



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise en culture de cellules synoviales humaines: étude préliminaire de leur activation par l'interleukine 1 $\beta$

Lecomte, Véronique

*Award date:*  
1988

*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.

1988



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTÉ DES SCIENCES

---

**Mise en culture  
de cellules synoviales humaines**  
**Etude préliminaire de leur activation  
par l'interleukine 1 $\beta$**

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

**Déronique Lecomte**



*Par ces quelques mots, je voudrais exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidée pendant ce travail.*

*Mon premier merci, je veux l'adresser à mes parents sans lesquels je n'aurais pas pu réaliser ces études. Sans eux et sans Roland, tous ces efforts n'auraient pas eu de sens, ils m'ont soutenue et encouragée pendant ces quatre années.*

*Je remercie aussi Monsieur Remacle de m'avoir accueillie dans ce laboratoire, Martine pour ses conseils, sa gentillesse et sa disponibilité. Je remercie Andrée et Isabelle pour leur aide, "Mimile" pour la réalisation des profils de prostaglandines et Marie (notre petite fée du logis) pour son travail et son sourire.*

*Zaza, Olivier et Dominique, j'ai été heureuse d'apprendre à mieux vous connaître. Merci à Christine, Isabelle, Manoëlle et Marie-Denise pour nous avoir accueillis dans ce petit bureau.*

*Enfin, je ne sais comment vous dire merci à vous tous pour avoir été là, pour avoir ensoleillé les jours les plus gris. Merci pour votre gaieté et votre gentillesse. J'aimerais tellement vous en dire plus mais je ne trouve pas les mots qui reflètent ce que je ressens...*

*Andrée, Anne, Carine, Christine, Dominique, Edouard, Eric, Etienne, Gégé, Isabelle, Zaza, Manoëlle, Emile, Marc, Marie, Marie-Denise, Martine, Philippe, Bobo, Olivier, le chef, mes parents, Roland, merci d'être là...*

# TABLE DES MATIERES.

## CHAPITRE I : INTRODUCTION.

### 1.1. MEMBRANE SYNOVIALE ET CELLULES SYNOVIALES.

1.1.1. LOCALISATION ANATOMIQUE DE LA MEMBRANE SYNOVIALE.

1.1.2. COMPOSITION DE LA MEMBRANE SYNOVIALE.

1.1.3. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE LA MEMBRANE SYNOVIALE.

1.1.4. LES CELLULES SYNOVIALES.

1.1.4.1. LES CELLULES MACROPHAGIQUES.

1.1.4.2. CELLULES FIBROBLASTIQUES.

1.1.4.3. LES CELLULES DENDRITIQUES.

1.1.5. PROLIFERATION DE LA MEMBRANE SYNOVIALE LORS D'UNE  
INFLAMMATION.

### 1.2. LES COLLAGENES

1.2.1. COLLAGENE DE TYPE I.

1.2.2. COLLAGENE DE TYPE II.

1.2.3. COLLAGENE DE TYPE III.

### 1.3. LES COLLAGENASES.

1.3.1. DEFINITION.

1.3.2. DISTINCTION ENTRE LA COLLAGENASE BACTERIENNE ET LA  
COLLAGENASE DES VERTEBRES.

1.3.3. LA COLLAGENASE PRODUITE PAR LES CELLULES SYNOVIALES ET  
SON ACTIVATION.

1.3.4. IMPLICATION DE LA COLLAGENASE DANS DIVERSES  
PATHOLOGIES.

### 1.4. LES PROSTAGLANDINES.

1.4.1. INTRODUCTION.

1.4.2. PROSTAGLANDINES ET CELLULES SYNOVIALES.

### 1.5. L'INTERLEUKINE-1

1.5.1. DESCRIPTION ET ROLES DE L'INTERLEUKINE-1.



1.5.2. ACTION DE L'INTERLEUKINE-1 SUR LES CELLULES SYNOVIALES.

CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES.

2.1. CULTURE DE CELLULES SYNOVIALES.

2.1.1. MISE EN CULTURE DE CELLULES SYNOVIALES.

2.1.1.1. MATERIELS.

2.1.1.2. METHODES.

2.1.2. REPIQUAGE DES CELLULES SYNOVIALES.

2.1.2.1. MATERIELS.

2.1.2.2. METHODES.

2.1.3. CLONAGE DES CELLULES SYNOVIALES.

2.1.4. DOSAGE DES PROTEINES CELLULAIRES IN SITU.

2.1.5. STIMULATION DE LA PRODUCTION DE COLLAGENASE PAR LES  
CELLULES SYNOVIALES ET LES FIBROBLASTES HUMAINS WI-38

2.1.5.1. STIMULATION DES CELLULES AVEC DU PHORBOL-12  
MYRISTATE-13 ACETATE (PMA).

2.1.5.2. STIMULATION DES CELLULES AVEC DE L'INTERLEUKINE-1.

2.2. MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE LA COLLAGENASE.

2.2.1. MARQUAGE DU COLLAGENE.

2.2.2. DOSAGE DU COLLAGENE A LA CHLORAMINE T.

2.2.3. DOSAGE DE LA COLLAGENASE SUR FILM DE COLLAGENE  
RADIOACTIF.

2.2.3.1. PREPARATION DU FILM DE COLLAGENE.

2.2.3.2. CONCENTRATION DE LA COLLAGENASE LATENTE PRODUITE  
PAR LES CELLULES.

2.2.3.3. ACTIVATION DE LA COLLAGENASE LATENTE PRODUITE PAR  
LES CELLULES.

2.2.3.4. DOSAGE DE LA COLLAGENASE.

2.2.4. EFFET DE L'INTERLEUKINE 1- $\beta$  SUR LA LIBERATION D'ACIDE  
ARACHIDONIQUE RADIOACTIF INCORPORE PREALABLEMENT PAR LES  
CELLULES.

2.2.5. EXTRACTION DES PROSTAGLANDINES.

2.2.6. DERIVATISATION DES PROSTAGLANDINES.

2.2.6.1. MATERIELS.

2.2.6.2. METHODES.

2.2.7. DETECTION DES PROSTAGLANDINES EN CHROMATOGRAPHIE  
GAZEUSE COUPLEE A UN SPECTROMETRE DE MASSE (GC-MS).

**CHAPITRE 3. RESULTATS.**

**3.1. CULTURE DE CELLULES**

3.1.1. PRELIMINAIRE.

3.1.2. MISE EN CULTURE.

3.1.2.1. LIGNEE 1-F-62.

3.1.2.2. LIGNEE 2-F-73.

3.1.2.3. LIGNEE 4-F-53.

3.1.2.4. LIGNEE 7-F-56.

3.1.2.5. LIGNEE 8-F-35.

3.1.3. ETUDE DE L'INFLUENCE DES SERA SUR LA MORPHOLOGIE ET LA  
CROISSANCE DES CELLULES SYNOVIALES.

3.1.3.1. MORPHOLOGIE.

3.1.3.2. COURBES DE CROISSANCE.

3.1.3.3. CLONAGE DE CELLULES SYNOVIALES.

3.1.3.4. CONCLUSIONS.

**3.2. MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE LA COLLAGENASE.**

3.2.1. INTRODUCTION.

3.2.2. ESTIMATION DE LA CONCENTRATION DU COLLAGENE RADIOACTIF  
PAR DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE L'HYDROXYPROLINE PAR LA  
CHLORAMINE T ET PAR ÉTALONNAGE AU SPECTROPHOTOMETRE.

3.2.2.1. DOSAGE DU COLLAGENE RADIOACTIF PAR LA CHLORAMINE T.

3.2.2.1.1. INTRODUCTION.

3.2.2.1.2. DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE.



3.2.2.1.3. DOSAGE D'UNE SOLUTION DE COLLAGENE NON RADIOACTIF ET DE CONCENTRATION CONNUE.

3.2.2.1.4. DOSAGE DE LA SOLUTION DE COLLAGENE RADIOACTIF.

3.2.2.2. DOSAGE DU COLLAGENE AU SPECTROPHOTOMETRE.

3.2.2.2.1. INTRODUCTION.

3.2.2.2.2. DROITE D'ETALONNAGE DU COLLAGENE DE TYPE I DE PEAU DE VEAU DISSOUS DANS UN TAMPON PHOSPHATE DE SODIUM 0,15 M, pH 7,4.

3.2.2.3. CONCLUSIONS.

3.2.3. MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE LA COLLAGENASE.

3.2.3.1. PREMIERE EXPERIENCE.

3.2.3.2. PROBLEME DE LA COLLAGENASE BACTERIENNE.

3.2.3.2.1. INTRODUCTION.

3.2.3.2.2. TEST DE "QUENCHING".

3.2.3.2.3. COMPTAGE DE LA RADIOACTIVITE DANS L'EAU DE RINÇAGE.

3.2.3.2.4. RECUPERATION DU FILM DE COLLAGENE RADIOACTIF AVEC DU NaOH 0,5 N.

3.2.3.2.5. NOUVEAU TEST SUR LA COLLAGENASE BACTERIENNE.

3.2.3.2.6. CONCENTRATION DU COLLAGENE RADIOACTIF.

3.2.3.4. PROBLEME DE LA TRYPSINE.

3.2.3.5. PROBLEME DE LA COLLAGENASE ACTIVEE.

3.2.3.5.1. INTRODUCTION.

3.2.3.5.2. CONCENTRATION DES MILIEUX CONTENANT LA COLLAGENASE.

3.2.4. STIMULATION DES CELLULES SYNOVIALES PAR L'IL-1 B.

3.2.4.1. EFFET DE L'IL-1B SUR LA LIBERATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE.

3.2.4.2. EFFET DE L'IL - 1 $\beta$  SUR LA PRODUCTION DES  
PROSTAGLANDINES. SYNERGIE AVEC L'ACIDE ARACHIDONIQUE.

3.2.4.3. EFFET DE L'IL-1 $\beta$  SUR LA PRODUCTION DE LA COLLAGENASE.

3.2.4.3.1. EXPERIENCE SUR LES CELLULES A CONFLUENCE.

3.2.4.3.2. EXPERIENCE SUR LES CELLULES REPIQUEES A UNE  
HAUTE DENSITE CELLULAIRE.

3.2.4.4. CONCLUSIONS.

**CHAPITRE 4. DISCUSSION ET CONCLUSION.**



Les cellules synoviales sont impliquées dans diverses pathologies articulaires (polyarthrite rhumatoïde, ostéoarthrite...). Au cours des pathologies inflammatoires, la membrane synoviale est infiltrée par des phagocytes. Suite à cette infiltration, les synoviocytes prolifèrent et un grand nombre de facteurs sont alors en contact avec les synoviocytes et peuvent les stimuler. Les cellules stimulées produisent des enzymes dont certains participent à la destruction du cartilage. Elles synthétisent également plusieurs molécules typiquement inflammatoires comme la PGE<sub>2</sub>, l'IL-1, l'activateur du plaminogène...(Mainardi, 1985).

