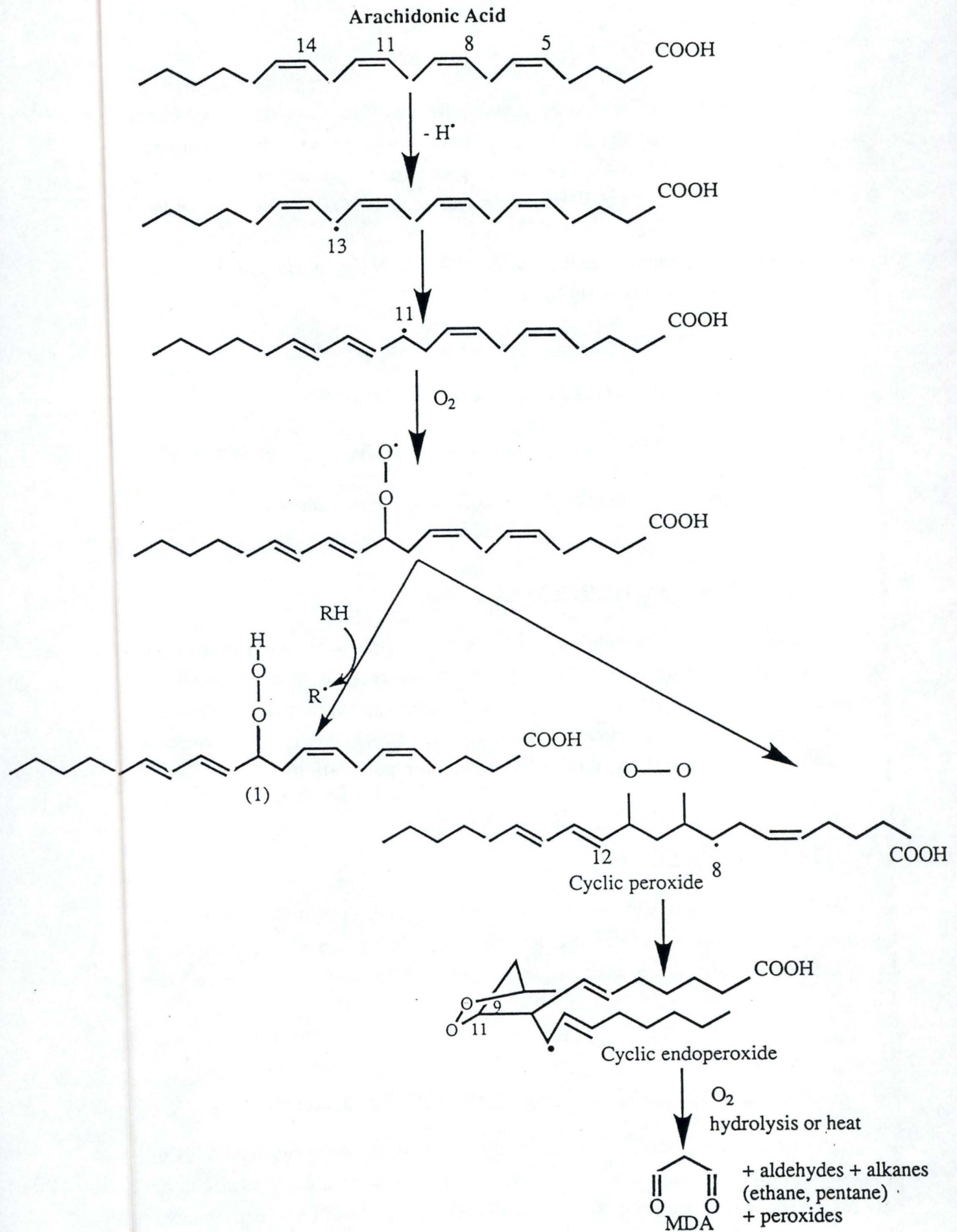


Figure I.22. : Peroxydation de l'acide arachidonique et formation d'hydroxyperoxydes lipidiques (1) ou de malonaldéhydes (MDA). Plusieurs autres peroxydes et aldéhydes sont formés lors de ces réactions de peroxydations.

2.3.1.2. DEGATS OXYDATIFS SUR LES ACIDES AMINES.

Plusieurs acides aminés sont particulièrement vulnérables aux radicaux libres, comme indiqué dans la table I.3.

En fait, selon la nature de l'acide aminé modifié et selon les espèces radicalaires impliquées, les conséquences des altérations oxydatives des protéines peuvent être très variées : aggrégation des molécules, pontages inter-moléculaires, dégradation et fragmentation,... Ces modifications s'accompagnent d'altérations fonctionnelles telles que perte d'activité catalytique pour les enzymes ou de capacité de transport pour les transporteurs membranaires, par exemple.

2.3.1.3. DÉGATS OXYDATIFS SUR LES LIPIDES.

Les membranes biologiques et particulièrement les acides gras insaturés représentent également une cible particulièrement sensibles aux attaques radicalaires.

En effet, les doubles liaisons des acides gras peuvent facilement perdre un H[°], par exemple suite à une attaque par des HO[°] comme le montre la fig. I.22.

Un réarrangement intramoléculaire au niveau des doubles liaisons stabilise la molécule, qui réagit alors avec l'O₂ pour former un peroxyde radicalaire (c'est l'étape de propagation de la réaction). La réaction de peroxydation lipidique peut se terminer en captant un H[°], intra- ou extra-moléculaire, et menant par exemple à la formation d'aldéhydes.

Les réactions de peroxydations lipidiques sont capables d'altérer le fonctionnement, la fluidité et même la perméabilité membranaire. C'est pourquoi la glutathion peroxydase (GPx) qui est chargée de détoxifier les peroxydes organiques joue un rôle protecteur extrêmement important

Si, comme nous venons de le voir, les dérivés actifs de l'O₂ sont capables d'altérer de nombreux constituants cellulaires, il faut toutefois signaler qu'ils s'avèrent très utiles dans la défense contre les pathogènes et qu'ils possèdent aussi des effets non toxiques.

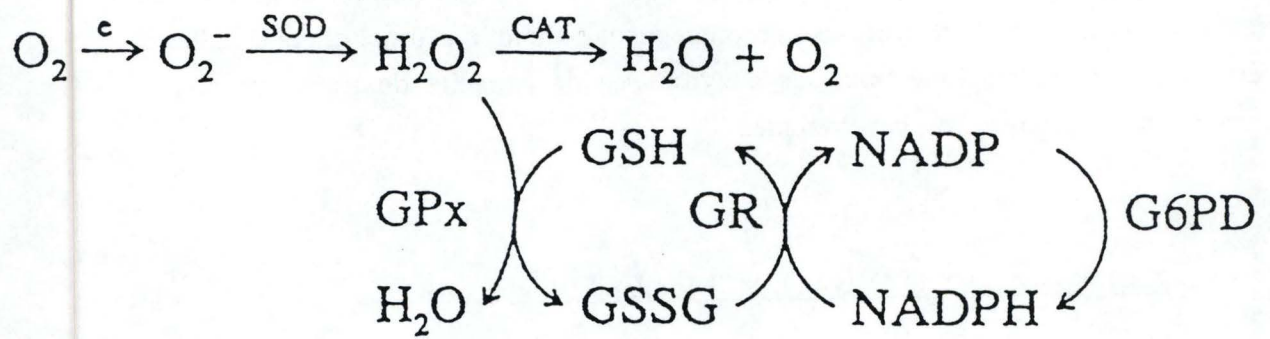


Figure I.23. : Mode d'actions des principales enzymes antioxydantes. (Sun, 1990).

2.3.2. EFFETS NON TOXIQUES.

Les radicaux interviennent aussi dans des phénomènes physiologiques tels que la respiration mitochondriale ou le fonctionnement de certaines enzymes (telle que la cyclooxygénase) ou encore la détoxification par le cytochrome P450. Ils jouent également un rôle important dans les lysosomes et les peroxysomes.

Durant ces dernières années, plusieurs auteurs ont suggéré qu'ils interviendraient également comme messagers secondaires et notamment lors de l'activation cellulaire par l'IL-1 ou le TNF α .(Schreck, Rieber et al. 1991) +(Réf TNF et réf IL-1--->FIERS)

2.4. LES SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LES DERIVES OXYGENES.

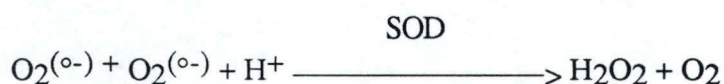
Afin de contrecarrer les effets de radicaux libres, la cellule a en son sein tout un système de défense efficace composé d'enzymes et de molécules non enzymatiques antioxydantes.

2.4.1. LES SYSTEMES DE DEFENSE ENZYMATIQUES.

Les enzymes antioxydantes ont entre autres la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (G.réd.) et la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD). Un bref aperçu de leurs effets est présenté à la figure I.23(Sun 1990).

2.4.1.1. LA SUPEROXYDE DISMUTASE.

La première superoxyde dismutase (SOD) a été découverte par Mc Cord et Fridovitch en 1969 (McCord and Fridovitch 1969). La SOD catalyse la réaction de dismutation des ions superoxydes (dont nous avons déjà parlé au point II.2.2.1.) :



Il existe plusieurs SOD qui diffèrent entre autres par la nature du métal présent dans leur site actif. On trouve donc des enzymes à cuivre-zinc, à manganèse et à fer, appelées respectivement CuZnSOD, MnSOD et FeSOD.

-La CuZnSOD se trouve principalement dans le cytosol des cellules eucaryotes. Comme son nom l'indique, elle a un ion Cu^{2+} (subissant l'oxydoréduction) et un ion zinc dans son site actif. Elle est inhibée de manière non spécifique par le cyanure. On en trouverait également dans l'espace intermembranaire des mitochondries, bien qu'en plus faible quantités.

- La MnSOD est présente chez les procaryotes et dans la mitochondrie des eucaryotes. C'est le Mn^{3+} du site actif qui subit une oxydoréduction avec le substrat.

-La FeSOD serait présente uniquement chez les procaryotes et dans certains végétaux supérieurs.

2.4.1.2. LA CATALASE.

C'est une des premières enzymes connues, elle a été découverte en 1901 (Percy 1984). Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Contrairement à la SOD, elle n'engendre pas de dérivés actifs de l'oxygène.



Elle est composée de quatre sous-unités contenant chacune un groupement hème (Fe(III)-protoporphyrine) lié au site actif et une molécule de NADPH. La dissociation de la catalase en ses sous-unités lui fait perdre son activité.

La catalase est particulièrement importante dans les peroxysomes car ces organites contiennent des oxydases qui transfèrent sur l' O_2 2 atomes d'hydrogène prélevés sur des substrats organiques, produisant beaucoup de molécules d' H_2O_2 . D'où l'utilité de la catalase dans ces organites.



La catalase peut être inhibée par l'aminotriazole (ATA) qui se lie au peroxyde d'hydrogène activant un résidu histidine présent près du site actif (Michiels and Remacle 1988). Elle peut l'être également par d'autres composés moins spécifiques tels que les azides ou le cyanure.

2.4.1.3. LA GLUTATHION PEROXYDASE.

Décrite pour la première fois par Mills en 1957 (Mills 1957), la glutathion peroxydase (GPx) est présente à 70 % dans le cytosol et à 30 % dans les mitochondries.

Elle est formée de 4 sous-unités identiques qui renferment chacune une sélénocystéine dans leur site actif.

Comme présenté à la figure I.23, la GPx complète la catalase en agissant sur le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est donc réduit par la GPx aux dépens du glutathion (GSH) (composé thiol antioxydant que nous verrons au point 2.4.2.).



Le GSSG sera alors retransformé en 2 GSH grâce à la glutathion réductase qui oxyde pour ce faire le NADPH en NADP⁺. Ce dernier est réduit par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD).

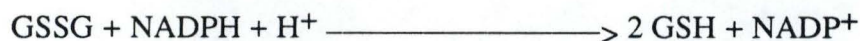
Mais la fonction principale de la GPx consiste à détoxifier la cellule de peroxydes organiques



Le mercaptosuccinate est un inhibiteur spécifique de la GPx. Il réagit avec la sélénocystéine du site actif de l'enzyme entraînant ainsi son inactivation.

2.4.1.4. LA GLUTATHION REDUCTASE.

La glutathion réductase a été observée pour la première fois dans le foie de différents animaux par Hopkin et Elliot en 1931 (Hopkin and Elliot 1931). L'enzyme catalyse la réaction suivante :



La glutathion réductase permet donc de régénérer le glutathion réduit qui peut alors être utilisé par la GPx pour éliminer les peroxydes organiques.

Avec un poids moléculaire de 120 kDa, l'enzyme est formée de deux sous-unités contenant chacune une flavine FAD dans leur site actif. L'enzyme est, tout comme la GPx, répartie dans le cytosol et dans la mitochondrie. Un des inhibiteurs de la glutathion réductase est la 1-3-bis-chloroéthyl-1-nitrosourée qui *in vivo* est dégradée en deux

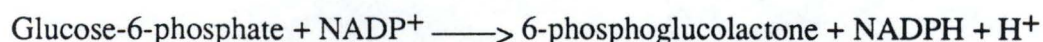
System studied	[GSH]	Ratio GSH/GSSG	Glutathione peroxidase activity	Glutathione reductase activity
Spinach chloroplasts	3.0 mM	> 10/1	Absent	High
Rat tissues				
liver	7-8 mM	> 10/1	High	High
erythrocyte	2 mM	> 10/1	Moderate	Moderate
heart	2 mM	> 10/1	Moderate	Moderate
lung	2 mM	> 10/1	Moderate	Moderate
lens	6-10 mM	> 10/1	Moderate	Moderate
spleen	4-5 mM	> 10/1	—	—
kidney	4 mM	> 10/1	Moderate	Moderate
brain	2 mM	> 10/1	Moderate	Moderate
skeletal muscle	1 mM	> 10/1	Low	Low
blood plasma	0.02-0.03 mM	~ 5/1	Low	Low
adipose tissue	3.2 µg per 10 ⁶ cells	> 100/1	Low	Low
Human tissue				
liver	4 µmol g ⁻¹ wet weight	> 10/1	High	High
lens	6-10 mM	> 10/1	Moderate	Moderate
erythrocytes	240 µg ml ⁻¹ blood	> 10/1	Moderate	Moderate
<i>N. crassa</i>	20 µmol g ⁻¹ dry weight	150/1	Absent	Moderate
<i>E. coli</i>				
aerobically-grown	27 µmol g ⁻¹	> 10/1	Absent	—
anaerobically-grown	7 µmol g ⁻¹			

Table I.4. : Présence de glutathion et d'enzymes l'utilisant dans différents organismes.
(D'après Hallivell, 1989).

métabolites dont l'agent carbamylateur qui réagit avec la forme réduite de l'enzyme et l'inactive. Il ne peut donc pas inhiber l'enzyme pure.

2.4.1.5. LA GLUCOSE 6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE.

Découverte dans des extraits de levure en 1936 (Dickens and Glock 1951), la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PD) catalyse la réaction suivante :



Formée de quatre ou deux sous-unités, l'enzyme peut être inhibée par des agents chélateurs de métaux.

En plus de cette panoplie de défenses enzymatiques il existe un système de défense non enzymatique considérable

2.4.2. LES SYSTEMES DE DEFENSE CHIMIQUES.

Il existe dans la cellule toute une série de molécules capto-datives qui sont capables d'éliminer les dérivés actifs de l'O₂. Parmi eux citons le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, le β carotène, ...

2.4.2.1. LE GLUTATHION.

C'est un composé thiol que l'on retrouve chez certaines bactéries, chez les plantes et les animaux.

Le glutathion est un tripeptide formé de glutamyl-cystéine-glycine, présent majoritairement sous forme réduite dans la cellule. Comme le montre la Table I.4., le rapport GSH/GSSG est généralement supérieur à 10/1. On constate également -en tous les cas pour les tissus animaux- un parallélisme entre les niveaux d'activité de la GPx et de la GSH réductase.

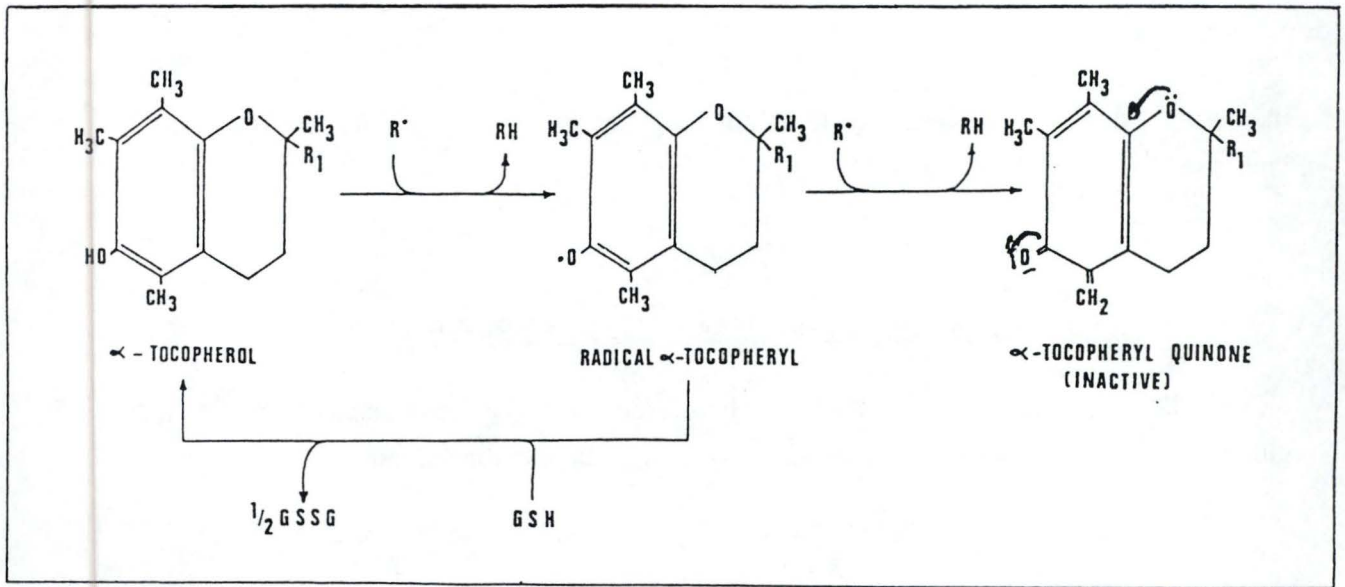


Figure I.24. : Voie de l'oxydation de la vitamine E en dérivé quinone et recyclage du radical α-tocophenyl.

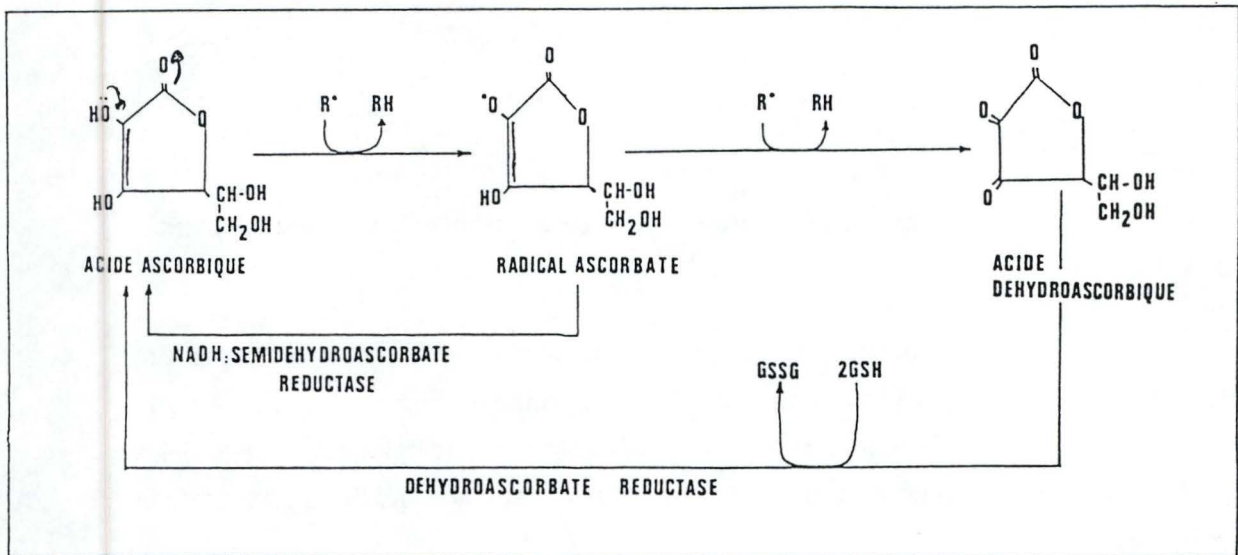
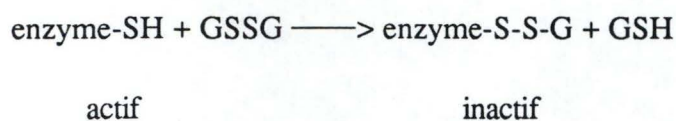


Figure I.25. : Oxydation et recyclage enzymatique de l'acide ascorbique.

Lors de stress oxydatifs, le rapport GSH/GSSG élevé ne parvient plus à être maintenu et le GSSG s'accumule. Le GSSG a plusieurs effets délétaires :

- Il peut inactiver certaines enzymes, entre autres par la formation de disulfures mixtes.



- Le GSSG inhibe la synthèse protéinique

- Le GSSG inhibe plusieurs enzymes dont l'adénylate cyclase.

En outre, le déficit en GSH empêche le fonctionnement des enzymes GSH-dépendantes telles que la GPx.

Le glutathion peut aussi réagir directement avec les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles pour former des radicaux thiyl. ceux-ci sont moins réactionnels que les radicaux OH° mais peuvent néanmoins s'avérer toxiques vu leur haute réactivité.

2.4.2.2. LA VITAMINE E.

La vitamine E est le terme collectif pour les tocophérols, tocotriénols et dérivés actifs biologiquement, présentant qualitativement l'activité biologique du RRR- α -tocophérol, le stéréoisomère naturel. On la retrouve dans les membranes où elle intervient dans les phénomènes de peroxydation lipidique décrits au point II.2.3.1.3. Son mode d'action est illustré à la figure I.24 où l'on voit qu'elle peut céder deux H° à deux molécules radicalaires. Après avoir cédé un H° elle peut être réduite par la vitamine E réductase en utilisant le pouvoir réducteur du glutathion .

2.4.2.3. LA VITAMINE C.

La vitamine C ou encore l'acide ascorbique est, contrairement à la vitamine E, une molécule hydrophile. Elle est présente dans le cytoplasme et son rôle antioxydant est détaillé à la figure I.25. Elle peut céder 2 H° en deux étapes successives mais elle forme lors

de la première un radical ascorbate qui est toxique. Celui-ci peut être ensuite réduit en acide ascorbique par l'intervention de la NADH semi-déshydroascorbate réductase.

Il existe encore beaucoup d'autres molécules antioxydantes telles que les flavonoïdes, le β carotène, les quinones, l'acide urique,... dont nous ne détaillerons pas ici les mécanismes d'action.

En conclusion, la cellule possède toute une batterie d'enzymes et de molécules antioxydantes capables d'absorber le surplus de dérivés actifs oxygénés produits et de réparer les dommages causés par celle-ci. De plus, la quantité ou l'activité de la plupart de ces molécules sont modulables suite à un stress oxydatif ou une stimulation. De cette manière, la cellule maintient un équilibre intracellulaire entre oxydants et antioxydants.

Récemment, une nouvelle fonction a été proposée pour les dérivés actifs de l'oxygène : produits en quantité réduite, ils pourraient agir comme des messagers secondaires induits entre autre par l'IL-1. Leur cible principale serait le facteur de transcription NF- κ B que nous allons introduire dans le chapitre suivant.

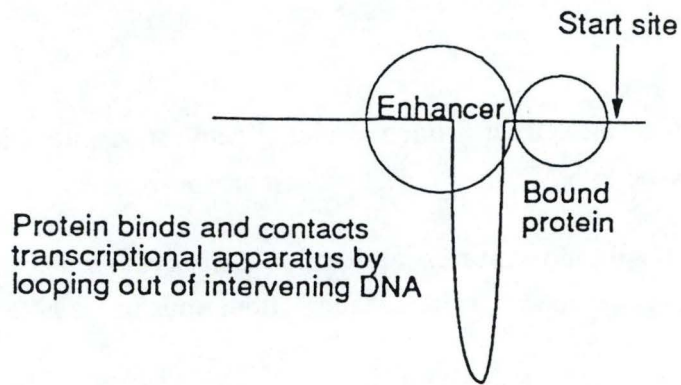


Figure I.26. : Caractéristiques d'un élément enhancer qui peut activer un promoteur à distance (a), dans une autre orientation par rapport à celle du promoteur (b) et positionné devant, derrière ou à l'intérieur de l'unité de transcription. (Latchman, 1991).

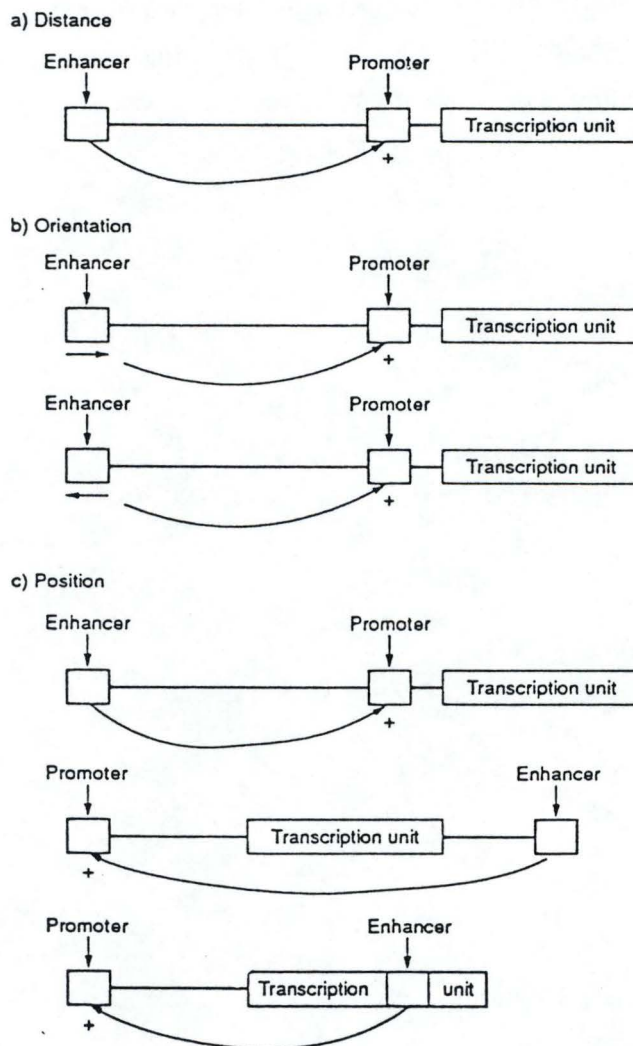


Figure I.27. : Le contact entre les protéines liées au promoteur et celles liées à un enhancer peut être réalisé grâce à une boucle de l'ADN. (Latchman, 1991).

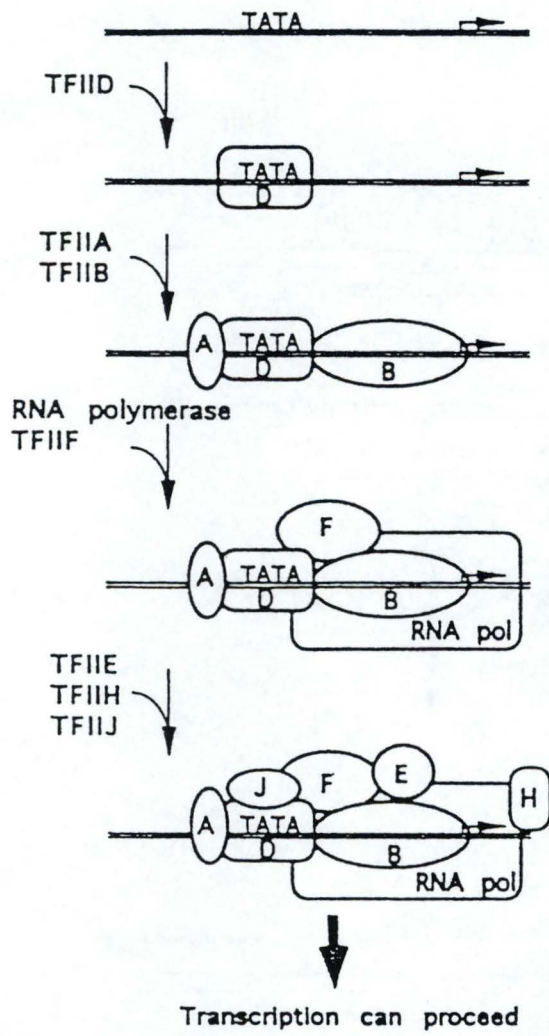
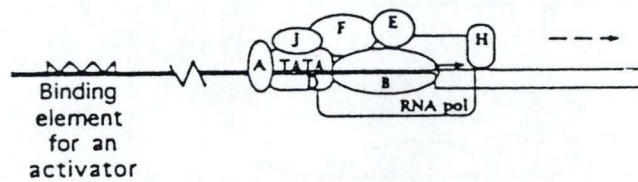
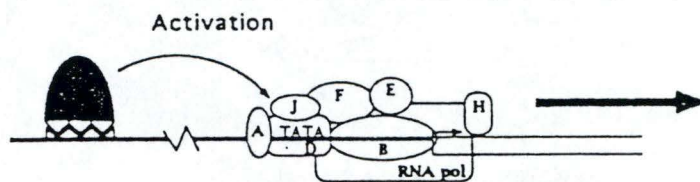
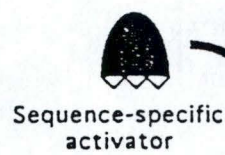


Figure I.28. : Etapes impliquées dans l'initiation de la transcription (Vellanoweth *et al.*, 1994).



Basal initiation complex with low transcription rate



Activated initiation complex with high rate of transcription

Figure I.29. : Le haut de la figure montre le complexe d'initiation basal de la transcription avec en amont un site de binding pour une activation spécifique de la séquence. Le taux de transcription sans cet activateur est généralement négligeable. Dans certains types cellulaires, l'activateur est présent et peut se lier à la séquence en amont du complexe d'initiation et activer la transcription grâce à des interactions protéine-protéine. (Vellanoweth *et al.*, 1994).

3. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF- κ B

Le NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de toute une série de gènes. Pour ce faire, il répond à un nombre considérable de signaux extracellulaires, dont l'IL-1 (voir point 3.2).

Récemment, Baeuerle et Baltimore (Baeuerle and Baltimore 1988) ont émis l'hypothèse que des dérivés actifs de l'oxygène interviendraient comme messagers pour activer ce facteur, d'autant que plusieurs antioxydants peuvent inhiber cette activation (Schreck, Rieber et al. 1991).

Avant d'avancer plus loin en ce qui concerne ce facteur, rappelons quelques généralités concernant les facteurs de transcription.

3.1. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Les facteurs de transcription sont des protéines spécifiques d'une séquence régulatrice, et nécessaires aux interactions entre ADN et ARN polymérase (Rawn 1990). On distingue deux types de séquences régulatrices (ou séquences *cis*) :

- les séquences localisées dans les promoteurs, directement en amont des gènes, et au niveau desquelles s'assemble le complexe d'initiation (Rawn 1990).

- les séquences localisées à une grande distance du site de démarrage de la transcription, qui peuvent se situer en amont ou en aval du promoteur, ou même dans les introns du gène (Latchman 1991) (figure I.26). Ces séquences sont appelées "enhancer" ou "silencer" selon qu'elles permettent respectivement l'activation ou l'inhibition de la transcription. Elles pourraient interagir avec l'ARN polymérase grâce à la formation d'une boucle dans l'ADN (figure I.27.).

Les facteurs de transcription, par leur liaison à des séquences *cis*, permettent donc d'augmenter ou d'inhiber l'intensité de la transcription en interagissant avec le complexe d'initiation de la transcription. Celui-ci est formé de plusieurs constituants :

- les facteurs transcriptionnels de base ou généraux, présents dans tous les promoteurs, tels que TF2A,B,D,F,E , qui permettront, entre autres, à l'ARN polymérase II de venir se placer correctement au début du gène (figure I.28.).

- les protéines auxiliaires qui activent les hélicases d'ADN.

- les facteurs de transcription régulateurs ou facteurs *trans*, qui peuvent agir sur l'ARN polymérase ou sur la machinerie de base, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un coactivateur (Vellanoweth, Supakar et al. 1994) (figure I.29.).

Consensus sequences	Response to	Protein factor	Gene containing sequences
CTNGAATNTT CTAGA	Heat	Heat-shock transcription factor	<i>hsp70</i> , <i>hsp83</i> , <i>hsp27</i> , etc.
T/G T/A CGTCA	Cyclic AMP	CREB / ATF	Somatostatin, fibronectin, α -gonadotrophin, <i>c-fos</i> , <i>hsp70</i>
TGAGTCAG	Phorbol esters	AP1	Metallothionein IIA, α_1 -antitrypsin, collagenase, <i>c-fos</i> , <i>Xenopus</i> γ -actin
GATGTCCATATT AGGACATC GGTACANN TGTTCT	Growth factors in serum Glucocorticoid, progesterone	Serum response factor GR and PR receptors	Metallothionein IIA, tryptophan oxygenase, uteroglobin, lysozyme
AGGTCANN TGACCT	Oestrogen	Oestrogen receptor	Ovalbumin, conalbumin, vitellogenin
TCAGGTCAT GACCTGA TGCGCCC GCC AAGTGA	Thyroid hormone, retinoic acid Heavy metals Viral infection	TH and RA receptors Not known Not known	Growth hormone, myosin heavy chain Metallothionein genes Interferon α and β , tumour necrosis factor

GR, glucocorticoid receptor; PR, progesterone receptor; TH, thyroid hormone receptor; RA, retinoic acid receptor

Table I.5. : Séquences qui confèrent une réponse à un stimulus particulier (d'après Latchman, 1991).

Mechanism of Regulation	Protein	Effect of Phosphorylation
Regulation of nuclear translocation	SW15	Cdc28 phosphorylation of Ser-552, Ser-646, and Ser-664 in SW15 inhibits nuclear import
	NF- κ B	Phosphorylation of I κ B regulatory subunit triggers nuclear import
	CREB β	?
	NF-AT	?
	ISGF3	Tyrosine phosphorylation of ISGF3 α
Regulation of DNA binding 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
	MyoD α	PKC phosphorylation in DNA-binding domain inhibits binding
	Oct1	Phosphorylation of Ser-305 in DNA-binding domain inhibits binding in mitosis
	GHF-1/PA1	Phosphorylation of Thr-220 by PKA or PKC inhibits binding to some response elements
	Ets-1	Ca ²⁺ -dependent phosphorylation may inhibit DNA binding
Stimulation of binding	SRF	CKII phosphorylation of sites upstream of DNA-binding domain increases binding on/off rate
	E2F and E4F	Phosphorylation may increase DNA binding
Regulation of transactivation 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
	CREB 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	Phosphorylation of one or more sites in C-terminal 20 residues required for transrepression
Inhibition of transactivation	v-ErbA	Phosphorylation of Ser-16/17 by PKA or PKC needed for repression of c-ErbA activity
	ADN1	Phosphorylation of Ser-230 by PKA inhibits transactivation

Table I.6. : Mécanismes hypothétiques de régulation des facteurs de transcription par phosphorylation. (Hunter *et al.*, 1992).

Le facteur NF- κ B et bien d'autres facteurs se fixent sur des séquences-cibles afin d'activer la transcription de gènes auxquels elles sont associées. Les séquences cibles, et donc les facteurs de transcription impliqués diffèrent selon les gènes à transcrire. Ce sont ces séquences *cis* spécifiques qui peuvent lier des protéines particulières conférant à un gène déterminé sa capacité de répondre à des stimuli spécifiques, (Latchman 1991). La table I.5. présente quelques exemples de séquences cibles liées par des facteurs protéiniques particuliers, en réponse à des stimuli extérieurs.

Les facteurs *trans* doivent assurer différentes fonctions :

- la liaison à la séquence-cible sur le génome.
- les interactions avec d'autres molécules de facteurs *trans*, étant donné que les facteurs *trans* fonctionnent très souvent sous forme d'hétéro- ou d'homodimères.
- l'activité de transactivation, c'est-à-dire la capacité d'influencer positivement ou négativement la transcription réalisée par l'ARN polymérase.
- les interactions éventuelles avec d'autres ligands protéiniques.

Les phosphorylations jouent un rôle essentiel dans la régulation fonctionnelle des facteurs *trans*. Selon les facteurs, la phosphorylation régulera leur distribution intracellulaire, leur capacité de liaison à l'ADN, et/ou leur capacité de transactivation, comme illustré à la table I.6., pour une série de facteurs *trans*.

Nous illustrerons ces différents aspects dans le cas particulier du facteur NF- κ B qui semble impliqué dans la transduction du signal de l'IL-1.

3.2. LE FACTEUR NF- κ B.

Le facteur NF- κ B a été mis en évidence pour la première fois par Sen et Baltimore (Sen and Baltimore 1986) dans les lymphocytes B. Sa fixation sur une séquence *cis* située entre le segment génique J et le segment génique C des gènes codants pour les chaînes légères kappa des immunoglobulines est indispensable pour que ces gènes soient correctement exprimés. C'est pour cette raison que les auteurs ont nommé ce nouveau facteur de transcription "nuclear factor kappa B".