Dans ce cadre général et cette problématique complexe, il était intéressant de pouvoir disposer de cultures in vitro de cellules synoviales. En effet, ces cellules en culture peuvent venir de modèles permettant de tester précisément l'effet d'activateurs tels que l'IL-1 sur la morphologie des synoviocytes et la synthèse exacerbée de certains enzymes. Dans ce travail, nous avons choisi plus particulièrement la collagénase et les prostaglandines. Les cellules au repos ne produisant pas de collagénase en quantité importante, ils ont dû être activés avec de l'IL-1 ou du PMA. Le test de dosage de la collagénase a dû être mis au point et a constitué une partie importante de ce travail. D'autres tests de stimulation des cellules ont apporté des résultats importants dans le cadre de la problématique des médiateurs de l'inflammation : c'est ainsi que nous avons abordé l'effet de l'IL-1 sur la phospholipase A<sub>2</sub> et sur la synthèse des prostaglandines. Ces résultats sont en fait le point de départ d'un travail plus large qui devrait permettre de comprendre les relations existant entre les cellules situées dans les zones d'inflammation affectant le cartilage. L'utilisation de cellules provenant de ces sites inflammatoires et l'étude des divers médiateurs trouvés dans ces sites constitueraient des compléments indispensables pour l'interprétation de ces résultats, en fonction des diverses pathologies inflammatoires du cartilage. Dans l'introduction, nous aborderons successivement chacun des divers domaines concernés par ce travail en faisant brièvement le point des travaux les plus récents sur ce sujet.

## CHAPITRE I : INTRODUCTION.

### 1.1. MEMBRANE SYNOVIALE ET CELLULES SYNOVIALES.

#### 1.1.1. LOCALISATION ANATOMIQUE DE LA MEMBRANE SYNOVIALE.

La membrane synoviale constitue un composant à part entière des articulations mobiles appelées diarthroses. Cette membrane limitant la cavité articulaire est un tissu conjonctif lâche hautement différencié qui tapisse la capsule de l'articulation. Elle couvre toutes les structures intraarticulaires sauf le cartilage (Harris, 1985) (Figure 1).

#### 1.1.2. COMPOSITION DE LA MEMBRANE SYNOVIALE.

La membrane synoviale est essentiellement constituée de deux couches :

- une couche sous-intimale qui est appliquée contre la capsule articulaire : c'est un tissu conjonctif composé de plusieurs types de cellules (fibroblastes, histiocytes et mastocytes, macrophages), de vaisseaux lymphatiques et sanguins, et abondamment innervé. On y trouve également des fibres de collagène.

- une couche intimale ou bordante qui limite la cavité articulaire : elle présente sur sa face interne, des bourgeonnements de formes et de volumes variables que l'on nomme franges synoviales. Celles-ci sont constituées de tissus graisseux et d'anses vasculaires. Cette couche bordante comporte trois éléments:

- + des capillaires très nombreux, pelotonnés en boucles qui sont de type fenêtré,

- + une substance intercellulaire riche en acide hyaluronique



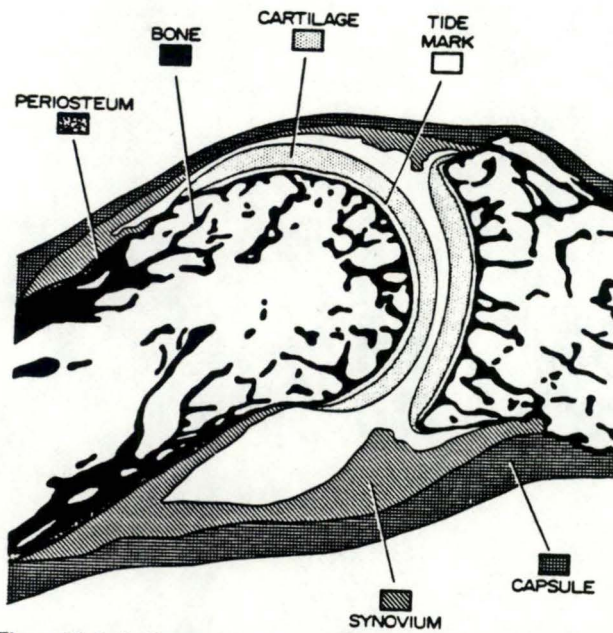


Figure 16-1. A diagram of a normal human interphalangeal joint in sagittal section, as an example of a synovial or diarthrodial joint. The "tidemark" represents the calcified cartilage which bonds articular cartilage to the subchondral bony plate. (From Sokoloff, L., and Bland, J.H.: *The Musculoskeletal System*. Baltimore, Williams & Wilkins Company, 1975).

Figure 1 : Schéma simplifié d'une articulation mobile (d'après Harris, 1985)

+ des cellules synoviales formant un revêtement discontinu d'une à deux assises cellulaires (voir 1.1.4.) (Simon et coll, 1983)

### 1.1.3. ROLES PHYSIOLOGIQUES DE LA MEMBRANE SYNOVIALE.

La membrane synoviale joue plusieurs rôles dans l'articulation (Simon et coll, 1983):

- elle est l'organe de sensibilité de l'articulation à cause de son abondante innervation.
- elle joue un rôle essentiel dans la nutrition du cartilage articulaire : elle intervient dans l'élaboration du liquide synovial et elle joue un rôle de membrane sélective, c'est-à-dire qu'elle laisse filtrer les substances dissoutes du sang et les protéines plasmatiques de faible poids moléculaire.
- elle assure la résorption du liquide synovial et débarrasse la cavité articulaire des éléments anormaux grâce à son pouvoir phagocytaire. Celui-ci est lié aux cellules de type macrophagique (voir 1.1.4.).
- elle sécrète de l'acide hyaluronique qui s'associe à une protéine pour former de la mucine. Cette substance assure la viscosité du liquide synovial et lui permet de jouer son rôle lubrifiant.
- elle a un très grand pouvoir de réparation.

### 1.1.4. LES CELLULES SYNOVIALES.

La population de cellules synoviales est hétérogène (Marsh et coll., 1978). A l'heure actuelle, on admet généralement l'existence de trois types cellulaires. Cependant, leur caractérisation n'est pas encore complètement établie (Woolley et coll, 1979; Werb et coll, 1977; Dayer et coll, 1984).



La classification de ces types cellulaires est essentiellement basée sur des caractères morphologiques :

- 1) cellules de type macrophagique ou cellules A.
- 2) cellules de type fibroblastique ou cellules B.
- 3) cellules de type dendritique ou cellules C.

#### 1.1.4.1. LES CELLULES MACROPHAGIQUES.

Les cellules de type macrophagique sont arrondies et aplaties. Le bord des cellules est assez irrégulier ("ruffled") et le rapport nucléocytoplasmique est grand. Elles ne constituent qu'un faible pourcentage de la population synoviale normale (Woolley et coll, 1979)

Elles sont également caractérisées par la présence d'antigènes de classe II, de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et de récepteurs pour la protéine C<sub>3</sub> du complément et des antigènes typiques de la lignée monocyte-macrophage (Klareskog et coll, 1981). Elles sont capables de phagocyter et ne produisent pas de collagénase (Dayer et coll, 1984).

In vitro, les cellules macrophagiques disparaissent peu à peu de la culture. Il semble qu'elles ne prolifèrent pas (Burmester et coll, 1983; Heino et coll, 1986) ou qu'elles croissent à un rythme très lent. Leur temps de doublement serait de 5 à 7 jours (Goto et coll, 1987).

#### 1.1.4.2. CELLULES FIBROBLASTIQUES.

Les cellules fibroblastiques constituent la majorité de la population; elles apparaissent comme des cellules allongées présentant occasionnellement des prolongements cytoplasmiques et contenant souvent des granules et des vésicules denses dans la région périnucléaire (Woolley et coll, 1979).

On les caractérise également par le fait que

- elles ne produisent pas de collagénase (Dayer et coll, 1984)
- elles expriment des antigènes identiques à ceux exprimés par les fibroblastes
- elles n'ont pas d'antigènes de classe II (Burmester et coll, 1983)
- elles ne phagocytent pas (Burmester et coll, 1983)
- elles montrent des capacités prolifératives importantes. Leur cycle cellulaire est de 1 à 2 jours et elles sont prédominantes dans les cultures à long terme (Werb et coll, 1977; Goto et coll., 1987).

#### 1.1.4.3. LES CELLULES DENDRITIQUES.

Les cellules dendritiques possèdent un cytoplasme compact. Elles sont parfois binucléées et sont également caractérisées par de longues extensions cytoplasmiques très découpées qui contiennent souvent de larges inclusions ovoïdes ou sphériques (Woolley et coll, 1979).

Ces cellules ne phagocytent pas; elles possèdent des antigènes de classe II et ne semblent pas avoir d'antigènes spécifiques de la lignée lymphoïde, monocytaire ou fibroblastique (Burmester et coll, 1983).

Elles sont les principales productrices de PGE<sub>2</sub> et de collagénase sous forme latente (Dayer et coll, 1976; Krane, 1981). Elles produisent aussi d'autres métalloprotéinases neutres telles que les gélatinases et les protéoglycanases (Golds et coll, 1983), une forme d'interleukine-1 (la cataboline) (Saklatvala et coll., 1984; Brown et coll, 1987) et un activateur du plaminogène (Werb et coll, 1977).

Il semble bien qu'il existe un rapport entre les cellules fibroblastiques et les cellules dendritiques, bien que cette relation reste controversée et encore mal comprise. En effet, d'une part, Hendler et coll (1985) observent par vidéomicroscopie la transition directe de cellules dendritiques en cellules



fibroblastiques après plusieurs repiquages et la transition directe de cellules fibroblastiques en cellules dendritiques après stimulation de ces cellules avec des substances telles que la PGE<sub>2</sub> et l'IL-1. Les cellules dendritiques qu'ils observent sont HLA-DR négatives.

D'autre part, Goto et coll. (1987) ont réussi à cloner les trois types de cellules synoviales. La caractérisation immunologique des cellules dendritiques montre qu'elles sont HLA-DR positives. Elles prolifèrent lentement (5 à 7 jours pour un doublement de la population). Après une culture à long terme, ils ont stimulé les cellules synoviales avec de l'interleukine-1 et ils ont constaté un changement dans la morphologie d'une partie de la population cellulaire. Les cellules dendritiques obtenues sont HLA-DR négatives. S'ils ôtent l'IL-1, les cellules reprennent un aspect fibroblastique. Heino (1986) propose deux explications plausibles :

- soit il s'agit de deux populations cellulaires d'origine différente,
- soit il s'agit d'une seule population de cellules mais dans les primocultures, il existerait "des facteurs inconnus" capables de réguler l'expression des antigènes HLA-DR. Ces facteurs ne seraient pas présents dans le milieu de culture

Nous constatons que certains points de la caractérisation des cellules dendritiques restent donc à définir.

#### 1.1.5. PROLIFÉRATION DE LA MEMBRANE SYNOVIALE LORS D'UNE INFLAMMATION.

Lors d'une réaction inflammatoire, il y a une infiltration leucocytaire abondante suivie d'une production de facteurs mitogènes, dont l'IL-1, qui vont agir sur les cellules synoviales. La membrane synoviale subit une hyperplasie et constitue un pannus (Mainardi, 1985).

Le pannus est une masse fibroproliférative composée de tissu conjonctif et de différents types cellulaires (les trois types de cellules synoviales, des macrophages, des polymorphonucléaires neutrophiles, des lymphocytes, des mastocytes et des cellules vasculaires (Dayer et coll., 1984).

L'origine des cellules présentes dans le pannus n'est pas encore éclaircie. Selon Howat et coll. (1987), les cellules de type A (macrophagiques) pourraient provenir du recrutement de cellules de la moëlle osseuse, alors que les cellules de type B (fibroblastiques) proviendraient du recrutement de cellules situées plus profondément dans la membrane synoviale.

Les pathologies articulaires inflammatoires aboutissent le plus souvent à une dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage. On constate que cette érosion se produit à l'interface entre le pannus et le cartilage (Krane, 1981). Par des études en fluorescence, Woolley et coll. (1977) ont montré qu'à cette interface, la production de collagénase est importante.

## 1.2. LES COLLAGENES

Le collagène constitue environ un tiers de la masse protéique totale chez les vertébrés; c'est en fait la protéine la plus abondante de l'organisme. Le collagène joue un rôle essentiel dans plusieurs fonctions biologiques : la morphogenèse, le développement de l'organisme, la chémotaxie, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, dans l'attachement des cellules (Gay et coll., 1983) et surtout dans des fonctions de soutien. Actuellement, on connaît onze types de collagènes (Tableau 1.). Les plus abondants et les mieux étudiés sont les collagènes interstitiels auxquels nous nous sommes intéressés. Ils sont en effet les substrats de la collagénase latente produite par les cellules synoviales.

Les collagènes interstitiels comprennent les types I, II et III qui représentent des espèces moléculaires assez proches. Chaque molécule consiste en trois chaînes  $\alpha$  assemblées en une triple hélice non interrompue de



Type	Organisation moléculaire	PM	Longueur de la zone triple hélice	Forme	Localisation
I	2 $\alpha$ 1 (I), $\alpha$ 2 (I)	300 000	280 nm	fibrilles striées Périodicité 67 nm	Peau, tendons, os.
II	3 $\alpha$ 1 (II)	300 000	280 nm	id.	Cartilage, humeur vitrée
III	3 $\alpha$ 1 (III)	300 000	280 nm	id.	Peau, vaisseaux
IV	2 $\alpha$ 1 (IV), $\alpha$ 2 (IV)	450 000	390 nm (interrompue)	interactions entre les extrémités	Membranes basales
V	$\alpha$ 1 (V), $\alpha$ 2 (V), $\alpha$ 3 (V)	> 300 000	280 nm	association avec fibres de type I.	Péricellulaire
VI	$\alpha$ 1 (VI), $\alpha$ 2 (VI), $\alpha$ 3 (VI)	400 000	105 nm	Fibrilles de 100 nm Dipériodicité.	Vaisseaux
VII	3 $\alpha$ 1 (VII)	500 000	450 nm	Dimères ?	Fibres d'ancrage dermo épidermiques
VIII	3 $\alpha$ 1 (VIII)	185 000	150 nm	Interconnectée	Vaisseaux
IX	$\alpha$ 1 (IX), $\alpha$ 1 (IX), $\alpha$ 3 (IX)	320 000	175 nm	Interrompue en ligne brisée	Cartilage
X		180 000	130 nm	?	Cartilage
1 $\alpha$					
2 $\alpha$	1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$	300 000	280 nm	?	?
3 $\alpha$					

Tableau 1 : Résumé des différentes caractéristiques connues sur les onze types de collagène (modifié d'après Robert et Labat-Robert, 1986)

280 à 300 nm de long. La séquence primaire des chaînes  $\alpha$  est constituée d'une répétition de triplets de type Gly-X-Y sur la plus grande partie de sa longueur. Les positions X et Y sont souvent occupées par la proline ou l'hydroxyproline. Cependant, certaines positions X sont occupées par des hydroxylisines qui peuvent être glycosylées. Cette structure primaire est essentielle pour que les structures d'ordre supérieur puissent se former correctement (Miller et coll., 1982; Gay et coll., 1983). Les molécules de collagène vont s'assembler en fibrilles de collagène (visibles au microscope électronique) qui elles-mêmes vont s'unir pour former des fibres (visibles au microscope optique). Les fibrilles présentent une striation périodique tous les 67 nm.

Les molécules de collagène de type I, II et III dérivent de la maturation extracellulaire de molécules précurseurs : les procollagènes. Les différentes chaînes pro  $\alpha$  sont constituées de trois domaines majeurs :

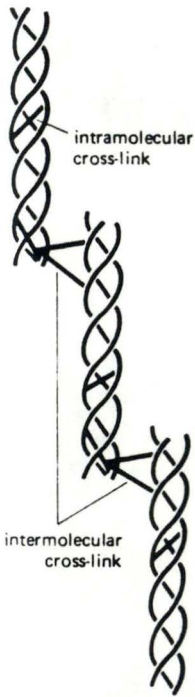
- La chaîne  $\alpha$  proprement dite constituée de la séquence en triplets flanquée à chaque extrémité de deux terminaisons non en triplets : les télopeptides qui interviendront dans la fibrillogenèse.

- un propeptide NH<sub>2</sub>-terminal (pN) constitué d'une séquence essentiellement non en triplet et de structure globulaire.

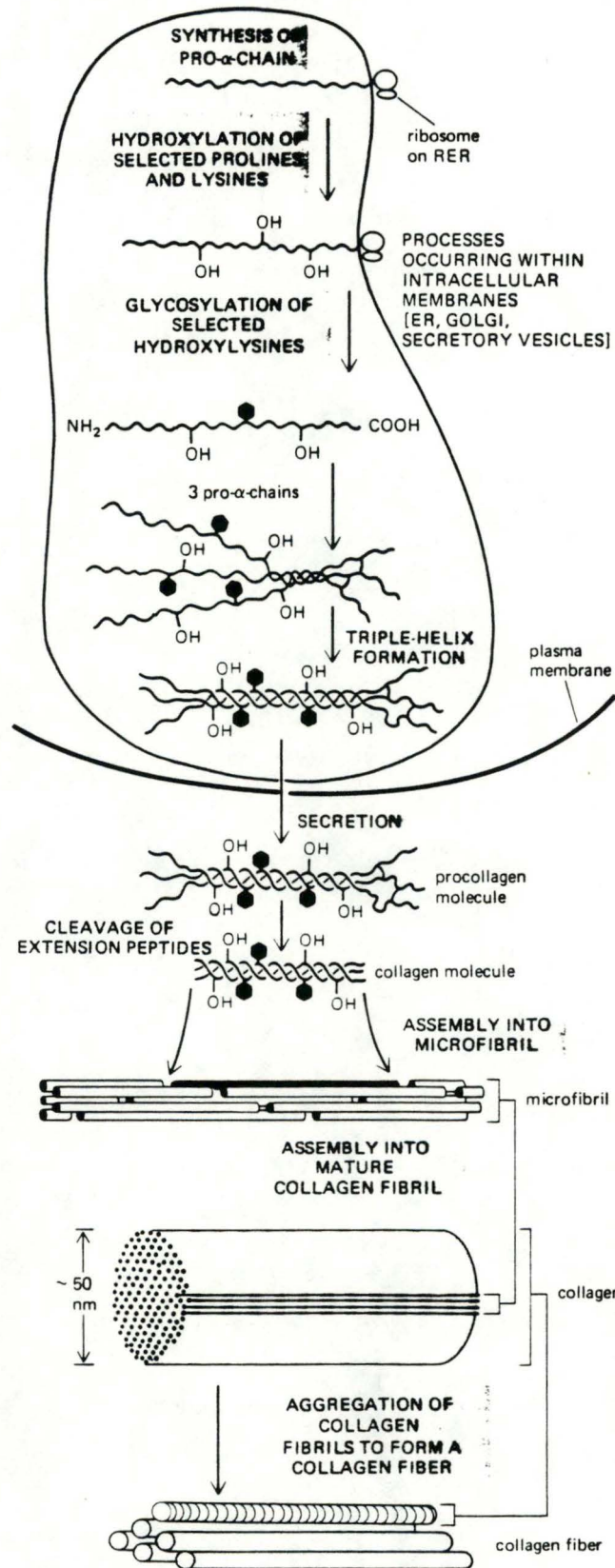
- Un propeptide COOH-terminal (pC) qui est également constitué d'une séquence non en triplet et de structure globulaire.

Les molécules de procollagène sont assemblées dans la cellule. Les étapes de maturation en collagène sont extracellulaires et se produisent à la suite de l'action de différentes procollagène-peptidases (Miller et Gay, 1982) (Figure 2.). L'assemblage des molécules de collagène est spontané dans le milieu extracellulaire après enlèvement des propeptides pN et pC.





Schematic diagram of the covalent intramolecular and intermolecular cross-links formed between modified lysine side chains within a collagen fibril.



Schematic drawing of the various intracellular and extracellular events involved in the formation of a collagen fibril. While extension peptide cleavage and fibril formation are shown occurring after secretion, there is some evidence that cleavage of the amino-terminal peptides and some aggregation of collagen molecules occurs just prior to secretion from the cell. Although this is not shown, the larger extracellular aggregates of collagen molecules are stabilized by covalent cross-links. As an example of how the collagen fibrils can form ordered arrays in the extracellular space, they are shown further assembling into large collagen fibers that are visible in the light microscope.

Figure 2 : Voie de la synthèse du collagène par les cellules (d'après Bruce A. et coll., 1983, in molecular biology of the cell, Garland Publishing Inc. (New York & London) ).

### 1.2.1. COLLAGENE DE TYPE I.

Les collagènes des types I, II et III diffèrent principalement par la séquence en acides aminés de leurs chaînes  $\alpha$ .

Les molécules de type I possèdent deux chaînes  $\alpha 1$  (I) et une chaîne  $\alpha 2$  (I). Ces molécules en triple hélice forment des fibrilles d'un diamètre d'environ 400 Å qui s'alignent pour former des faisceaux de fibres.