Il a ensuite été montré que ce facteur était présent dans la plupart des types cellulaires et qu'il était capable d'activer bien d'autres gènes que ceux codant pour les immunoglobulines, comme nous le verrons au point 3.2.3.

Avant de parler des modes d'activation du facteur NF- κ B, nous allons d'abord décrire sa structure.

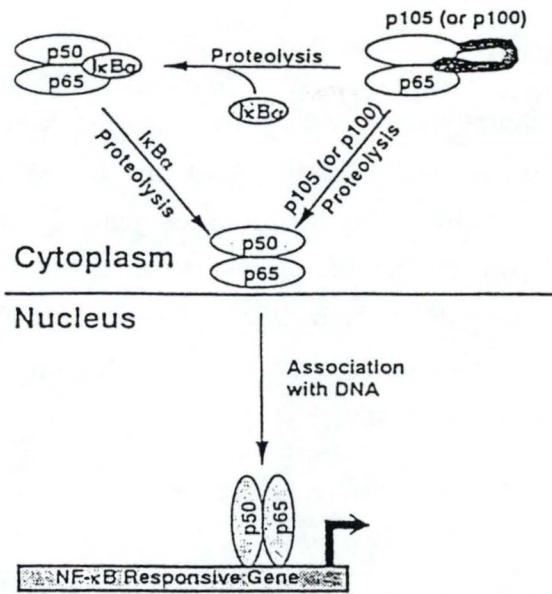


Figure I.30. : Mécanismes de l'activation de la transcription par les membres de la famille NF- κ B (modifié d'après Beg *et al.*, 1993).

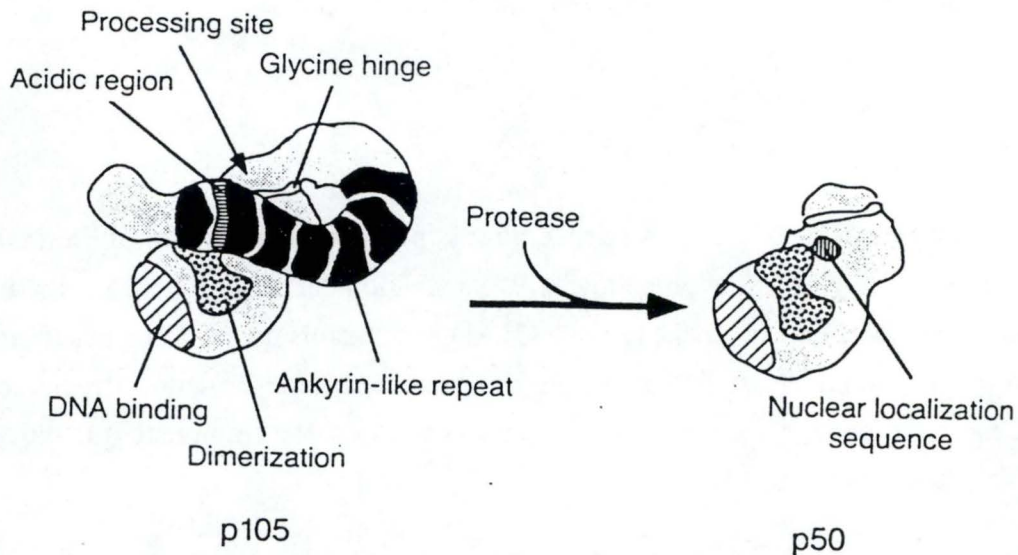


Figure I.31. : Modèle hypothétique des interactions intramoléculaires dans le précurseur p105. La répétition de type ankyrine, masquerait le site NLS (Nuclear Localization Sequence) et le site de clivage. Le clivage donne lieu à une molécule p50 pour laquelle le NLS est accessible, ce qui permettra la translocation dans le noyau (modifié d'après Blank *et al.*, 1992).

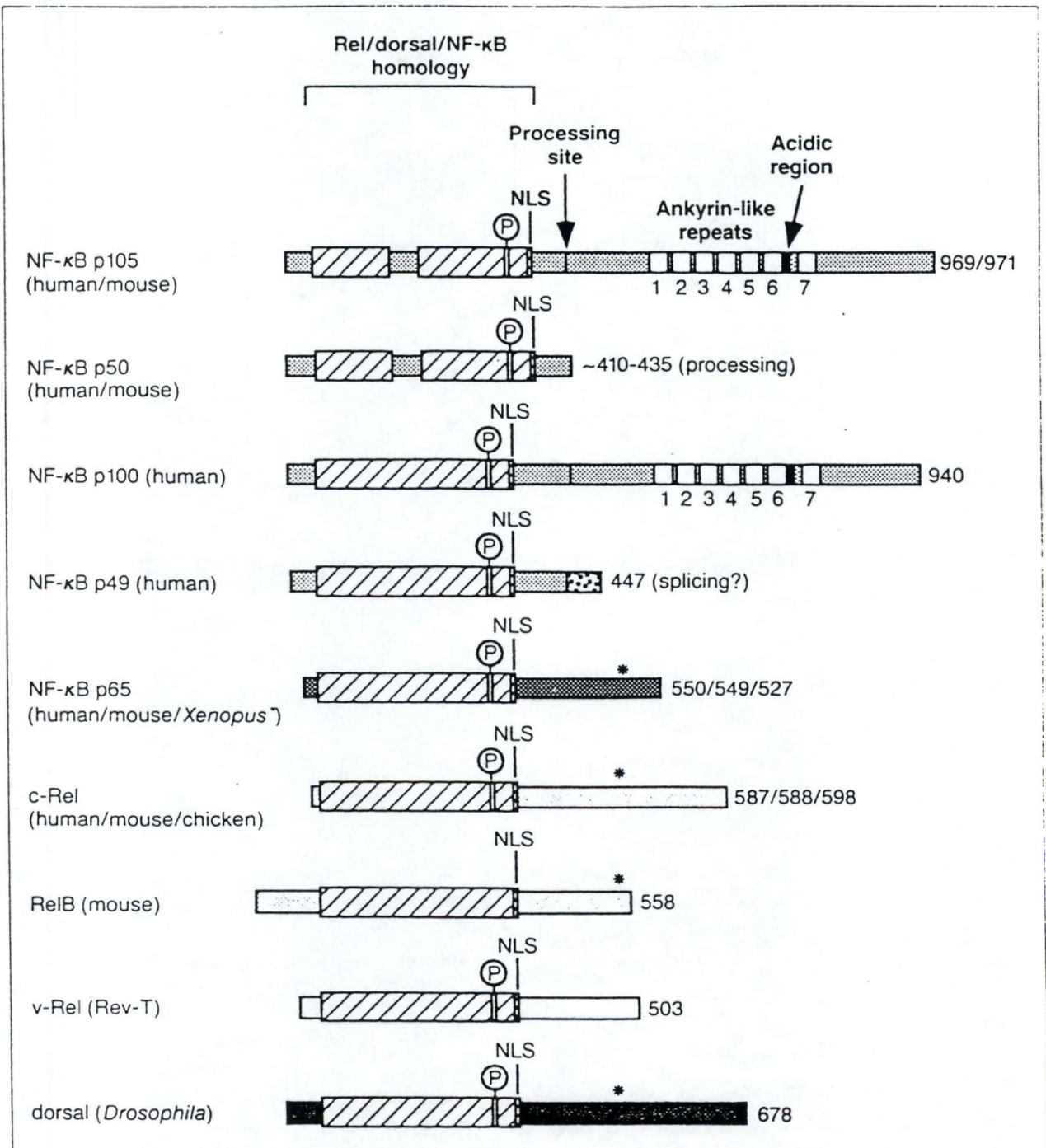


Figure I.32. : Membres de la famille Rel/dorsal/NF- κ B. Le symbole * représente le région transactivatrice (modifié d'après Blank *et al.*, 1992).

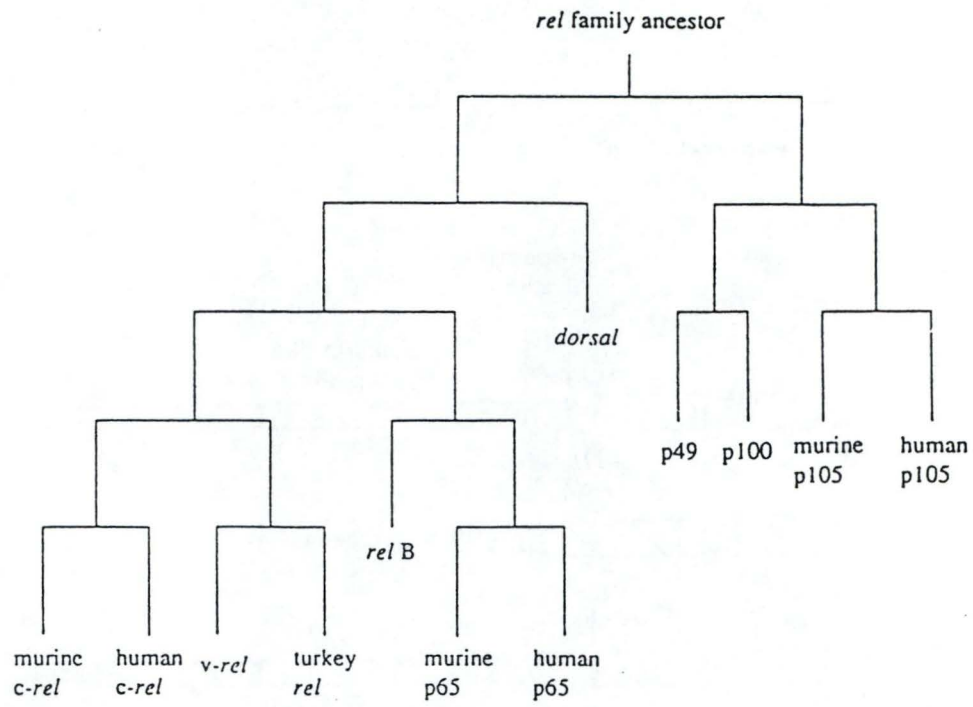


Figure I.33. : Relations phylogénétiques entre les gènes des membres de la famille Rel. (Grilli *et al.*, 1993).

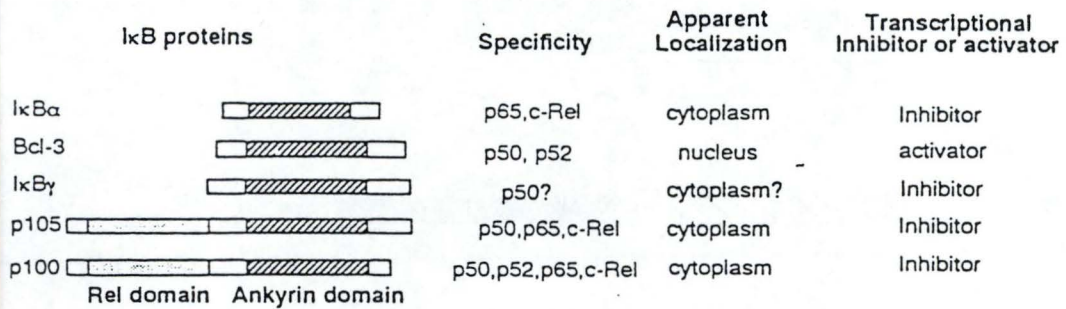


Figure I.34. : Membres de la famille IκB. (Grilli *et al.*, 1993).

3.2.1. FAMILLES NF- κ B/rel ET I κ B.

Le facteur de transcription NF- κ B sous sa forme active est formé de deux sous-unités, appelées p50 et p65, correspondant respectivement à 2 polypeptides de 50 et 65 kDa.

La forme inactive du facteur NF- κ B peut être séquestrée dans le cytoplasme de deux manières, comme l'indique la figure I.30.

- soit en liant une sous-unité inhibitrice, nommée I κ B, qui, par sa liaison, maintient le complexe protéinique dans le cytoplasme. La fixation de certains ligands sur leur récepteur membranaire induit un processus qui provoque l'activation de NF- κ B, vraisemblablement par phosphorylation puis protéolyse (voir point 3.2.3.).

- soit il ne s'agit pas de la sous-unité p50 elle-même qui est associée à p65 mais bien son de précurseur, p105 (voir figure I.30.). Celui-ci contient dans sa partie NH₂-terminale le polypeptide correspondant à p50, tandis que l'autre extrémité de p105 présente une structure proche de I κ B (Neumann, Tsapos et al. 1992; Rice, MacKichan et al. 1992). Certains stimuli cellulaires sont capables d'induire le clivage de p105 et par conséquent l'activation du facteur NF- κ B (figure I.31.).

Le facteur ainsi libéré migre vers le noyau et se fixe sur sa séquence-cible (-GGGGACTTCC-). Il est donc susceptible de stimuler la transcription des gènes possédant cette séquence cible dans leur promoteur.

Les clonages de p50 et p65 ont montré de fortes homologues avec le proto-oncogène *c-rel* (dont l'homologue viral *v-rel* induit des lymphomes chez les gallinacées), ainsi qu'avec la protéine "dorsal" qui est impliquée dans le développement de la Drosophile (Blank, Kourilsky et al. 1992).

On considère actuellement que toutes ces protéines font partie de la même famille NF- κ B/rel. Les sous-unités p65 et p50 ainsi que son précurseur p105 appartiennent bien sûr à cette famille, mais aussi d'autres sous-unités telles que *c-rel*, *relB*, *dorsal*, *p49*, *p52* et *p100* (cette dernière étant le précurseur de *p52*, aussi appelé *lyt-10*). Les différents membres de cette famille sont représentés à la figure I.32., avec leurs principaux domaines structuraux et leurs domaines d'homologies. Ils semblent tous provenir d'un ancêtre commun, *rel*, qui a d'ailleurs donné son nom à cette famille (figure I.33.).

La famille I κ B inclut également plusieurs protéines modulatrices du facteur NF- κ B, dont I κ B α , β et γ encore appelée CTR (pour "carboxy-terminal region" de p105), le proto-oncogène *Bcl-3* et le gène *cactus* de la Drosophile. Ce dernier est défini comme le régulateur négatif de la protéine Dorsal (figure I.34.)(Beg and Baldwin Jr. 1993).

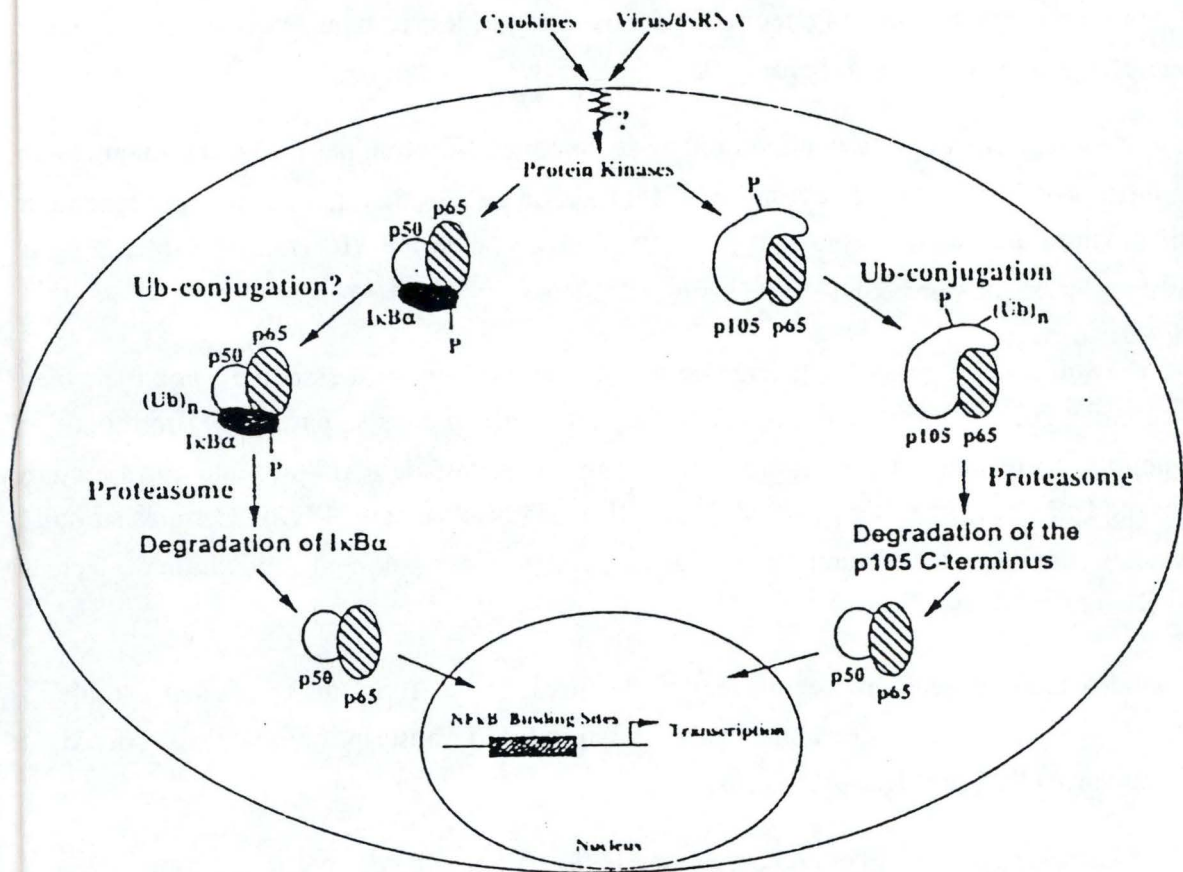


Figure I.35. : Rôle du protéasome dans l'activation du NF-κB. (Palombella, 1994).

Table 4. DNA-binding specificity and transcriptional activity of NF- κ B/rel proteins

Complex	Binding sites*	Binding sites†	Transcriptional activation	Reference
p50/p65	IL-2 IL-2R IL-6 Urokinase	Ig/HIV IFN- β H2	Ig/HIV IFN- β H2	[43••,46] [47•,48] [49]
p52/p65		Ig/HIV PD H2 IL-2R	Ig/HIV (but not H2, IL-2R and PD)	[6,50] [51]
p50/RelB		Ig/HIV PD	Ig/HIV PD	[7]
p52/RelB		Ig/HIV PD	Ig/HIV (but not PD)	[6]
p52/p50		Ig/HIV PD	No activation	[6]
p50/c-Rel	Ig/HIV			(H-C Liou, D Baltimore, unpublished data) [45]
p52/c-Rel	IL-2R			[52]
p65/c-Rel	Urokinase			[46]
(p50) ₂	Ig/HIV IL-2 IL-2R	Ig/HIV IFN- β H2	H2, Ig/HIV (but not IFN- β)	[43••,47•]
(p52) ₂		H2 (but not Ig/HIV)	no activation	[5,50] [51]
(p65) ₂	IL-2R	Ig/HIV IFN- β	IFN- β	[45,47•]
Rel ₂		IL-2R IL-6 (but not Ig/HIV)	IL-2R repressor for IL-6	[49,52]
RelB	No homodimer			[7]

*Binding sites were tested by EMSA only; †binding sites were tested for both DNA binding and transcription activities. Transcription activities were determined mostly by transfection of reporter constructs with various κ B sites. Studies by Fujita *et al.* were carried out both by transfection and *in vitro* transcription analyses. For κ B site sequences, see Table 5.

Table I.7. : Spécificité de différents dimères de la famille Rel vis-à-vis des promoteurs de plusieurs gènes. La table présente la capacité de liaison à l'ADN (mise en évidence par EMSA) et l'activité transcriptionnelle des complexes dimériques. (Liou et Baltimore, 1993).

Il existe des préférences d'associations entre le facteur et sa sous-unité inhibitrice. $I\kappa B\alpha$, par exemple, inhiberait exclusivement les dimères contenant p65 et c-rel tandis que $I\kappa B\gamma$ et Bcl-3 interagiraient préférentiellement avec p50 et/ou p52 (voir figure I.35.) (Beg and Baldwin Jr. 1993)..

Il est important de noter que les sous-unités de la famille rel sont capables de former non seulement des homodimères mais aussi des hétérodimères en s'associant les unes avec les autres. Cette propriété fournit au système une multitude de combinaisons possibles correspondant chaque fois à un facteur de transcription différent. Les dimères ainsi formés varient à la fois par leurs propriétés transactivatrices et par leur affinité pour des séquences cibles légèrement différentes d'un promoteur à l'autre (Table I.7.).

Cette caractéristique de la famille rel, conjuguée à l'existence de différentes sous-unités inhibitrices $I\kappa B$ permet d'expliquer en partie comment la spécificité d'induction est conservée. En effet, comme nous le verrons au point 3.2.2., le facteur NF- κB est particulièrement pléiotrope, puisque non seulement de très nombreux stimuli sont capables de l'activer, mais il contrôle aussi plusieurs dizaines de gènes différents. Pourtant, seulement un ou quelques gènes répondent spécifiquement à un stimulus précis.

Le facteur NF- κB comprend un domaine RH (pour rel homology) (figure I.32.) dans lequel se trouve le NLS (pour "nuclear localization signal") qui lui permet d'entrer dans le noyau (Boulikas 1994). Ce site NLS est typiquement représenté par une courte suite d'acides aminés basiques. Les sous-unités $I\kappa B$ se lient au facteur NF- κB par le domaine RH, le site NLS serait caché et la translocation dans le noyau rendue impossible. Ceci est illustré pour le précurseur inactif p105 à la figure I.31. Les domaines de type ankyrine à l'extrémité C-terminale du précurseur masquent le NLS et le site de clivage. Le clivage protéolytique libère la sous-unité p50 où le domaine NLS est devenu accessible. Les molécules $I\kappa B$ agiraient de la même manière via leurs domaines répétés de type ankyrine (figure I.34.). Malheureusement, on ne connaît pas encore ni la nature de ces interactions, ni la structure moléculaire impliquée.

Comme le montre la figure I.32., seuls certains membres de la famille rel possèdent un domaine transactivateur. C'est ainsi que les dimères contenant une sous-unité p65 induiront une forte transcription du gène, alors que les homodimères p50/p50 par exemple (aussi appelés KBF-1) n'interagiront pas avec l'ARN polymérase II. Ils auront même tendance à inhiber la transcription du gène, de manière indirecte, en occupant les sites de liaison susceptibles d'être reconnus par des facteurs de transcription positifs, comme l'hétérodimère p50/p65.

3.2.2 ACTIVATION DU FACTEUR NF- κB

Inducer	Cell type	Species	Reference
Lipopolysaccharide	Pre-B (70Z/3; 3-1)	m	Sen and Baltimore, 1986b
	Splenic B	m	Atchison and Perry, 1987
	Fibrosarcoma (WEHI 164)	m	Liu <i>et al.</i> , 1991
	Monocyte/macrophage (mono-mac-6)	h	Gromkowski <i>et al.</i> , 1990 Haas <i>et al.</i> , 1990
Protein synthesis inhibitors	Pre-B (70Z/3)	m	Sen and Baltimore, 1986b
	Splenic B	m	Liu <i>et al.</i> , 1991
Phorbol ester	Pre-B (70Z/3)	m	Sen and Baltimore, 1986b
	T (Jurkat)	h	Sen and Baltimore, 1986b
	HeLa	h	Sen and Baltimore, 1986b
	Splenic B	m	Liu <i>et al.</i> , 1991
	Monocyte/macrophage	h/m	Griffin <i>et al.</i> , 1989
Anti-IgM	Splenic B	m	Marcuzzi <i>et al.</i> , 1989
		m	Liu <i>et al.</i> , 1991
HTLV-1 <i>tax</i>	Plasmacytoma	m	Mauxion <i>et al.</i> , 1991
	T (Jurkat)	h	Leung and Nabel, 1988; and others (see text)
dsRNA	Osteosarcoma (MG63)	h	Visvanathan and Goodbourn, 1989
	HeLa		
	Fibrosarcoma (WEHI 164)	h	Visvanathan and Goodbourn, 1989
	Fibroblast L929	m	Gromkowski <i>et al.</i> , 1990 Lenardo <i>et al.</i> , 1989
TNF- α	Pro-monocytic (U937)	h	Griffin <i>et al.</i> , 1989
	Rat-2 fibroblast	r	Pessara and Koch, 1990
	Myelomonocytic (WEHI 3B)	m	Pessara and Koch, 1990 Osborn <i>et al.</i> , 1989
	T (Jurkat)	h	Gromkowski <i>et al.</i> , 1990
	Fibrosarcoma (WEHI 164)	m	Banerjee <i>et al.</i> , 1989
	Hepatoma (HepG2)	h	
	Erythroleukemia (K562)	h	Meichle <i>et al.</i> , 1990
	Macrophages	m	Collart <i>et al.</i> , 1990
Lymphotoxin	Myelomonocytic	h	Hohmann <i>et al.</i> , 1990a, 1991b
Interleukin-1	T (YT)	h	Freimuth <i>et al.</i> , 1989
	T (Jurkat)	h	Osborn <i>et al.</i> , 1989
	T (EL-4-E1)	m	Novak <i>et al.</i> , 1990
	Foreskin fibroblast	h	Zhang <i>et al.</i> , 1990
Interleukin-1	Hepatoma (HepG2)	h	Nonaka and Huang, 1990
Interleukin-2	T (SPB21)	h	Hazan <i>et al.</i> , 1990

Inducer	Cell type	Species	Reference
Phytohemagglutinin	T (Jurkat)	h	Sen and Baltimore, 1986b
	Pro-monocytic (U937)	h	Liebermann and Baltimore, 1990
Concanavalin A	T (Jurkat)	h	Rattner <i>et al.</i> , 1991
Calcium ionophore	T (EL-4-E1)	m	Novak <i>et al.</i> , 1990
Anti-CD2	Monocytes	h	Bressler <i>et al.</i> , 1991
Anti-CD3	T (AR-5)	m	Jamieson <i>et al.</i> , 1991
	T (SPB21)	h	Hazan <i>et al.</i> , 1990
Anti CD28	T (Jurkat)	h	Verweij <i>et al.</i> , 1991
Anti- $\alpha\beta$ TCR	T (SPB21)	h	Hazan <i>et al.</i> , 1990
Antigen	T (SPB21)	h	Hazan <i>et al.</i> , 1990
	T (A-E7)	m	Kang <i>et al.</i> , 1992a
c-AMP	Pre-B (70Z/3)	m	Shirakawa <i>et al.</i> , 1989
UV light	HeLa	h	Stein <i>et al.</i> , 1989a; b
4-Nitroquinoline oxide	HeLa	h	Stein <i>et al.</i> , 1989a
H ₂ O ₂	T (Jurkat)	h	Schreck <i>et al.</i> , 1991
<i>Theileria parva</i> (parasite)	T cells	b	Ivanov <i>et al.</i> , 1989
Serum	BALB/c 3T3	m	Baldwin <i>et al.</i> , 1991
Okadaic acid	T (Jurkat)	h	Thevenin <i>et al.</i> , 1990
Viruses			
	CMV	T (Jurkat) or HF (foreskin)	h
Adenovirus	Fibroblast (3T3)	m	Shurman <i>et al.</i> , 1989
	Cervical carcinoma (HeLa)	h	Nielsen <i>et al.</i> , 1991
Hepatitis B	Hepatocyte (HepG2)	h	Twu <i>et al.</i> , 1989a; Faktor and Shawi, 1990
Sendai	Fibroblast (L929)	m	Lenardo <i>et al.</i> , 1989
Herpes simplex, type 1	T (Jurkat)	h	Gimble <i>et al.</i> , 1988
Human herpes virus, type VI	T (Molt3)	h	Ensoli <i>et al.</i> , 1989

Table I.8. : Agents inducteurs du facteur NF- κ B (Grilli *et al.*, 1993).

Le facteur NF- κ B a une activité constitutive dans les lymphocytes B matures et les neurones (Sen and Baltimore 1986; Kaltschmidt, Kaltschmidt et al. 1994), mais il serait induit dans la plupart des types cellulaires par différents agents présentés à la table I.8.

Les mécanismes moléculaires aboutissant à la libération de la sous-unité inhibitrice restent largement méconnus.

3.2.2.1. MECANISMES MOLECULAIRES D'ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B

A. *In vitro*.

Deux phénomènes semblent devoir fonctionner de manière concertée : une phosphorylation et une protéolyse de I κ B ou du précurseur p105 (Henkel, Machleidt et al. 1993).

La (ou les) kinase(s) impliquée(s) dans la transduction du signal de l'IL-1 n'est (ne sont) toujours pas clairement identifiée(s). *In vitro*, Ghosh et Baltimore ont montré qu'ils pouvaient induire l'activation du facteur NF- κ B en ajoutant au complexe NF- κ B/I κ B partiellement purifié des protéines kinases purifiées telles que la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase AMPc dépendante (PKA) ou encore une protéine kinase eIF-2 hème régulée (HRI) (Ghosh and Baltimore 1990). Ils ont ensuite montré par purification que c'était effectivement la sous-unité I κ B qui était phosphorylée. Notons cependant que la PKC et la HRI peuvent également phosphoryler la sous-unité I κ B purifiée, contrairement à la PKA. La caséine kinase II (CK-II), par contre, n'induit pas d'activation du facteur NF- κ B.

Ces résultats n'ont cependant pas toujours été confirmés ultérieurement lorsqu'on a travaillé sur des cultures cellulaires. Ces conditions expérimentales correspondent à ce que nous appellerons "*in vivo*", c'est-à-dire non plus sur les protéines plus ou moins purifiées, mais dans des cellules ou dans des extraits cellulaires totaux.

B. In vivo.

B.1. Implication de la PKC dans l'activation du facteur NF- κ B.

Meichle et ses collaborateurs (Meichle, Schütze et al. 1990) n'ont pas pu mettre en évidence de blocage de l'activation du facteur NF- κ B activé par le TNF α , en utilisant des inhibiteurs de la PKC, alors que le TNF α active effectivement la PKC dans les lignées lymphocytaires Jurkat et K562. Par contre, si le facteur est activé par le PMA (phorbol-12-myristate-acetate), alors ces mêmes inhibiteurs de PKC bloquent l'activation du facteur de transcription.

En travaillant sur des fibroblastes NIH 3T3, l'équipe de Diaz-Meco (Diaz-Meco, Municio et al. 1993) a montré que le rôle des isoformes de la PKC sensibles au PMA n'est pas évident *in vivo*, mais qu'une isoforme de la PKC insensible au PMA, la PKC ζ , intervient dans l'activation du facteur NF- κ B par la protéine ras p21. Cette affirmation est étayée par les arguments suivants : d'une part, la surexpression de la PKC ζ peut à elle seule activer le facteur, et d'autre part, la transfection de ces fibroblastes par un mutant négatif de la PKC ζ inhibe l'activation du facteur.

D'après ces résultats, il semble donc qu'*in vivo* la PKC puisse médier l'activation du facteur NF- κ B seulement dans le cas de certains stimuli. D'autre part, plusieurs voies d'activation différentes peuvent, dans un même type cellulaire, déclencher l'activation du facteur NF- κ B. Enfin, il semble qu'il faille opérer des distinctions entre les différentes isoformes de la PKC.

B.2. Implication des MAP kinases dans l'activation du facteur NF- κ B.

D'après Li et ses collaborateurs, Raf-1 aurait un effet activateur sur NF- κ B *in vivo*. En effet, des cellules transfectées avec un gène mutant dominant positif codant pour la kinase Raf-1, présentent une forte activation du facteur NF- κ B (Li and Sedivy 1993). Ils ont également montré *in vitro* que Raf-1 phosphorylait I κ B.

En utilisant un mutant dominant négatif de Raf-1, d'autres équipes ont montré que Raf-1 est impliqué dans l'activation du facteur NF- κ B (Finco and Baldwin 1993).

B.3. Implication des PKA dans l'activation du facteur NF- κ B.

En ce qui concerne la PKA, Muroi et Suzuki ont montré qu'elle était impliquée dans la voie d'activation du facteur par les lipopolysaccharides (LPS) dans les cellules d'une lignée macrophagique murine (J774). En effet, l'activation du facteur NF- κ B par les LPS est bloquée par un inhibiteur de la PKA (H89) mais pas par un inhibiteur de la PKC (H7). De plus, le prétraitement de ces cellules avec le dibutyryl AMPc, la forskoline, la PGE₂ ou la toxine du choléra augmente l'activation du facteur NF- κ B induite par les LPS (Muroi and Suzuki 1993).

Mais si la phosphorylation de I κ B joue indéniablement un rôle dans l'activation du facteur NF- κ B, on sait également qu'une étape protéolytique semble impliquée (Henkel, Machleidt et al. 1993)

B.4. Importance de la protéolyse dans l'activation de facteur NF- κ B

La protéolyse d'I κ B a reçu un éclairage nouveau avec les données récentes de Palombella (Palombella, Rando et al. 1994). Les protéasomes joueraient un rôle essentiel dans l'activation du facteur NF- κ B suivant deux mécanismes distincts montrés à la figure I.35. Le premier est l'induction de la dégradation d'I κ Ba liée à l'hétérodimère p50/p65, ce qui permet au facteur de migrer dans le noyau. Une fois phosphorylée, I κ B serait ubiquitinée, ce qui la marquerait comme cible à digérer par le protéasome. I κ B étant dégradée, le dimère p50/p65 devient actif, passe dans le noyau et exerce son activité transactivatrice. Le second consiste en l'activation de l'hétérodimère p105/p65 par la protéolyse de p105. La région carboxy-terminale de p105 peut effectivement être dégradée par le protéasome, générant une sous-unité p50 (voir point 3.2.1.) Ces auteurs ont montré que l'activation du facteur NF- κ B requérait le protéasome 26S (fonctionnant de manière ATP-dépendante) et la formation d'une chaîne d'ubiquitines sur la sous-unité à dégrader. De plus, des inhibiteurs spécifiques du protéasome bloquent cette activation (Henkel, Machleidt et al. 1993). D'après ces résultats, la protéolyse semble indispensable à l'activation du NF- κ B, de manière conjuguée aux phosphorylations (Henkel, Machleidt et al. 1993).

Condition	Class	Concentration range used	Incubation period
<i>Activating:</i>			
Hydrogen peroxide	Peroxide	30-150 μM	1-2 h
Butyl peroxide	Peroxide	300 μM	1 h
<i>Not Activating:</i>			
Paraquat	O_2^- generating	0.1 μM -5 mM	3.5 h, 18 h
Doxorubicin	O_2^- generating	10-50 μM	2 h
Mitomycin C	O_2^- generating	1-50 $\mu\text{g/ml}$	2 h
Menadion	O_2^- generating	1-100 μM	2 h
4-Nitroquinolineoxide	DNA damaging	1-50 μM	2 h
1- β -D-arabinofuranosylcytosin (Ara-C)	DNA damaging	0.1-100 μM	2 h
3,3'-(1,4-naphtylidene) dipropionate	Singlett oxygen generating	0.1-8 mM	1 h
Sodium nitroprusside	NO-generating	1-250 μM	1 h
Clofibrate	Peroxisome proliferator	1-1000 μM	18 h
CuSO_4	Chemical stress	100-750 μM	4 h
CdSO_4	Chemical stress	50 μM	4 h
Sodium arsenite	Chemical stress	50 μM	4 h
42°C	Heat shock		1 h

Table I.9. : Effets de différents systèmes générateurs de dérivés actifs de l'oxygène sur l'activation du facteur NF- κ B (Schreck *et al.*, 1991).

Agent	Class	Concentration range tested	Preincubation period	Inhibiting effect on NF- κ B activation
N-Acetyl-L-cysteine	Scavenger (-SH)	0.1-30 mM	2.5 h	++++ (30 mM)
L-Cysteine	Scavenger (-SH)	30-300 μM	1 h	++++ (0.3 mM)
2-Mercaptoethanol	Scavenger (-SH)	14 mM	2.5 h	++++
Glutathione	Scavenger (-SH)	10 mM	2.5 h	++
Pyrrolidine dithiocarbamate	Scavenger (>NCS ₂)	10 μM -5 mM	1-20 h	++++ (100 μM)
Diethyldithiocarbamate	Scavenger (>NCS ₂)	100 μM	1 h	++++
Disulfiram	Scavenger (>NCS ₂)	100 μM	1 h	++++
Butylated hydroxyanisol	Scavenger (non S)	10-400 μM	6 h	+++ (400 μM)
Orthophenanthroline	Metal chelator (Cu)	100 μM	1.5 h	+++
Desferrioxamine	Metal chelator (Fe)	100 μM	17 h	+++
Ebselen (PZ 51)	Se peptide with GSH peroxidase activity	50 μM	2.5 h	++
Diclofenac	cyclooxygenase inhibitor	1-50 μM	1.5 h	-
Diphenylene iodonium	NADPH oxidase inhibitor	1-20 μM	1.5 h	-
Mannitol	OH \cdot scavenger	50 mM	1 h	-
Dimethylsulfoxide	OH \cdot scavenger	280 mM	1 h	-
Tetramethylurea	OH \cdot scavenger	10 mM	1 h	-
N ω -Nitro-L-arginine methylester	NO \cdot synthesis inhibitor	5-10 mM	16 h	-
Quinacrine	PLA ₂ inhibitor	5 μM	2 h	-
Aminobenzamide		10 mM	2 h	++
Sodium orthovanadate		1-1000 μM	1.25 h	+++

Table I.10. : Agents testés comme suppresseurs de l'activation du facteur NF- κ B. (Schreck *et al.*, 1991).