On les trouve essentiellement dans la peau, les tendons, les os et autres structures de soutien de l'organisme (Robert et coll, 1986). La disposition des fibres est fonction de leur rôle dans l'organe et de leur localisation.

### 1.2.2. COLLAGENE DE TYPE II.

Les molécules de collagène de type II possèdent trois chaînes identiques  $\alpha 1$  (II) et forment des fibrilles d'environ 100 Å de diamètre. Ces fibrilles, assemblées en fibres, ne s'alignent pas en faisceaux mais se disposent en un réseau tridimensionnel adapté aux propriétés du tissu cartilagineux c'est-à-dire la résistance à une pression élevée conjuguée à une certaine élasticité (Herbage, 1986). On trouve le collagène de type II dans les cartilages hyalins et une variante de ce type de collagène dans le corps vitré de l'oeil (Robert et coll, 1986).

### 1.2.3. COLLAGENE DE TYPE III.

Les molécules de collagène de type III sont constituées de trois chaînes identiques  $\alpha 1$  (III). Le collagène de type III est synthétisé dans une moindre mesure que le collagène de type I. Sa localisation est semblable à celle des molécules de type I et on le retrouve de plus dans les vaisseaux sanguins. La



conversion du procollagène de type III est relativement lente et les fibrilles ne dépassent 50 Å de diamètre.

### **1.3. LES COLLAGÉNASES.**

#### **1.3.1. DÉFINITION.**

La collagénase de vertébrés est une métalloprotéinase neutre, contenant un atome de zinc dans son site actif, qui dégrade le collagène natif à la température et au pH physiologique. Elle clive le collagène dans une conformation de triple hélice à travers les trois chaînes polypeptidiques au niveau d'un site unique, situé entre les 772<sup>ème</sup> et 773<sup>ème</sup> acides aminés (glycine et isoleucine) (Masui et coll., 1977; Harris et coll, 1982; Mitrovic, 1986) (Figure 3.).

Le clivage donne deux fragments TCA et TC<sup>B</sup> représentant respectivement 3/4 et 1/4 de la longueur de la molécule de collagène natif. La collagénase peut également agir comme une gélatinase sur le collagène dénaturé à 37°C et à pH neutre. Cependant, elle agit plus lentement que les autres protéases non spécifiques (Woolley et coll., 1975).

Dans l'organisme, les fragments sont rapidement dénaturés (Mitrovic, 1986). : ils peuvent être le substrat de gélatinases, d'enzymes lysosomiales, de la cathepsine G ou de l'élastase des PMNs qui vont achever le dégradation (Loyau et Pujol, 1986) (Figure 4.) .

L'action de la collagénase est stimulée par la présence de calcium.

	Collagenase								
$\alpha 1(I)^B$ bovine	GLY	ILE-ALA	GLY-GLN-ARG	GLY-VAL-VAL	GLY-LEU-HYP	GLY-GLN-ARG	GLY-GLU-ARG	GLY	
$\alpha 1(I)^B$ chick	GLY	ILE-ALA	GLY-GLN-ARG	GLY-VAL-VAL	GLY-LEU-HYP	GLY-GLN-ARG	GLY-GLU-ARG	GLY	
$\alpha 1(II)^B$ human	GLY	ILE-ALA	GLY-GLN-ARG	GLY- <u>LEU</u> -VAL	GLY-LEU-HYP	GLY-GLN-ARG	GLY-GLU-ARG	GLY	
$\alpha 1(III)^B$ human	GLY	ILE*	ALA-GLY- <u>LEU</u> -ARG	GLY- <u>ALA-ARG</u>	GLY-LEU- <u>ALA</u>	GLY- <u>PRO-HYP</u>	GLY- <u>MET-HYP</u>	GLY	
$\alpha 2^B$ chick	GLY	<u>LEU</u> -ALA	GLY						
Residue number	772	773	775	780	785	790			

The primary structure of homologous regions of  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 1(II)$ ,  $\alpha(III)$  and  $\alpha 2$  chains immediately adjacent on the carboxyl side to the sites of cleavage by collagenase. The site of cleavage at residues 772-773 is depicted by the arrows. The underlined residue in the  $\alpha 1(II)^B$  sequence denotes an amino acid substitution relative to the  $\alpha 1(I)^B$ . The underlined residues in the  $\alpha 1(III)^B$  sequence denote amino acid substitution relative to both  $\alpha 1(I)^B$  and  $\alpha 1(II)^B$  sequences. The residue at the right of the cleavage site in the  $\alpha 1(III)$  chain (marked \*) was originally identified as -LEU-, but new results suggest that it is -ILE- (E.D. Harris, Jr., personal communication). (Redrawn from Miller, E.J., et al.: Biochemistry 15:787, 1976).

Figure 3 : Séquence en acides aminés de la portion des chaînes  $\alpha$  clivée par la collagénase (d'après Barrett et Saklatvala, 1985)

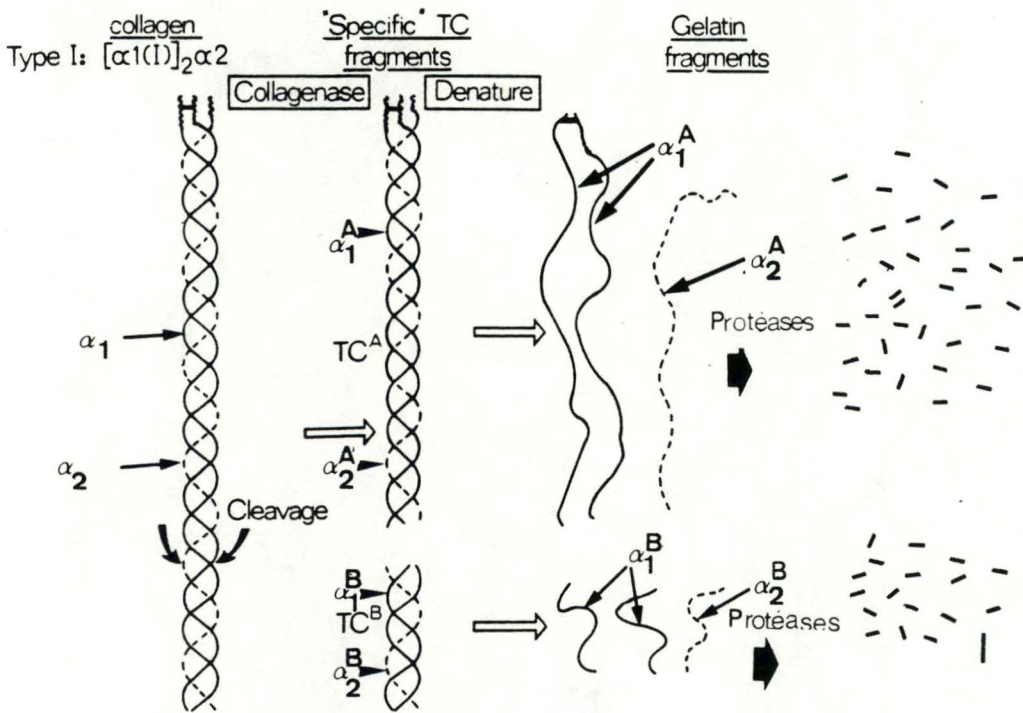


Figure 4 : Schéma explicatif de la dégradation du collagène par la collagénase (modifié d'après Barrett et Saklatvala, 1985)



### 1.3.2. DISTINCTION ENTRE LA COLLAGÉNASE BACTÉRIENNE ET LA COLLAGÉNASE DES VERTÉBRÉS.

La collagénase bactérienne, contrairement à celle des vertébrés, agit en clivant le collagène du côté N-terminal des glycines et donne ainsi de nombreux petits peptides.

Cependant, des études plus récentes ont montré que certaines collagénases bactériennes coupent également le collagène en deux fragments TCA et TCB et que d'autres protéases peuvent aussi réaliser ce type de clivage. Il existe d'ailleurs d'autres sites similaires dans la séquence du collagène et on ne comprend pas bien pourquoi cette région de l'hélice est particulièrement sensible à la protéolyse (Barrett et coll., 1985). Une hypothèse serait que ce genre de coupure ne dépend pas d'une spécificité de l'enzyme mais d'une fragilité localisée du substrat : à cet endroit précis, on constate que la structure de la triple hélice semble moins compacte (Keil, 1986).

### 1.3.3. LA COLLAGÉNASE PRODUITE PAR LES CELLULES SYNOVIALES ET SON ACTIVATION.

Les cellules synoviales produisent la collagénase sous forme d'une proenzyme qui doit être activée.

La procollagénase semble être rapidement sécrétée après sa synthèse comme le montrent les études d'incorporation d'<sup>3</sup>H-leucine par les cellules (Harris et coll, 1984). Il n'y a pas ou peu de granules de stockage de la collagénase dans les cellules synoviales (Mainardi, 1985), contrairement aux PMNs où la collagénase est stockée dans les granules spécifiques ou primaires et où elle sera sécrétée en réponse à des stimuli appropriés (Barrett et coll., 1985).

L'activation de la collagénase peut être réalisée par la plasmine, la kallikréine, la tryptase (une enzyme semblable à la trypsine et synthétisée par les

mastocytes), la trypsine, les organo-mercuriels (acétate p-aminophénylmercurique (APMA), chloromercuribenzoate (CMB)), la cathepsine G, l'élastase, la papaine...(Cawston et coll., 1981; Barrett et coll., 1985; Loyau et coll, 1986).

In vivo, dans le liquide synovial, la collagénase pourrait être activée par la plasmine, la kallikréine, la tryptase. L'élastase et la cathepsine G (produites par les PMNs) pourraient aussi jouer un rôle. Cependant, elles ne peuvent activer la collagénase latente qu'à des concentrations assez fortes et, à ces concentrations, ces molécules dégradent aussi la collagénase (Cawston et coll., 1981).

In vitro, l'activation se fait surtout au moyen de trypsine et de composés organomercuriels : APMA , CMB...(Harris et coll., 1982; Mainardí 1985; Loyau et coll., 1986).

Une fois activée, l'enzyme est influencée par le pH et la température. Son pH optimum est situé aux environs de 8,0. Au cours de l'inflammation, la température moyenne des tissus s'élève, ce qui augmente l'activité de la collagénase et accélère la dénaturation du collagène. D'autres métalloprotéinases neutres non spécifiques telles la gélatinase, dont l'activité est aussi augmentée, clivent alors le collagène dénaturé et accélèrent ainsi le processus de la collagénolyse (Mainardí, 1985).