3.2.2.2. ROI ET ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B

A. Arguments généraux

Schreck et Baeuerle (Schreck, Rieber et al. 1991; Meyer, Shreck et al. 1993) ont montré que des ROI (reactive oxygen intermediates) sont impliqués dans l'activation du facteur NF- κ B. Cette observation, qui a ensuite été confirmée par les travaux de nombreuses autres équipes (Meyer, Shreck et al. 1993; Suzuki and Packer 1993) repose essentiellement sur trois types d'arguments :

1°) Tout d'abord, des cellules issues des lignées cellulaires Jurkat ou Hela incubées en présence d'H₂O₂ présentent une forte activation du facteur NF- κ B (Schreck, Rieber et al. 1991; Schreck, Albermann et al. 1992). Notons cependant que cette observation ne se vérifie pas pour tous les types cellulaires (Zor, Ferber et al. 1993; Brennan and O'Neil 1994). De plus, l'activation du facteur NF- κ B par le H₂O₂ nécessite parfois, pour pouvoir être mise en évidence, la présence d'inhibiteurs de phosphatases (Zor, Ferber et al. 1993) comme nous le verrons plus loin.

Les systèmes générateurs d'anions superoxydes, par contre, ne présentent pas l'effet activateur caractéristique des peroxydes comme le montre la Table I.9. L'implication des peroxydes plutôt que celle des superoxydes se confirme lorsque l'on provoque une surexpression de la SOD dans des cellules stimulées par le TNF α : ces cellules présentent une suractivation du facteur NF- κ B alors que l'abondance de SOD implique une diminution des O₂⁻ et une augmentation de H₂O₂ (Schreck, Albermann et al. 1992; Baeuerle 1994). Par contre, si on ajoute de la SOD et de la catalase dans le milieu de culture de cellules pré-B (70Z/3) stimulées par les LPS, le facteur NF- κ B n'est plus activé car l'H₂O₂ produit par la SOD est détruit par la catalase (Schreck, Albermann et al. 1992).

2°) D'autre part, de nombreuses molécules antioxydantes sont capables d'inhiber l'activation du facteur NF- κ B quel que soit le stimulus étudié (pour une revue, (Schreck, Albermann et al. 1992).). La Table I.10. nous indique que ce sont les molécules protégeant les fonctions -SH et les chélateurs de métaux qui seuls inhibent l'activation du facteur NF- κ B, alors que les scavengers des radicaux hydroxyles, par exemple, n'ont pas d'effet.

3°) Enfin, on a montré que les LPS, le TNF α , l'IL-1 et la PMA induisent effectivement la production de ROI dans différents types cellulaires dont les fibroblastes (Meier, Radeke et al. 1989), les cellules pré-B (Schreck, Albermann et al. 1992), etc. ...

B. Hypothèse moléculaire

Imbert et ses collaborateurs ont montré que des tyrosine kinases ainsi que des inhibiteurs de phosphatases pouvaient induire l'activation du facteur NF- κ B dans les lymphocytes T (Imbert, Peyron et al. 1994). Le pervanadate, molécule issue de la réaction entre H₂O₂ et l'orthovanadate, est un puissant inhibiteur de phosphotyrosine phosphatases (PTPases). Le pervanadate inhibe toute activité PTPase cytosolique ou membranaire. A lui seul il peut induire une production d'IL-2, dépendante de l'activation de NF- κ B, qui est fortement amplifiée par une addition de PMA ou d'un anticorps monoclonal anti-CD3. L'activation du NF- κ B est supprimée par exemple par l'herbimycine A, un inhibiteur de tyrosine kinases. Ceci suggère que les phosphorylations par les tyrosine kinases jouent un rôle dans la dissociation du NF- κ B de son inhibiteur I κ B.

Récemment, l'équipe de Schieven (Schieven, Kirihara et al. 1993) a montré que les ROI pourraient activer le facteur NF- κ B par un mécanisme dépendant des tyrosines kinases. En effet, l'herbimycine A (inhibiteur de tyrosines kinases) et la N-acétyl cystéine (NAC) inhibent l'activation du facteur induite par des radiations ou par le H₂O₂, ce qui signifie que ces deux inducteurs activent le facteur NF- κ B à la fois par l'intermédiaire des ROI et des phosphorylations. De plus, le traitement des cellules avec H₂O₂ et le l'orthovanadate, inhibiteur de tyrosine phosphatases conduit à l'activation de p56lck et p59fyn, deux tyrosines kinases. Ces résultats indiquent que les radiations induisent la génération de ROI dont dépend l'activation de tyrosine kinases, elles-mêmes activatrices du facteur NF- κ B.

Menon a également avancé des arguments en faveur d'un lien entre l'action des ROI et celle des tyrosine kinases sur l'activation du facteur. Des inhibiteurs de phosphatases, tels l'acide okadaïque et caniculine A, activent le facteur NF- κ B dans plusieurs lignées cellulaires (cellules Hela, Jurkat, U937,...) mais pas dans des souches non transformées (fibroblastes de poumon humains WI-38 et MRC-5, HUVEC,...) sauf si celles-ci subissent un pré-traitement à l'H₂O₂ ou au BSO (buthionine sulfoximine, inhibiteur de la synthèse de glutathion). Dans les lignées cellulaires, la cystéine qui sert entre autres de précurseur du glutathion) peut inhiber l'activation du NF- κ B induite par l'acide okadaïque (Menon, Qin et al. 1993).

Dernièrement, on a identifié un résidu cystéine sur la PTPase dans les cellules HER14 (Sullivan, Chiu et al. 1994) qui serait susceptible de constituer une cible pour le H₂O₂. L'oxydation de ce site pourrait induire l'inactivation de la PTPase et donc favoriser le maintien

de tyrosines phosphorylées.

Notons qu'une coopération entre ROI et phosphorylations a déjà été mise en évidence pour des cellules Fao où le H_2O_2 et l' orthovanadate induisent fortement une activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline (Heffetz and Zick 1989).

Le niveau de phosphorylation des tyrosines dans la cellule résulte d'un équilibre entre kinases et phosphatases. Le H_2O_2 pourrait perturber ce rapport et provoquerait l'activation des kinases tout en inhibant des phosphatases. De cette manière, l' H_2O_2 pourrait agir indirectement sur I κ B qui, une fois phosphorylée, subirait une protéolyse.

4. OBJECTIFS DU MEMOIRE.

Comme nous venons de le voir, la transduction du signal émis par l'IL-1 n'est pas définie de manière universelle. Il semble en effet que toutes les voies de transduction du signal connues puissent être empruntées par le signal IL-1, le choix des voies utilisées dépendant fortement du type cellulaire étudié.

Parmi toutes ces voies de transduction, nous nous sommes intéressés à la plus récente, celle des dérivés actifs de l'oxygène (ROI), et particulièrement à un facteur de transcription auquel aboutit cette voie : le facteur NF- κ B.

Du chapitre introductif consacré au facteur de transcription NF- κ B, il ressort que le mode d'activation de ce facteur, bien que largement hypothétique, peut lui aussi varier en fonction du type cellulaire étudié, mais également suivant le stimulus utilisé. Cependant, les ROI semblent clairement impliqués dans l'activation du facteur NF- κ B, du moins dans tous les cas décrits jusqu'à présent. En effet, d'après les données de la littérature, non seulement le facteur NF- κ B peut être activé par des peroxydes, mais surtout, son activation peut être bloquée par des espèces antioxydantes ajoutées de manière exogène.

Le but de ce travail est d'établir si, en jouant sur l'activité d'enzymes antioxydantes, il est possible de moduler le potentiel rédox intracellulaire de manière à modifier l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1. Pour ce faire, nous allons procéder en deux étapes :

- Nous allons tout d'abord induire une diminution du potentiel rédox de la cellule en utilisant des inhibiteurs relativement spécifiques des enzymes antioxydantes suivantes : catalase, glutathion réductase et glutathion peroxydase. L'effet de ces inhibiteurs d'enzymes sera testé sur l'activation du facteur NF- κ B ainsi que sur la libération d'interleukine-6, dont le gène est sous la dépendance du facteur.

- Dans un deuxième temps, nous comparerons le comportement de fibroblastes WI-38 VA13 avec celui de fibroblastes transfectés avec le gène de la glutathion peroxydase, toujours vis-à-vis de l'activation du facteur NF- κ B et de la libération d'IL-6. Nous nous attendons donc à moduler ainsi l'activation du facteur, ainsi que l'expression de l'IL-6 qu'il régule.

En utilisant les inhibiteurs d'enzymes antioxydantes, on diminue les défenses de la cellule entre autre contre les ROI. Ceux-ci devraient donc favoriser l'activation du facteur dans les cellules stimulées à l'IL-1, ainsi que l'expression des gènes qu'il régule, dont le gène codant pour l'IL-6.

Par contre, en utilisant les fibroblastes transfectés avec le gène de la glutathion peroxydase, on augmente les défenses de la cellule contre les ROI. Lorsque ces cellules sont

stimulées par l'IL-1, elles sont surprotégées vis-à-vis des ROI induits par elle et on peut s'attendre à une moindre activation du facteur et à une diminution de l'expression du gène de l'IL-6.

II. Matériels et méthodes

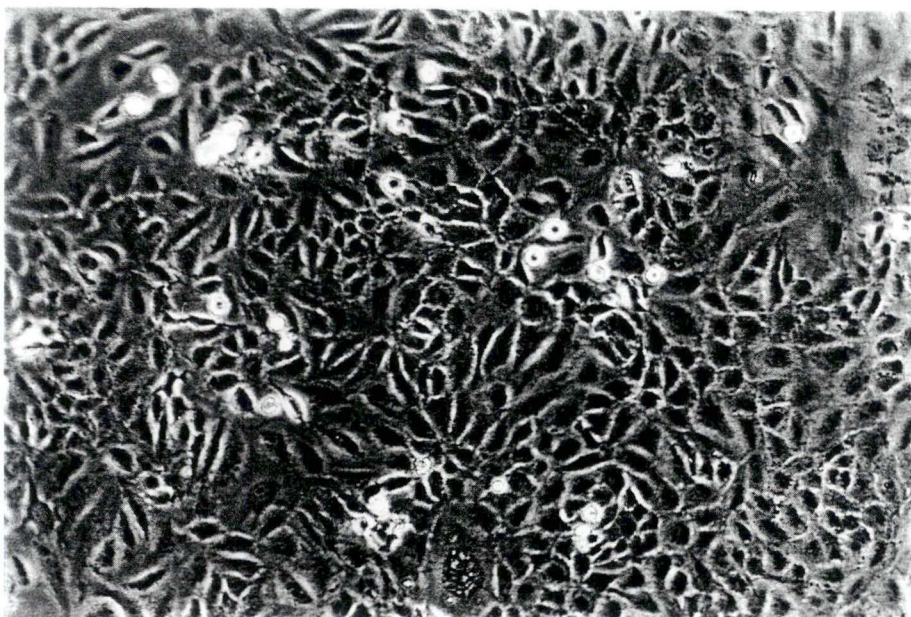


Figure II.1. : Photographie de cellules WI-38 VA13 prises au microscope optique.

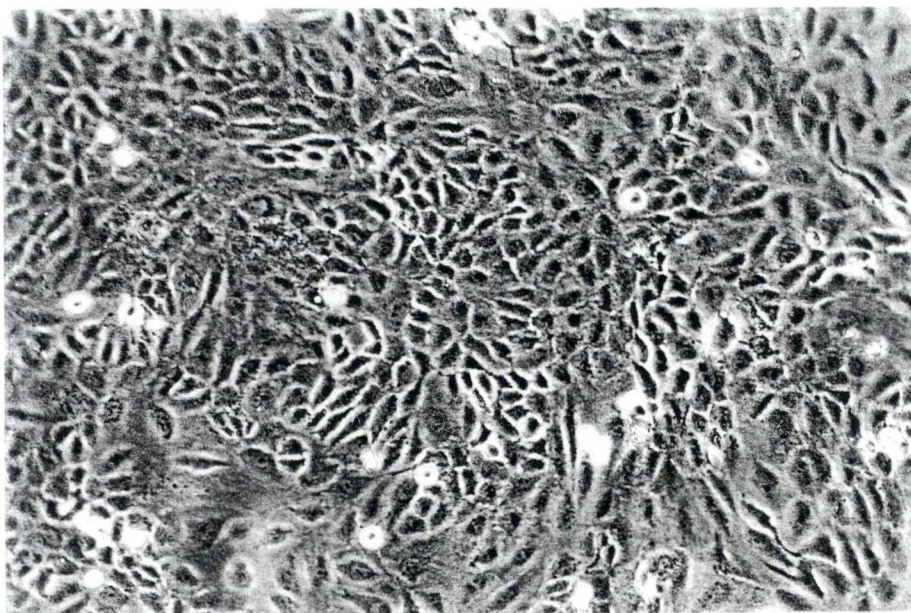


Figure II.2. : Photographie de cellules WI-38 MT08 prises au microscope optique.

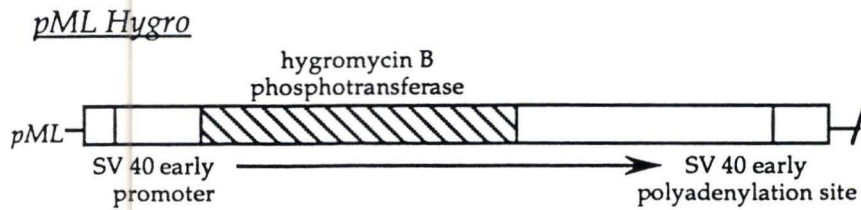


Fig. II.3. Représentation schématique du plasmide pML Hygro (d'après Mirault *et al.*, 1991).

Le plasmide pML Hygro renferme un marqueur génique conférant la résistance à l'hygromycine B pour la sélection dans des cellules eucaryotes, ainsi qu'un site multiple de clonage pour l'insertion d'ADN étranger.

pML Hygro HCMV-GPx

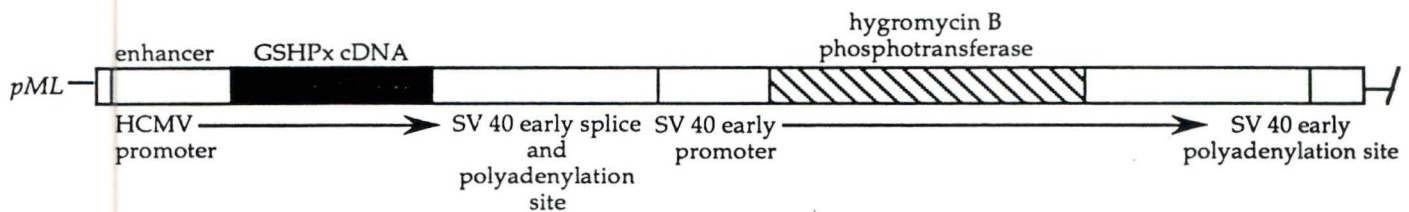


Fig. II.4. Représentation schématique du plasmide pML Hygro HCMV-GPx (d'après Mirault *et al.*, 1991).

Le plasmide pML Hygro HCMV-GPx est le résultat d'une triple recombinaison entre HCMV, l'ADNc de la glutathion peroxydase humaine et une partie de l'ADN de SV40 ("early promoter") inséré dans le site multiple de clonage de pML Hygro dans la même orientation que le gène de l'hygromycine B phosphotransférase.

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1. CELLULES :

Les cellules WI-38 VA13 (fig.II.1.) sont des fibroblastes pulmonaires humains WI-38 transformés par le virus SV40, elles sont fournies par l'American Type Culture Collection.

Les cellules WI-38 MT08 (fig.II.2) sont issues de la lignée immortelle WI-38 VA13 transfectée avec le gène de la glutathion peroxydase humaine (GPx) intégré dans le plasmide pML-MT-GPx-Hyg⁺(fig.II.4.). Elles nous ont été fournies par le laboratoire du Professeur Mirault, Ste Foy, Québec (Mirault, Tremblay et al. 1991). (Mirault M.-E. 1991)

Le plasmide pML-MT-GPx-Hyg⁺ est dérivé du plasmide pML Hygro, provenant lui même d'un pBR322 modifié, le pML, auquel a été ajoutée la séquence du site multiple de clonage de SPT19 (PvuII-EcoRI) et celle du gène codant pour l'hygromycine B phosphotransférase placée sous le contrôle du promoteur précoce du SV40 (fig.II.3). Ce gène confère la résistance des cellules à l'hygromycine B, un antibiotique qui a servi de marqueur positif de sélection des cellules transfectées. Le plasmide pML-MT-GPx-Hyg⁺ (fig.II.4) est donc le fruit d'une triple recombinaison entre le promoteur de la métallothionéine humaine, l'ADNc de la GPx et une partie de l'ADN du SV40 inséré dans le site multiple de clonage de pML Hygro dans la même orientation que le gène de l'hygromycine B phosphotransférase.

Les cellules WI-38 MT08 ne devraient donc pas présenter en principe une augmentation de leur activité en GPx par rapport aux cellules normales non transfectées, dans des conditions normales de culture, mais bien lorsque l'on ajoute au milieu des métaux lourds pour lesquels le promoteur est sensible.

1.2 SOLUTIONS :

- Trypsine : solution stérile de trypsine à 0,25% dans un tampon Tris (0,4 g/l KCl ; 2,2 g/l NaHCO₃ ; 6,8 g/l NaCl ; 1,0 g/l glucose ; 0,0005 g/l rouge de phénol) (25050-014, Gibco, Grande Bretagne)

- MEM : milieu (Minimum Essentiel Medium) (41200-056, Gibco, G-B).
Avec, pour 5 l : MEM poudre
 - + AA (Acides Aminés) non essentiels pour MEM (11140-035, Gibco, G-B) : 50 ml
 - + vitamines pour MEM (11120-037, Gibco, G-B) : 50 ml
 - + AA pour MEM (043-01135, Gibco, G-B) : 100 ml
 - + NaHCO₃ : 3,6 g
- MEM+Se+SB : milieu MEM avec du Sélénite de Sodium (Na₂SeO₃) à une concentration de 10⁻⁷M et 10% de sérum de veau foetal (Euro Biochem PAA). Il est nécessaire d'ajouter du Se car dans les milieux non enrichis, les quantités en Se sont limitantes pour une activité GPx optimale (Pigeolet, Zachary)
- Milieu de rinçage : MEM
- HLA : solution d'hydrolysate de lactalbumine 10% (Gibco, GB)
- MEM+Se+HLA 0,2% : milieu MEM avec du Sélénite de Sodium (Na₂SeO₃) à une concentration de 10⁻⁷M additionné d'hydrolysate de lactalbumine à 0,2%.

1.3 METHODE :

1.3.1. REPIQUAGE :

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (T 75, Corning, New-York, USA), lorsqu'elles arrivent à confluence, c'est-à-dire à une densité moyenne de 120000 cellules / cm² (9*10⁶ cellules / T75), on les repique.

Les milieux utilisés sont préchauffés à 37°C. On décante l'ancien milieu et l'on rince les cellules avec 10 ml de milieu de rinçage. Après deux minutes, on retire ce milieu et l'on ajoute 2 ml de trypsine que l'on laisse agir durant une à deux minutes à température ambiante. Lorsque les cellules se sont arrondies, la trypsine est décantée et la boîte est placée à 37 °C durant 5 minutes, ce qui va permettre d'accélérer leur détachement de la paroi ; elles apparaissent alors réfringentes au microscope à contraste de phase.

Lorsque la majorité des cellules se sont détachées, on ajoute 10 ml de

MEM+Se+SB : le sérum contenant des inhibiteurs de protéases, la trypsine est inactivée.

On agite alors le milieu avec une pipette Pasteur afin de rompre les agrégats cellulaires et de bien rincer le support sur lequel étaient attachées les cellules.

C'est à ce moment qu'un comptage peut être réalisé en prélevant deux gouttes de la suspension cellulaire et en les déposant dans une chambre de Neubauer (Vel, Belgique).

Le milieu est alors recueilli et centrifugé (1000 rpm, 15 minutes, Hettich universal, Tuttlingen, RFA). Le culot est resuspendu dans du MEM+Se+SB (ou du MEM+Se+HLA pour les expériences réalisées en l'absence de sérum). Les cellules sont alors transférées dans des boîtes de culture de 75 cm², de 25 cm² ou dans des boîtes multi-puits selon les expériences. On ajuste enfin le pH du milieu en ajoutant un mélange gazeux contenant 5 % de CO₂ et 95 % d'air. Les boîtes sont placées dans une étuve à 37 °C. Après quelques jours, un renouvellement du milieu s'impose afin de réapprovisionner les cellules en éléments nutritifs.

1.3.2. CONGELATION ET DECONGELATION DES CELLULES :

1.3.2.1. Congélation :

Les cellules sont rincées et trypsinisées suivant la méthode décrite ci-dessus.

Après centrifugation, on obtient un culot que l'on resuspend dans 0,4 ml de MEM + Se + SB (20 %) + DMSO (5 %). On place alors cette suspension dans une ampoule stérile (Nunc, Danemark).

La congélation est réalisée grâce à un appareil programmable (l'Air Liquide, Liège) qui diminue la température de 1°C par minute. L'ampoule contenant les cellules est stockée dans de l'azote liquide à -196 °C.

1.3.2.2. Décongélation :

L'ampoule avec les cellules stockée dans de l'azote liquide est immédiatement plongée dans un bain à 40 C°.

Une fois décongelées, les cellules sont directement centrifugées pendant 15 minutes à 1000 rpm (Hettich Universal).

Le surnageant est éliminé tandis que le culot est resuspendu dans du MEM+Se+SB avant d'être transféré dans une boîte de culture.

2. TESTS DE CYTOTOXICITE

Tout au long de nos expériences, nous avons fréquemment utilisé des molécules dont nous avons voulu vérifier la non-toxicité sur notre modèle cellulaire. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests au bromure d'éthidium et l'acridine orange (des tests préliminaires avec la méthode classique au MTT ayant montré des interférences avec nos molécules).

Les molécules pour lesquelles nous avons évalué la cytotoxicité sont :

- le pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)
- le N-acétyl cystéine (NAC)
- le mercaptosuccinate (MS)
- l'aminotriazole (ATA)
- la bischloroéthylnitrosourée.(BCNU)

2.1 MATERIEL :

- Milieu de culture : MEM+Se+HLA.
- PBS : tampon phosphate 10 mM contenant 0,9 % de NaCl et à pH 7,4.

- Solution de coloration : 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma E-8751, Chemical Co, USA) et 15 mg d'acridine orange (Sigma, Chemical Co, USA) sont dissous dans 1 ml d'éthanol à 95 % et 49 ml d'eau. Cette solution est aliquotée en fractions de 1 ml et stockée à - 20 °C. Nous l'utilisons diluée 100 fois dans du PBS : elle se conserve alors un mois à 4 °C et à l'abri de la lumière.
- Boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, New Jersey, USA).
- Microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz).

2.2 METHODE :

Les cellules sont repiquées comme décrit au point 1.3. dans des boîtes de Pétri à raison de 200000 cellules par boîte dans 2 ml de MEM+Se+HLA.

Le lendemain, le milieu est décanté et remplacé par du MEM+Se+HLA contenant la molécule dont nous voulons connaître la cytotoxicité. Les boîtes contrôle ne reçoivent que du milieu seul.

Après un temps bien défini d'incubation, le milieu est décanté et, deux gouttes de la solution de coloration sont déposées dans la boîte de Pétri.

Comme Parks et collaborateurs l'ont décrit en 1979 [Parks, 1979 #3], la méthode est basée sur deux colorants nucléaires : l'acridine orange et le bromure d'éthidium.

L'acridine orange pénètre dans les cellules vivantes et colore leur noyau en vert fluorescent. Par contre, le bromure d'éthidium ne traverse pas la membrane des cellules vivantes, mais colore en orange le noyau des cellules mortes.

Dès que les cellules ont été mises en présence des colorants, on les observe au microscope à fluorescence et on réalise immédiatement un comptage différentiel (cellules vertes et oranges séparément) sur un total de 500 cellules réparties sur l'ensemble de la boîte de Pétri.

Le comptage doit être effectué rapidement, car si on laisse "traîner" les échantillons colorés dans la solution d'acridine orange et de bromure d'éthidium, on constate que le nombre de cellules mortes augmente au cours du temps.

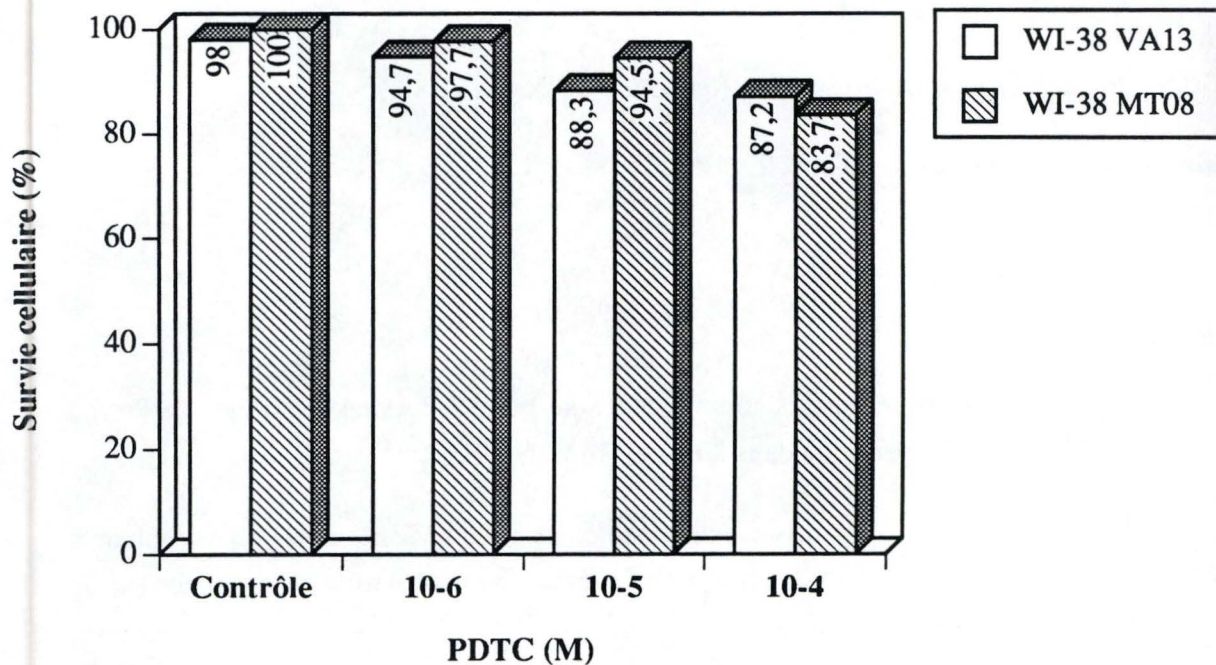
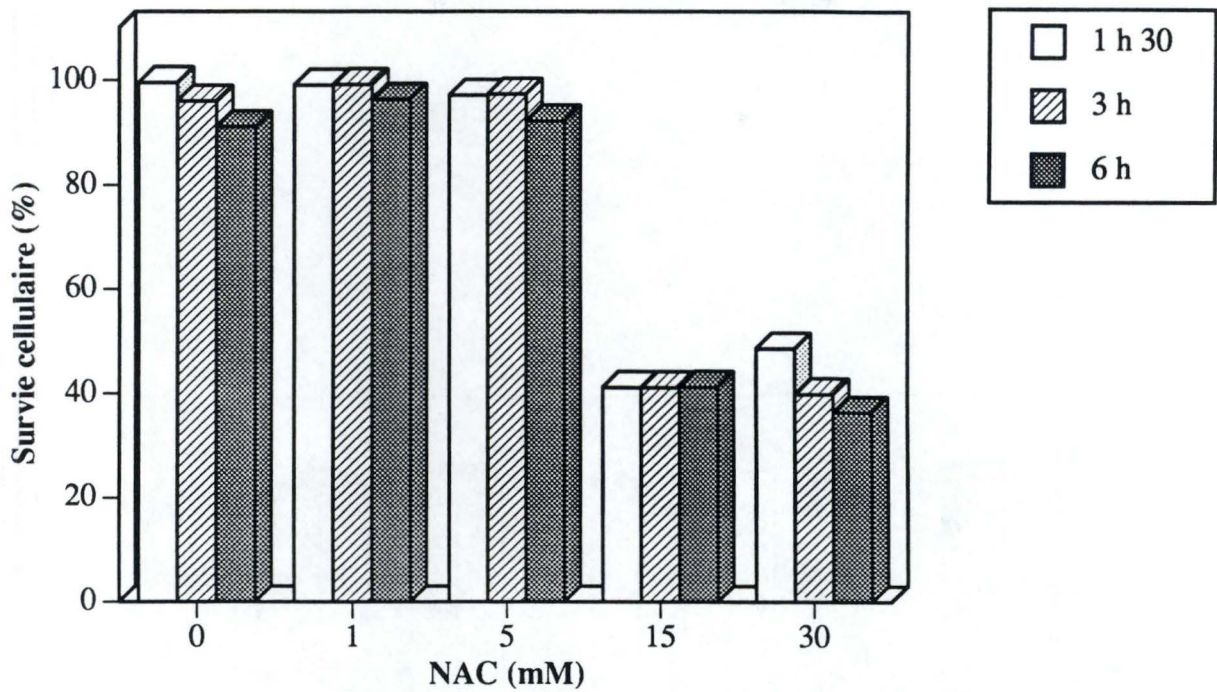


Figure II.5. : Effet du Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) sur la viabilité cellulaire, suivant la méthode à l'acridine orange / bromure d'éthidium (voir point II.2.). Les cellules WI-38 VA13 et WI-38 MT08 ont été incubées durant 6 h en présence de PDTC aux différentes concentrations indiquées. Les comptages cellulaires ont été réalisés sur environ 300 cellules.

A.



B.

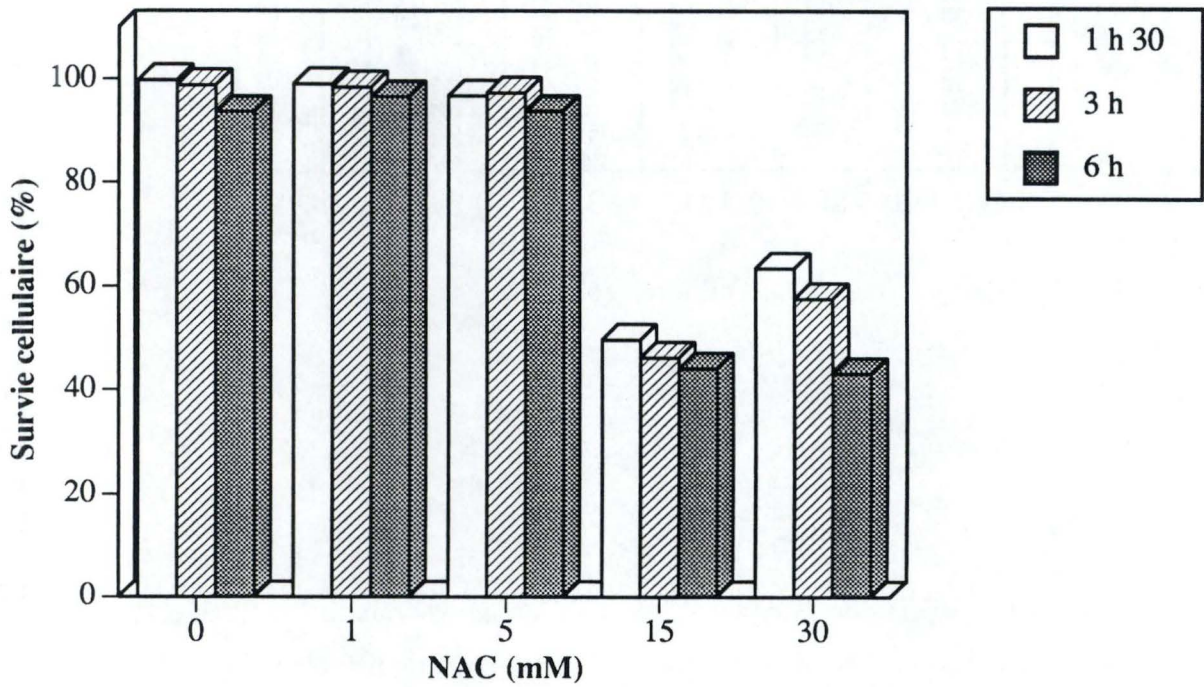


Figure II.6. : Effet de la N-acétyl-cystéine (NAC) sur la viabilité cellulaire, par la méthode de l'acridine orange / bormure d'éthidium (voir point II.2.). Les cellules WI-38 VA13 (A) et WI-38 MT08 (B) ont été incubées durant 1h30, 3h ou 6h en présence de différentes concentrations en NAC. Les comptages de cellules ont été réalisés sur environ 300 cellules.

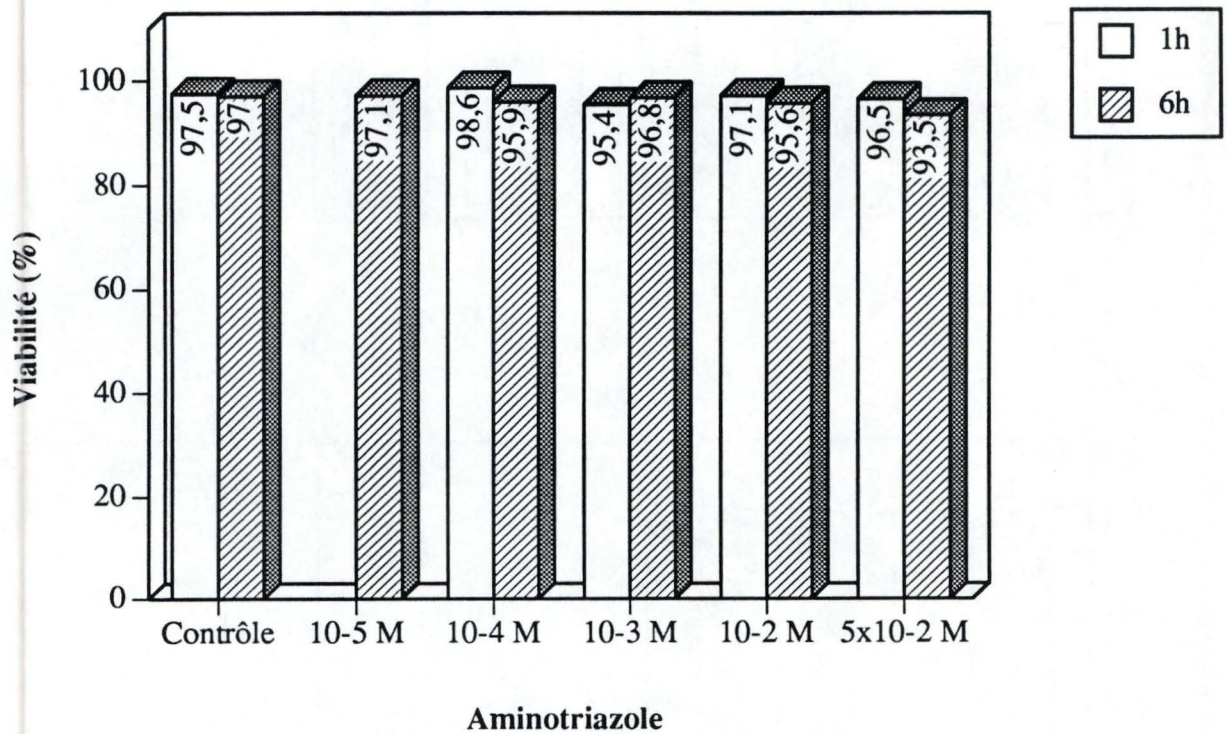


Figure II.7. : Effet de l'aminotriazole (ATA) sur la viabilité cellulaire, établi suivant la méthode à l'acridine orange / bromure d'éthidium (voir point II.2.). Les cellules WI-38 VA13 ont été incubées durant 1 ou 6 heures en présence de différentes concentrations en ATA. Les comptages de cellules ont été effectués sur environ 300 cellules.

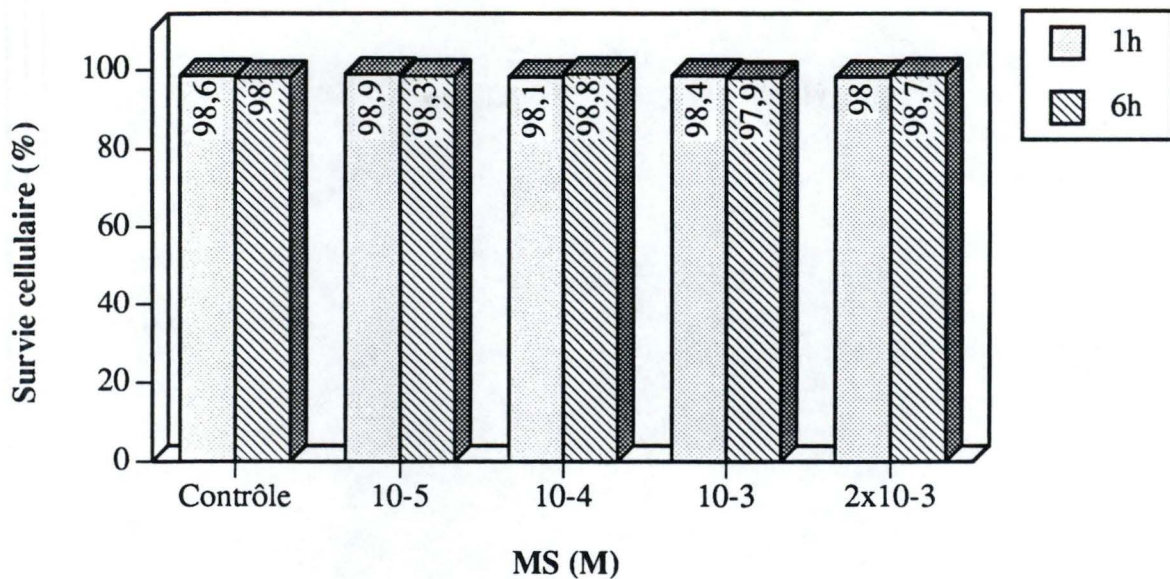


Figure II.8. : Effet du mercaptosuccinate (MS) sur la viabilité cellulaire, établi suivant la méthode à l'acridine orange / bromure d'éthidium (voir point II.2.). Les cellules WI-38 VA13 ont été incubées durant 1 ou 6 heures en présence de différentes concentrations en MS. Les comptages de cellules ont été réalisés sur environ 300 cellules.

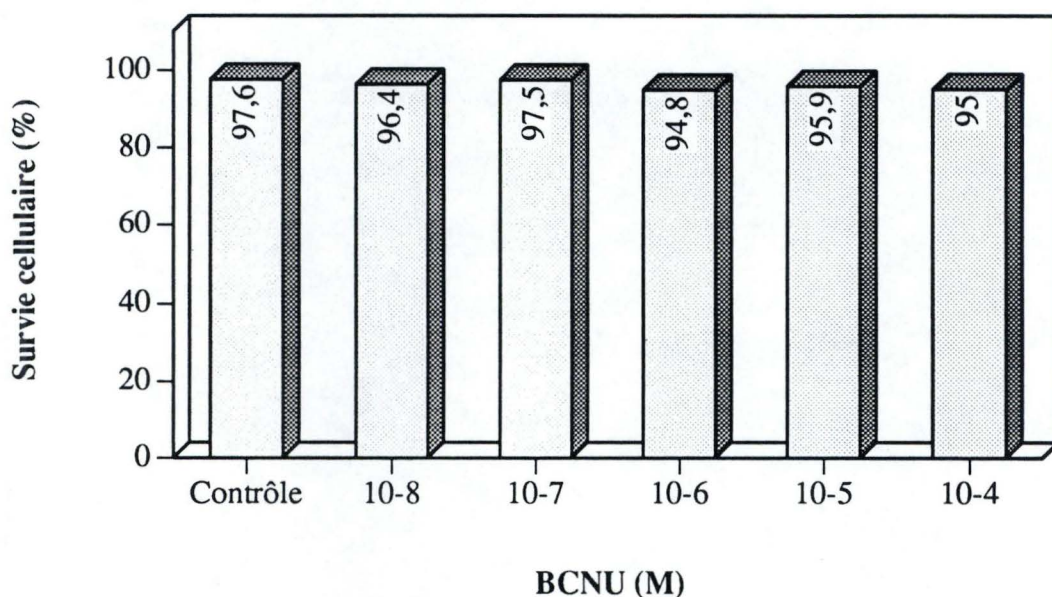


Figure II.9. : Effet de la BCNU sur la viabilité cellulaire, établi suivant la méthode à l'acridine orange / bromure d'éthidium (voir point II.2.). Les cellules WI-38 VA13 ont été incubées durant 6 heures en présence de différentes concentrations en BCNU. Les comptages de cellules ont été réalisés sur environ 300 cellules.

Les résultats sont exprimés comme suit :

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

2.3 RESULTATS :

Le PDTC, le NAC, ainsi que les inhibiteurs d'enzymes antioxydantes ont été testés sur nos deux lignées cellulaires (WI-38 VA13 et WI-38 MT08).

Le PDTC n'entraîne pas de cytotoxicité après 6 heures d'incubation à des concentrations de 10^{-6} M, 10^{-5} M et 10^{-4} M. Plus de 84% de survie pour les WI-38 VA13 et plus de 84% en ce qui concerne les WI-38 MT08 (fig.II.5.). Ces dernières résistent généralement mieux que les WI-38 VA13, ce qui est rassurant lorsque l'on sait que les WI-38 MT08 bénéficient d'une protection accrue par le fait même qu'elles surexpriment la GPx.

Le NAC, par contre, montre une toxicité élevée dès 15 mM après 1h30 d'incubation (fig.II.6.). Nous n'avons donc pas pu l'utiliser dans nos expériences car c'est seulement à des concentrations de 15 mM à 30 mM que le NAC exerce son effet inhibiteur comme l'indiquent Schreck et Baeuerle (1991).

L'ATA ne présente pas de cytotoxicité après 1 heure ou 6 heures avec des concentrations de 10^{-5} à 5.10^{-2} M (fig.II.7.). Il n'y a que 6,5% de mortalité après 6 heures d'incubation à 0,05 M.

Le MS et le BCNU ne créent pas non plus de cytotoxicité après des incubations de 1 ou 6 heure(s) aux concentrations allant de 10^{-7} à 5.10^{-2} M pour le MS et 10^{-8} à 10^{-4} M dans le cas du BCNU (fig.II.8. et II.9.).

Mis à part le NAC (toxique aux concentrations recommandées dans la littérature), nous pouvions d'ores et déjà être assuré qu'un éventuel effet inhibiteur ne pouvait pas être attribué à une mortalité cellulaire.

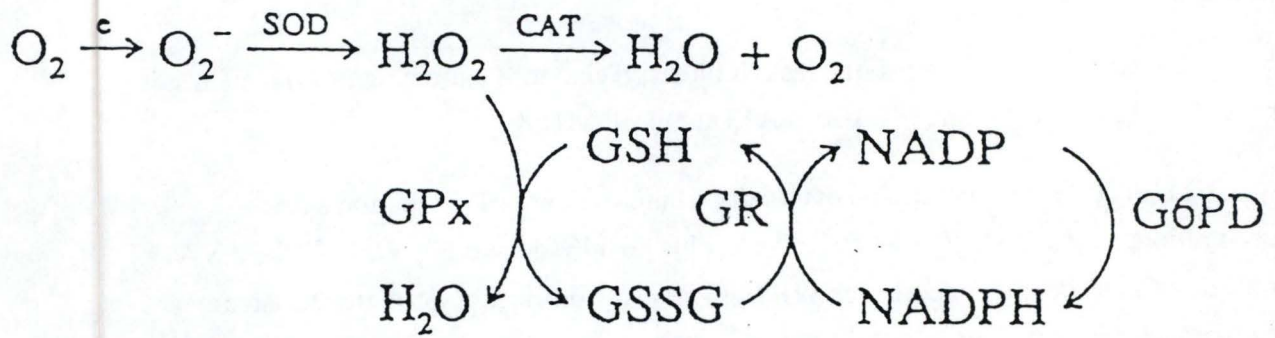


Figure II.10 : Mode d'actions des principales enzymes antioxydantes. (Sun, 1990).

3.DOSAGES ENZYMATIQUES.

Les cellules sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS à 4 °C par boîte T75.

Elles sont ensuite raclées dans 0,5 ml de PBS à 4°C et la boîte est rincée avec la même quantité de PBS. Ces cellules sont ensuite homogénéisées avec un homogénéiseur de Dounce (piston serré). Un dosage protéique est alors réalisé selon la méthode de Bradford (colorant BIO-RAD)(Bradford 1976), ainsi que les dosages enzymatiques suivants.

3.1. DOSAGE DE LA GLUTATHION PEROXIDASE (GPx) :

Ce dosage a été réalisé selon la méthode de Mbemba (Mbemba, Houbion et al. 1985) et améliorée par la suite par Pigeolet (Pigeolet 1990) .

3.1.1. PRINCIPE :

Le terbutylhydroperoxyde est réduit par la glutathion peroxydase en oxydant le glutathion. Celui-ci sera réduit par la glutathion réductase qui oxyde en même temps le NADPH.

C'est la diminution du NADPH suivie à 366 nm qui nous permet d'estimer l'activité (fig.II.10.) de la GPx. (Les constituants soulignés sont ajoutés en excès par rapport à la GPx afin d'en doser la totalité.)

3.1.2. REACTIFS :

- Solution éthanol / eau dans des proportions 1/3 (v/v).
- KH₂PO₄ (Merck) 60 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5.
- NADPH (Sigma N-7505, USA) 1,1 mM dans le KH₂PO₄-EDTA.
- GSH (Sigma G-4251, USA) 13 mM dans la solution éthanol / eau.

- TBHP (terbutylhydroperoxide, Merck, C₄H₁₀O₂) 2,4 mM dans la solution éthanol / eau.
- Glutathion réductase pure 500 U / 1,8 ml (Sigma, USA).
- Triton X-100 : 2 %.
- PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9 M, pH 7,4.
- homogénats cellulaires.

3.1.3. MIXTURE :

On prépare fraîchement avant chaque dosage une mixture conservée à 4 °C contenant :

- 8 ml de KH₂PO₄-EDTA (60 mM, 1 mM).
- 1 ml de NADPH (1,1 mM).
- 1 ml de GSH (13 mM).
- 50 µl de glutathion réductase

3.1.4. METHODE :

Mettre en présence :

- pour les tests et les blancs enzymes (BE) : 0,1 ml d'homogénat cellulaire + 0,1 ml de triton 2 %.
- pour les blancs blancs (BB) et les blancs substrats (BS) : 0,1 ml de PBS froid + 0,1 ml de triton 2 %.

On en prélève 0,1 ml que l'on ajoute à 0,4 ml de mixture.

Incuber 5 minutes afin que le mélange atteigne la température ambiante.

Ajouter 0,1 ml de t-BHP (2,4 mM) pour les tests et les BS, et la réaction enzymatique démarre, ou 0,1 ml du mélange éthanol / eau pour les BB et les BE.

Lire l'absorbance au spectrophotomètre (UVIKON 940, Kontron Instruments, Suède) à 366 nm pendant 2 minutes 30 secondes.

Calculer l'activité :

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\text{DO/min} \times 10 \times 0,6 \times \text{dilution}}{3,39} = (\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1})$$

où : DO/min : (Test - BE) - (BS-BB)

3,39 : coefficient d'extinction micromolaire du NADPH à 366 nm.

0,6 ml : volume total de la cuvette

dilution : dilution de l'échantillon, en l'occurrence 2.

Une unité enzymatique correspond à une μmole de NADPH oxydé / minute à 25 °C.

3.2. DOSAGE DE LA CATALASE :

Ce dosage a été réalisé selon la méthode de Baudhuin (Baudhuin, Beaufays et al. 1964)

3.2.1. PRINCIPE :

Il repose sur la disparition de l' H_2O_2 , suite à l'activité de la catalase. Le complexe formé par l' H_2O_2 non réduit et le TiOsO_4 est lu à 420 nm.

3.2.2. REACTIFS :

- Albumine (Boseral)
- Tampon imidazol HCl 0,2 M, pH 8,0
- H_2O_2 30% (Merck)
- Triton x100 2%

- Oxysulfate de Titane dans H₂SO₄ 2N
(1,7 g d'Oxysulfate de Titane (Riedel, n° 14023, Allemagne) dans 500 ml de H₂SO₄ 2N, faire bouillir 10 minutes sur agitateur, refroidir, porter à 500 ml avec H₂O, ajouter 250 ml d' H₂SO₄ 2N, filtrer sur 4 filtres plissés (whatman n°2)
- Homogénats cellulaires

3.2.3. MIXTURES :

- Mixture blanc (laissée à température ambiante):
 - . 500 mg albumine
 - . 50 ml imidazol
 - . 450 ml H₂O
- Mixture test (laissée à température ambiante) :
 - . 250 ml de mixture blanc
 - . 0,04 ml H₂O₂ 30 %.

3.2.4. METHODE :

On mélange 0,1 ml d'homogénat cellulaire avec 0,1 ml de triton pour les BE et les tests, et 0,1 ml de PBS froid avec 0,1 ml de triton pour les BB et les BS.

De 30 en 30 secondes, on ajoute 5 ml de mixture blanc pour les BE et les BB, tandis que les BS et les tests sont additionnés de 5 ml de mixture test.

Les échantillons sont incubés 45 minutes à température ambiante, fixés avec 3 ml de TiSO₄ (oxysulfate de titane dans H₂SO₄ 2N), et enfin lus à 420 nm (spectrophotomètre PM6, Zeiss, Allemagne).

L'activité se calcule comme suit :

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\log(\text{BS}-\text{BB})}{(\text{T}-\text{BE})} \times \frac{5,2 \times \text{dil.}}{0,1 \times 45 \times 50} = (\text{unité} / \text{ml})$$

où : 5,2 : correspond au volume de la réaction (avant la fixation)

dil. : dilution de l'échantillon

0,1 : représente la quantité d'échantillon ajoutée (en ml)

45 : temps d'incubation (en minutes)

50 : afin de ramener à des unités/ml étant donné que par définition l'unité de catalase est égale à la quantité d'enzyme qui détruit 90 % de H_2O_2 dans 50 ml de substrat par minute.

3.3. DOSAGE DE LA GLUTATHION REDUCTASE :

Ce dosage a été réalisé selon la méthode de Dubler.

3.3.1. PRINCIPE :

Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit en glutathion (GSH) par la glutathion réductase qui oxyde pour ce faire le NADPH (fig. II.10.).

Le dosage est réalisé de telle manière que seule l'enzyme à doser soit limitante. Tous les autres réactifs sont en excès.

3.3.2. REACTIFS :

- KH_2PO_4 (Merck) 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.
- GSSG (Sigma, Chemical Co, USA) 3 mM dans le tampon phosphate.
- NADPH (Sigma N-7505, Chemical Co, USA) 1,1 mM dans le tampon phosphate.
- Triton X-100 2 %.
- Homogénat cellulaire.

3.3.3. MIXTURE : (à 25 °C).

- 1 ml de NADPH 1,1 mM
- 3,3 ml de GSSG 3 mM
- 6,6 ml de tampon KH_2PO_4 / EDTA.

3.3.4. METHODE :

A 0,5 ml de mixture, ajouter dans la cuvette 0,1 ml d'un mélange 1:1 d'homogénat cellulaire et de triton pour les tests et les BE, et 0,1 ml d'un mélange 1:1 de PBS et de triton pour les BS et les BB.

Laisser incuber pendant 2 minutes, et lire à 340 nm à 25 °C (spectrophotomètre PM6, Zeiss, Allemagne).

Calcul de l'activité :

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\text{DO/min} \times 10 \times 0,6 \times \text{dil}}{6,22} = (\mu\text{moles/min/ml})$$

L'activité de la glutathion réductase est, par définition, égale au nombre de μmoles de NADPH oxydé. Soit 1 unité = 1 μmole de NADPH oxydé / min. à 25 °C.

4. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE 6 (IL-6).

4.1. MATERIEL :

- Surnageant cellulaire dilué 2 fois dans du MEM+HLA.
- Kit ELISA (Eurogenetics IL-6 kit) qui contient :
 - . Une plaque multi-puits dont les 96 cupules sont tapissées avec un anticorps monoclonal anti-IL-6.
 - . Solutions standard, prêtes à l'emploi, de 10, 25, 50, 200 et 500 pg d'IL-6 par ml.

- . Standard zéro ou tampon de dilution.
 - . Un échantillon de 1 ng d'IL-6 lyophilisée, à reconstituer dans du milieu de culture par exemple.
 - . Tampon de rinçage : tampon phosphate additionné d'agents antimicrobiens.
 - . Anticorps anti-IL-6 biotinylés.
 - . Streptavidine couplée à l'HRP (peroxydase de raifort).
 - . Solutions de révélation :
 - Solution A : tampon phosphate-citrate contenant de l'H₂O₂.
 - Solution B : solution de tétraméthylbenzidine
 - . Solution stop : acide sulfurique 2 N.
- Lecteur de plaques multi-puits (Bio-rad, USA).

4.2. METHODE :

4.2.1. CULTURE DE CELLULES :

Les cellules WI-38 VA13 et WI-38 MT08 sont repiquées comme décrit au point 1.3.1. à raison de 4000 cellules par 200 µl de MEM+HLA 0,2 % par cupule dans une plaque multi-puits (96 puits, Nunc, Danemark).

Après 24 h, le surnageant est décanté et remplacé par 200 µl de MEM+HLA 0,2 % contenant les molécules à tester (chaque test est réalisé en quadruple). Après incubation à 37°C pendant 6 heures, les surnageants sont prélevés et stockés à -20 °C si nécessaire (d'après Eurogenetics, la congélation n'influence pas le dosage d'IL-6).

4.2.2. PRINCIPE DU DOSAGE ET METHODE :

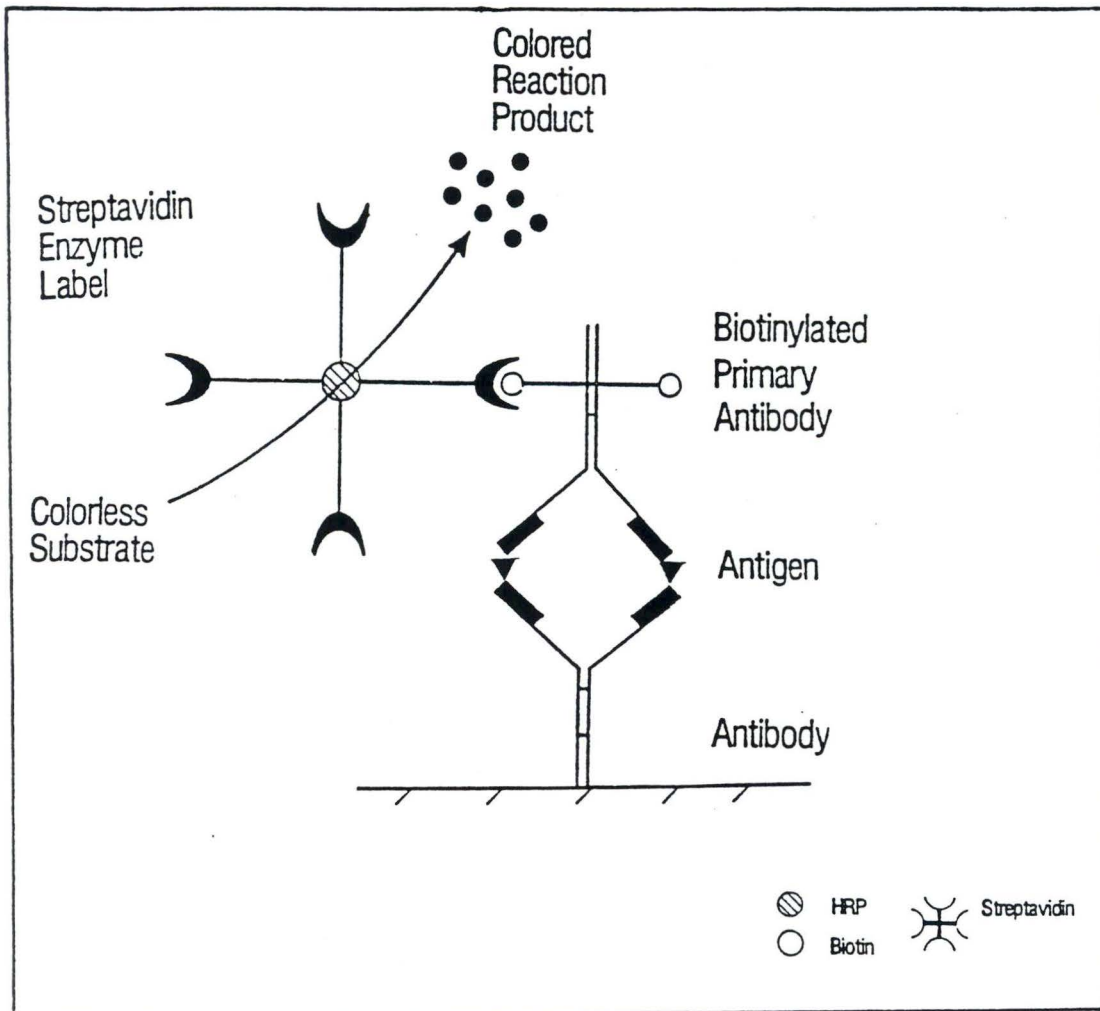
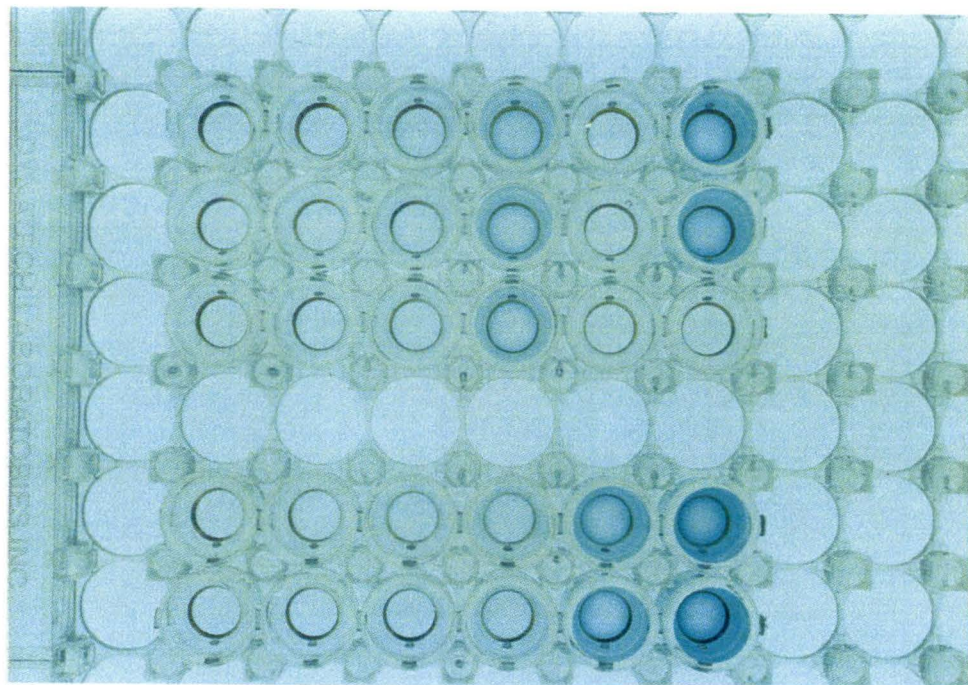


Figure II.11. : Principe du test ELISA tel qu'il est utilisé pour doser l'IL-6 (d'après British Bio-technology limited, OXFORD, Grande-Bretagne).

A



B

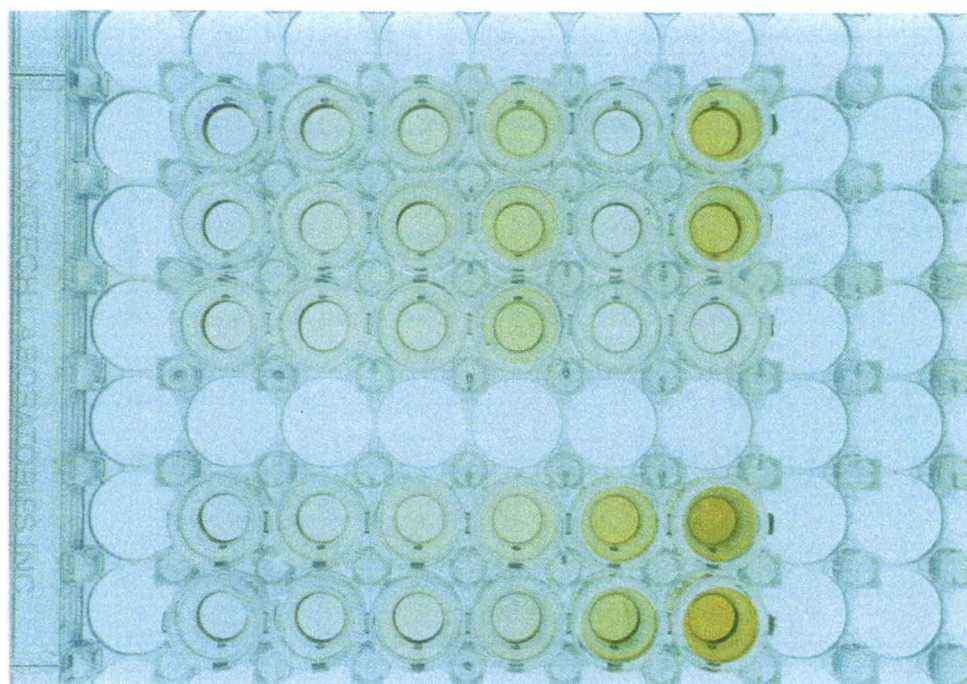


Figure II.12. : Dosage d'IL-6 par la méthode de l'ELISA : l'étape de révélation par l' H_2O_2 et le tétraméthyl-benzidylène colore en bleu les puits contenant de l'IL-6 (A). L'arrêt de la réaction entraîne une transformation de la couleur bleue en jaune (B).

Il s'agit d'un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (fig.II.11.).

Les solutions standard et les surnageants sont placés dans les puits à raison de 100 µl par cupule. On incube alors 20 minutes à 37°C. Pendant cette incubation, l'IL-6 contenue dans les échantillons se lie aux anticorps monoclonaux anti-IL-6 fixés dans les puits. Dans le but d'éliminer toutes les autres molécules présentes dans le surnageant, on procède à 5 rinçages.

Cela fait, on ajoute des anticorps biotinylés anti-IL-6 qui vont s'attacher à l'IL-6 durant les 20 minutes d'incubation à 37°C. Cinq nouveaux rinçages éliminent les anticorps biotinylés en surplus et l'on ajoute la streptavidine-HRP qui va reconnaître la biotine avec une très grande affinité. Après 20 minutes à 37°C, on rince pour enlever l'excédent de streptavidine.

Vient ensuite la révélation à température ambiante en ajoutant du tampon contenant l'H₂O₂ et le tétraméthylbenzidine. Il apparaît alors, au cours du temps, une coloration bleue d'autant plus intense qu'il y a de l'IL-6. (fig II.12.)

La réaction enzymatique est arrêtée au bout de 20 minutes avec de l'acide sulfurique 2N qui transforme la couleur bleue en jaune. La plaque multi-puits est alors vortexée et l'absorbance est lue au lecteur de plaques multi-puits BIO-RAD à 450 nm. La valeur de l'absorbance est transformée en pg d'IL-6/ml de surnageant grâce à une droite d'étalonnage établie lors de chaque test.

5. EMSA.

La technique de l'"Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) permet de mettre en évidence la (non)-liaison d'une protéine avec une séquence génomique.

Un oligonucléotide contenant la séquence cible d'un facteur de transcription est incubé en présence d'un extrait cellulaire avant d'être déposé sur un gel d'électrophorèse.

Si la protéine est présente sous sa forme active dans l'extrait cellulaire, elle se lie à l'ADN marqué et la migration du complexe ADN-protéine formé sera retardée par rapport à

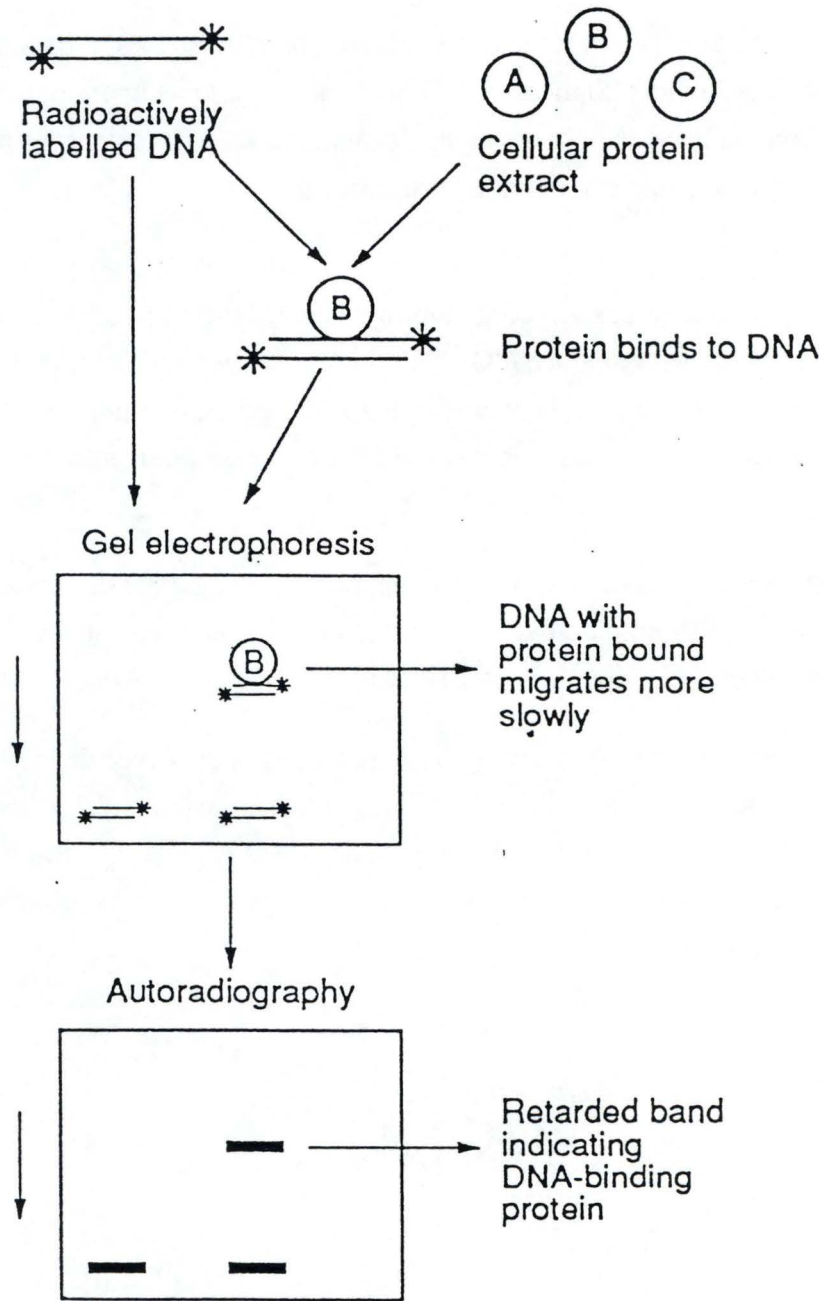


Figure II.13. : Principe de la technique de retard sur gel (electrophoretic mobility shift assay ou EMSA). La liaison du facteur de transcription (B) à l'oligonucléotide marqué au P^{32} cause un retard de migration lors d'une électrophorèse sur un gel natif. Cette bande retardée apparaît sur une autoradiographie.

la migration de la sonde seule (fig.II.13.).

5.1.MATERIELS :

5.1.1.POUR LA STIMULATION DES CELLULES :

- Cellules WI-38 VA13 et WI-38 MT08
- Médiateurs
- PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9%, porté à pH 7,4.

5.1.2.POUR L'EXTRACTION :

- pipettes pasteur
- raclette (Nunc, Danemark)
- Tampon de lyse : . HEPES : 0,02 M, pH 7,5 (Janssen Chimica)
 - . NaCl : 0,35 M (Merck)
 - . Glycérol : 20% (Merck)
 - . NP-40 : 1% (Nonidet P-40, N-6537, Sigma, USA)
 - . MgCl₂ : 1 mM (Merck)
 - . EDTA : 0,5 mM, pH 7,5 (Titriplex, Merck)
 - . EGTA : 0,1 mM, pH 7,5 (E-4378, Sigma, USA)

porter à 100 ml, autoclaver et ajouter la leupeptine :

- . Leupeptin 10 µg / ml (L-2884, Sigma, USA)

avant chaque utilisation ajouter par 5 ml :

- . DTT : 5 μ l / ml (Dithiothréitol, D-8024, Sigma, USA)
- . PMSF : 5 μ l / ml (Pefabloc, n°1429876, Boehringer)
- . Aprotinin : 10 μ l / ml (A-6279, Sigma, USA)

5.1.3. POUR LE MARQUAGE DE LA SONDE :

- Mixture réactionnelle : . Oligo NF- κ B (Proméga E-3291) Il est constitué de 22 paires de bases et reproduit la séquence enhancer de la chaîne légère de cellules B.

5'-AGTTGAGGGGACTTT CCC AGGC-3'
 3'-TCAACT CCC CTGAAAGGGTCC G-5'
 --->1 μ l / 10 μ l

. Kinase buffer (n°1465392, Boehringer) (1 μ l / 10 μ l)
 --->1 μ l / 10 μ l

. H₂O --->6,5 μ l / ml

. Polynucléotide kinase (n°174645, Boehringer)
 (10 u / μ l)

. ATP³² 10 mCi / ml (25 μ l) (Amersham PB 10168)

- EDTA : 0,25 M ; pH 8,0 ; autoclavé

- Spin colonnes : . Gel Sephacryl S-200 (Pharmacia biotech)

. Laine de verre

. Seringues de 1 ml

. Tubes

. Tampon TE : Tris HCl 10 mM, EDTA 1mM ; pH 8,0 ; autoclavé

- Centrifugeuse : Jouan B.311 (Vel, Louvain-La-Neuve)

- Comptage : avec l'Aqua-luma (Lumac, Pays-Bas)

5.1.4. POUR LA LIAISON SONDE-PROTEINE :

- Binding buffer : . HEPES : 0,01 M, pH 7,5 (Janssen Chimica)

. Glycérol : 20% (Merck)

. KCl : 300 mM (Merck)

. DTT : 10 mM (Dithiotréitol, D-8024, Sigma, USA)

- Binding mixture par puits : . H₂O distillée, autoclavée (---> 4 µl)

. Binding buffer (---> 4 µl)

. Poly d (I-C) : (n°108812, Boehringer Mannheim) ressuspendu dans du tampon Tris 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, pour une concentration finale de 1 mg / ml. Cette solution est fractionnée et congelée à -20°C (---> 2 µl). Le Poly d (I-C) permet d'éviter la liaison non spécifique de protéines avec la sonde marquée.

. B.S.A. : Albumine de sérum bovin sans DNAases(B-2518, Sigma, USA) (---> 2 µl) Sa présence empêche la liaison non spécifique entre la sonde et diverses protéines de l'extrait cellulaire.

. Oligo marqué (---> 20000 cpm)

. Extrait protéique (---> 25 µg)

. Bleu de bromophénol 1%
dilué dans du tampon de lyse(---> 1 µl)

Nous avons utilisé la méthode décrite par Urban et Baeuerle (1991) et adaptée par Patestos et Hageman (Gent).

Elle comprend plusieurs étapes :

5.2.1. CULTURE DE CELLULES :

Les cellules sont repiquées dans des boîtes T25 (Cel-Cult, G-B). Lorsqu'elles arrivent à confluence (\pm 3 millions de cellules par T25), elles sont rincées dans 3 ml de MEM +HLA 0,2% pendant 30 minutes afin d'éliminer toute trace de sérum.

Ensuite, on les stimule avec de l'IL-1 β à une concentration de 5 ng/ml, en l'absence et en présence d'inhibiteurs d'enzymes antioxydantes ou de molécules antioxydantes, tandis que d'autres ne reçoivent que ceux-ci et certaines que du MEM+HLA 0,2 %. Avec certaines molécules, un temps de préincubation d'une demi-heure est nécessaire avant la stimulation proprement dite.

5.2.2. EXTRACTION DES PROTEINES :

Après 30 minutes de stimulation, les boîtes sont décantées et rincées deux fois avec du PBS. Les cellules sont alors raclées dans 1,5 ml de PBS froid. La suspension cellulaire est récoltée dans un eppendorf qui est placé dans la centrifugeuse 10 minutes à 1000 rpm. On retire alors le PBS et on resuspend le culot dans 0,1 ml de tampon de lyse (composition donnée au point 5.1.2.). Le culot est resuspendu par une agitation douce. On laisse la réaction se dérouler pendant 10 minutes à 4°C. Les eppendorfs seront alors centrifugés à vitesse maximale (14000 rpm, centrifugeuse Janetski TH12) pendant 20 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récolté et aliquoté. Quelques μ l sont nécessaires pour effectuer un dosage de protéines selon la méthode de Bradford. Les extraits cellulaires sont enfin placés à - 70°C.

5.2.3. MARQUAGE DE LA SONDE :

- Faire chauffer un bain à 37 °C.
- Préparer la mixture réactionnelle (dans l'ordre) et incuber 15 minutes à 37 °C.
- Stopper la réaction en ajoutant 2 µl d'EDTA 0,25 M.
- Ajouter 10 µl d'H₂O distillée autoclavée.
- Purifier sur spin colonne :
 - . enfoncer de la laine de verre au fond de la seringue
 - . couler le gel jusqu'au bord de la seringue
 - . spin : 2 minutes à 2400 rpm
 - . répéter ces deux dernières étapes pour que le gel centrifugé atteigne 1 ml.
 - . vider le tube de son éluat, et y placer un eppendorf décapité
 - . déposer l'échantillon (maximum 50 µl ; compléter avec du TE si nécessaire) au centre de la colonne.
 - . spin.
 - . rincer la colonne avec 50 µl de TE.
 - . spin.
 - . évaluer la quantité de sonde élue à l'aide du Geiger : l'eppendorf doit être plus radioactif que la colonne. Sinon, refaire un spin après rinçage.
(NB : les nucléotides sont éliminés au cinquième spin.)

Lorsque la sonde est marquée, on évalue sa radioactivité à l'aide du compteur à scintillation. Il est conseillé d'utiliser la sonde oligonucléotidique assez rapidement après son marquage car la durée de demi-vie du ³²P n'est que de 14 jours.

5.2.4. LIAISON SONDE-PROTEINES :

- Prélever pour chaque échantillon le volume d'extrait cellulaire correspondant à 25 µg de protéines, et homogénéiser les volumes des différents échantillons en ajoutant du tampon de lyse.

- Rassembler les constituants de la binding mixture de tous les puits (= pool), excepté les protéines (composition donnée au point 5.1.4.).

- Pour chaque électrophorèse, deux puits sont réservés au blanc (contenant un même volume de tampon de lyse que les protéines + la binding mixture) et au p50 (Proméga Lt 08152) une des sous-unités du facteur NF-κB qui nous permet de situer sur le gel le retard attendu avec le facteur. Ajouter à chaque eppendorf de protéines sa part de pool (soit environ 13 µl) et laisser incubé 30 minutes avant d'ajouter, à chaque eppendorf, 1 µl de bleu de bromophénol 1 %.

- Charger les échantillons sur le gel.