Mais, il existe également des inhibiteurs naturels de la collagénase qui régulent son activité in vivo : l' $\alpha$ -2 macroglobuline, la  $\beta$ 1 anticollagénase et les TIMP (inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases).

Enfin, in vitro, la production de collagénase par les cellules synoviales peut être stimulée via différents agents : IL-1, PMA (12 phorbol, 13 myristate acétate), la cytochalasineB...



#### 1.3.4. IMPLICATION DE LA COLLAGÉNASE DANS DIVERSES PATHOLOGIES.

Au cours de certaines pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde (PAR), par exemple, de nombreux macrophages, PMNs et lymphocytes sont présents dans le liquide synovial. Il y a une libération non négligeable de MCF (IL-1) par les macrophages infiltrés lors de l'inflammation. Le MCF (Mononuclear Cell Factor) stimule la prolifération des cellules synoviales et la production par ces mêmes cellules de collagénase, de PGE<sub>2</sub>, de cataboline et d'autres enzymes (gélatinases, protéoglycanases, activateur du plasminogène,...). Les chondrocytes sont également activés par le MCF et relarguent eux aussi des enzymes lytiques et de la PGE<sub>2</sub> (Henderson et coll., 1987).

Les PMNs se trouvant dans le liquide synovial après l'infiltration peuvent, suite à un stimulus adéquat, relarguer de l'élastase, de la cathepsine, ainsi qu'une collagénase et une gélatinase toutes deux sous forme latente qui sont activées par les mêmes processus que la collagénase des cellules synoviales (Hendersson et coll., 1987).

L'arthrose, quant à elle, se caractérise généralement par une dégénérescence du cartilage et de l'appareil capsulo-ligamentaire. Cependant, bien que l'arthrose ait été considérée jadis comme maladie non inflammatoire, elle semble également présenter une composante inflammatoire au cours de laquelle une synovite active apparaît avec production exacerbée de collagénase (Bland et coll., 1984).

Les deux maladies données en exemples, conduisent donc irrémédiablement à la destruction de la matrice extracellulaire et, la collagénase semble, dans les deux cas, être une enzyme clé au niveau pathologique.

## **1.4. LES PROSTAGLANDINES.**

### **1.4.1. INTRODUCTION.**

De nombreux travaux ont montré le rôle des éicosanoïdes dans les pathologies articulaires inflammatoires. La famille des éicosanoïdes est composée des éicosanoïdes cycliques ou prostaglandines (PGs) et des éicosanoïdes linéaires qui sont les leucotriènes(LTs), les acides hydroxyéicosatétraénoïques (HETEs) et les acides hydroperoxyéicosatétraénoïques (HPETEs). Le précurseur principal de toutes ces molécules est l'acide arachidonique (AA), un acide gras polyinsaturé de 20 carbones avec quatre doubles liaisons qui se trouve sous forme estérifiée dans les phospholipides membranaires des cellules. Il est libéré par une phospholipase activée par le calcium. Il s'agit le plus souvent de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

Les PGs sont formées par la voie cyclooxygénasique tandis que les LTs, HETEs et HPETEs sont formés par la voie lipoxygénasique du métabolisme de l'AA (Craстès de Paulet, 1983) (Figure 5.).

### **1.4.2. PROSTAGLANDINES ET CELLULES SYNOVIALES.**

Il semble d'après Moilanen et coll. (1987) que les cellules synoviales sont capables de produire non seulement la PGE<sub>2</sub> mais aussi de la PGI<sub>2</sub> (stabilisée dans le milieu sous forme de 6-kéto-PGF<sub>1α</sub>) et la PGF<sub>2α</sub> que l'on considère comme des éléments importants des processus inflammatoires. Dans les cellules synoviales rhumatoïdes en culture, on trouve en effet ces trois types de PGs bien que la PGE<sub>2</sub> soit quantitativement plus importante.

Moilanen et coll.(1987) constatent qu'il existe une forte différence entre les cellules synoviales saines et les cellules synoviales rhumatoïdes au niveau des trois PGs : les taux de production de la PGE<sub>2</sub>, de la PGF<sub>2α</sub> et de



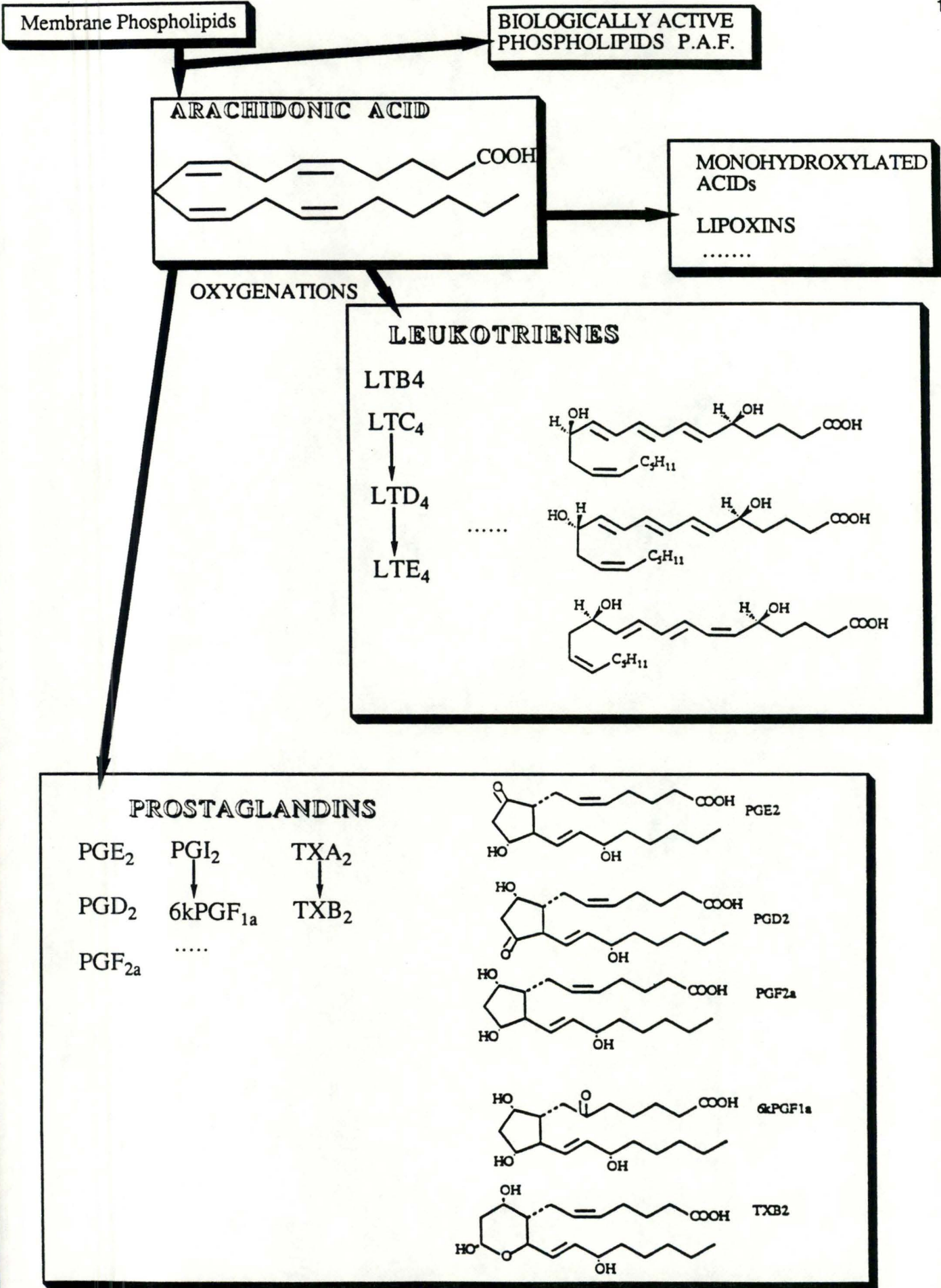


Figure 5 : Métabolisme de l'AA (d'après G. Lenoir.)

la 6-kéto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$  par les cellules saines en culture sont très faibles durant toute la culture alors que ceux des cellules rhumatoïdes sont très élevés en début de culture puis diminuent pour atteindre après sept jours environ le niveau atteint par les cellules saines. Ils constatent également que les cellules rhumatoïdes tout comme les cellules saines ne produisent pas de thromboxane (TXA<sub>2</sub>), molécule aussi impliquée dans les processus inflammatoires.

## 1.5. L'INTERLEUKINE-1

### 1.5.1. DESCRIPTION ET ROLES DE L'INTERLEUKINE-1.

L'interleukine-1 est un peptide d'environ 17 000 Da qui induit des effets biologiques importants sur les cellules lymphoïdes et non lymphoïdes. Les nombreuses fonctions actuellement attribuées à l'IL-1 ont été à l'origine associées à un grand nombre d'agents différents tels que le facteur activateur des lymphocytes (LAF), la cataboline, le pyrogène endogène, le médiateur leucocytaire endogène, le facteur des cellules mononucléaires (MCF), le facteur activateur des ostéoclastes et l'hémopoïétine 1. Toutes ces molécules représentent en fait différentes formes d'une même molécule : l'IL-1 (Dinarello, 1987).

Au départ, on croyait que seuls les monocytes-macrophages produisaient l'IL-1 ensuite, on s'est aperçu que bien d'autres types cellulaires pouvaient synthétiser ce facteur quoique dans une moindre mesure : les cellules synoviales de types dendritique et macrophagique, les cellules endothéliales, les cellules gliales, les kératinocytes...(Bunning et coll., 1986).

L'IL-1 a notamment comme effet biologique de stimuler la prolifération des lymphocytes T et B, d'être le premier signal requis pour la synthèse d'IL-2 et de récepteurs à l'IL-2 et de transformer les lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps. Elle induit la fièvre, la chondrolyse par les chondrocytes, une activité



de résorption de l'os, la libération de l'histamine, promeut la prolifération des fibroblastes et augmente la production des métabolites dérivés de l'AA dans un grand nombre de cellules (Bunning et coll., 1986).