5.2.5. ELECTROPHORESE :

- Couler le gel (composition donnée au point 5.1.5.) et le laisser polymériser pendant une heure.

- Placer le gel dans la cuve ainsi que le TBE 0,5 x afin que le gel subisse un pré-run d'une heure 30 à 100 V.

- Déposer les échantillons dans les puits et laisser migrer durant environ 3 heures à 100 V, jusqu'à ce qu'ils atteignent les deux tiers de la hauteur du gel. Le gel est alors démoulé et placé entre un papier Whatman et un papier cellophane afin d'être séché sous vide à 80 °C pendant une heure. Ensuite on dépose le gel dans une cassette (Kodak, KP63375) en présence d'un film MP pré-flashé.

5.2.6. REVELATION DU FILM :

Après deux jours, nous révélons le film en le plaçant 5 minutes dans le révélateur, puis 30 secondes dans de l'eau distillée, et enfin 4 minutes dans le fixateur. Le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

5.2.7. QUANTIFICATION :

Afin de quantifier l'intensité des différentes bandes apparues sur le film, nous utilisons un système d'analyse d'image, le Visage 101 (Millipore, USA). Il est composé principalement d'une caméra haute résolution (1024 x 1024, Videk) et d'un ordinateur doté entre autres du logiciel Whole Band (Millipore, USA). La caméra est calibrée sur une échelle de gris précise et enregistre l'image du film. L'image est traitée par le logiciel qui transforme les différents niveaux de gris (pixels) en densité optique (DO).

Nous délimitons les bandes sur le gel et le logiciel réalise une intégration de la densité optique (IOD) contenue dans la surface déterminée.

REACTIFS UTILISÉS

- **ATA** : 3-amino-1,2,4-triazole (26.4857.73, Janssen chimica, Belgique)
L'ATA est dissout dans du MEM + HLA 0,2 % pour constituer une solution stock de $2 \cdot 10^{-1}$ M.

- **BCNU** : 1,3-bis (2chloroéthyl)-1-nitrosourée (Carmustine (Bicnu), Bristol-Myers Squibbs, Paris).
Le BCNU est dilué dans de l'éthanol absolu pour constituer une solution de $2 \cdot 10^{-2}$ M qui est ensuite redilué 100 x dans du MEM + HLA 0,2 %.

- **IL-1 β** : 1mg est dissout dans 10 ml de MEM + SAB 0,1% (H-7360, Bachem, Bâle, Suisse) fractionné et congelé à -70°C .

- **MS** : Mercaptosuccinic acid (M-3754, Sigma, USA)
Le MS est dissout dans du MEM + HLA 0,2% pour constituer une solution stock de $2 \cdot 10^{-2}$ M.

- **NAC** : N-acétyl-cystéine (A-9165, Sigma, USA)
Le NAC est dissout dans du MEM + HLA 0,2% pour constituer une solution stock de 60 mM.

- **PDTC** : Pyrrolidine dithiocarbamate (P-8765, Sigma, USA)
Le PDTC est dissout dans l'eau distillée, puis dilué 100 fois dans du MEM + HLA 0,2% pour constituer une solution stock de $2 \cdot 10^{-4}$ M.

III. Résultats

pML Hygro HCMV-GPx

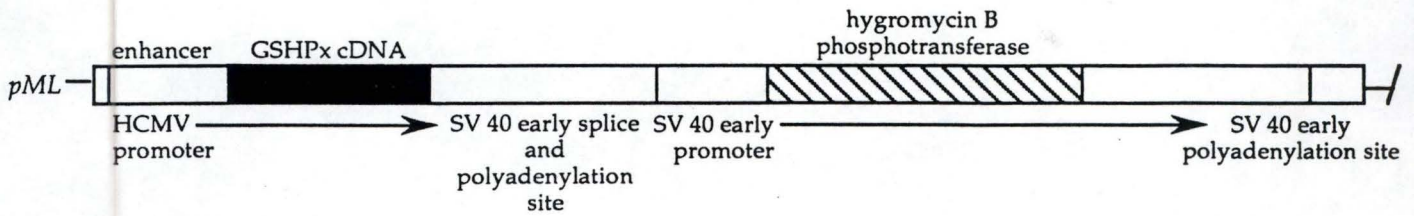


Figure III.1 : Représentation schématique du plasmide pML Hygro HCMV-GPX (Mirault et al., 1991). Le plasmide pML Hygro HCMV-GPX est le résultat d'une triple recombinaison entre HCMV, l'ADNc de la glutathion peroxydase humaine et une partie de l'ADN de SV40 ("early promoter") inséré dans le site multiple de clonage de pML Hygro dans la même orientation que le gène de l'hygromycine B phosphotransférase.

Comme déjà exposé dans le point I.4., le but de ce travail était de voir si une modulation du potentiel antioxydant de la cellule affecterait la transduction du signal IL-1, étant donné que cette cytokine transduirait son signal via des dérivés actifs de l'oxygène (ROI ou Reactive Oxygen Intermediates).

Nous modulerons ce potentiel antioxydant essentiellement de deux manières :

- soit nous le diminuerons, en ayant recours à des inhibiteurs relativement spécifiques de certaines enzymes antioxydantes.
- soit nous l'augmenterons. Dans ce cas, deux approches seront utilisées : d'une part, l'utilisation d'antioxydants exogènes tels que le PDTC ; d'autre part, nous comparerons cellules non transfectées et transfectées avec le gène de la glutathion peroxydase (GPx).

1. CARACTERISATION DES MODELES CELLULAIRES UTILISES DANS CE TRAVAIL.

1.1. ORIGINE DES CELLULES.

La souche de WI-38 VA13 est dérivée de fibroblastes pulmonaires humains WI-38 transformés par le virus SV40 ; elle est fournie par l'American Type Culture Collection (ATCC).

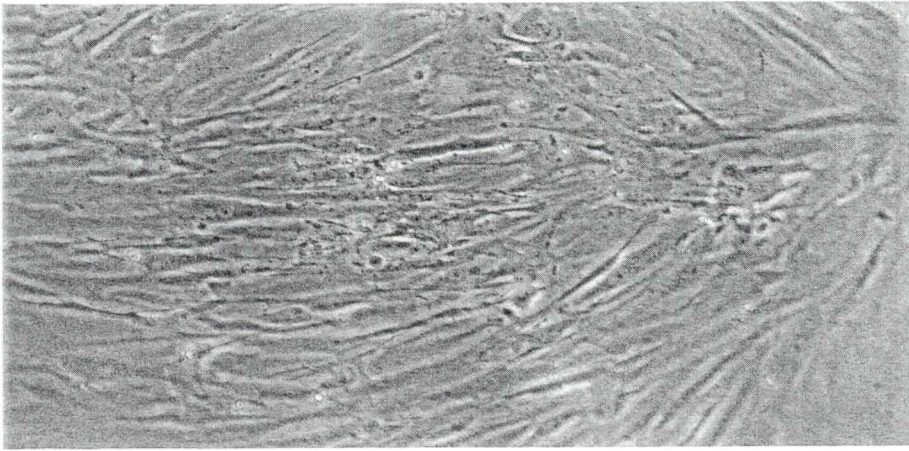
La souche WI-38 MT08 est issue de la lignée immortelle WI-38 VA13 transfectée avec le gène de la glutathion peroxydase humaine (GPx) intégré dans le plasmide pML-MT-GPx-Hyg⁺ dérivé du plasmide pML Hygro HCMV-GPx (figure III.1.) (voir point II.1.1. du matériel et méthode).

1.2. DESCRIPTION DES CELLULES.

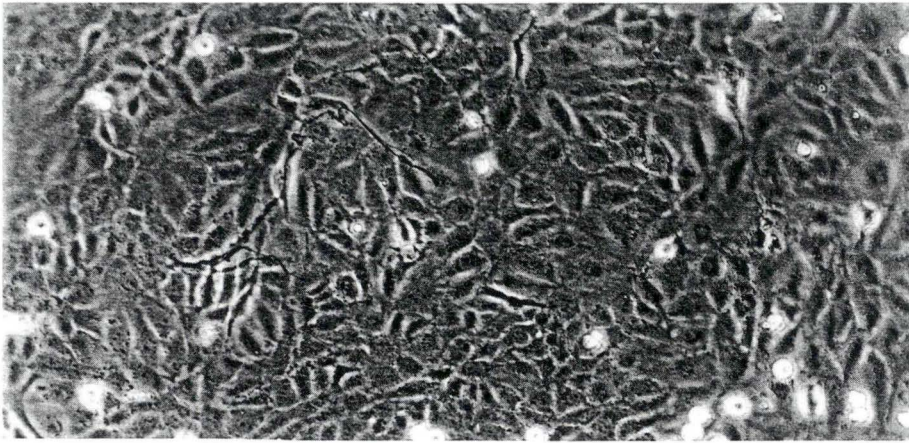
La figure III.2. représente les fibroblastes WI-38 non transformés (A), les fibroblastes WI-38 VA13 (B) et les cellules WI-38 MT08 (C).

On observe une différence morphologique entre les cellules transformées ou non. Les cellules WI-38 sont allongées et effilées tandis que les cellules transformées sont arrondies. Par contre, aucune différence morphologique ne peut être relevée entre les lignées WI-38 VA13 et MT08.

A



B



C

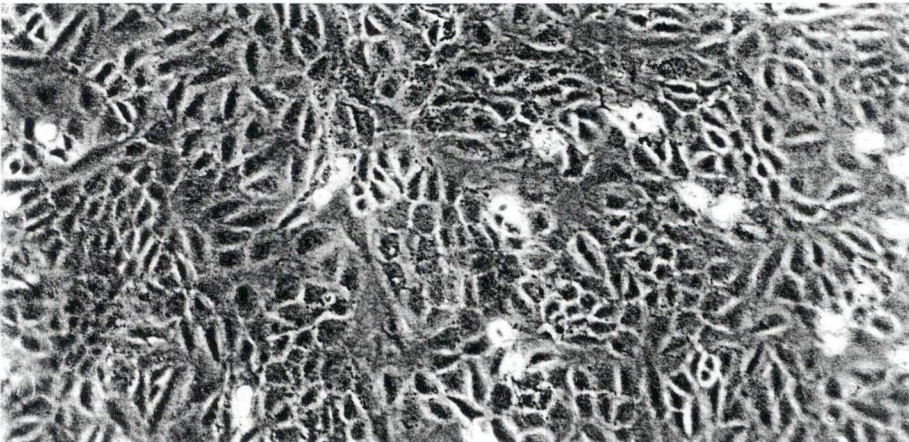


Figure III.2 : La photo A prise en microscopie optique représente les fibroblastes WI-38 transformés. La photo B montre les cellules WI-38 VA13 et la C les cellules WI-38 MT08.

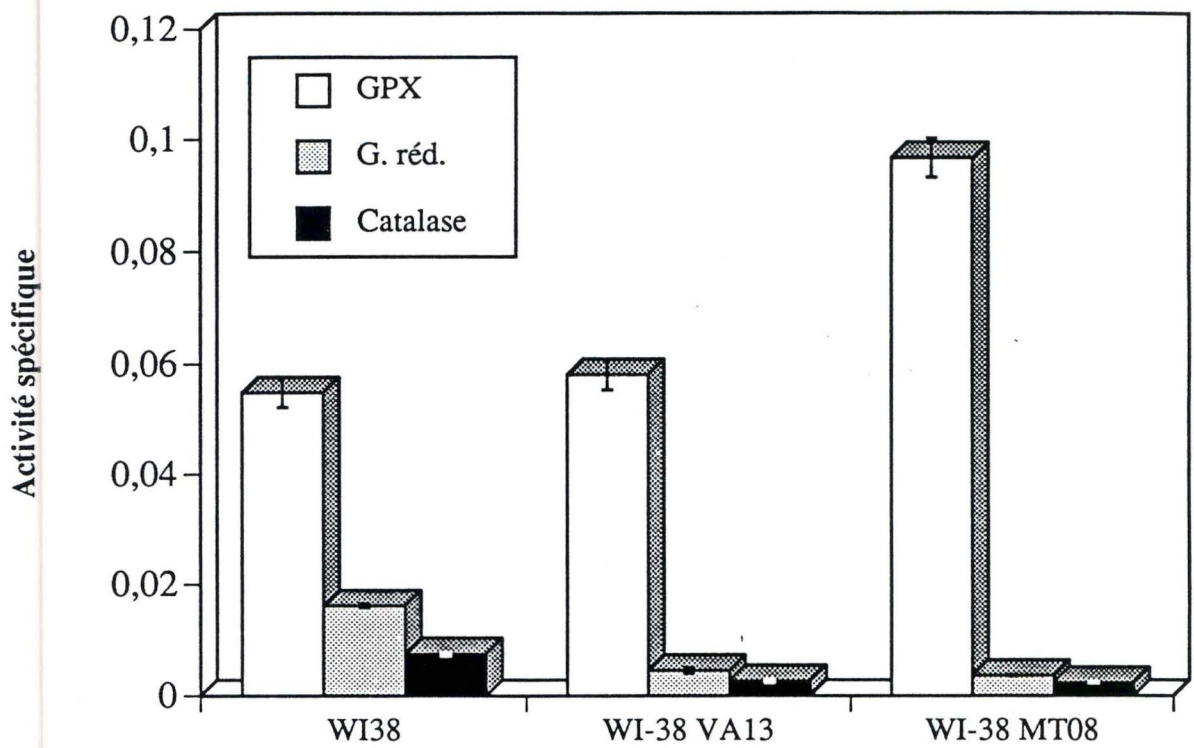


Figure III.3. : Activité spécifique de la glutathion peroxydase (GPx), de la glutathion réductase (G. réd.) et de la catalase pour les souches cellulaires WI-38, WI-38 VA13 et WI-38 MT08.

1.3. DOSAGE DES ENZYMES ANTIOXYDANTES.

Nous avons dosé la glutathion peroxydase (GPx), la catalase et la glutathion réductase sur ces trois souches de cellules (figure III.3.).

On observe que la transformation provoque une diminution de l'activité spécifique de la glutathion réductase, alors que celle de la catalase et de la GPx ne sont pas réduites par la transformation.

En ce qui concerne la glutathion peroxydase, on voit que son activité spécifique est plus élevée pour les cellules transfectées avec le gène de la GPx (WI-38 MT08) par rapport aux WI-38 et WI-38 VA13. Il est à signaler que, pour des raisons non élucidées, nous avons constaté une induction constitutive du gène de la GPx dans la souche WI-38 MT08, bien qu'il soit sous contrôle d'un promoteur inductible : celui de la métallothionéine.

2. EFFET DE LA DIMINUTION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT SUR L'ACTIVATION PAR L'IL-1.

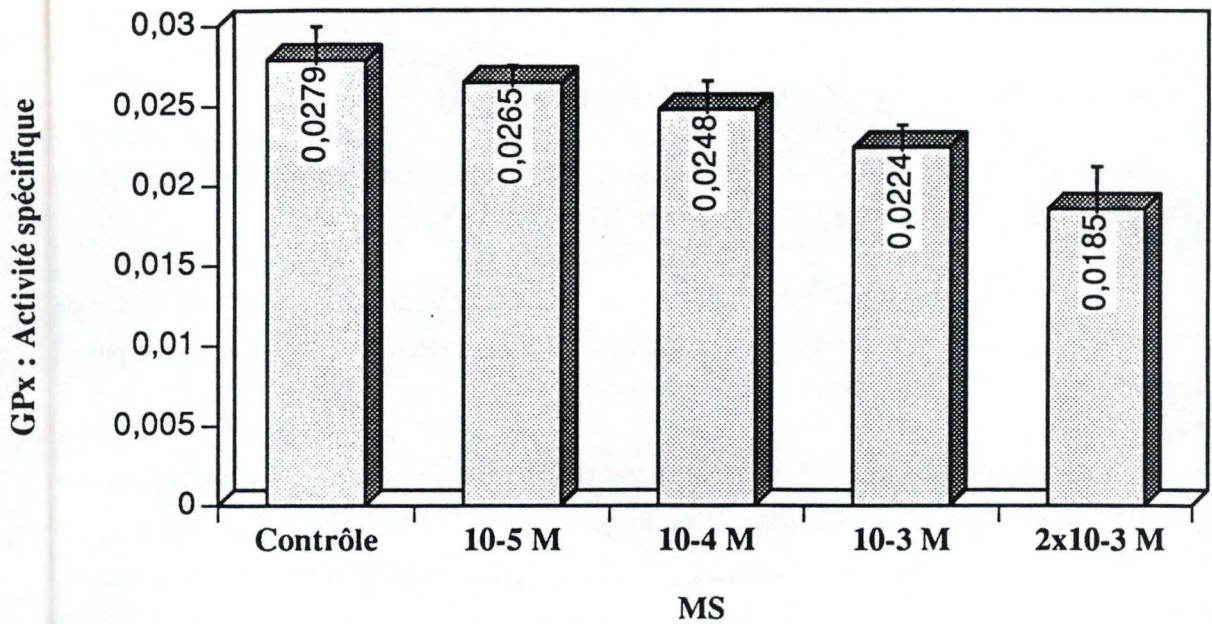
Pour diminuer le potentiel antioxydant de la cellule, nous avons eu recours à divers inhibiteurs relativement spécifiques, déjà utilisés sur les fibroblastes WI-38 (Michiels and Remacle 1988). Il s'agit du mercaptosuccinate (MS) pour inhiber la GPx, de la bischloroéthylnitrosourée (BCNU) pour la glutathion réductase, et de l'aminotriazole (ATA) pour inhiber la catalase. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'inhibiteur satisfaisant de la CuZn SOD.

Après avoir évalué leur cytotoxicité sur les cellules WI-38 VA13 (voir point II.2.3.), nous avons établi les courbes d'inhibition sur les différentes enzymes.

2.1. INHIBITION DES ENZYMES ANTIOXYDANTES.

Les cellules WI-38 VA13, cultivées dans des T75, sont d'abord rincées avec du MEM + HLA 0,2 % pendant 30 minutes de façon à éviter toute interférence entre d'une part, le sérum, et d'autre part, les inhibiteurs. Après ce rinçage, elles sont incubées avec ou sans inhibiteurs à différentes concentrations.

A.



B.

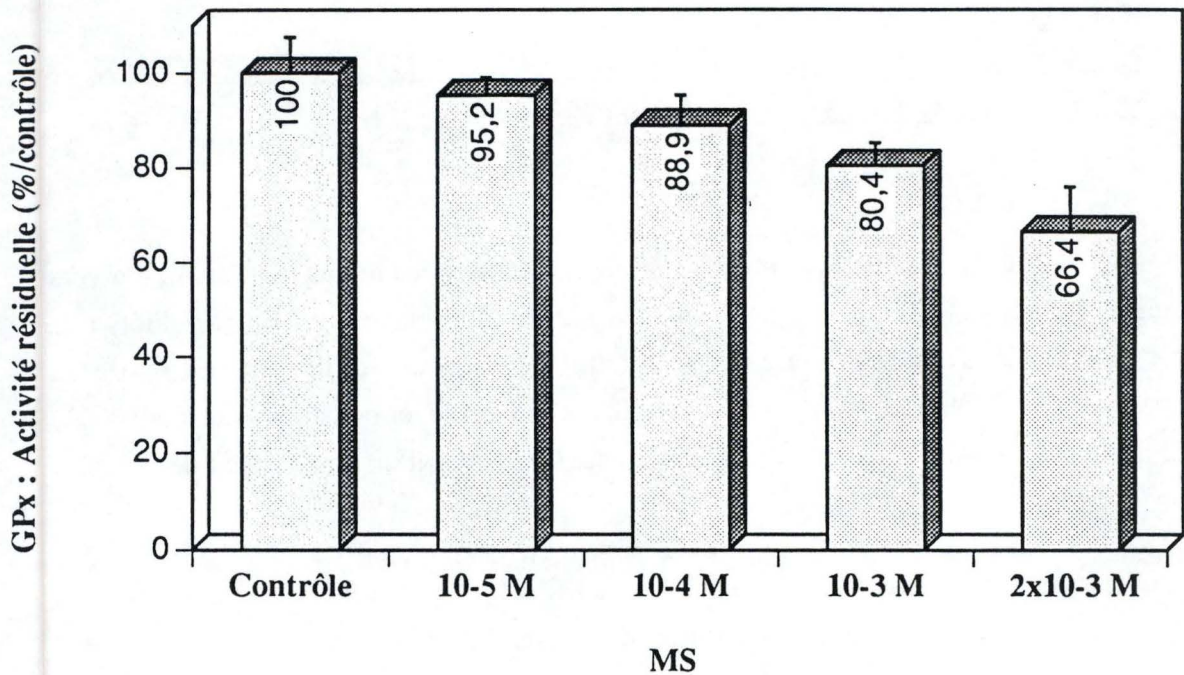


Figure III.4. : Effet du mercaptosuccinate (MS) sur la GPx.

A. Activité spécifique de la GPx exprimée en U/mg de protéines, en fonction de la concentrations croissantes en MS.

B. Activité résiduelle exprimée en % par rapport aux cellules contrôles (incubées sans MS) arbitrairement portées à 100 %. Les cellules WI-38 VA13 ont été incubées 30 minutes à 37°C. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures \pm 1 écart type.

2.1.1. EFFET DU MERCAPTOSUCCINATE SUR L'ACTIVITÉ DE LA GLUTATHION PEROXYDASE.

Le mercaptosuccinate (thiomalate) est l'un des acides mercaptoxyliques les plus efficaces pour inhiber la glutathion peroxydase (GPx). Il entre en compétition avec le glutathion et réagit avec la sélénocystéine du site actif (pour former un thiosélérate) entraînant l'inactivation de l'enzyme (Chaudière, Wilhemsen et al. 1984). Des expériences portant sur l'effet du mercaptosuccinate (MS) sur la GPx pure montrent 100 % d'inhibition avec une concentration de 50 μ M.

En ce qui concerne les fibroblastes WI-38, l'inhibition totale de la GPx est atteinte avec une incubation de 30 minutes à 200 μ M de MS (si l'incubation est d'une heure, 50 μ M suffisent)(Michiels and Remacle 1988).

Pour les cellules WI-38 VA13, les résultats sont présentés à la figure III.4. L'activité spécifique de la GPx est exprimée en unités par mg de protéines en fonction de la concentration en MS. En effet, avec une concentration de 10^{-3} M, on arrive à inhiber 20 % de l'activité de la GPx si l'on se réfère au contrôle et 34 % pour une concentration de 5×10^{-2} M.

En incubant une heure à la place de 30 minutes, le pourcentage d'inhibition de la GPx n'augmente pas (résultats non montrés).

Nous constatons donc qu'il y a bien une inhibition de la GPx obtenue avec le MS, mais qu'elle n'est jamais totale, même à une concentration déjà élevée de 2×10^{-3} M. Rappelons que les courbes de cytotoxicité révélaient que ces concentrations n'entraînaient pas la mort de nos cellules (voir point II.2.3.).

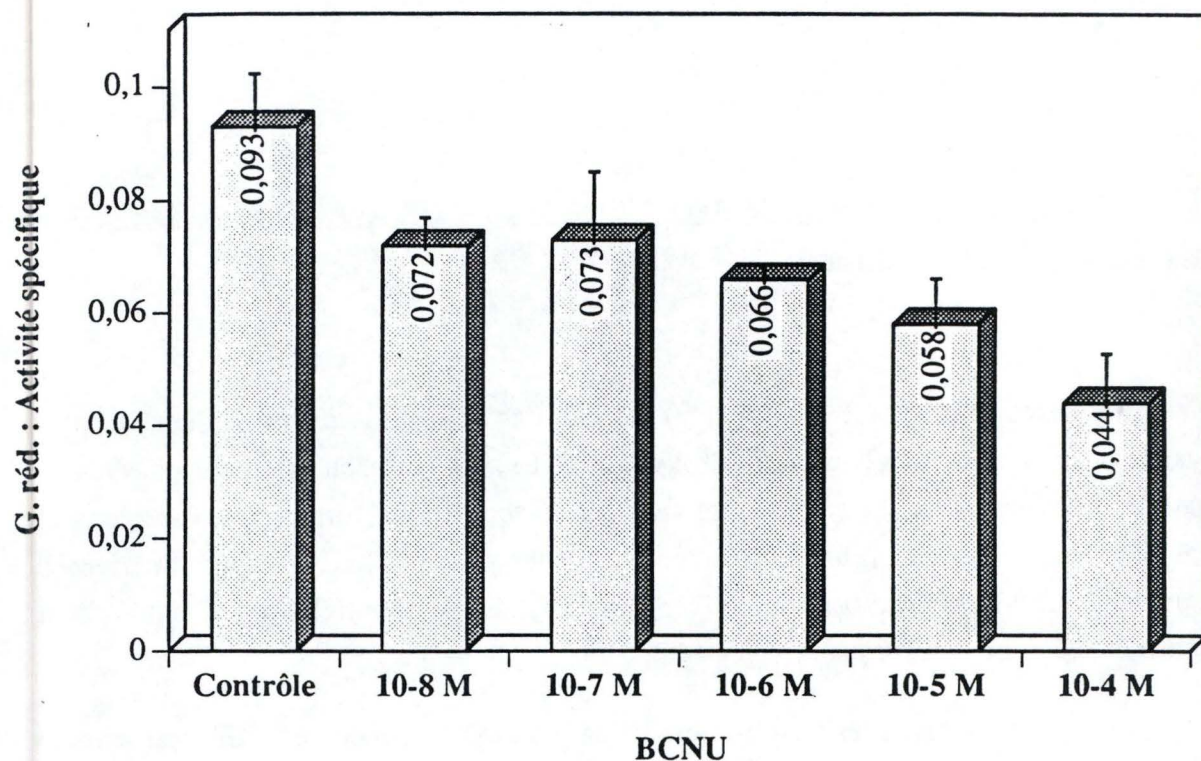
Ces expériences ont été réalisées cinq fois avec des résultats similaires.

2.1.2. EFFET DE LA BISCHLOROÉTHYLNITROSOURÉE SUR L'ACTIVITÉ DE LA GLUTATHION RÉDUCTASE.

La 1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée (BCNU ou carmustine) est un inhibiteur de la glutathion réductase(Smith and Boyd 1984).

In vivo, le BCNU est dégradé en deux métabolites, dont l'agent carbamylateur, qui

A.



B.

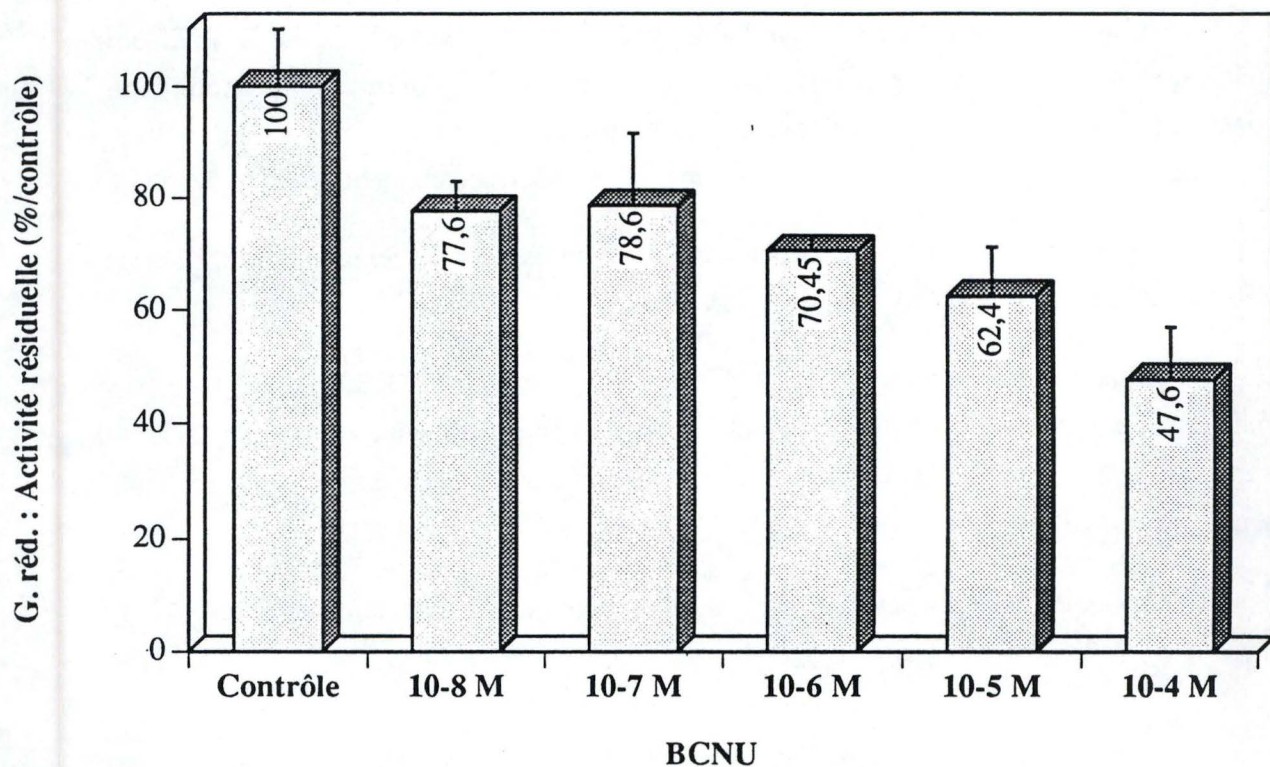
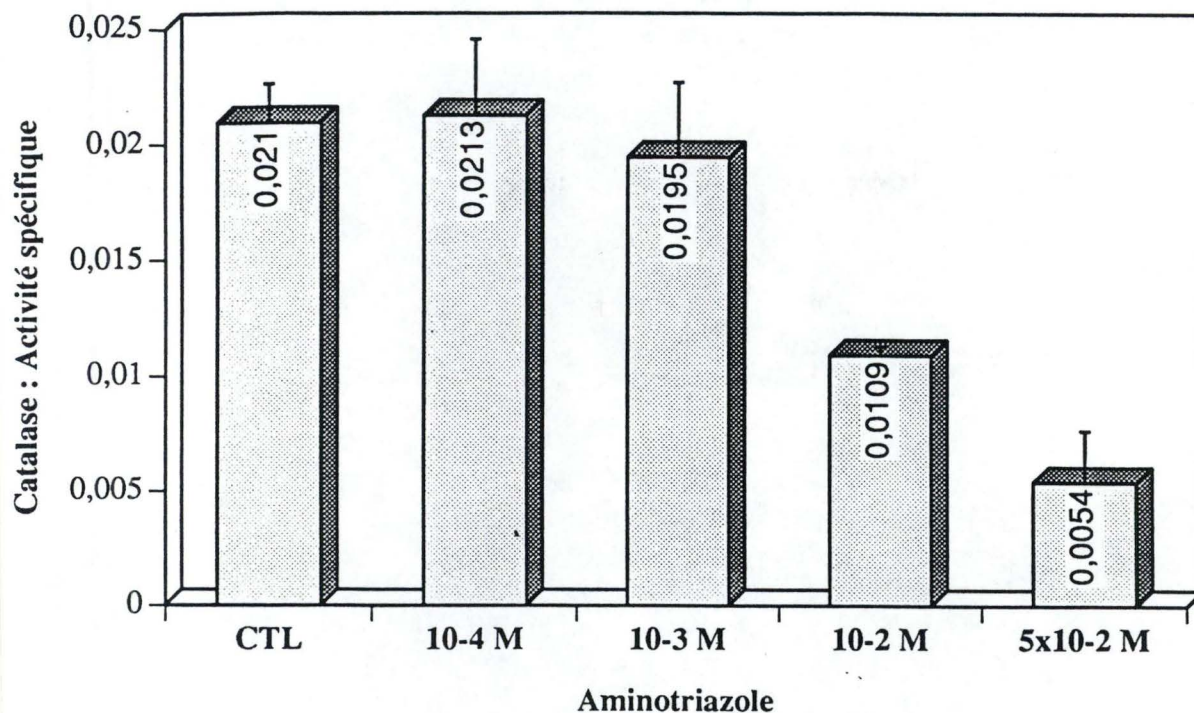


Figure III.5. : Effet de la BCNU sur la glutathione réductase (G.réd.).

A. Activité spécifique de la glutathione réductase exprimée en U/mg de protéines en fonction de concentrations croissantes en BCNU.

B. Activité résiduelle exprimée en % par rapport aux cellules contrôles incubées sans BCNU. Les cellules WI-38 VA13 ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C, chaque point représente la moyenne de 3 mesures \pm 1 écart type.

A.



B.

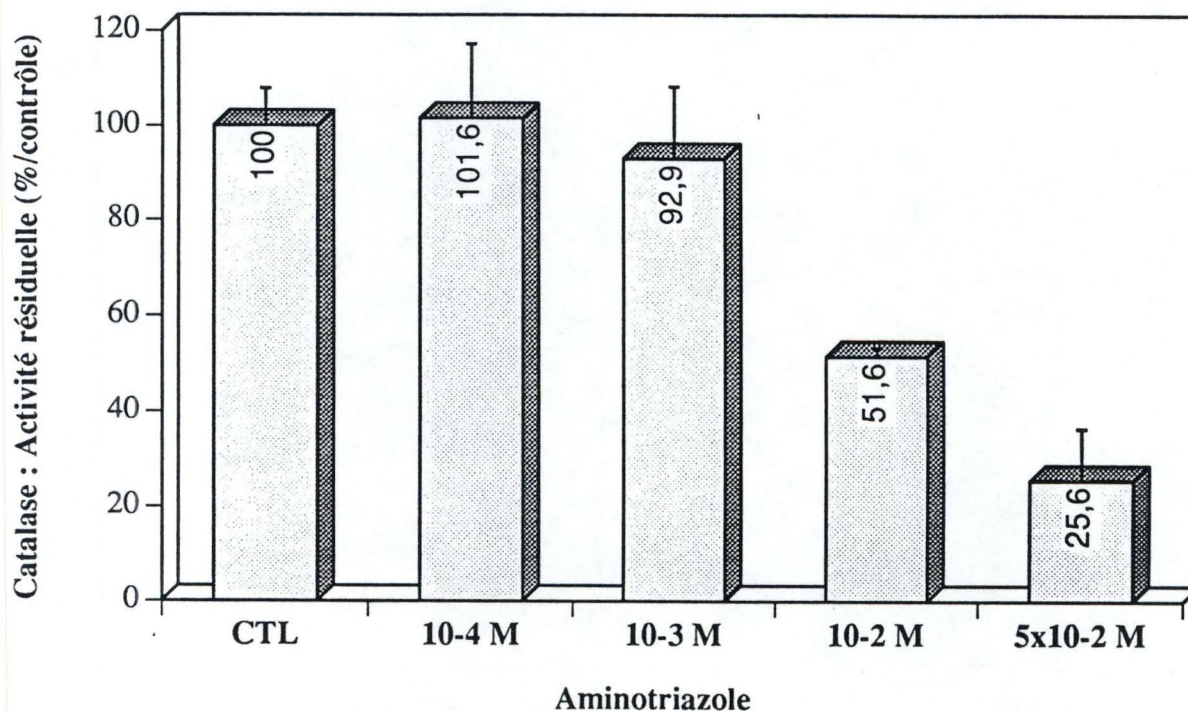


Figure III.6. : Effet de l'aminotriazole (ATA) sur la catalase.

A. Activité spécifique de la catalase exprimée en U/mg de protéines en fonction de concentrations croissantes en ATA.

B. Activité résiduelle exprimée en % par rapport aux cellules contrôles incubées sans ATA. Les cellules WI-38 VA13 ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C.

Chaque point représente la moyenne de 3 valeurs \pm 1 écart-type.

inactive la glutathion réductase en réagissant avec sa forme réduite. Ce qui le rend apte à inactiver la glutathion réductase dans les cellules, mais pas dans l'enzyme pure.

Les expériences réalisées sur les fibroblastes WI-38 montrent une inhibition de 100 % de la glutathion réductase avec 50 μ M de BCNU (suite à une incubation de 15 minutes) (Michiels and Remacle 1988).

L'évolution de l'activité spécifique de la glutathion réductase en fonction de la concentration en BCNU est exposée à la figure III.5. pour les cellules WI-38 VA13. On voit qu'elle est de 0,093 unités / mg de protéines pour le contrôle et déjà de 0,072 unités / mg de protéines en présence de BCNU 10^{-8} M.

Une diminution de 53,4 % de l'activité spécifique de la glutathion réductase est notée lorsque l'on atteint une concentration de 10^{-4} M de BCNU.

Bien qu'étant inférieurs aux résultats obtenus pour les fibroblastes WI-38, le BCNU peut inhiber à plus de 50 % l'activité enzymatique présente dans les cellules contrôles.

Ce dosage n'a malheureusement pu n'être réalisé que deux fois en raison d'une indisponibilité de BCNU sur le marché européen.

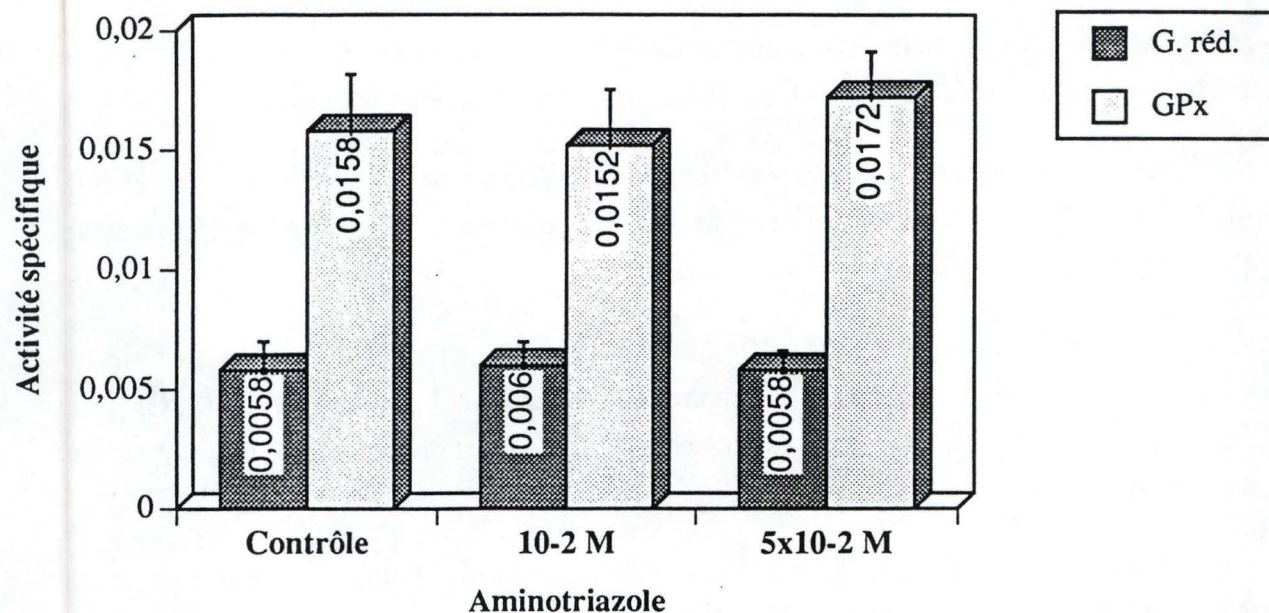
2.1.3. EFFET DE L'AMINOTRIAZOLE SUR L'ACTIVITÉ DE LA CATALASE.

Le 3-amino-1,2,4-triazole (ATA) est un inhibiteur irréversible de la catalase (Margoliash, Novogrodsky et al. 1959). L'ATA se lie au peroxyde d'hydrogène qui active un résidu histidine présent près du site actif de la catalase.

Cette liaison covalente de l'ATA inactive la catalase. L'ATA a pu être testé sur la catalase purifiée en présence de 0,4 mM d' H_2O_2 (Darr and Fridovich 1986). Une inhibition de 96 % est obtenue avec une concentration de 200 mM d'ATA pendant 30 minutes à température ambiante.

Sur les fibroblastes WI-38, une inhibition maximale de 93 % de l'activité de la catalase est observée à 50 mM d'ATA (Michiels and Remacle 1988). En ce qui concerne les cellules WI-38 VA13, la figure III.6. montre qu'elles ont une activité spécifique de $\pm 0,022$ unité / mg de protéines. Cette activité diminue lentement lorsque la concentration en ATA passe de 10^{-4} M à 10^{-3} M, mais est réduite de moitié à 10^{-2} M et n'est plus que de ± 22 % à une concentration de 5×10^{-2} M. Signalons que l'ATA à 10^{-2} M et 5×10^{-2} M n'a aucun effet ni

A.



B.

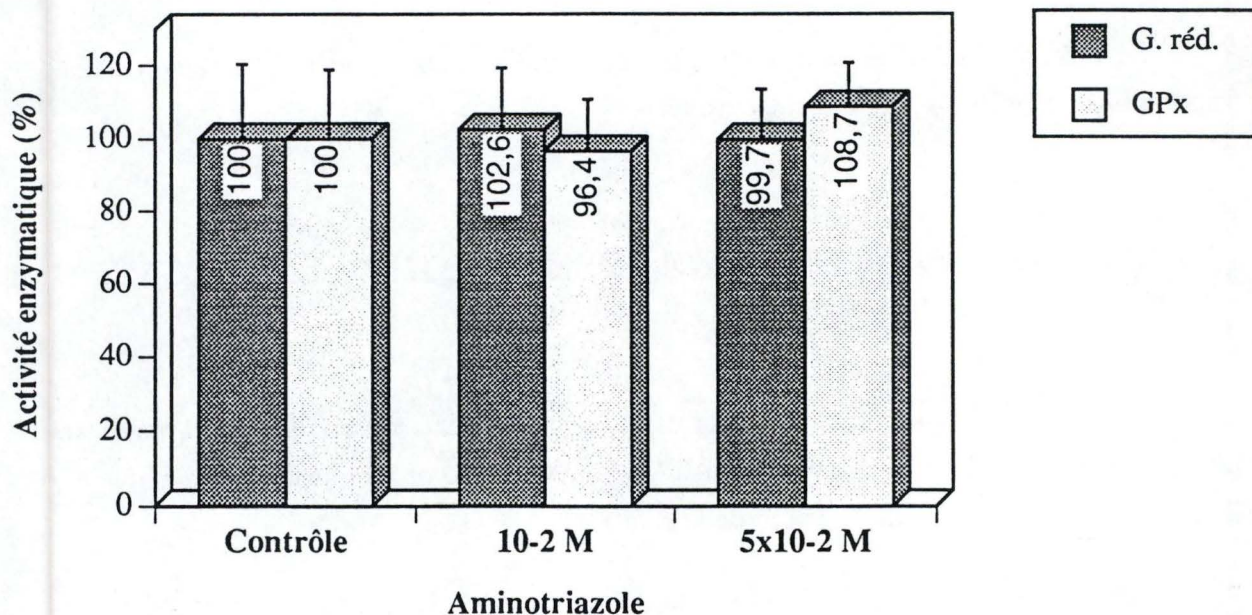


Figure III.7. : Effet de l'aminotriazole (ATA) sur l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) et de la glutathion réductase (G. réd.) dans les cellules WI-38 VA13. Les cellules ont été rincées 30 minutes dans du MEM+HLA puis incubées durant 30 minutes en présence d'ATA 10^{-2} ou 5×10^{-2} M. Les résultats sont exprimés en activité spécifique (U/mg de protéines) (A) et en % par rapport aux contrôles arbitrairement portés à 100 % (B).

sur la GPx ni sur la glutathion réductase (figure III.7.). Les courbes d'inhibition de la catalase en présence d'ATA ont été recommencées 6 fois avec des résultats semblables.

2.2. EFFET DES INHIBITEURS D'ENZYMES ANTIOXYDANTES SUR L'ACTIVATION PAR L'IL-1.

Comme déjà annoncé, dans les cellules stimulées à l'IL-1 nous nous sommes focalisés sur deux aspects de l'activation cellulaire : l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B et la sécrétion d'IL-6. Nous allons successivement évaluer l'impact des inhibiteurs d'enzymes antioxydantes sur ces deux événements cellulaires induits par l'IL-1.

2.2.1. EFFET DES INHIBITEURS SUR L'ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B INDUIT PAR L'IL-1.

On sait par la littérature que dans les cellules stimulées par l'IL-1, le facteur NF- κ B est activé par les ROI.

Avec les inhibiteurs d'enzymes antioxydantes et l'IL-1 β , nous espérons voir dans un premier temps une activation du facteur plus importante qu'avec l'IL-1 seule et peut être éclaircir dans un second temps cette (ces) voie(s) d'activation en y précisant les mécanismes moléculaires (source et nature des ROI ? Kinases activées par les ROI ?...).

La culture des WI-38 VA13 et l'extraction des protéines sont décrites dans le point II.5.2. du matériel et méthode. Un temps de préincubation de 30 minutes a été choisi avec les inhibiteurs afin d'inhiber les enzymes antioxydantes avant la stimulation avec l'IL-1. Afin de mettre en évidence la liaison du facteur NF- κ B à sa séquence cible et donc son activation, on utilise la technique de l'"electrophoretic mobility shift assay" (EMSA) décrite au point II.5 des matériels et méthode.

Elle consiste à mettre en présence une sonde oligonucléotidique marquée au phosphore 32 contenant la séquence cible du facteur NF- κ B et un extrait protéique de cellules. Si le facteur de transcription NF- κ B activé se trouve dans l'extrait protéique, il peut se lier à la sonde oligonucléotidique. Cette liaison provoquera un retard dans la migration de la sonde sur le gel natif d'électrophorèse, entraînant l'apparition d'une bande déplacée (=shift) quantifiée et exprimée en IOD (intégration de la densité optique, soit la DO x surface de la bande).

IL-1 (ng/ml)	0	10 ⁻⁴			10 ⁻³		CTL	
Temps d'incubation (min)	0	20	30	40	20	30	-	+

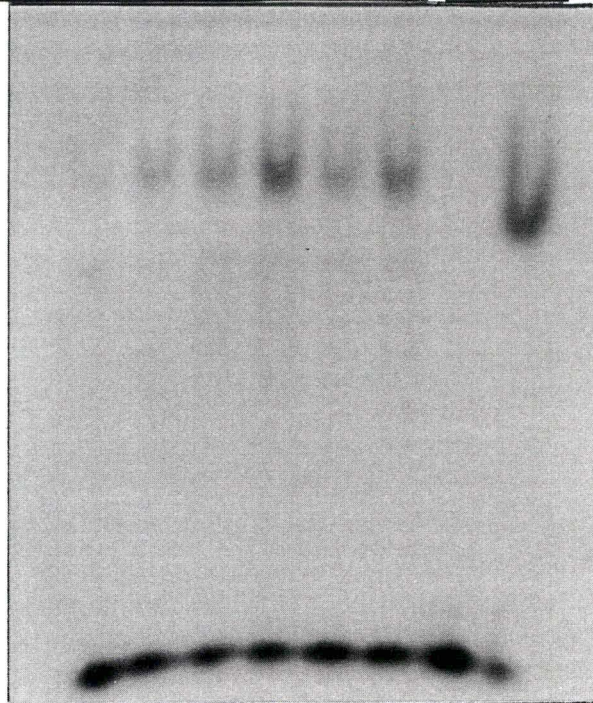


Fig.III.8. : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'activation du facteur NFκB induite par l'IL-1 dans les WI-38 VA13. Les cellules ont été rincées dans du MEM+HLA pendant 30 minutes puis stimulées ou non avec l'IL-1 à 5ng/ml ou 10 ng/ml pendant 20, 30 et 40 minutes.

Le contrôle (CTL) négatif 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.

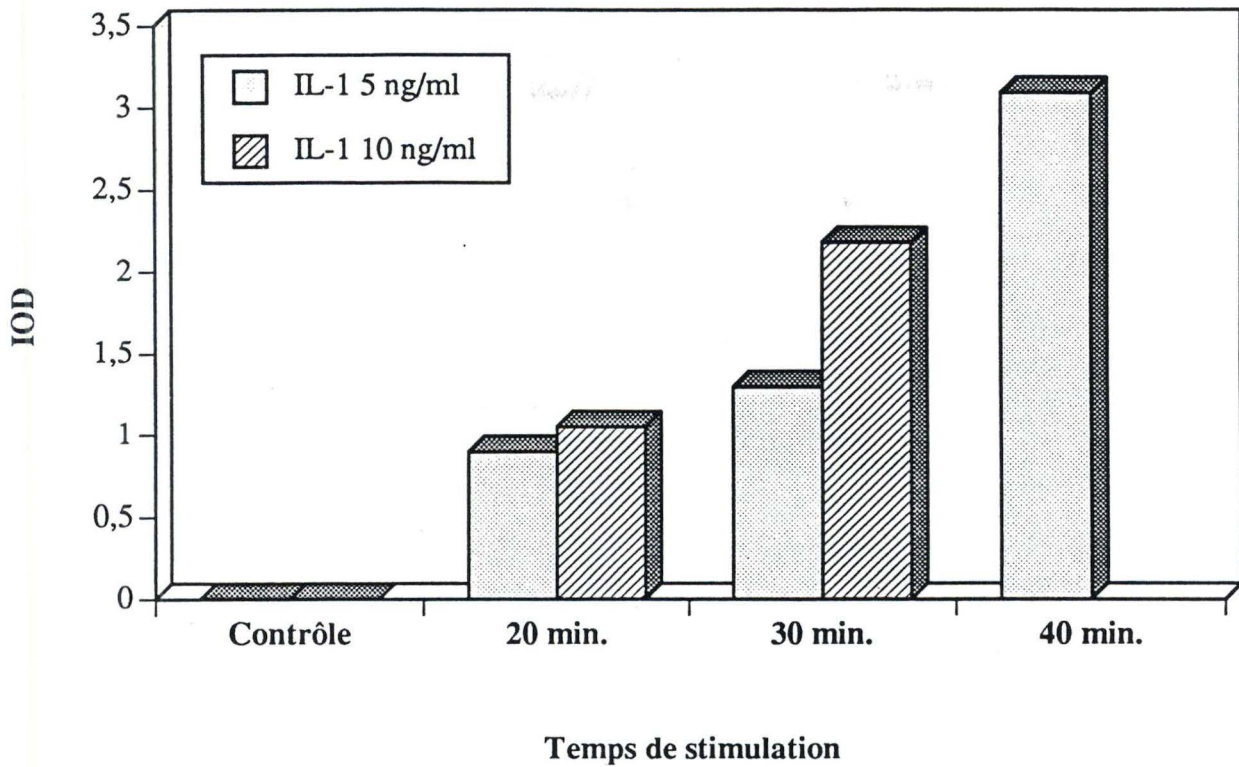


Figure III.9. : Activation du facteur NF- κ B par l'IL-1.

Le gel de la figure III.8. a été analysé quantitativement par le système d'analyse d'images (voir point II.5.2.7. du matériel et méthodes). Les résultats sont exprimés en IOD (intégration de la densité optique) en fonction des différents traitements subis par les cellules WI-38 VA13. Les cellules ont été incubées durant 20, 30 ou 40 minutes en présence ou non (= contrôle) de 5 ou 10 ng d'IL-1/ml

MS (M)	0		10 ⁻⁵		10 ⁻⁴		10 ⁻³		2x10 ⁻³		CTL	
IL-1 (5ng/ml)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

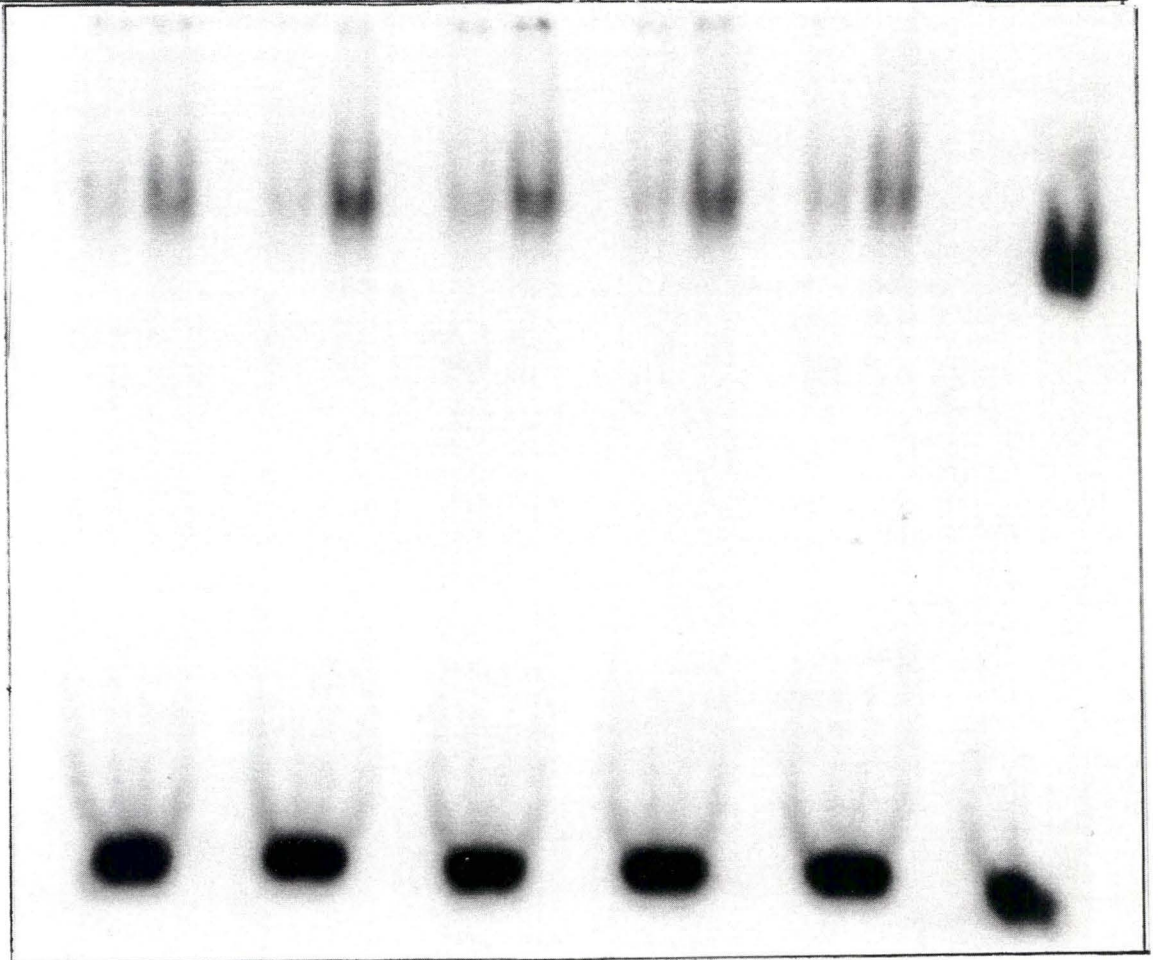


Fig.III.10. : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, comparant l'effet du mercaptosuccinate sur l'activation du facteur NFκB induite par l' IL-1 (5 ng/ml) dans les WI-38 VA13.

Les cellules ont été rincées dans du MEM+HLA pendant 30 minutes puis préincubées 30 minutes avec le mercaptosuccinate (MS) seul et enfin stimulées ou non 30 minutes avec l'IL-1 en présence ou non de MS.

25µg de protéines ont été déposés par piste.

Le contrôle (CTL) négatif 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.

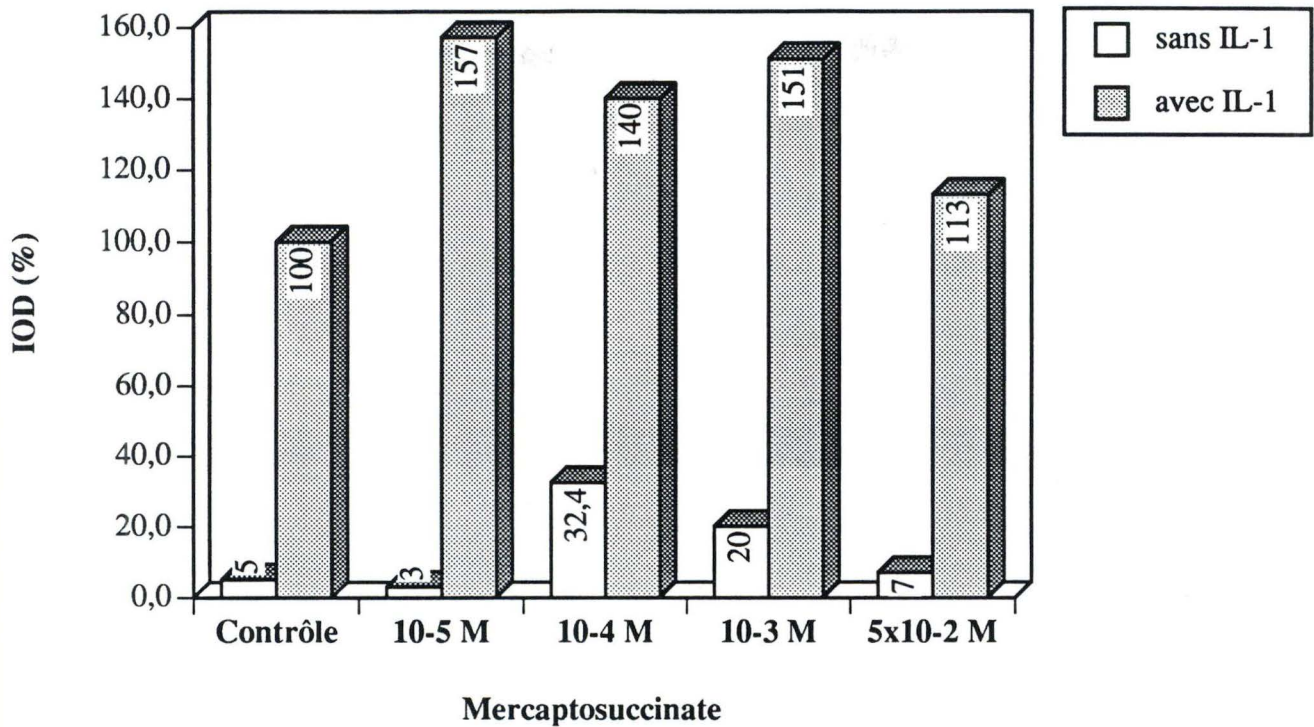


Figure III.11. Effet du mercaptosuccinate (MS) sur l'activation du facteur NF- κ B. Le gel de la figure III.10. a été analysé quantitativement par le système d'analyse d'images (voir point II.5.2.7. du matériels et méthodes). Les résultats sont exprimés en IOD (intégration de la densité optique) en fonction de différents traitements subis par les cellules WI-38 VA13. Les cellules ont été préincubées pendant 30 minutes avec le MS, puis stimulées (ou non = contrôle) pendant 30 minutes avec l'IL-1 (5 ng/ml), toujours en présence de MS aux différentes concentrations indiquées. Les résultats obtenus sont exprimés en % par rapport aux cellules traitées à l'IL-1 seule, portées arbitrairement à 100 %.

BCNU (M)	0		10 ⁻⁸		10 ⁻⁷		10 ⁻⁶		10 ⁻⁵		10 ⁻⁴		CTL	
IL-1 (5 ng/ml)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

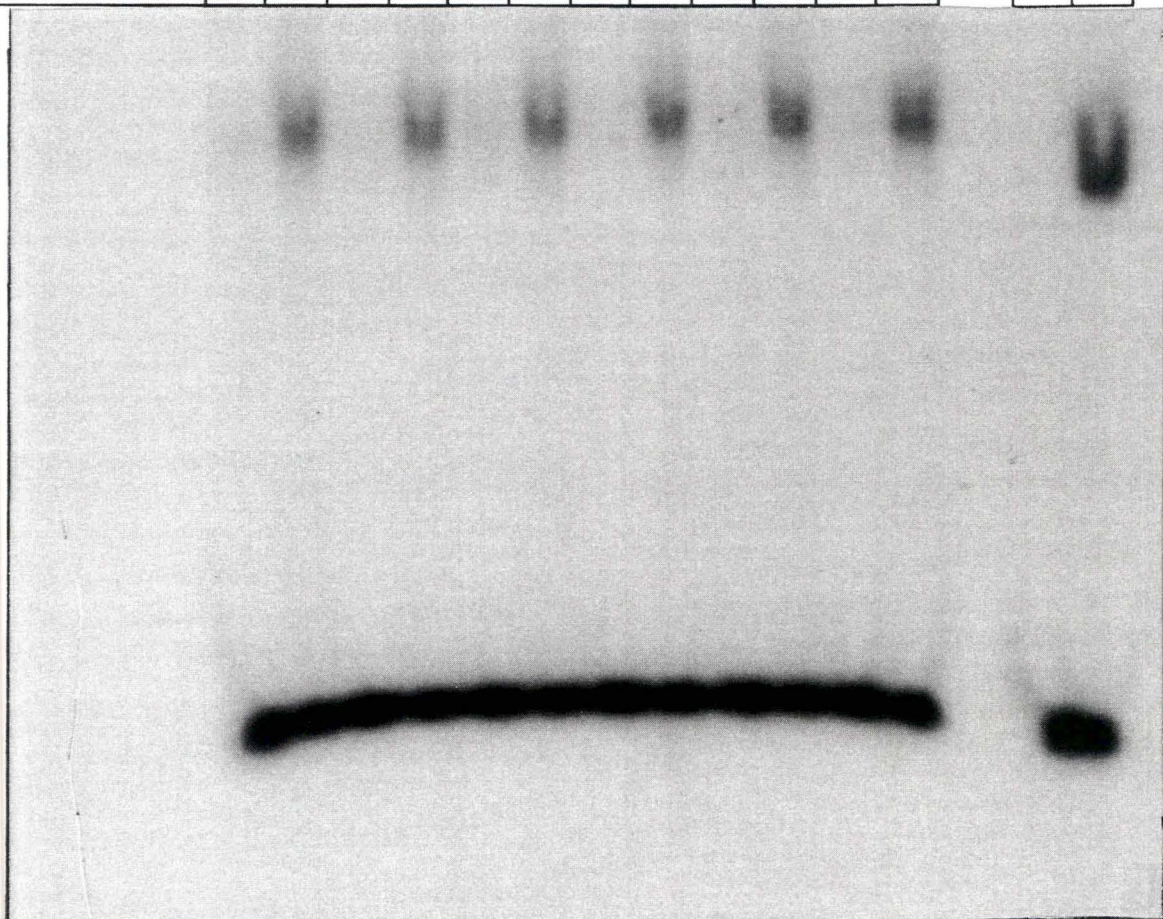


Fig.III.12. : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet de la bischloroéthylnitrosourée sur l'activation du facteur NFκB induite par l'IL-1 (5ng/ml) dans les WI-38 VA13.

Les cellules ont été rincées dans du MEM+HLA 30 minutes avec la bischloroéthylnitrosourée (BCNU) seule et enfin stimulées ou non 30 minutes avec l'IL-1 en présence ou non de la BCNU.

25µg de protéines ont été déposés par piste.

Le contrôle (CTL) négatif 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.

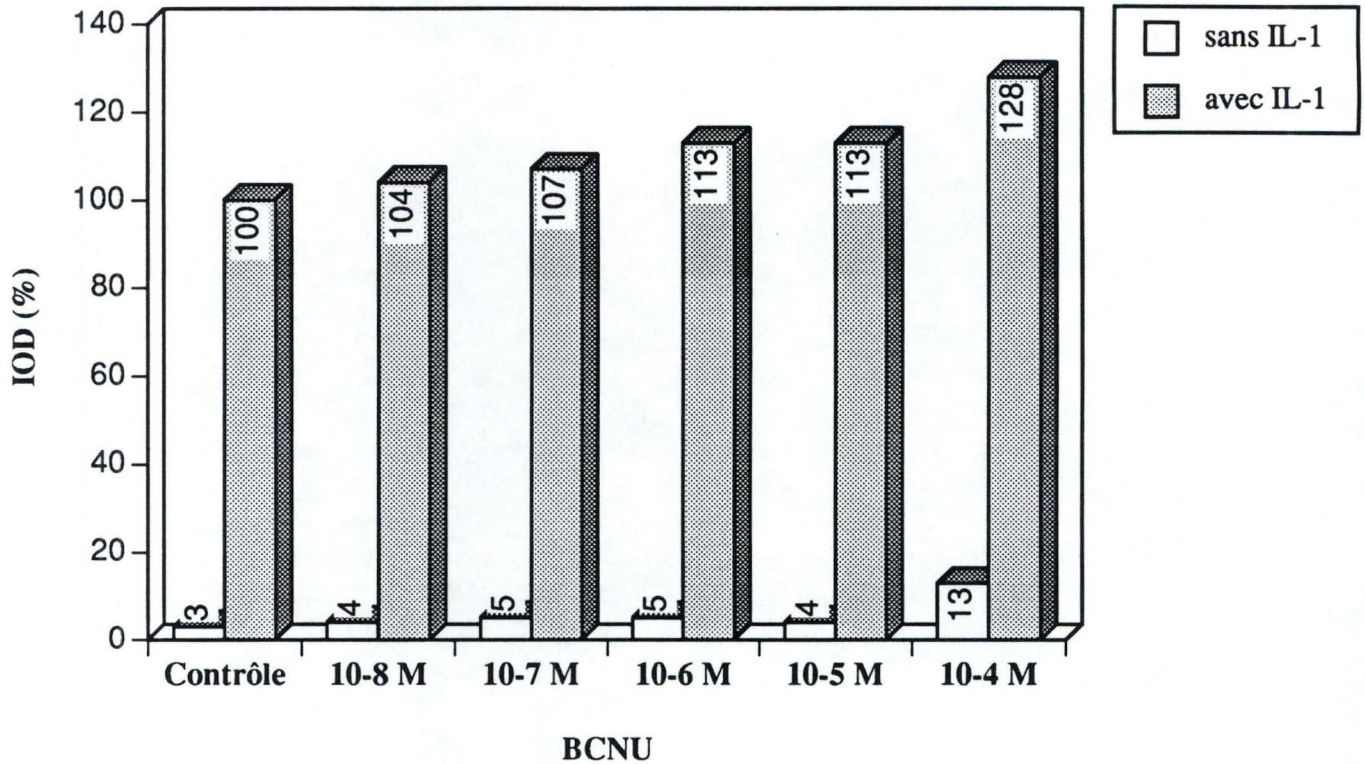


Figure III.13. : Effet du BCNU sur l'activation du facteur NF- κ B.

Le gel de la figure III.12. a été analysé quantitativement par le système d'analyse d'image (voir point II.5.2.7. des matériels et méthodes). Les résultats sont exprimés en IOD (intégration de la densité optique) en fonction de différents traitements subis par les cellules WI-38 VA13. Les cellules ont été préincubées pendant 30 minutes avec le BCNU puis stimulées (ou non) pendant 30 minutes par 5 ng/ml d'IL-1, toujours en présence de BCNU aux différentes concentrations indiquées. Les résultats obtenus ont été exprimés en % par rapport aux cellules traitées à l'IL-1 seule, portées arbitrairement à 100 %.

2.2.1.1. Effet du MS sur l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1.

Des expériences préliminaires ont montré que l'IL-1 activait bien le facteur NF- κ B dans notre modèle cellulaire (figures III.8. et III.9.)

Pour tester les différents inhibiteurs sur l'activation du facteur transcriptionnel il nous fallait choisir une concentration en IL-1 intermédiaire. Une concentration de 5 ng/ ml d'IL-1 a été choisie.

Nous avons d'abord testé le mercaptosuccinate (MS), inhibiteur de la GPx. La figure III.10. montre un gel retard typique obtenu avec le MS, tandis que la figure III.11. montre l'analyse quantitative du gel par le système d'analyse d'images. Les résultats sont exprimés en IOD (intégration de la densité optique) en fonction des différentes incubations en présence ou non d'IL-1 et / ou de MS à différentes concentrations.

On voit tout d'abord que sans IL-1, le facteur NF- κ B n'est pratiquement pas activé. Cela correspond aux données de la littérature concernant les fibroblastes (Menon, Qin et al. 1993). Dans d'autres cellules, comme les lymphocytes B, le facteur NF- κ B est maintenu sous sa forme activée dans des cellules non stimulées.. (Liou, Sha et al. 1994). On n'observe donc pas de retard significatif pour les cellules ayant été incubées avec du MEM + HLA 0,2 %. Aucun retard n'est observé non plus avec le MS seul. Par contre, le MS semble bien augmenter la stimulation provoquée par l'IL-1. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'en diminuant l'activité de la GPx, on augmente le niveau d'oxydation dans la cellule, ce qui permet une meilleure activation du facteur par l'IL-1. Ces expériences ont été recommencées par 3 fois en double exemplaire en présentant des résultats similaires.

2.2.1.2. Effet de la BCNU sur l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1.

L'effet de la BCNU est mis en évidence à la figure III.13. qui présente l'analyse quantitative en IOD (en % par rapport à l'IL-1) en fonction de la concentration en BCNU, à partir du gel révélé à la figure III.12.

Comme pour le MS, la BCNU seule ne provoque pas d'activation du facteur mais on voit qu'en présence d'IL-1 il est capable d'en modifier son action. En effet, dès 10^{-7} M, alors que l'on inhibe la glutathion réductase de ± 22 %, on a déjà un retard plus conséquent qu'avec l'IL-1 seule et donc une stimulation plus forte du facteur. L'IOD (exprimée arbitrairement en % par rapport à l'IL-1) dépasse 120 % à 10^{-4} M. Cette stimulation du facteur augmente donc

ATA (M)	0		10 ⁻⁴		10 ⁻³		10 ⁻²		5x10 ⁻²		CTL	
IL-1 (5 ng/ml)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

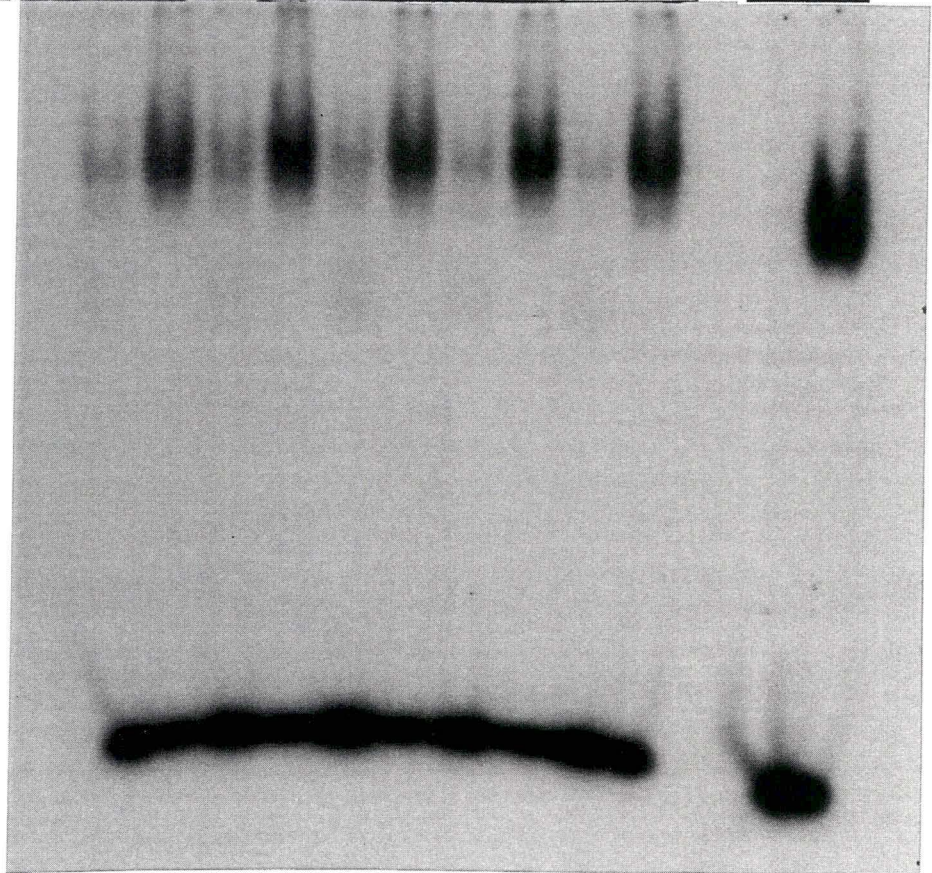


Fig.III.14. : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, représentant l'effet de l'aminotriazole sur l'activation du facteur NFκB induite par l'IL-1 (5 ng/ml) dans les WI-38 VA13.

Les cellules ont été rincées dans du MEM+HLA 30 minutes puis stimulées ou non 30 minutes avec l'IL-1 en présence ou non d'aminotriazole (ATA) seule et enfin stimulées ou non 30 minutes avec l'IL-1, en présence ou non de l'ATA. 25μg de protéines ont été déposés par piste.

Le contrôle négatif (CTL) 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.

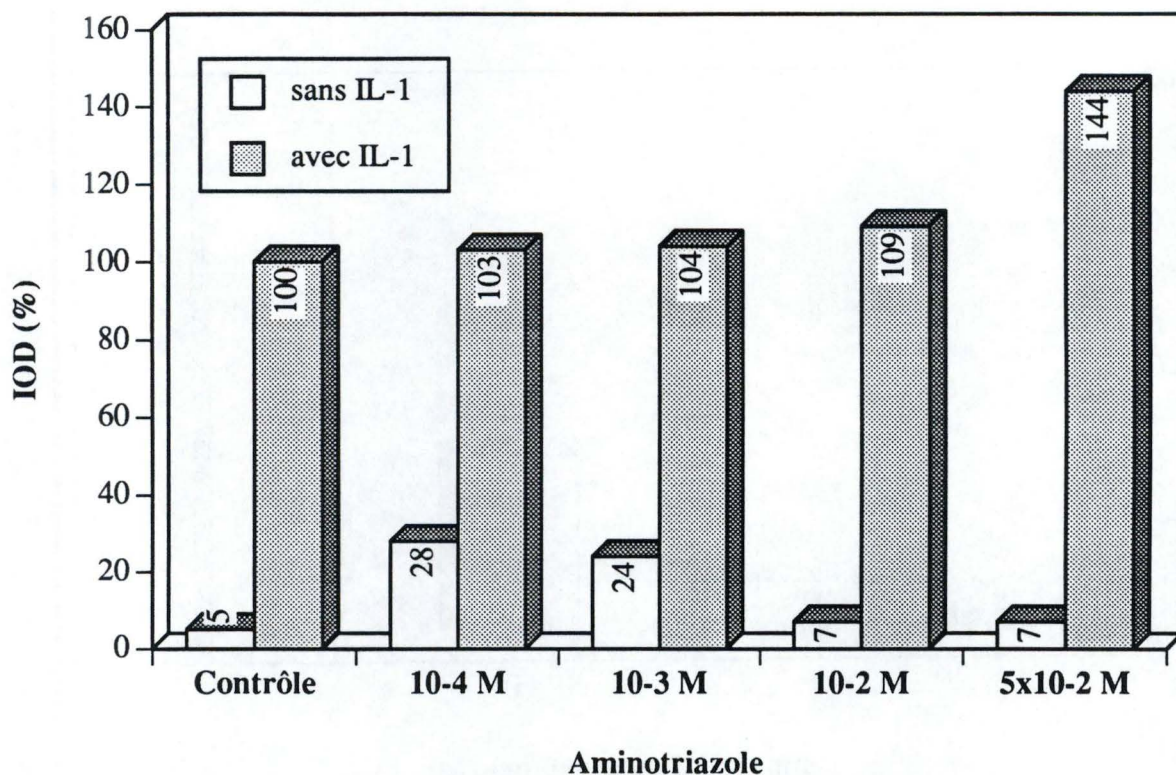


Figure III.15. : Effet de l'aminotriazole (ATA) sur l'activation du facteur NF- κ B.