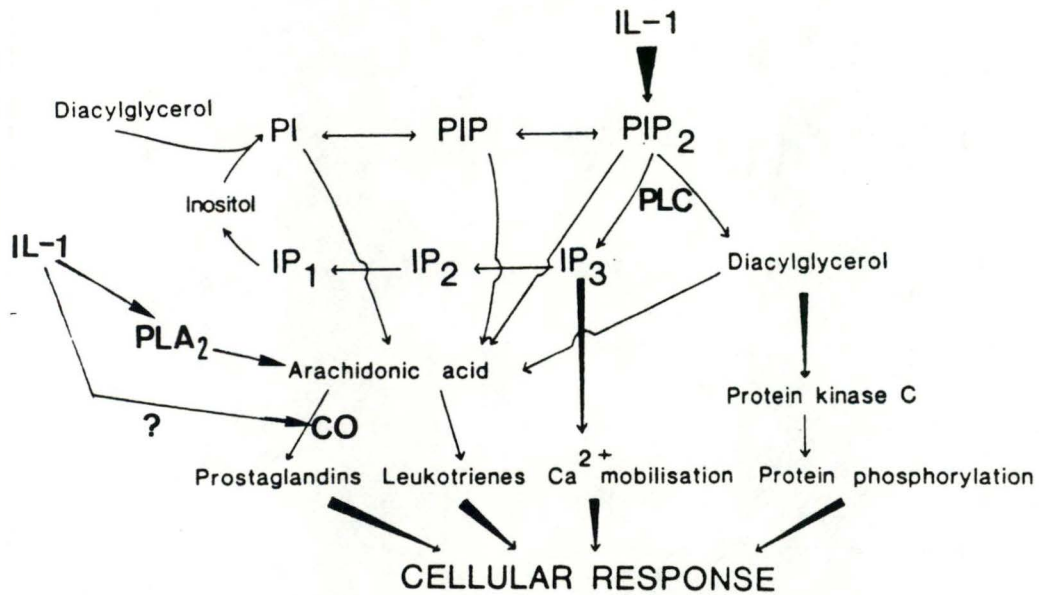
L'IL-1 est une protéine qui existe sous deux formes codées par deux gènes distincts situés sur le chromosome 2 chez l'homme : la forme  $\alpha$  et la forme  $\beta$ . On a montré que la production de la forme  $\beta$  était prédominante (Dinarello, 1987).

Les formes  $\alpha$  et  $\beta$  ne sont homologues que pour environ 26 % de leurs acides aminés. Cependant elles partagent de nombreuses propriétés biologiques et sont reconnues par les mêmes récepteurs (Dinarello, 1988).

L'utilité biologique de la distinction entre les formes  $\alpha$  et  $\beta$  n'est pas encore bien comprise, mais il semble que cela soit lié à une localisation cellulaire différente. Dans la cellule, L'IL-1 est produite sous forme d'une molécule précurseur de 31 000 Da qui ne contient pas de séquence signal de clivage. On retrouve la molécule précurseur ainsi qu'une forme de 22 000 Da dans la cellule ou en association avec la membrane cellulaire. Divers arguments suggèrent que la forme associée aux membranes (qui est une forme active), est plutôt l'IL-1  $\alpha$  alors que l'IL-1  $\beta$  est sécrétée dans la matrice extracellulaire sous la forme de 17 000 Da. La maturation du précurseur  $\beta$  se fait grâce à des sérines protéases (Dinarello, 1988).

Les deux formes  $\alpha$  et  $\beta$  ont été clonées. Les molécules recombinantes rIL-1  $\alpha$  et rIL-1  $\beta$  ne reproduisent pas toutes les propriétés biologiques des IL-1 trouvées dans l'organisme. Dingle et coll.(1987) affirment que la purification de l'IL-1 jusqu'à l'homogénéité des formes  $\alpha$  et  $\beta$  conduit à une perte sélective du matériel actif.

Quant aux mécanismes d'action cellulaire de l'IL-1, ils sont peu connus (figure 6.). Il est possible qu'il s'agisse d'une induction des réponses cellulaires par stimulation du renouvellement des phosphoinositides et par action sur la protéine kinase C (Bunning et coll., 1986). Ce qui expliquerait pourquoi les esters de phorbol (PMA...), analogues du diacylglycérol, imitent in vitro les effets



Possible events leading to cellular responses to IL-1. PI = phosphatidylinositol; PIP = phosphatidylinositol 4-phosphate; PIP<sub>2</sub> = phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; IP<sub>3</sub> = inositol 1,4,5-trisphosphate; IP<sub>2</sub> = inositol 1,4-bisphosphate; IP<sub>1</sub> = inositol 1-phosphate. Phospholipase-C catalyses the conversion of PIP<sub>2</sub> to IP<sub>3</sub> and diacylglycerol; phospholipase A<sub>2</sub> catalyses the production of arachidonic acid from PI, PIP and PIP<sub>2</sub> and also phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. Diacylglycerol lipase catalyses the production of arachidonic acid from diacylglycerol. ▶ = stimulation, → = metabolic conversion.

PLA<sub>2</sub>: phospholipase A<sub>2</sub>  
CO: cyclooxygenase

Figure 6 : Schéma montrant les mécanismes d'action probables de l'IL-1 sur les cellules.

(modifié d'après Bunning et coll., 1986).



de l'IL-1. On sait en effet que ces esters de phorbol agissent au niveau de la protéine kinase C (Stephenson et coll., 1987).

In vivo, la production d'IL-1 est régulée notamment par la PGE<sub>2</sub> qui agit en feed back négatif sur la production d'IL-1 (Miossec, 1987). Les PGs pourraient également médier la production de protéinases par l'IL-1 (Bunning et coll, 1986). L'IL-1 pourrait aussi potentialiser une réponse de l'adénylate cyclase à la PGE<sub>2</sub> exogène en augmentant le nombre et l'affinité des récepteurs à la PGE<sub>2</sub> (Dayer et coll., 1979).

Récemment on a proposé que l'IL-1 puisse induire le métabolisme de l'AA (Chang et coll., 1986); ce qui expliquerait la stimulation de la production de PGE<sub>2</sub> par les cellules synoviales. Il serait donc possible que l'IL-1 induise l'activité de la phospholipase A<sub>2</sub> (Chang et coll., 1986; Godfrey et coll., 1987, Gilman et coll, 1988) et probablement de la cyclooxygénase (O'Neill et coll, 1987).

#### 1.5.2. ACTION DE L'INTERLEUKINE-1 SUR LES CELLULES SYNOVIALES.

L'IL-1 agit sur les cellules synoviales à deux niveaux :

-elle stimule la prolifération des synoviocytes et contribue ainsi à la formation du pannus (Bunning et coll., 1986)

-elle stimule la production par les cellules synoviales de PGE<sub>2</sub> (Dayer et coll., 1979; Fontana et coll. 1982), de métalloprotéinases neutres et latentes (collagénases, gélatinases, protéoglycanases), de l'activateur du plasminogène, des glycosaminoglycans (Bunning et coll., 1986) et même la production de cataboline (IL-1) (Pujol et coll., 1987, Goto et coll., 1987,).

-elle inhibe fortement la production des TIMP.

Une controverse existe au sujet de l'inhibition ou de l'activation par l'IL-1 de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire (Bunning et coll., 1986).

## CHAPITRE 2. MATERIELS ET METHODES.

### 2.1. CULTURE DE CELLULES SYNOVIALES.

#### 2.1.1. MISE EN CULTURE DE CELLULES SYNOVIALES.

##### 2.1.1.1. MATERIELS.

Nous utilisons pour récolter l'échantillon et le rincer, une solution stérile d'HBSS préparée au laboratoire et additionnée des antibiotiques suivants :

- de la pénicilline à une concentration de 200 U / ml (Gibco, Grande-Bretagne).
- de la streptomycine à une concentration de 200 µg / ml (Gibco, Grande-Bretagne).
- de la fungizone (amphotéricine B) à une concentration de 5 µg / ml (Gibco, Grande-Bretagne).

Ce mélange constitue la solution appelée HBSS + AB.

Les cellules synoviales sont mises en culture dans du milieu OPTI-MEM (Gibco, Grande-Bretagne) qui est une modification du milieu essentiel minimum de Eagle (MEM), tamponné avec de l'HEPES et du bicarbonate de sodium (2,4 g/L) et enrichi en hypoxanthine, thymidine, pyruvate de sodium, L-glutamine, traces d'éléments et facteurs de croissance. Cependant la L-glutamine et le pyruvate de sodium étant assez instables, nous les ajoutons fraîchement au milieu à raison respectivement de 2 mM et de 1 mM, ainsi que du 2-mercaptoéthanol 50 µM.

Ce milieu n'a jamais été testé sur les cultures de cellules synoviales à notre connaissance. Nous l'avons choisi parce qu'une étude antérieure réalisée en 1986 au laboratoire sur les chondrocytes humains et bovins avait montré que ce milieu donnait de meilleurs résultats pour la mise en culture et le maintien des cellules dans un état différencié. L'addition de pyruvate et de mercaptoéthanol



pourrait expliquer ces résultats positifs peut-être du fait de leur propriétés antioxydantes (Chen et coll, 1987; O'Donnel et coll, 1987).

Nous utilisons de l' OPTI-MEM + 10 % de sérum de veau foetal (Séra-Lab, Grande-Bretagne) (OPT + SB) ou de l'OPTI-MEM + 10 % de sérum humain (OPT + SH).

Le sérum humain est préparé au laboratoire à partir de prélèvements de sang réalisés par la Croix Rouge de Namur. Ne sont utilisés que des prélèvements effectués sur des personnes saines âgées de 18 à 25 ans. Nous laissons d'abord le sang reposer 24h00 à 4°C puis, nous prélevons le sérum que nous centrifugeons 20 min. à 1300 RPM à la centrifugeuse International (Beckman). Ensuite, nous prélevons le surnageant que nous recentrifugeons 120 min. à 20 000 RPM (Rotor Beckman JA-20). Nous récupérons alors le surnageant en évitant de prélever le voile de lipides que l'on peut parfois observer en surface et nous le filtrons au moyen d'un préfiltre Millex AP 20 (Millipore, France) et d'un filtre Stérivex GV (Millipore, France). De la sorte, nous obtenons de 150 à 250 ml de sérum stérile par donneur.

#### 2.1.1.2. MÉTHODES.

Les fragments de membrane synoviale prélevés au cours d'une intervention chirurgicale sont immédiatement placés dans un flacon stérile contenant de l'HBSS + AB et sont mis en culture sous une hotte à flux laminaire dans les 2 à 4 heures qui suivent l'opération.

Pour la mise en culture, nous nous basons dans les grandes lignes sur la méthode de Dayer et coll. (1976). Nous effectuons d'abord trois rinçages dans de l' HBSS + AB puis nous découpons les prélèvements en morceaux les plus petits et homogènes possibles que nous incubons entre 30 et 45 min. à 37°C dans de la trypsine 0,25 % (Gibco, Grande-Bretagne). Nous décantons ensuite la

trypsine, généralement après une centrifugation de 5 min. à 500 RPM vu la viscosité de la solution.