Le gel de la figure III.14. a été analysé quantitativement par analyse d'image (voir point II.5.2.7. du matériel et méthodes). Les résultats sont exprimés en IOD (intégration de la densité optique) en fonction de différents traitements subis par les cellules WI-38 VA13. Les cellules ont été préincubées pendant 30 minutes avec l'ATA puis stimulées (ou non) pendant 30 minutes avec l'IL-1 (5 ng/ml), toujours en présence du MS aux concentrations indiquées. Les résultats obtenus ont été exprimés en % par rapport aux cellules traitées à l'IL-1 seule, portées arbitrairement à 100 %.

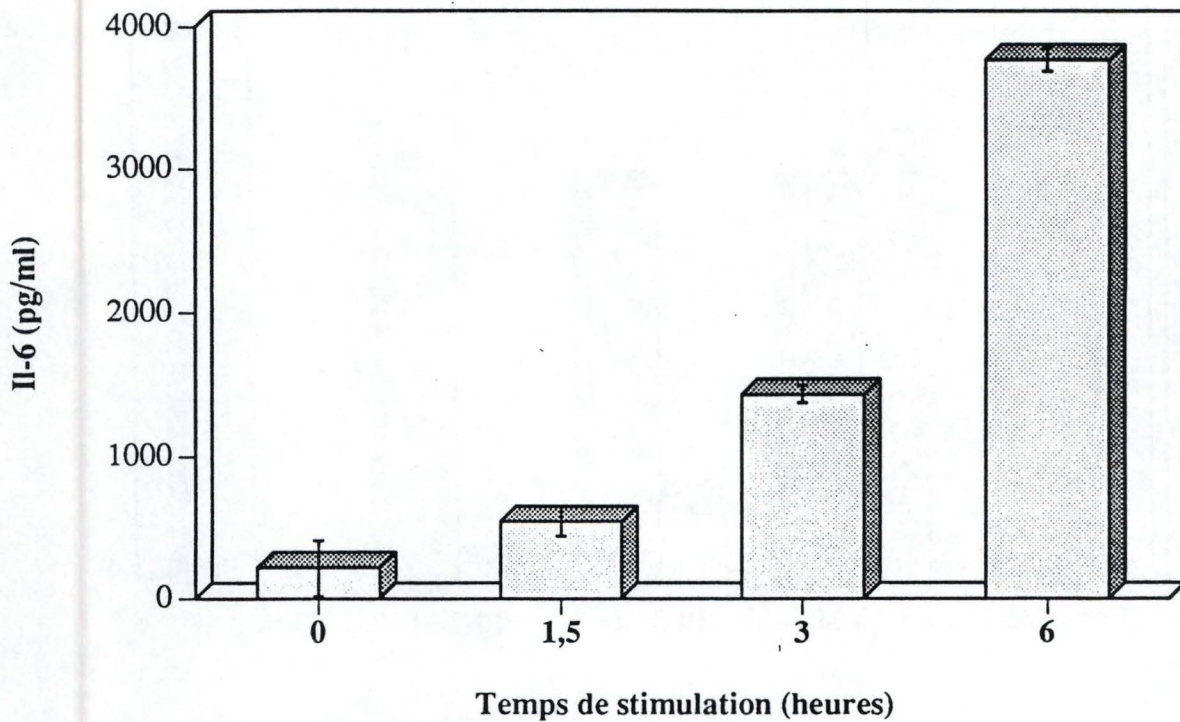


Figure III.16 : Effet du temps de stimulation sur la synthèse d'IL-6 induite par l'IL-1.

Les cellules WI-38 VA13 ont été incubées durant 0 ; 1,5 ; 3 et 6 heures en présence de 5 ng/ml d'IL-1. La quantité d'IL-6 contenue dans le surnageant a été dosée par ELISA comme décrit au point II.4. des matériels et méthodes.

Les résultats sont exprimés en pg d'IL-6 /ml de surnageant, sachant qu'il y a ± 3500 cellules/cupule et 0,200 ml/cupule ; ils représentent une moyenne de 3 valeurs ± 1 écart-type.

en fonction de la concentration en BCNU. Ceci peut s'expliquer de la manière suivante : plus il y a de BCNU, plus on inhibe la glutathion réductase, moins il y a de glutathion réduit disponible pour la GPx, moins les dérivés actifs de l'oxygène peuvent être éliminés et plus ils pourraient participer à l'activation du facteur NF- κ B par l'IL-1.

2.2.1.3. Effets de l'ATA sur l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1.

L'activation du facteur NF- κ B en fonction de la concentration en aminotriazole (ATA) est présentée aux figures III.14 (gel) et III.15 (analyse quantitative).

Sans IL-1, le facteur n'est pas activé (pas de retard observé sur le gel), que ce soit avec ou sans inhibiteur. Mais lorsqu'on ajoute des concentrations croissantes en ATA à l'IL-1, l'IOD augmente : légèrement de 10^{-4} M à 10^{-2} M, mais jusqu'à 140 % à 5×10^{-2} M, ce qui correspond à une inhibition de ± 80 % de l'activité de l'enzyme. La catalase une fois inhibée ne dégrade plus le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Une plus grande quantité en H_2O_2 permettrait d'augmenter l'activité du facteur provoquée par l'IL-1 (Schreck, Rieber et al. 1991).

Il faut cependant rester prudent dans l'interprétation de ces résultats, vu que les concentrations en ATA qui semblent avoir de l'effet sont très élevées.

Après avoir réalisé une approche moléculaire, nous avons pensé qu'il serait intéressant de vérifier l'impact physiologique de ces différents inhibiteurs sur la cellule, en examinant le produit d'un gène activé par le facteur NF- κ B, l'IL-6.

2.2.2. EFFET DES INHIBITEURS SUR LA LIBÉRATION D'IL-6 INDUITE PAR L'IL-1.

Le gène de l'IL-6 porte dans son promoteur un site de liaison pour le facteur NF- κ B. Il est reconnu que l'IL-1 induit rapidement la libération de l'IL-6 et que cette libération peut être fortement voire totalement inhibée par des molécules antioxydantes (Raes, Renard et al. 1994). Nous nous sommes demandé si des inhibiteurs d'enzymes antioxydantes pouvaient au contraire accroître la libération d'IL-6 déjà induite par l'IL-1.

On a tout d'abord réalisé une cinétique de production d'IL-6 montrée à la figure III.16. Nous voyons qu'un temps d'incubation de 6 heures avec l'IL-1 est nécessaire pour

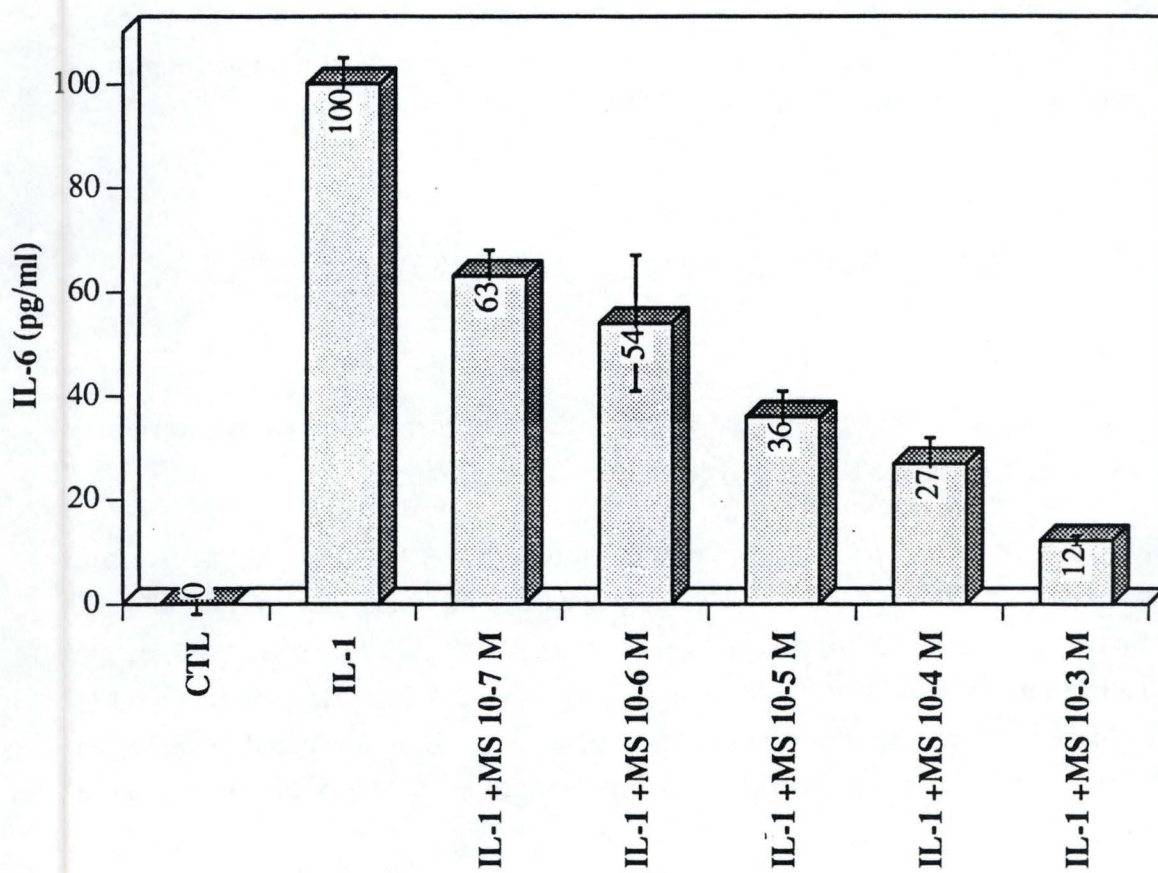


Figure III.17. : Effet du mercaptosuccinate (MS) sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.

Les cellules WI-38 VA13 ont été préincubées durant 30 minutes en présence de MS aux concentrations indiquées, puis stimulées pendant 6 heures par 5 ng/ml d'IL-1, toujours en présence de MS. La quantité d'IL-6 libérée dans le surnageant est mesurée par ELISA, comme décrit au point II.4. des matériels et méthodes. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux cellules stimulées par l'IL-1 seule, arbitrairement portées à 100 %.

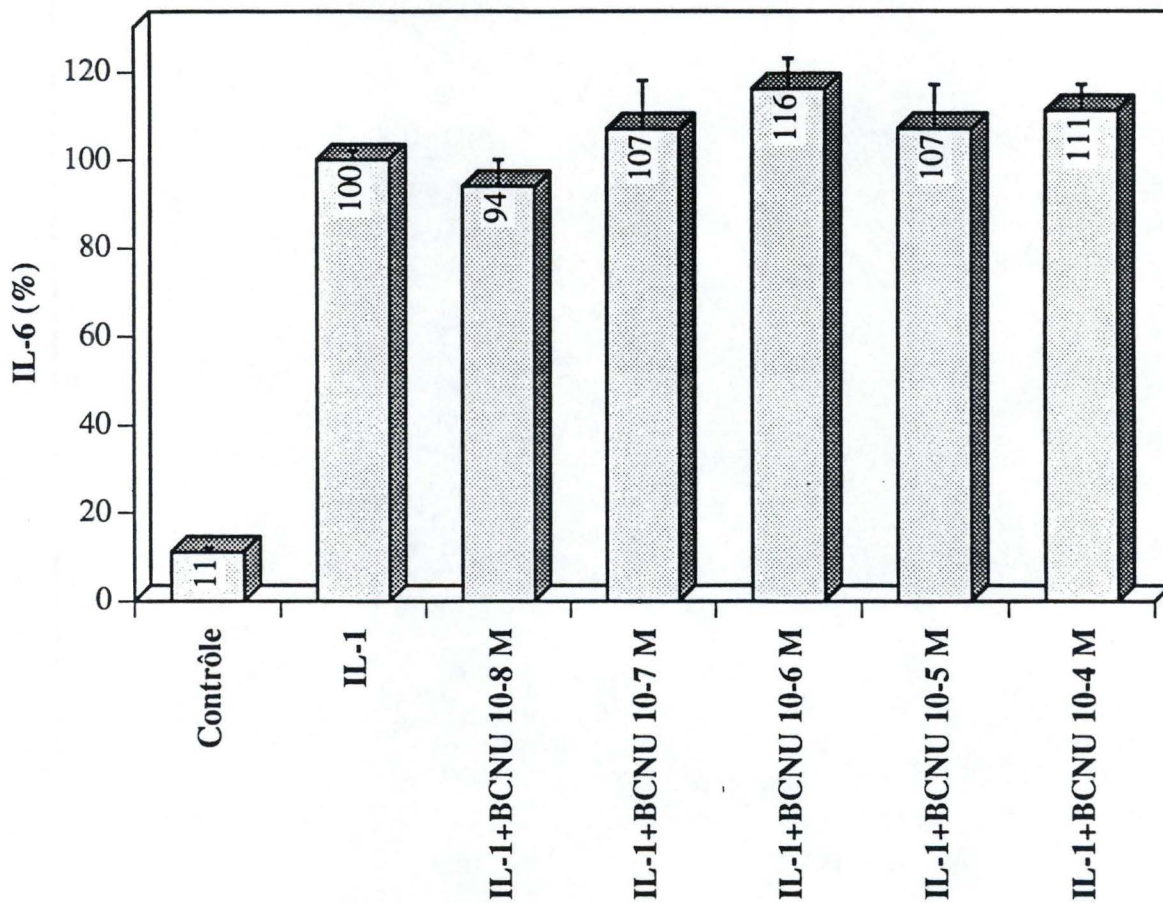


Figure III.18. : Effet de la BCNU sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.

Les cellules WI-38 VA13 ont été préincubées pendant 6 heures en présence ou non de BCNU aux concentrations indiquées, puis stimulées durant 6 heures par 5 ng/ml d'IL-1 additionnée de BCNU. Les quantités d'IL-6 contenues dans les surnageants ont été dosées par ELISA comme décrit au point II.4. des matériels et méthodes. Les résultats obtenus sont exprimés en % par rapport aux cellules stimulées par l'IL-1 seule, arbitrairement portées à 100 %.

Chaque point représente la moyenne de 4 mesures \pm 1 écart-type.

obtenir dans le surnageant une quantité non négligeable d'IL-6 (± 3500 pg/ml d'IL-6).

Les cellules sont cultivées comme décrit au point II.4.2. des matériels et méthodes.

2.2.2.1. Effet du MS sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.

Le dosage de l'IL-6, induite par l'IL-1 avec les différents inhibiteurs devrait normalement refléter ce qui a été obtenu avec l'EMSA. Donc, l'IL-1 avec les inhibiteurs d'enzymes anti-oxydantes devrait provoquer une libération d'IL-6 plus importante qu'à lui seul. Le MS bloquant la GPx, la quantité de dérivés oxygénés actifs présents dans la cellule augmente. En effet, le potentiel oxydant augmentant, lors de la stimulation à l'IL-1, le facteur NF- κ B est activé en plus grande quantité (voir figure III.11.) et devrait donc augmenter la synthèse de l'IL-6. Or, avec l'IL-1 et le mercaptosuccinate, on observe une diminution de la quantité d'IL-6 et ce de manière dose dépendante (figure III.17.).

Au vu de ces résultats inattendus, nous nous sommes demandé si le mercaptosuccinate n'interférerait pas avec la traduction des protéines (Halliwell and Gutteridge 1989). Pour tenter de répondre à cette question, il faudrait réaliser des Northern blot. Si seule la traduction protéinique est affectée par le MS, nous devrions détecter une production de ARNm pour l'IL6 supérieure en présence de MS.

2.2.2.2. Effet du BCNU sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.

Par rapport à la stimulation à l'IL-1, la figure III.18. nous dévoile une faible augmentation de la production d'IL6.

En effet, si l'on se réfère à un test de Student, seules les libérations d'IL-6 suite à une stimulation à l'IL-1 et au BCNU à 10^{-6} M et 10^{-4} M sont significatives ($p=0,95$). Cette absence d'effet du BCNU pourrait être masquée par une stimulation trop élevée par l'IL-1. En effet, 5 ng/ml d'IL-1 sont bien requis pour voir une activation du facteur NF- κ B sur l'EMSA mais ici, nous pouvons penser que cette dose d'IL-1 représente déjà un "plafond" de synthèse d'IL-6 et que le BCNU n'est plus capable de la moduler.

Un effet plus marqué pourrait apparaître lors d'une stimulation à l'IL-1 plus modeste. Il serait donc intéressant de le vérifier sur des cellules stimulées avec des concentrations beaucoup plus faibles. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion générale.

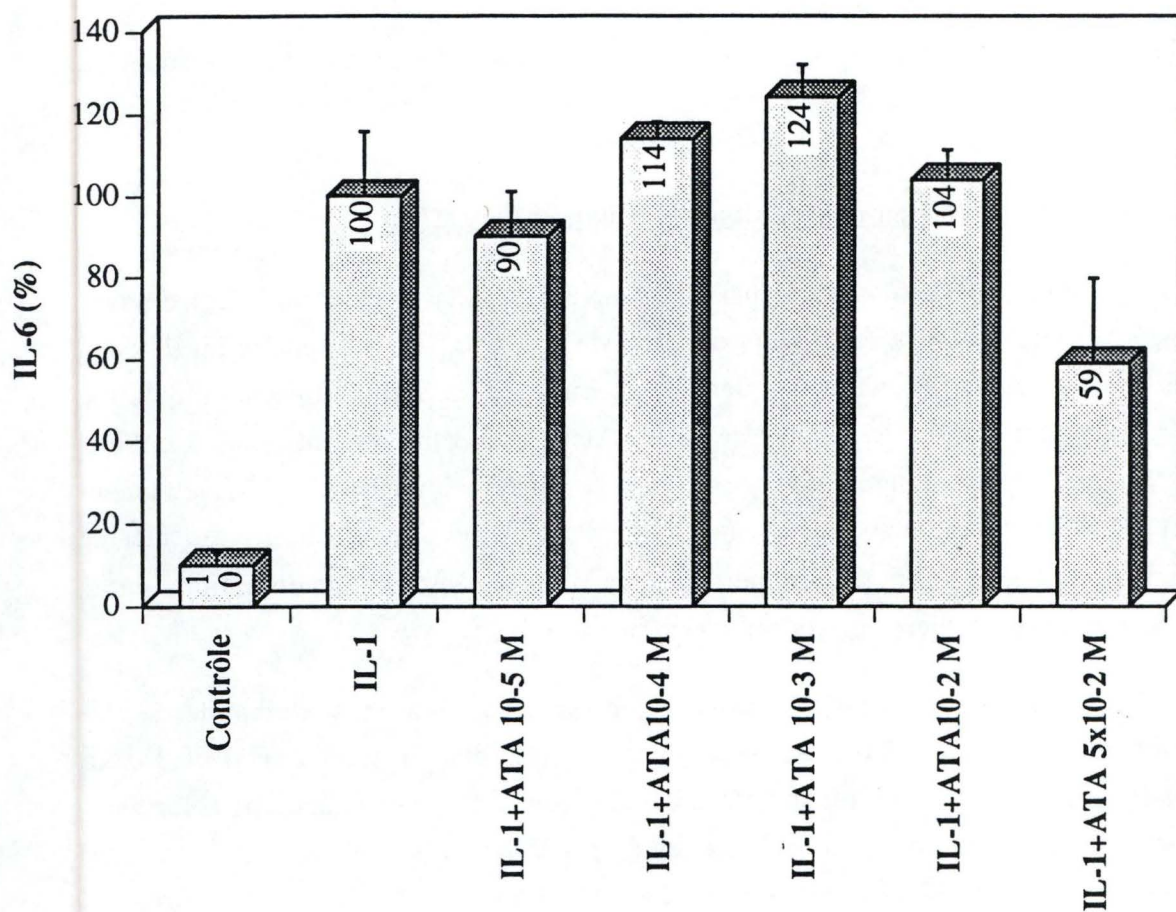


Figure III.19. : Effet de l'aminotriazole (ATA) sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1. Les cellules WI-38 VA13 ont été préincubées durant 30 minutes en présence d'ATA aux concentrations indiquées, puis stimulées durant 6 heures par 5 ng/ml d'IL-1, toujours en présence d'ATA. La quantité d'IL-6 libérée dans le surnageant est mesurée par ELISA, comme décrit au point II.4. des matériels et méthodes. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux cellules stimulées par l'IL-1 seule arbitrairement portées à 100 %. Chaque point représente la moyenne de 4 mesures \pm un écart-type.

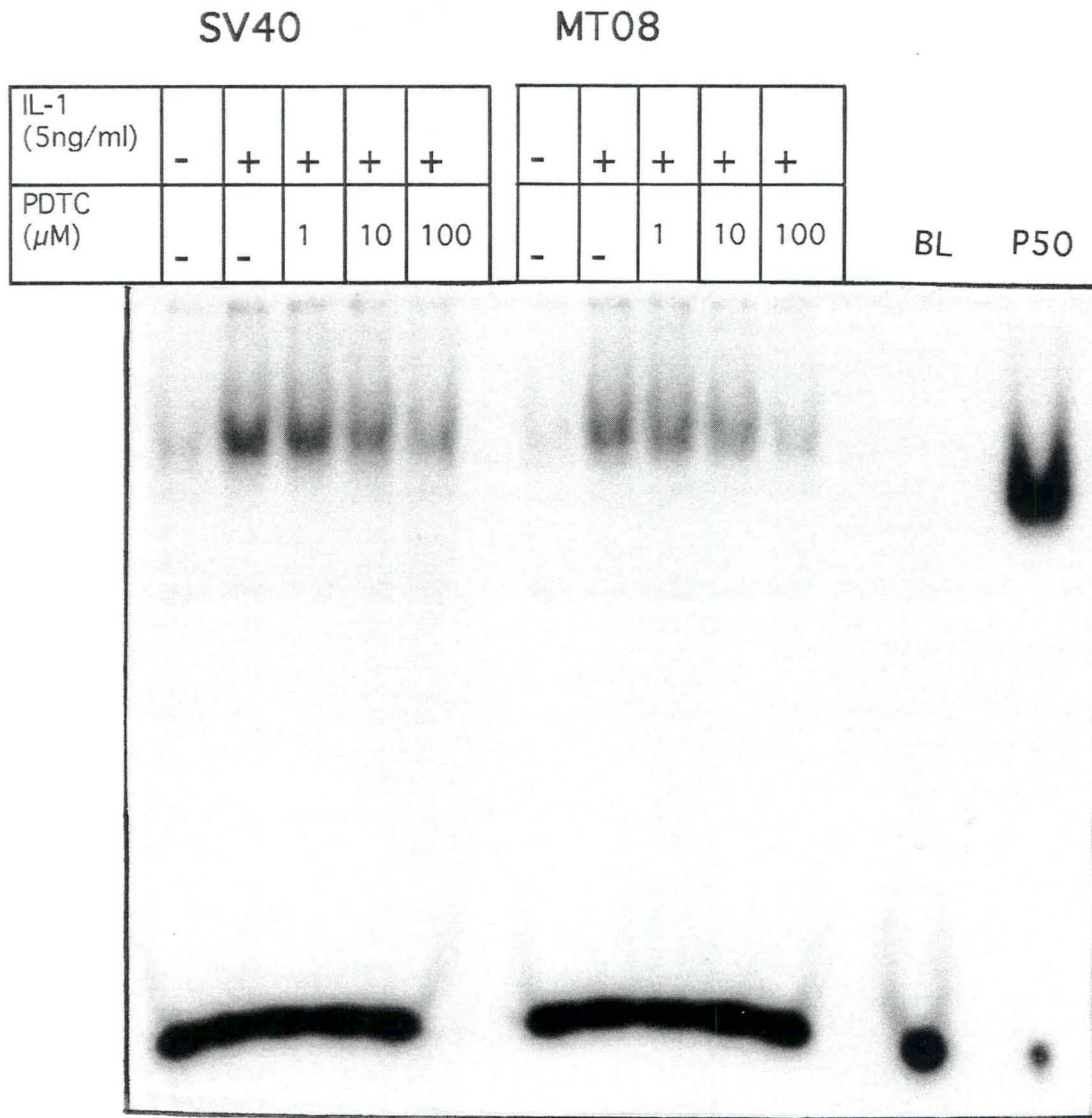


Fig.III.20. : Autoradiographie d'un gel issu d'une expérience d'EMSA, comparant l'effet du pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) dans les WI-38 VA13 et WI-38 MT08 sur l'activation du facteur NF κ B induite par l' IL-1 (5 ng/ml).

Les cellules ont été rincées dans du MEM+HLA 30 minutes puis stimulées ou non 30 minutes avec l'IL-1 en présence ou non de PDTC.

25 μ g de protéines ont été déposés par piste. Le contrôle négatif (blanc) représente la migration de la sonde seule tandis que le contrôle positif (p50) représente la migration de la sonde en présence de l'homodimère p50-p50 purifié.

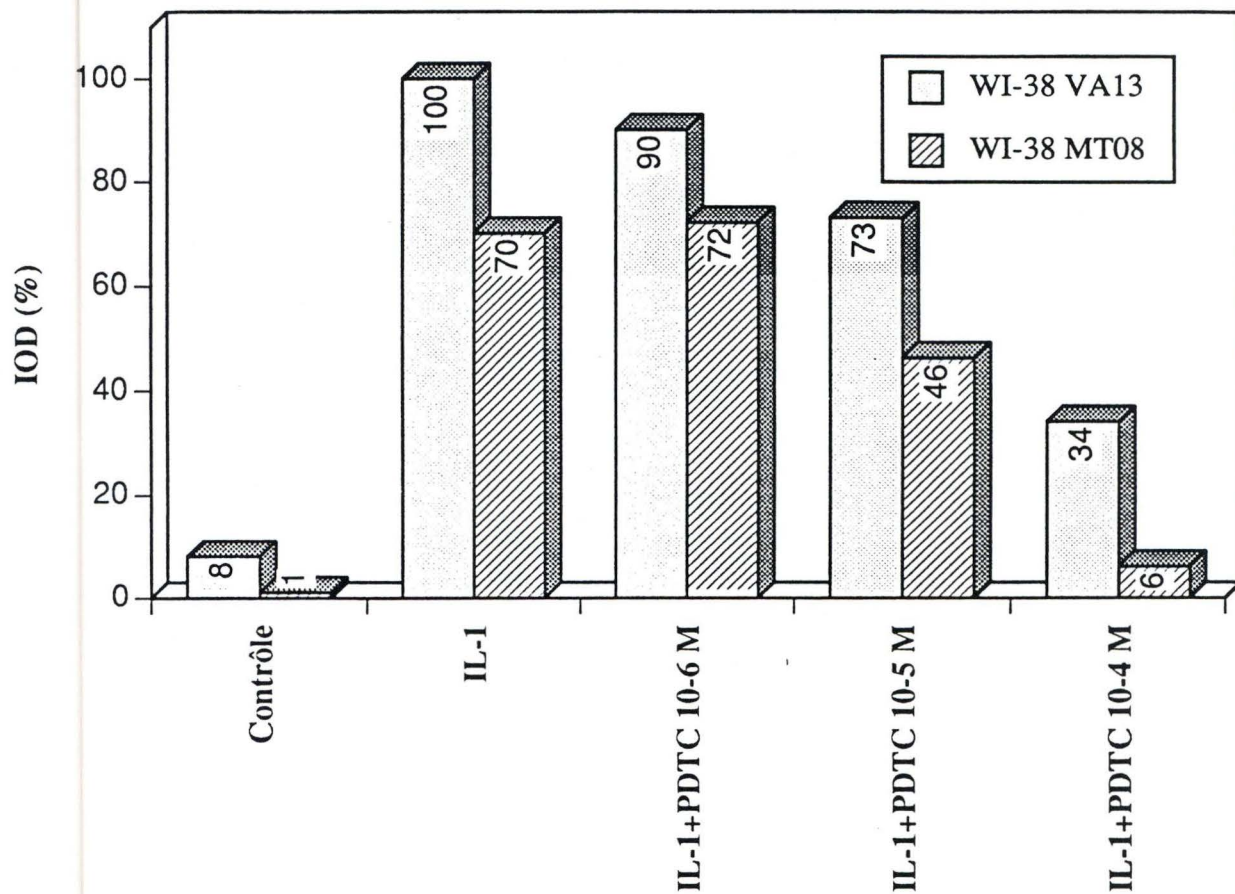


Figure III. 21. : Effet du PDTC sur l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1 dans les cellules WI-38 VA13 et WI-38 MT08.

Le gel de la figure III.20. a été analysé quantitativement par le système d'analyse d'image (voir point II.5.2.7. des matériels et méthodes). Les résultats sont exprimés en IOD (intégration de la densité optique) en fonction des différents traitements subis par les cellules WI-38 VA13 et WI-38 MT08.

Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes en présence d'IL-1 additionnée ou non de PDTC aux concentrations indiquées. Les résultats obtenus sont exprimés en % par rapport aux cellules WI-38 VA13 traitées à l'IL-1 seule, arbitrairement portées à 100 %.

2.2.2.3. Effet de l'ATA sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1.

Les résultats montrés à la figure III.19. montrent l'effet de l'ATA sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1. On peut les comparer avec ceux obtenus avec le BCNU, ici les valeurs significatives ($p=0,95$) par rapport à la stimulation avec l'IL-1 seule s'observent avec des stimulations à l'IL-1+ATA 10^{-3} M et IL-1+ATA 5.10^{-2} M.

Le test ELISA devrait donc être recommencé avec des concentrations plus faibles en IL-1, par exemple 0,25 ng/ml, en espérant ainsi mieux pouvoir mettre en évidence une surproduction éventuelle d'IL6 dans les cellules stimulées par l'IL1 en présence d'inhibiteurs d'enzymes antioxydantes, par rapports aux cellules stimulées avec l'IL1 seule.

3. EFFET D'UNE AUGMENTATION DU POTENTIEL ANTI-OXYDANT SUR L'ACTIVATION PAR L'IL-1.

Après avoir diminué le potentiel anti-oxydant de la cellule via des inhibiteurs enzymatiques, nous allons l'augmenter, soit par l'addition d'anti-oxydants exogènes, soit en recourant au modèle de cellules WI-38 VA13 transfectées avec le gène de la GSH peroxydase (Zachary 1994). Rappelons que les cellules transfectées présentent une activité spécifique équivalente à 190 % de celle observée dans les cellules non transfectées (fig. III.3.). Les effets ont été successivement étudiés sur l'activation du facteur NF- κ B et sur la libération d'IL-6.

3.1. EFFET DU PDTC SUR L'ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B PAR L'IL-1 DANS LES WI-38 VA13 ET LES WI-38 MT08

Nous avons voulu comparer par la technique de retard sur gel les cellules WI-38 VA13 et les MT08 face à une stimulation à l'IL-1 et ce en présence ou non d'un anti-oxydant, le PDTC, connu pour inhiber l'activation du facteur . Son mode d'action n'est pas encore élucidé. Des hypothèses ont été proposées telle que la chélation d'ions métalliques divalents ou la modification du niveau de thiol intracellulaire . Le PDTC a été testé à 3 concentrations différentes : 1, 10 et 100 μ M (Fig III.20.).

Les figures II.21 donnent les résultats obtenus, après l'analyse quantitative des gels par le système d'analyse d'image. Deux conclusions majeures apparaissent clairement :

- Primo : Lorsque l'on compare les cellules WI-38 VA-13 (non transfectées) et les cellules MT-08 (transfectées), en ce qui concerne l'activation du facteur NF- κ B par l'IL-1 seule, on constate que le niveau d'activation atteint dans les cellules transfectées est nettement inférieur à celui obtenu dans les cellules non transfectées, puisqu'il n'est que de 70%, ce qui

	Activation résiduelle du facteur NFκB IOD (%) *	
	WI-38 VA13	WI-38 MT08
IL-1	100	100
IL-1+PDTC 10-6 M	90	103
IL-1+PDTC 10-5 M	73	65
IL-1+PDTC 10-4 M	34	8

* Les % d'activation résiduelle ont été calculés en rapportant les IOD obtenues pour chaque traitement au PDTC à l'IOD obtenue pour les cellules traitées à l'IL-1 seule.

Table III.1. : Effet du PDTC sur l'activation du facteur NF-κB dans les cellules WI-38 VA13 et WI-38 MT08.

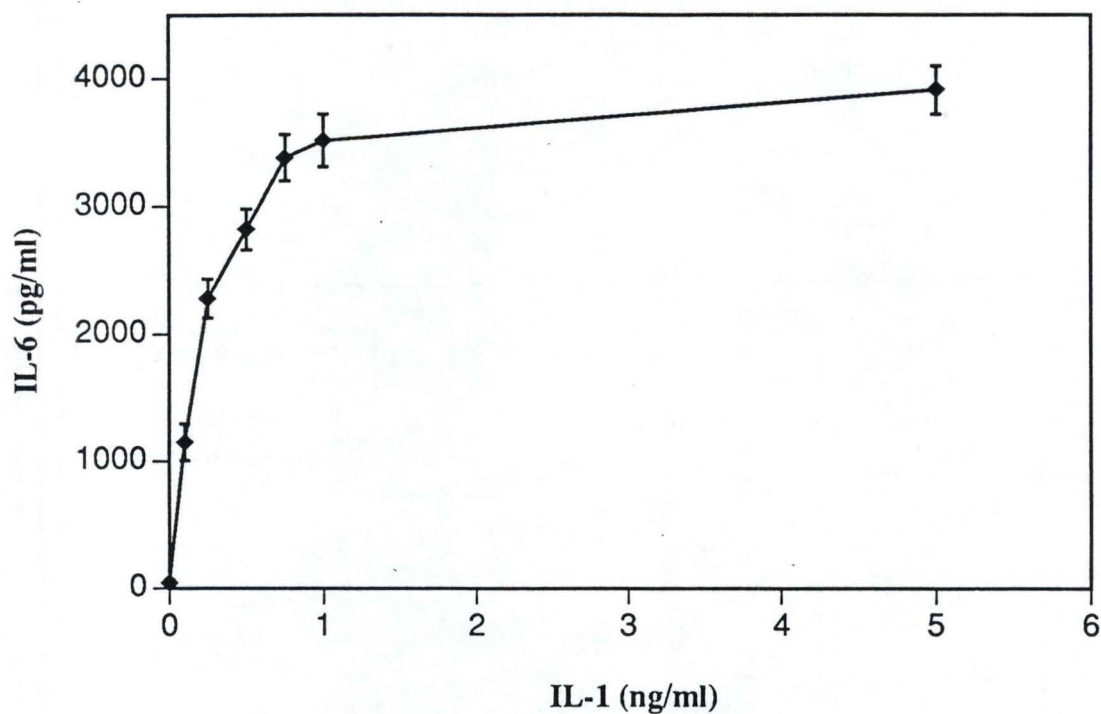


Figure III.22. : Effet de la concentration en IL-1 sur la libération d'IL-6.

Les cellules WI-38 VA13 ont été incubées pendant 6 heures en présence de 0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 et 5 ng/ml d'IL-1. La quantité d'IL-6 libérée a été dosée par ELISA comme décrit au point II.4. des matériels et méthodes. Les résultats sont exprimés en pg d'IL-6 libérée /ml de surnageant.

Chaque point représente la moyenne de 4 mesures \pm un écart-type.

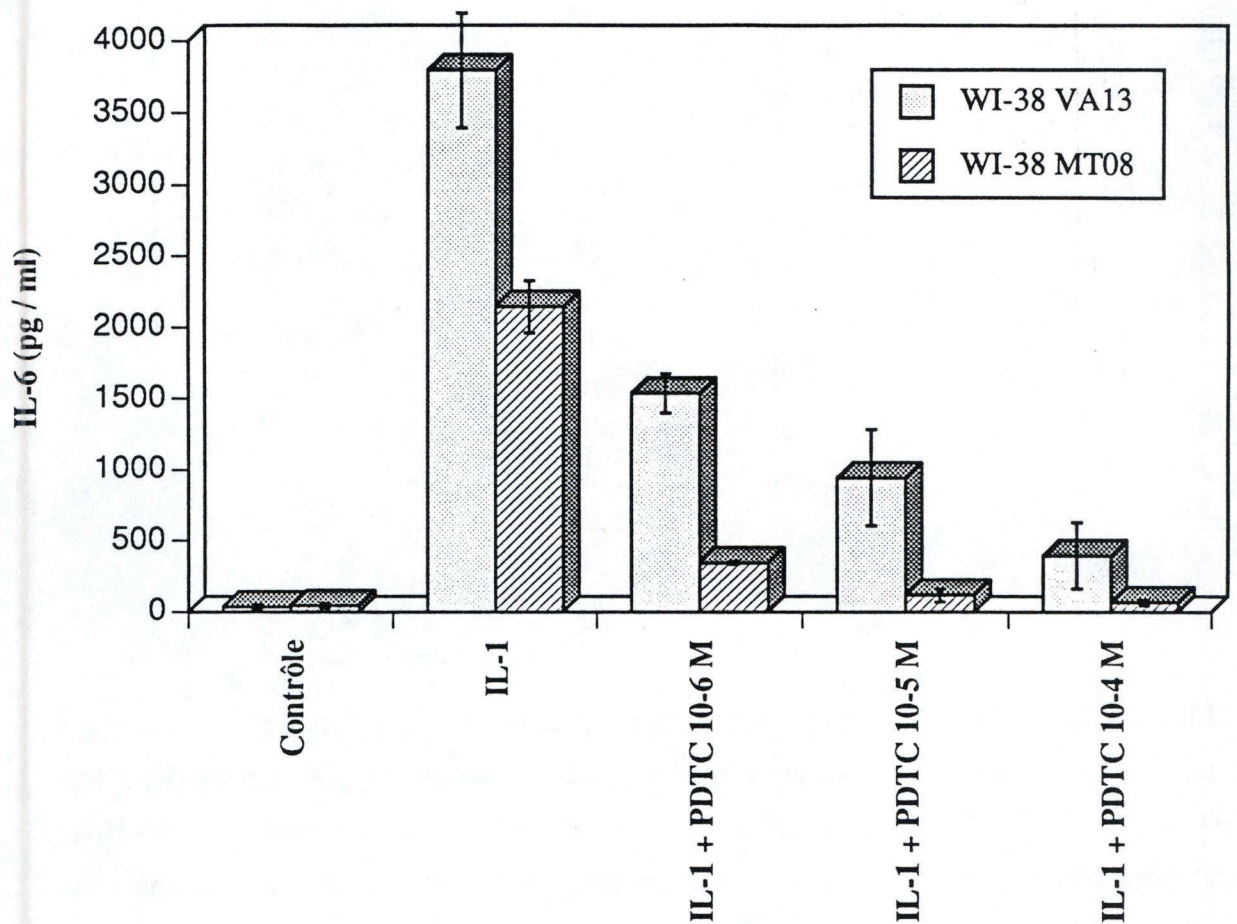


Figure III. 23. : Effet du PDTC sur la libération d'IL-6 induite par l'IL-1 (0,25 ng/ml) dans les cellules WI-38 VA13 et WI-38 MT08.