La seconde étape est une digestion enzymatique de quelques heures dans de la collagénase bactérienne extraite de *Clostridium histolyticum* (C-6885, Sigma Chemical Co, U.S.A.) à une concentration de 0,1 % dans de l'OPTI-MEM. Quand la digestion enzymatique est plus ou moins complète, les cellules sont prélevées et filtrées sur des filtres Nylex respectivement de 100 et 68  $\mu\text{m}$  et préalablement autoclavés pour éliminer les agrégats cellulaires. Elles sont recueillies dans du sérum de veau foetal qui va inhiber la collagénase et ainsi stopper la digestion enzymatique.

Les cellules sont ensuite centrifugées 20 min. à 1200 RPM (International, Beckman). Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans l'OPT + SB ou l'OPT + SH. Après avoir effectué un comptage des cellules dans une chambre de Neubauer, les cellules sont placées dans une boîte de culture (Sterilin, Grande-Bretagne) de surface adéquate (il faut environ 40 à 50 000 cellules par  $\text{cm}^2$ ). Nous réalisons également un test de viabilité sur les cellules avec une solution d'acridine orange et de bromure d'éthidium (Parks et coll., 1979), les cellules sont visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz, R.F.A.). La viabilité après chaque mise en culture était nettement supérieure à 90 %.

## 2.1.2. REPIQUAGE DES CELLULES SYNOVIALES.

### 2.1.2.1. MATERIELS.

Les boîtes de culture de 25  $\text{cm}^2$  ou 75  $\text{cm}^2$  ainsi que les plaques de Pétri de 7  $\text{cm}^2$  et 30  $\text{cm}^2$  sont de marque Cell Cult, Stérilin, Grande-Bretagne. La solution stérile de trypsine 0,25 % et EDTA 0,02 % préparée dans une solution saline de Puck, (T+E), vient de Gibco, Grande-Bretagne.



### 2.1.2.2. METHODES.

Nous repiquons les cellules en 2 ou en 4, c'est-à-dire qu'après le traitement à la trypsine, nous répartissons les cellules pour obtenir environ 10 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour un repiquage en 4 et environ 20 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour un repiquage en 2. Cependant, après avoir fait agir la T + E, nous lavons les cellules par une centrifugation de 20 min. à 1200 RPM pour éliminer les traces de trypsine et d'EDTA. Nous resuspendons le culot dans une solution d'OPT + SB ou dans de l'OPT + SH. Nous ajustons le pH du milieu en ajoutant du CO<sub>2</sub> aux cellules, et après quelques jours, nous réapprovisionnons les cellules en éléments nutritifs en changeant le milieu. Signalons que pour certaines expériences, nous avons également utilisé des fibroblastes humains WI-38. Ceux-ci sont cultivés et repiqués d'après Hayflick (1965).

### 2.1.3. CLONAGE DES CELLULES SYNOVIALES.

Les boîtes de Pétri de 30 cm<sup>2</sup> ainsi que les boîtes multicompartimentées à 24 grandes cupules comprenant chacune 16 cupules de 9 mm<sup>2</sup> (soit 384 cupules au total) viennent de Cell Cult, Stérilin, Grande-Bretagne.

Lors d'un repiquage, nous prélevons des cellules de manière à en ensemercer 200 par boîte de Pétri et 16 à 20 cellules pour chaque grande cupule de la boîte multicompartimentée (pour avoir en moyenne 1 cellule par petite cupule).

Nous laissons croître les cellules pendant 9 jours, puis nous les fixons. Le principe de la fixation est le suivant : les cellules sont rincées avec du PBS, puis nous les mettons dans un mélange 50 % PBS-50 % fixateur (méthanol

#### 2.1.4. DOSAGE DES PROTEINES CELLULAIRES IN SITU.

Pour établir une courbe de croissance des cellules synoviales en fonction du temps, nous employons des boîtes multicompartimentées à 25 cupules de 4 cm<sup>2</sup> chacune et nous dosons les protéines selon la méthode décrite par Lowry et coll. (1951) après 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours. L'expérience étant étalée sur plusieurs jours, chaque étape doit être réalisée stérilement pour ne pas contaminer les cupules qui devront servir les jours suivants. La solution de rinçage (PBS) ainsi que la solution de NaOH 0,5 N utilisée pour dénaturer les protéines seront donc stérilisées.

Nous avons testé plusieurs séra à différentes concentrations :

- OPT + 5 % SB
- OPT + 10 % SB
- OPT + 5 % SB et 5 % SH
- OPT + 10 % SH

Pour ce faire, nous plaçons environ 40 000 cellules par cupule de la boîte multicompartimentée. Aux jours 2, 3, 4, 5, 6 et 7, nous prélevons les cellules dans trois cupules différentes (pour à avoir des triples) de la manière suivante : nous rinçons deux fois les cellules avec du PBS très délicatement; puis nous ajoutons 1 ml de NaOH 0,5 N et nous incubons 30 min. à 37°C de façon à dénaturer les protéines. Les solutions de protéines dénaturées sont prélevées et congelées à -20°C jusqu'au moment du dosage.



### 2.1.5. STIMULATION DE LA PRODUCTION DE COLLAGENASE PAR LES CELLULES SYNOVIALES ET LES FIBROBLASTES HUMAINS WI-38

Nous avons stimulé des cellules synoviales ainsi que les fibroblastes humains WI-38 avec du PMA et de l'IL-1 $\beta$ . Pendant la phase de stimulation, les cellules sont cultivées dans de l'OPT sans sérum, étant donné que le sérum contient des inhibiteurs de la collagénase. Nous utilisons alors comme substitut du sérum de l'hydrolysate de lactalbumine (HLA) à 0,2 %.

#### 2.1.5.1. STIMULATION DES CELLULES AVEC DU PHORBOL-12 MYRISTATE-13 ACETATE (PMA).

Le PMA (Sigma, USA) est suspendu dans de l'éthanol à raison de 0,5 mg/ml. Il est fractionné et congelé à -70° C. La concentration finale en éthanol dans le milieu de culture ne dépasse jamais 0,05 %.

La stimulation au PMA se fait durant 15 jours à 3 semaines maximum en alternant des périodes de stimulation (48 à 72h00) et des périodes de repos (24 à 48h00).

Pour la stimulation, nous ajoutons dans une boîte de culture subconfluente, une solution d'OPT + HLA 0,2 % + PMA 50 ng/ml afin de stimuler la production de collagénase par les cellules. Après 48 à 72h00, nous prélevons le milieu et nous remplaçons dans la boîte de l'OPT + HLA 0.2 % pour mettre les cellules au repos avant de recommencer une nouvelle stimulation avec du PMA. Tous les milieux prélevés sont congelés à -20°C jusqu'au moment où nous allons les concentrer.

### 2.1.5.2. STIMULATION DES CELLULES AVEC DE L'INTERLEUKINE-1.

Nous avons utilisé l'IL-1 $\beta$  recombinante (Janssen Biochimica, Turnhout, Belgique). L'IL-1 $\beta$  est diluée dans du PBS, filtrée et congelée à -70° C.

Les cellules sont stimulées une seule fois pendant une période définie qui est au maximum de 48h00. Dans la boîte de culture, on met de l'OPT + HLA 0.2 % + IL-1 $\beta$  soit à raison de 1U/ml, soit à raison de 10 U/ml. Quand la période de stimulation est terminée, nous récoltons le milieu de culture et nous le congelons jusqu'au moment où nous l'utilisons soit pour doser la collagénase, soit pour doser la quantité de prostaglandines.

## 2.2. MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE LA COLLAGENASE.

### 2.2.1. MARQUAGE DU COLLAGENE.

Pour préparer le collagène radioactif, nous nous sommes basés sur la méthode de Cawston et coll.(1979) et toutes les étapes décrites ci-dessous sont réalisées à 4°C. Nous avons utilisé 1 gramme de collagène de type I de peau de veau, acido-soluble (C-3511, Sigma Chemical Co, U.S.A.) que nous avons dissous dans 200 ml d'acide acétique 0,2 M; puis nous l'avons dialysé contre un tampon tétraborate 0,01 M contenant du CaCl<sub>2</sub> 0,2 M à pH 9,0. Pour le marquage, nous avons ajouté de l'anhydride acétique tritié (Amersham, TRI 2-2, activité spécifique : 5,3 Ci/mMole ou 51,9 mCi/mg c-à-d 1,961 10<sup>11</sup> Bq/mMole ou 1,920 10<sup>9</sup> Bq/mg) dissous dans du dioxane (Merck, R.F.A.) à raison de 12,5 mCi par 1,5 ml de dioxane aux 200 ml de solution de collagène. Après agitation douce, nous dialysons la solution de collagène radioactif contre du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,4, jusqu'à ce que le nombre de cpm dans le dialysat soit inférieur à 5 000 cpm / ml.



Une partie de la solution de collagène radioactif est dialysée contre de l'acide acétique 0,2 M puis est fractionnée pour être stockée à -70°C, et une autre partie est diluée dans du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,4 pour avoir une concentration d'environ 2 mg/ml puis elle est dialysée contre du tampon phosphate de sodium 0,15 M pH 7,4. Cette partie sera utilisée pour faire le dosage de la collagénase d'après la méthode de Johnson-Wint (1980) et elle est conservée à 4°C. Comme cette solution était assez trouble, nous l'avons centrifugée 2h15 à 20 000 RPM (Beckman, rotor JA-20) (Johnson-Wint, 1980). Après centrifugation, nous avons recueilli un surnageant bien clair. Nous récupérons 46,07% de la radioactivité dans ce surnageant, soit une radioactivité moyenne de 2 250 000 cpm/ml soit  $5,202 \cdot 10^6$  dpm/ml soit encore 2,35  $\mu$ Ci/ml ou  $8,695 \cdot 10^4$  Bq/ml.

### 2.2.2. DOSAGE DU COLLAGENE A LA CHLORAMINE T.

Nous avons suivi la méthode décrite par Huszar et coll (1979) qui est le dosage de l'hydroxyproline par la chloramine T. La chloramine T vient de Sigma Chemical Co, U.S.A.; la p-diméthylaminobenzaldéhyde et l'hydroxyproline de chez Merck, R.F.A..

Pour le dosage, le collagène radioactif dissous dans le tampon phosphate de sodium 0,15 M, pH 7,4 est utilisé à différentes concentrations et en aliquots de 50  $\mu$ l. Le phosphate de potassium est à déconseiller parce qu'il se forme du perchlorate de potassium lors de l'addition de la solution aldéhyde/acide perchlorique. Ce composé est relativement insoluble. Bien qu'il ne paraisse pas interférer avec la méthode de dosage (Jackson et coll., 1967), nous avons toutefois préféré utiliser le phosphate de sodium.