Les cellules ont été stimulées durant 6 heures par 0,25 ng/ml d'IL-1 en présence de PDTC.

La quantité d'IL-6 libérée dans le surnageant est mesurée par ELISA, comme décrit au point II.4. des matériels et méthodes.

Les résultats sont exprimés en pg d'IL-6/ml de surnageant.

correspond aux résultats attendus.

- Secundo : Le PDTC inhibe bien de manière dose-dépendante l'activation de facteur NF- κ B induit par l'IL-1 dans les deux souches de cellules, mais on constate clairement un décalage dans la courbe de concentration pour les deux souches, les cellules transfectées s'avèrent plus sensibles aux effets du PDTC que les cellules non transfectées. Nous avons calculé les activations résiduelles en présence de PDTC pour les deux souches (Table III.1). Comme l'illustre cette table, on constate qu'à 10^{-4} M, par exemple, l'activation résiduelle du facteur NF- κ B est de l'ordre de 34% pour les cellules non transfectées (ce facteur fait 66% d'inhibition) tandis que qu'elle n'est plus que de 8% pour les cellules transfectées, ce qui correspond à 92% d'inhibition. Les effets du PDTC exogène viennent donc accentuer les effets imputables aux niveau enzymatiques différents dans les deux souches de cellules.

3.2. EFFET DU PDTC SUR LA LIBERATION D'IL-6 INDUITE PAR L'IL-1 DANS LES WI-38 VA13 ET LES MT08.

Comme précédemment, nous avons voulu confirmer ces effets sur la sécrétion d'IL-6.

Nous avons d'abord refait une courbe de concentration en IL-1 sur la production d'IL-6 (Fig III.22).

Nous avons choisi la concentration de 0,25 ng/ml d'IL-1 pour la stimulation des cellules avec et sans PDTC. La figure III.22 montre que cette concentration engendre en effet une libération d'IL-6 réduite de moitié par rapport à celle obtenue avec une stimulation de 5 ng/ml.

La figure III.23 donne les résultats obtenus pour les deux souches de cellules.

Nous pouvons tirer le même type de conclusions que pour les expériences d'activations du facteur NF- κ B (Fig III.20 et 21) :

-Primo : Pour une même concentration en IL-1, les cellules transfectées, sécrètent comparativement moins d'IL-6 que les cellules non transfectées. En fait les quantités d'IL-6 pour un même nombre de cellules représentent 56% chez les cellules transfectées par rapport aux cellules non transfectées.

-Secundo : Le PDTC inhibe la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-1, d'une manière toujours dose dépendante, mais les courbes de concentration en PDTC sont décalées, les cellules transfectées s'avèrent plus sensibles.

	Production résiduelle d'IL-6 (%) *	
	WI-38 VA13	WI-38 MT08
IL-1	100	100
IL-1+PDTC 10-6 M	40	16
IL-1+PDTC 10-5 M	29	5
IL-1+PDTC 10-4 M	10	3

* Les % de production résiduelle d'IL-6 ont été calculés en rapportant les quantités d'IL-6 produites pour chaque traitement au PDTC, à celles produites par les cellules stimulées à l'IL-1 seule, et ce pour chaque souche de cellules.

Table III.2. : Effet du PDTC sur la libération d'IL-6 dans les cellules WI-38 VA13 et WI-38 MT08.

Nous avons calculé les productions d'IL-6 résiduelles en présence de PDTC pour les deux souches de cellules (Table III.2). On constate que pour la concentration en PDTC la plus faible utilisée (10^{-6} M), la production résiduelle d'IL-6 est de 40% pour les cellules non transfectées tandis qu'elle n'est plus que de 16% pour les cellules transfectées. Ces résultats suggèrent que la production d'IL-6 dans des cellules stimulées à l'IL-1 à 0,25 mg/ml constitue un test particulièrement sensible pour évaluer des molécules antioxydantes.

IV. Discussion générale et perspectives

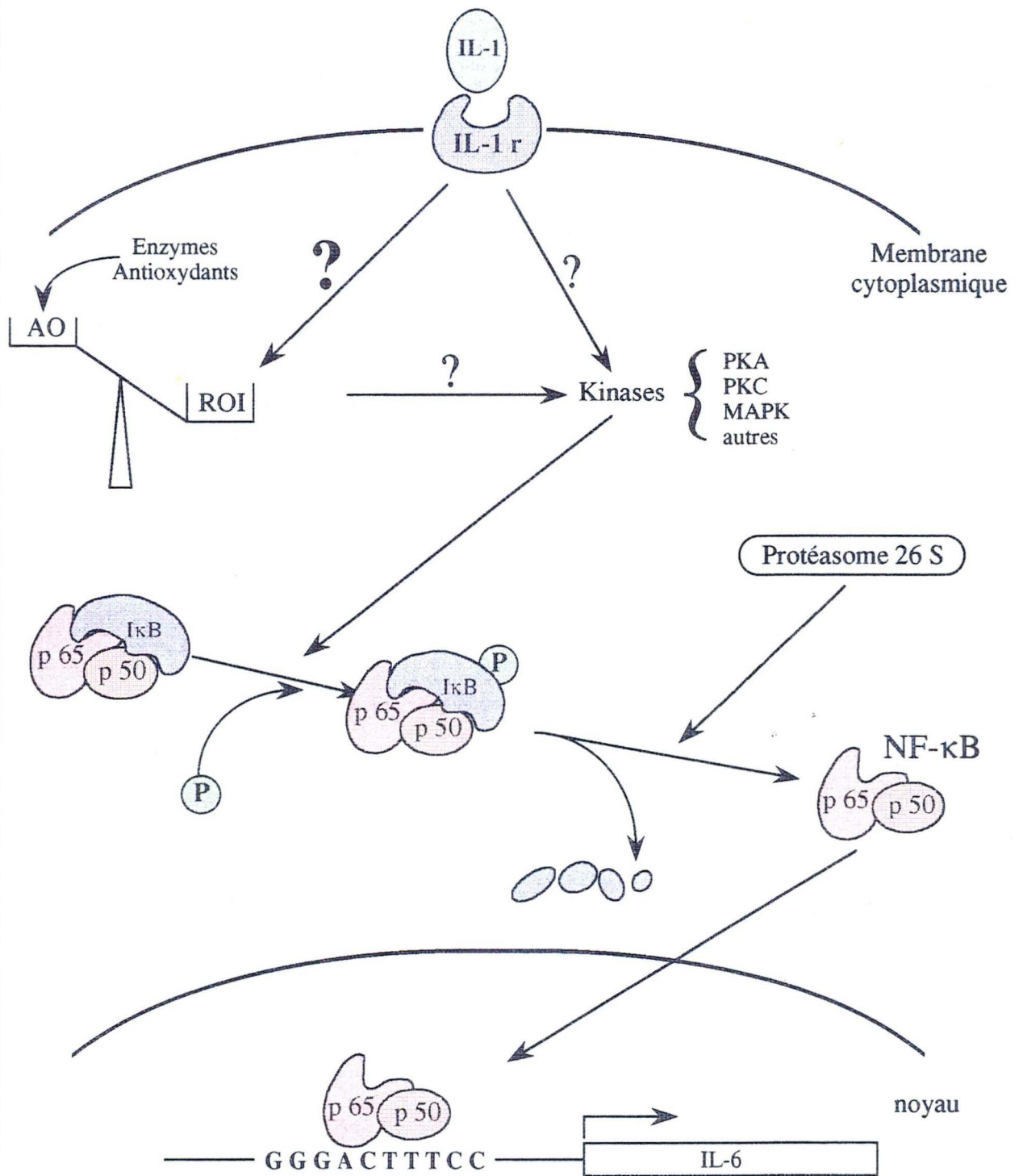


Figure IV.1. : Schéma hypothétique de l'activation du facteur NF- κ B par l'IL-1. La fixation de l'IL-1 sur son récepteur provoquerait un déséquilibre de la balance cytoplasmique antioxydants (AO) / oxydants (ROI) en faveur des espèces oxydantes. Ce phénomène activerait le facteur NF- κ B par l'intermédiaire d'une phosphorylation sur la sous-unité I κ -B. Cette phosphorylation entraînerait la dégradation d'I κ -B par le protéasome 26S. Le NF- κ B, libéré de sa sous-unité inhibitrice, pourrait alors migrer dans le noyau et se fixer sur sa séquence cible afin de transactiver.

Lors de la transduction du signal de l'IL-1, plusieurs voies semblent impliquées dont celle des dérivés actifs de l'oxygène (ROI). Depuis peu, celle-ci s'est avérée impliquée dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B.

Afin d'étudier l'importance des ROI dans l'activation du facteur NF- κ B induit par l'IL-1, nous avons décidé de moduler le potentiel antioxydant de la cellule de différentes manières. Suivant une première approche, nous l'avons diminué en utilisant des inhibiteurs d'enzymes antioxydantes. Dans un second temps, l'utilisation de cellules transfectées avec le gène de la GPx (glutathion peroxydase) nous a permis d'étudier l'effet d'une augmentation de ce potentiel antioxydant.

a) Diminution du potentiel antioxydant :

Nous avons tout d'abord vérifié l'effet des inhibiteurs d'enzymes antioxydantes sur les activités spécifiques de celles-ci. La GPx était effectivement inhibée par le MS, la glutathion réductase par la BCNU, et la catalase par l'ATA.

Les résultats obtenus montrent au moins 20% d'inhibition pour chacune des enzymes, la glutathion réductase allant même jusqu'à être inhibée de 50 % par le BCNU (10^{-4} M) et la catalase inhibée jusqu'à 66 % par l'ATA (5×10^{-2} M). Remarquons qu'aux concentrations utilisées, ces inhibiteurs n'avaient pas d'effet sur les autres enzymes antioxydantes (Michiels and Remacle 1988). Nous l'avons également vérifié pour l'ATA qui est l'inhibiteur utilisé aux concentrations les plus élevées. A ces concentrations, l'ATA n'inhibe ni la GPx ni la glutathion réductase.

Les inhibiteurs utilisés induisant effectivement une diminution de l'activité enzymatique, nous avons testé leurs effets sur l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1. En diminuant le potentiel antioxydant des cellules, nous avons accru la quantité de ROI intracellulaire, et de ce fait facilité l'activation du facteur NF- κ B induit par l'IL-1 (figure IV.1.). Effectivement, les résultats montrent que l'inhibition de chacune des trois enzymes antioxydantes lors de stimulations par l'IL-1 entraîne une augmentation de l'activité du facteur par rapport à la stimulation par l'IL-1 seule. Un indice de protection a été défini. D'après ces auteurs, pour obtenir 20 % de protection, dans des cellules soumises à l'hyperoxie, c'est la GPx qui s'avère la plus efficace puisqu'il faut injecter comparativement 2 000 fois plus de molécules de SOD et 6 fois plus de molécules de catalase pour atteindre le même niveau de protection.

Remarquons que malgré la faible inhibition de l'activité glutathion peroxydase obtenue

avec le MS (20% d'inhibition enzymatique à 10^{-3} M), celui-ci induit néanmoins une activation de 150% du facteur NF- κ B par rapport aux cellules stimulées en présence d'IL-1 seule. Cette hyperactivation observée en présence de MS est de loin la plus élevée, puisque 20% d'inhibition enzymatique correspondent à une activation de 107,2% du facteur NF- κ B en présence de la BCNU (10^{-7} M) et de 109,5% dans le cas d'une inhibition de la catalase par l'ATA (10^{-2} M).

Ceci reflète l'importance de la GPx au sein de la cellule, ce qui confirme une étude faite par Raes *et al.* en 1986. Dans cette étude comparative des systèmes enzymatiques de défense, ils ont testé l'efficacité respectivement de la SOD, de la catalase et de la GSH peroxydase face à la mortalité cellulaire induite par une hyperoxie, et ce par microinjection des enzymes dans les cellules. Parmi toutes les enzymes antioxydantes, la GPx joue donc un rôle très important et en l'inhibant, on participe fortement à l'augmentation des peroxydes dans la cellule. Ceci se traduit par une augmentation de l'activité du facteur de transcription NF- κ B. Cela explique que la facteur NF- κ B soit particulièrement sensible à une diminution de l'activité glutathion peroxydase.

Afin de compléter notre approche moléculaire par des données plus cellulaires, nous avons voulu vérifier l'impact physiologique de ces différents inhibiteurs en examinant le produit d'un gène activé par le facteur NF- κ B, celui de l'IL-6.

Nous espérons donc reproduire ici les résultats obtenus par retard sur gel sur l'activation du facteur. L'IL-6 libérée lors d'une stimulation à l'IL-1 en présence de BCNU ou d'ATA n'est significativement plus élevée que pour deux valeurs. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la stimulation à l'IL-1 (à 5 ng/ml) correspondrait déjà à un maximum en ce qui concerne la synthèse de l'IL-6 comme nous l'avons montré par la suite. Il serait donc intéressant de recommencer ces stimulations avec des concentrations plus faibles en IL-1.

D'après les résultats obtenus avec le MS sur l'activation de facteur NF- κ B, on aurait pu s'attendre à observer une augmentation dans la synthèse d'IL-6 lorsqu'on stimule à l'IL-1 en présence de MS par rapport à l'IL-1 seule.

Or, nous avons constaté une diminution dose-dépendante de la production d'IL-6 vis-à-vis de la concentration en MS. Il est possible que des groupements SH du MS interrégissent de manière non spécifique avec des enzymes de la machinerie de synthèse protéique. Si le système de traduction protéique est inhibé par le MS, cela implique une diminution de la synthèse d'IL-6 en présence de ce médiateur. Cela signifie également que la quantité d'ARNm d'IL-6 devrait évoluer différemment de celle des protéines. Si un Northern blot révèle une augmentation de la quantité de mRNA IL-6 en présence de concentrations croissantes en MS, cela confirmerait cette hypothèse d'interférence entre MS et la machinerie de synthèse protéique.

b) Augmentation du potentiel antioxydant :

La seconde approche de ce travail consistait à augmenter le potentiel antioxydant de la cellule. Ceci devrait permettre une meilleure défense contre les ROI, qui se trouveraient donc en concentration moindre pour participer à la transduction du signal de l'IL-1. Le facteur NF- κ B devrait donc être moins activé. Signalons que ce type d'approche a déjà été réalisé par Schreck et son équipe, en surexprimant la SOD (Schreck, 1992). Mais rappelons que la SOD élimine un type de ROI ($O_2^{\cdot-}$) pour en créer un autre (H_2O_2).

Cette surexpression de la SOD a donc conduit à une augmentation des H_2O_2 , ce qui a provoqué une activation plus élevée du facteur par rapport aux cellules non transfectées.

Nous avons également suivi une approche basée sur l'utilisation de cellules surexprimant des enzymes antioxydantes. Elle était cependant différente en ce sens que l'augmentation des défenses contre les ROI entraînait une diminution de l' H_2O_2 impliqué dans l'activation du facteur. En effet, nous avons augmenté le potentiel antioxydant soit en utilisant des cellules transfectées par le gène soit par addition d'antioxydants exogènes de la GPx ou encore en combinant ces deux défenses.

Deux conclusions majeures apparaissent clairement :

- premièrement, lorsque l'on compare les cellules non-transfectées (WI-38 VA13) et les cellules transfectées avec le gène de la GPx (WI-38 MT08) en ce qui concerne l'activation du facteur NF- κ B par l'IL-1 seule, on constate que le niveau d'activation atteint dans les cellules transfectées est nettement inférieur à celui obtenu dans les cellules non-transfectées. Ces résultats étaient prévisibles étant donné qu'en surexprimant la GPx nous facilitons la destruction des peroxydes qui sont reconnus pour activer le facteur NF- κ B, bien que la nature des mécanismes moléculaires impliqués reste inconnue.

- deuxièmement, le PDTC, comme mentionné dans la littérature, inhibe bien de manière dose-dépendante l'activation du facteur NF- κ B induite par l'IL-1, et ce dans les deux souches de cellules, mais on constate clairement un décalage dans la courbe de concentration pour les deux souches. Les cellules transfectées s'avèrent en effet plus sensibles aux effets du PDTC que les cellules non-transfectées. Cette activation très faible du facteur NF- κ B dans les cellules WI-38 MT08 s'explique facilement par le fait que, outre l'ajout d'un antioxydant exogène (le PDTC), ces cellules surexpriment la GPx. On arrive donc à diminuer l'activation du facteur par l'IL-1 en surexprimant la GPx et en apportant des antioxydants exogènes.

Le comportement des deux lignées cellulaires soumis à une stimulation par l'IL-1 en présence de PDTC a également été testé vis-à-vis de la sécrétion d'IL-6. Toutefois pour cette stimulation, nous avons utilisé une concentration plus faible en IL-1. Nous avons choisi la concentration de 0,25 ng/ml sur base d'une courbe de dose-dépendante de l'IL-6 par rapport à l'IL-1.

Le test ELISA reproduit exactement le profil obtenu avec le facteur NF- κ B si ce n'est que ces effets sont encore plus marqués. En effet, en utilisant cette concentration moindre en IL-1 pour stimuler les cellules, on parvient à inhiber plus fortement l'expression d'IL-6.

Ces résultats suggèrent que la production d'IL-6 dans des cellules stimulées à l'IL-1 (0,25 ng/ml) constitue un test particulièrement sensible pour évaluer des molécules antioxydantes afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action sur l'activation cellulaire, mais aussi afin d'élargir les thérapies notamment en ce qui concerne le SIDA où la N-acétylcystéine est déjà utilisé, comme agent complémentaire.

Certaines expériences mériteraient d'être réalisées afin de compléter ce travail. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les expériences de libération d'interleukine-6 induite par l'IL-1 en présence d'ATA et de la BCNU devraient être reproduites en utilisant des doses plus faibles en IL-1.

Dans le cas où l'ATA et la BCNU ne montreraient pas d'effet sur une libération d'IL-6 induite par des doses moindres en IL-1, il pourrait être intéressant de tester ces médiateurs sur la synthèse d'ARNm d'IL-6 par Northern blot.

L'effet du MS sur la production d'ARNm d'IL-6 devrait être également vérifiée par Northern blot de manière à établir si le MS provoque effectivement une diminution de la synthèse d'IL-6 en inhibant la machinerie de synthèse protéique.

Toutefois, si cette théorie apporte un argument supplémentaire à la théorie impliquant des ROI dans l'activation du NF- κ B il faut reconnaître, que les mécanismes moléculaires de l'activation du facteur restent largement hypothétique. Une perspective intéressante de ce travail serait de vérifier si la cascade des kinases mise en évidence par Freshney et al. (1994) [Freshney, 1994 #281] et qui est responsable de la phosphorylation de la protéine de choc thermique HSP27 induite par l'IL-1 peut être modulé par le potentiel antioxydant des cellules. Etant donné que la plupart de ces kinases ont été purifiées et sont en cours de caractérisation, il devient envisageable de tester cette hypothèse. Le potentiel antioxydant pourrait également être testé sur d'autres kinases reconnues pour jouer un rôle dans la transduction du signal de l'IL-1 telle que la MAP kinase. L'identification de la ou des kinases, sensible aux potentiels antioxydants constituerait un pas décisif dans l'élucidation des mécanismes moléculaires de la transduction du signal lié à l'IL-1 via les ROI.

V. Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Baeuerle, P. A. (1994). Transcription factor NF- κ B, a protein complex specialized in responding to pathogenic stimulation of cells. International summer school on molecular mechanisms of transcellular signaling : "from the membrane to the gene"., Island of Spetses,

Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1988). "Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor." Cell **53**: 211-17.

Baudhuin, P., H. Beaufays, et al. (1964). "Tissue fractionnement studies, 17 intracellular distributions of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine dehydrogenase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue." Biochemistry Journal **92**: 179-184.

Beg, A. A. and A. S. Baldwin Jr. (1993). "The I κ B proteins : multifunctional regulators of Rel/NF- κ B transcription factors." Genes and development **7**: 2064-2070.

Berridge, M. (1985). "Les molécules de la communication dans la cellule." Pour la Science Décembre 1985: 134-146.

Betts, J. C., A. B. Agranoff, et al. (1994). "Dissociation of Endogenous Cellular Ceramide from NF-kappa b Activation." J Biol Chem **269**(11): 8455-8458.

Blank, V., P. Kourilsky, et al. (1992). "NF- κ B and related proteins : Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats." TIBS **17**: 135-140.

Bouchelouche, P. N., C. Reimert, et al. (1988). "Effects of natural and recombinant interleukin-1 α and - β on cytosolic free calcium in human and murine fibroblasts." Leukemia **10**: 691-696.

Boulikas, T. (1994). "Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors." J Cell Biochem **55**(1): 32-58.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.

Brennan, P. and L. A. O'Neil (1994). Studies into the inhibition of NF κ B by thiol-modifying compounds. (Poster Abstract). International summer school on molecular mechanisms of transcellular signaling : "from the membrane to the gene"., Island of Spetses, NATO:FEBS advanced study institute for post-doctoral scientists and advanced students.

Burch, R., M. White, et al. (1989). "IL-1 stimulates prostaglandin synthesis and cAMP accumulation in Swiss 3T3 fibroblasts : interactions between two second messenger systems." J. Cell. Physiol. **139**(29-33):

Cavaillon, J. M. (1992). "La participation des cytokines au cours de la réponse inflammatoire." Cyt. Inflamm. **41**(8 bis): 799-810.

Chaudière, J., E. C. Wilhemsens, et al. (1984). "Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans." The Journal of Biological Chemistry **252**(2): 1043-1050.

Colotta, F., F. Re, et al. (1993). "Interleukin-1 type II receptor : a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4." Science **261**: 472-475.

Darr, D. and I. Fridovich (1986). "Irreversible inactivation of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole." Biochem Pharmacol **35**(20): 3642.

Dbaibo, G. S., L. M. Obeid, et al. (1993). "Tumor necrosis factor- α (TNF- α) signal transduction through ceramide." The Journal of Biological Chemistry **268**(24): 17762-17766.

Diaz-Meco, M. T., M. M. Municio, et al. (1993). "A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation." Mol. Cell. Biol. **13**(8): 4770-4775.

Dickens, F. and G. E. Glock (1951). "Direct oxidation of glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate and pentose-5-phosphates by enzymes of animal origin." Biochem. J. **50**: 81-95.

Dinareello, C. A. (1988). "Biology of interleukin 1." FASEB J. **2**: 108-15.

Dinareello, C. A. (1991). "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism." Blood **77**(8): 1627-1652.

Dizdaroglu, M. (1991). "Chemical determination of free radical-induced damage to DNA." Free Radical Biol. Med. **10**: 225-42.

Doborowsky, R. T. and Y. A. Hannun (1992). "Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase." J. Biol. Chem. **267**(8): 5048-5051.

Dower, S. K., E. E. Qwarnstorm, et al. (1990). "Biology of the interleukin-1 receptor." J. Invest. Dermatol. **94**(6, supplement): 68S-73S.

Fagarasan, M. O., J. F. Bishop, et al. (1990). "Interleukin-1 induces early protein phosphorylation and requires only a short exposure for late induced secretion of β -endorphin in a mouse pituitary cell line." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**(2555-2559):

Fenton, M. (1992). "Review : transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin-1 gene expression." :

Finco, T. S. and A. S. Baldwin (1993). "Kappa-B site-dependent induction of gene expression by diverse inducers of nuclear factor kappa B requires Raf-1." J. Biol. Chem. **268**(24): 17676-17679.

Forman, H. J. and M. Torres (1991). Inflammation : an overview. Oxidative damage and repair : chemical, biological, and medical aspects. Ed. D. K.J.A. Oxford, England, Pergamon Press. 636-641.

Freeman, B. A. and J. D. Crapo (1982). "Biology of disease : free radicals and tissue injury." Lab. Invest. **47**: 412-426.

Freshney, N. W., L. Rawlinson, et al. (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." Cell **78**: 1039-49.

Ghosh, S. and D. Baltimore (1990). "Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B." Nature **344**: 678-682.

Gilman, S. C., J. Chang, et al. (1988). "Interleukin-1 activates phospholipase A2 in human synovial cells." Arthritis Rheum. **31**: 126-130.

Guy, G. R., S. P. Chua, et al. (1991). "Interleukin 1 and tumor necrosis factor

activate common multiple protein kinases in human fibroblasts." J. Biol. Chem. **266**(22): 14343-52.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1989). Free radicals in biology and medicine. Oxford, Great Britain, Clarendon Press.

Heffetz, D. and Y. Zick (1989). "H₂O₂ potentiates phosphorylation of novel putative substrates for the insulin receptor kinase in Fao cells." J. Biol. Chem. **264**(17): 10126-10132.

Henkel, T., T. Machleidt, et al. (1993). "Rapid proteolysis of IκB-α is necessary for activation of transcription factor NF-κB." Nature **365**: 182-185.

Hopkin, F. G. and K. A. C. Elliot (1931). "The relation of glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue." Proc. Roy. Soc. **109**: 58-88.

Hulkower, K. I., S. J. Wertheimer, et al. (1994). "Interleukin-1 beta induces cytosolic phospholipase A(2) and prostaglandin h synthase in rheumatoid synovial fibroblasts - Evidence for their roles in the production of prostaglandin E(2)." Arthritis Rheum **37**(5): 653-661.

Imbert, V., J. F. Peyron, et al. (1994). "Induction of Tyrosine Phosphorylation and T-Cell Activation by Vanadate Peroxide, an Inhibitor of Protein Tyrosine Phosphatases." Biochem J **297**(Part 1): 163-173.

Kaltschmidt, C., B. Kaltschmidt, et al. (1994). "Constitutive NF-kappa B activity in neurons." Mol Cell Biol **14**(6): 3981-3992.

Kelso, A. (1989). "Cytokines : structure, function and synthesis." Curr. Opinion Immunol. **2**: 215-25.

Kerr, J. S., T. M. Stevens, et al. (1989). "Effects of recombinant interleukin-1 β on phospholipase A2 activity, phospholipase A2 mRNA levels, and eicosanoids formation in rabbit chondrocytes." Biochim. Biophys. Res. Comm. **165**: 1079-1084.

Kester, M., M. S. Simonson, et al. (1989). "Interleukin-1 generates transmembrane signals from phospholipids through novel pathways in cultured rat mesangial cells." J. Clin. Invest. **83**: 718-723.

Kishimoto, T., T. Taga, et al. (1994). "Cytokine signal transduction." Cell **76**: 253-262.

Kolesnick, R. (1992). "ceramide : a novel second messenger." Trends in cell Biol. **2**: 232-236.

Lancaster, J. R., G. Werner-Felmayer, et al. (1994). "Coinduction of nitric oxide synthesis and intracellular nonheme iron-nitrosyl complexes in murine cytokine-treated fibroblasts." Free Radical Biology & Medicine **16**(6): 869-870.

Larrick, J. W. and S. L. Kunkel (1988). "The role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the immunoinflammatory response." Pharm. Res. **5**(3): 129-139.

Latchman, D. S. (1991). Eukaryotic transcription factors. Arcourt Brace Jovanovitch.

Li, S. F. and J. M. Sedivy (1993). "Raf-1 Protein Kinase Activates the NF-kappa B Transcription Factor by Dissociating the Cytoplasmic NF- kappa B-I kappa B Complex." Proc Natl Acad Sci Usa **90**(20): 9247-9251.

Lin, L.-L., A. Y. Lin, et al. (1992). "Interleukin-1 α induces the accumulation of cytosolic phospholipase A2 and the release of prostaglandin E2 in human fibroblasts." J. Biol. Chem. **267**(33): 234541-23454.

Liou, H. C., W. C. Sha, et al. (1994). "Sequential induction of NF- κ B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation." Mol. Cell. Biol. **14**(8): 5349-5359.

Lunec, J. (1990). "Free radicals : their involvement in disease processes." Ann. Clin. Biochem. **27**: 173-182.

Margoliash, E., A. Novogrodsky, et al. (1959). "Irreversible reaction of 3-amino-1 : 2 : 4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase." Biochem. J. **74**: 339-48.

Mary, D., C. Aussel, et al. (1987). "Regulation of interleukin-2 synthesis by cAMP in human T cells." J. Immunol. **139**: 1179.

Mayer, R. J. and L. Marshall (1993). "New insights on mammalian phospholipase A2 (s) ; comparison of arachidonoyl-selective and non-selective enzymes." FASEB J. **7**: 339-348.

Mbemba, F., A. Houbion, et al. (1985). "Subcellular localisation and modification with ageing of glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts." Biochimica and Biophysica Acta **838**: 211-220.

McCord, J. M. and I. Fridovitch (1969). "Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein)." J. Biol. Chem. **244**: 6049-6055.

Meichle, A., S. Schütze, et al. (1990). "Protein kinase C-independent activation of nuclear factor κ B by tumour necrosis factor." J. Biol. Chem. **265**(11): 8339-8343.

Meier, B., H. H. Radeke, et al. (1989). "Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor- α ." Biochem. J. **263**(539-545):

Menon, S. D., S. X. Qin, et al. (1993). "Differential Induction of Nuclear NF- κ B by Protein Phosphatase Inhibitors in Primary and Transformed Human Cells - Requirement for Both Oxidation and Phosphorylation in Nuclear Translocation." J Biol Chem **268**(35): 26805-26812.

Meyer, M., R. Shreck, et al. (1993). "H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells : AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor." EMBO J. **12**(5): 2005-2015.

Michiels, C. and J. Remacle (1988). "Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance." Eur. J. Biochem. **177**: 435-441.

Mills, G. C. (1957). "Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown." J. Biol. Chem. **229**: 189-197.

Mirault, M.-E., A. Tremblay, et al. (1991). "Overexpression of seleno-glutathione peroxidase by gene transfer enhances the resistance of T47D human breast cells to clastogenic oxidants." J. Biol. Chem. **266**(31): 20752-20760.

Munoz, E., U. Beutner, et al. (1990). "IL-1 activates two separate signal transduction pathways in T helper type II cells." J. Immunol. **144**: 9-64.

Muroi, M. and T. Suzuki (1993). "Role of protein kinase A in LPS-induced activation

of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774." Cell-Signal. **5**(3): 289-298.

Neumann, M., K. Tsapos, et al. (1992). "Identification of complex formation between intracellular tyrosine substrates : human c-Rel and the p105 precursor of p50 NF-κB." Oncogene **7**: 2095-2104.

O'Neill, L. A. J. (1992). "How does interleukin-1 activate cells?" Kidney Int. **41**: 546-549.

Palombella, V. J., O. J. Rando, et al. (1994). "The Ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-κB1 precursor protein and the activation of NF-κB." Cell **78**: 773-785.

Percy, M. E. (1984). "Catalase : an old enzyme with a new role ? A review." Can. J. Biochem. Cell. Biol. **62**: 1006-1014.

Pigeolet, E. (1990). Comportement de la glutathion peroxydase au cours du vieillissement cellulaire et en conditions oxydantes. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Belgique.

Piomelli, D. (1993). "Arachidonic acid in cell signaling." Curr. Op. Cell Biol. **5**: 274-280.

Raes, M., P. Renard, et al. (1994). Effects of antioxidants on IL-6 secretion induced by IL-1 in human cultured lung fibroblasts. Involvement of NFκB. Oxidative stress, cell activation and viral infection. Ed. O. C. Pasquier R.Y., Auclair, C., Packer, L. Basel, Switzerland., 77-90.

Rawn, J. D. (1990). Traité de biochimie. Bruxelles,

Reddy, C. C. (1991). Antioxidant enzymes : an overview. Oxidative damage and repair. Ed. D. K.J.A. England, Pergamon Press. 595-601.

Renard, P. (1992). Importance des radicaux libres dans l'activation de fibroblastes de poumon par l'interleukine-1. FUNDP.

Rice, N. R., M. L. MacKichan, et al. (1992). "The precursor of NF-κB p50 has IκB-like functions." Cell **71**: 243-53.

Rice-Evans, C., A. T. Diplock, et al. (1991). Techniques in free radical research. Elsevier.

Rivas, C. I., D. W. Golde, et al. (1994). "Involvement of the Sphingomyelin Pathway in Autocrine Tumor Necrosis Factor Signaling for Human Immunodeficiency Virus Production in Chronically Infected HL-60 Cells." Blood **83**(8): 2191-2197.

Roberfroid, M. (1987). "Free radicals and oxidative phenomena in oxidative systems." Belg. J. Food Chem. Biotechnol. **6**: 163-175.

Rosof, P. M., N. Savage, et al. (1988). "Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism." Cell **54**: 73-81.

Rossi, B. (1993). "IL-1 transduction signals." Eur. Cytokine Netw. **4**(3): 181-187.

Schieven, G. L., J. M. Kirihaara, et al. (1993). "Reactive oxygen intermediates

activate NF- κ B in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56^{lck} and p59^{fyn} tyrosine kinases in human lymphocytes." Blood **82**(4): 1212-1220.

Schreck, R., K. Albersmann, et al. (1992). "Nuclear factor κ B : an oxidative stress responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)." Free Rad. Res. Comms. **17**(4): 221-237.

Schreck, R., P. Rieber, et al. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1." EMBO J. Trends Cell Biol. **10**: 2247-2258.

Schütze, S., K. Pothof, et al. (1992). "TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown." Cell **71**: 765-776.

Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences." Cell **46**: 705-716.

Shirakawa, F., U. Yamashita, et al. (1988). "Cyclic AMP - an intracellular second messenger for interleukin-1." Proc. Natl. Aca. Sci. USA **85**: 8201.

Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **25**: 1058-1071.

Smith, A. C. and M. A. Boyd (1984). J. Pharm. Exp. Ther. **229**: 658-663.

Stylianou, E., O. L.A., et al. (1992). "Interleukin-1 induces NF- κ B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes." J. Biol. Chem. **267**: 1538.

Sullivan, G. S., D. T.-Y. Chiu, et al. (1994). "Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells." Free Radical Biology & Medicine **16**(3): 399-403.

Sun, Y. (1990). "Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis." Fr. Rad. Biol. Med. **8**: 583-599.

Suzuki, Y. J. and L. Packer (1993). "Inhibition of NF-kappa B DNA Binding Activity by alpha-tocopheryl Succinate." Biochem Mol Biol Int **31**(4): 693-700.

Vellanoweth, R. L., P. C. Supakar, et al. (1994). "Transcription factors in development, growth, and aging." Lab Invest **70**(6): 784-799.

Walker, N. P. C., R. V. Talanian, et al. (1994). "Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 β -converting enzyme : A (p20/p10)₂ homodimer." Cell **78**: 343-52.

Welsh, N., T. Nilsson, et al. (1989). "Human interleukin 1 β stimulates islet insulin release by mechanism not dependent on changes in phospholipase C and protein kinase C activities or Ca²⁺ handling." Acta Endocrin. **121**: 698-704.

Wijelath, E. S., A. M. Kardasz, et al. (1988). "Interleukin-1 induced inositol phospholipid breakdown in murine macrophages : possible mechanism of receptor activation ." Bioch. Bioph. Res. Comm. **152**(1): 392-397.

Xia, H. Z., C. C. Kannappell, et al. (1993). "Differential Regulation of Human B-Lymphocyte Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) and Lymphotoxin (TNF- beta)

Production by Protein Phosphatase-1 and Phosphatase- 2a Inhibitor." Blood **82**(9): 2806-2812.

Yanaga, F. and S. P. Watson (1994). "Ceramide Does Not Mediate the Effect of Tumour Necrosis Factor-alpha on Superoxide Generation in Human Neutrophils." Biochem J **298**(Part 3): 733-738.

Zachary, M. D. (1994). Importance de la glutathion peroxydase pour les fibroblastes WI38 : étude dans les différentes situations de stress et effet de l'inhibition et de la surexpression de l'enzyme sur le comportement cellulaire. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.

Zhang, Y., X.-J. Lin, et al. (1988). "Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts : role in the induction fo interleukin 6." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **8**: 6802-6805.

Zor, U., E. Ferber, et al. (1993). "Reactive oxygen species mediate phorbol ester-related tyrosine phosphorylation and PLA2 activation : potentiaton by vanadate." Biochem. J. **295**: 879-888.