Les aliquots sont d'abord séchés à 100°C puis il subissent une hydrolyse basique à 120°C dans 50  $\mu$ l de NaOH 4 N pendant 10 min. Le pH est ramené à 6,0 avec 50  $\mu$ l d'acide citrique 1,4 N afin que la chloramine T puisse

oxyder l'hydroxyproline pour former un groupement pyrrole. L'étape suivante est l'addition d'une solution aldéhyde/acide perchlorique qui va permettre les deux réactions suivantes :

-L'acide perchlorique va détruire l'excès de chloramine T en acidifiant le milieu

-la p-diméthylaminobenzaldéhyde réagit avec le dérivé pyrrole pour former un complexe coloré détectable à 550 nm.

### 2.2.3. DOSAGE DE LA COLLAGENASE SUR FILM DE COLLAGÈNE RADIOACTIF.

#### 2.2.3.1. PREPARATION DU FILM DE COLLAGÈNE.

Nous avons utilisé des plaques à 96 puits de Nunc (Danemark) ainsi que le collagène radioactif que nous avons marqué et dialysé contre le tampon phosphate de sodium 0,15 M pH 7,4 puis centrifugé (cfr 2.2.1.). La concentration de la solution de collagène a été estimée à 964,5 µg/ml de solution de collagène par dosage à la chloramine T. Sa radioactivité est de 2,35 µCi/ml ou 8,695 10<sup>4</sup> Bq/ml de solution de collagène.

Nous nous sommes basés sur la méthode de Johnson-Wint (1980) nous plaçons 20 µl de la solution de collagène radioactif par puits en les inclinant à 45° afin que le film de collagène radioactif soit seulement sur une moitié de la surface des puits. Nous incubons la plaque toujours inclinée à 45° à 35°C ou 37 °C dans une étuve pendant 1h00. Nous plongeons alors doucement la plaque 1h00 dans de l'eau distillée pour éliminer les traces de tampon phosphate et nous laissons sécher à l'air pendant une nuit.



### 2.2.3.2. CONCENTRATION DE LA COLLAGENASE LATENTE PRODUITE PAR LES CELLULES.

Nous rassemblons les milieux de culture récoltés et nous dialysons l'ensemble contre un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,2 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,5 en changeant 3 ou 4 fois le tampon de dialyse. Ensuite, nous concentrons 5 à 6 fois la solution sur un système Amicon.

### 2.2.3.3. ACTIVATION DE LA COLLAGENASE LATENTE PRODUITE PAR LES CELLULES.

La collagénase produite par les cellules étant sous une forme latente, il est nécessaire de l'activer pour pouvoir la détecter. Nous nous inspirons de la méthode décrite par Kandel et Coll. (1987). Nous employons une solution de trypsine TPCK (T-8642, Sigma Chemical Co, U.S.A.) préparée dans un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,2 M, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, pH 7,4 (Tampon A) à raison de 1 mg/ml et une solution de SBTI (T-9003, Sigma Chemical Co, U.S.A.) préparée dans le même tampon A à raison de 5 mg/ml pour inhiber la trypsine.

Nous ajoutons la solution de trypsine TPCK à raison de 0,1 mg/ml de la solution de collagénase concentrée et nous l'incubons 10 min. à 37 °C. Ensuite, nous ajoutons à la solution de collagénase activée l'inhibiteur de trypsine, à raison de 0,5 mg/ml de solution de collagénase et nous laissons agir au moins 5 min. à température ambiante.

#### 2.2.3.4. DOSAGE DE LA COLLAGENASE.

Nous nous basons à nouveau sur la méthode décrite par Johnson-Wint (1980). Nous recouvrons chaque film de collagène radioactif avec 200 µl de différents échantillons en réalisant des triples pour chaque temps d'incubation. Comme le film a été coulé incliné à 45°, il nous suffit d'incliner la plaque dans le sens inverse pour prélever les 50 µl de surnageant sur lesquels nous ferons un comptage de radioactivité. Nous ajoutons les échantillons suivants sur les films :

- la collagénase produite par les cellules que nous avons concentrée et activée et que nous voulons doser

- du tampon A seul qui va nous servir de blanc (N.B.: il faut un blanc pour chaque temps d'incubation)

- de la trypsine TPCK préparée dans le tampon A à une concentration de 0,01 % et qui va nous servir de test de dénaturation car la trypsine ne peut dégrader le collagène que sous forme non native

- de la collagénase bactérienne extraite de *Clostridium histolyticum* (C-6885, Sigma Chemical Co, U.S.A.) préparée dans le tampon A à raison de 4 mg/ml. Elle va agir en dégradant totalement le collagène radioactif.

Remarquons que dans certaines expériences, nous dosons la collagénase activée ou non à la trypsine.

#### 2.2.4. EFFET DE L'INTERLEUKINE 1- $\beta$ SUR LA LIBERATION D'ACIDE ARACHIDONIQUE RADIOACTIF INCORPORE PREALABLEMENT PAR LES CELLULES.

Nous nous basons sur la méthode décrite par Godfrey et coll. (1987). Nous procédons comme lors d'un repiquage de cellules mais le culot est resuspendu de telle façon que l'on ait environ 300 000 cellules par cupule d'une boîte multicompartimentée à 24 cupules de 2 cm<sup>2</sup> (Nunc, Danemark.)



Dans chaque cupule nous ajoutons 5  $\mu$ l d'acide arachidonique tritié (activité spécifique : 191 Ci/m mole, NEN), soit 0,5  $\mu$ Ci/300 000 cellules. Nous laissons les cellules incorporer l'acide arachidonique radioactif pendant 18h00 à 37°C, puis nous prélevons le surnageant cellulaire sur lequel nous réalisons un comptage pour estimer la quantité d'acide arachidonique radioactif incorporée et nous lavons trois fois la cupule avec du PBS stérile. Nous y ajoutons soit de l'interleukine-1  $\beta$  à 1 U/ml soit à 10 U/ml dans de l'OPT + HLA 0,2 %. Dans les cupules contrôles, nous n'ajoutons que de l'OPT + HLA 0,2 %. Pour estimer la quantité d'acide arachidonique incorporé par les cellules au temps 0 (juste avant l'incubation avec l'IL-1 $\beta$ ) c'est-à-dire après les 18h00 d'incorporation en présence de l'acide arachidonique radioactif, 2 ou 3 cupules sont fixées dans 0,5 ml de NaOH 0,5 N après les rinçages au PBS stérile; 2 X 100  $\mu$ l serviront à réaliser des comptages de radioactivité pour permettre l'estimation de la quantité d'acide arachidonique radioactif incorporé par les cellules (radioactivité incorporée au temps 0).

Nous incubons alors les cellules 2,4,8,24 et 48h00 dans les différents milieux puis, après le temps d'incubation adéquat, nous prélevons le surnageant : par comptage nous estimons la quantité de radioactivité relarguée au temps t. Nous exprimons les résultats comme suit :

$$\text{Radioactivité relarguée(\%)} = \frac{\text{radioactivité relarguée au temps t}}{\text{radioactivité incorporée au temps 0}}$$

### 2.2.5. EXTRACTION DES PROSTAGLANDINES.

Les cellules sont repiquées comme décrit précédemment et ensuite stimulées au non avec différents agents dissous dans l'OPT + HLA 0,2 %. Après différents temps, le milieu de culture est prélevé et acidifié à pH 3-3,5 avec de l'HCl 1 N. Le milieu est ensuite déposé sur une colonne C<sub>18</sub> (J.T. Baker Chemical Co,

USA) conditionnée avec 6 ml d'acétate d'éthyle puis 9 ml d'eau bidistillée. Après avoir déposé doucement l'échantillon, la colonne est lavée avec 6 ml d'eau et les prostaglandines sont éluées avec 5 ml d'acétate d'éthyle. Nous récupérons ainsi deux phases : une phase acétate d'éthyle et une phase aqueuse. La phase organique est alors déposée sur une colonne de silice (J.T.Baker Chemical Co, USA) conditionnée par 5 ml de méthanol puis 5 ml d'acétate d'éthyle. La colonne est lavée avec 2 ml d'acétate d'éthyle après dépôt de l'échantillon et les prostaglandines sont éluées avec 5 ml de méthanol. Cette phase organique est évaporée sous azote. Le tube est ensuite lavé avec un ml d'un mélange de chloroforme-méthanol (1/1, v/v) pour amener les prostaglandines dans le fond du tube. Cette phase est évaporée à nouveau sous azote.

## 2.2.6. DERIVATISATION DES PROSTAGLANDINES.

### 2.2.6.1. MATERIELS.

Le bromure de PFB ( bromure de 2,3,4,5,6 -pentafluorobenzyl 99 % + *o*-bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluène), la N-éthyl-diisopropylamine viennent de Aldrich Chemie, RFA.; le BSTFA ( Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide), le méthoxime HCl, l'acétonitrile et le dodécane de chez Janssen Chimica (Belgique); la pyridine sèche de chez Merck (RFA).

### 2.2.6.2. METHODES.

La méthode de dérivation est une version modifiée de celle de Waddel et coll.(1983). A chaque tube, nous ajoutons 50 µl de bromure de PFB dissous dans de l'acétonitrile (7 %, v/v) et 10 µl de diisopropyléthylamine. Après



avoir agité fortement, les tubes sont incubés pendant 10 min à température ambiante.

Ils sont ensuite évaporés sous azote et 50  $\mu$ l de méthoxime HCl dissous dans de la pyridine sèche à une concentration de 2 % sont ajoutés et nous incubons pendant 90 min à une température de 60°C.

Les tests sont évaporés sous azote et on ajoute 50  $\mu$ l de BSTFA dissous dans de la pyridine sèche (2/1, v/v). Ils sont incubés pendant 20 min à 60°C.

Après évaporation sous azote, les prostaglandines sont resuspendues dans 50  $\mu$ l de dodécane. Les tubes sont alors centrifugés pendant 10 min à 3000 RPM (Hettich Universal) et le surnageant est récupéré.

#### 2.2.7. DETECTION DES PROSTAGLANDINES EN CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLEE A UN SPECTROMETRE DE MASSE (GC-MS).

L'appareil GC-MS (Hewlett-Packard(USA)) est équipé d'une colonne capillaire de 5 % phényl méthyl silicone dont le diamètre interne est de 0,32 mm et la longueur de 25 m. L'épaisseur du film de la phase stationnaire est de 0,17  $\mu$ m.

La caractérisation des prostaglandines se fait par ionisation chimique négative en présence de méthane comme gaz réactionnel et les molécules sont identifiées par fragmentométrie ou "selected ions monitoring" (SIM). Le gradient de la température du four se réalise comme suit : 180 °C pendant une minute, ensuite la température monte de 25 °C par minute jusqu'à 270°C; la température de l'injecteur est de 260°C; celle de la ligne de transfert vers le spectromètre de masse est de 290°C tandis que celle de la source d'ions est de 150°C. Le gaz vecteur est l'hélium dont la vitesse à travers la colonne est de 1 ml/min. Les ions détectés ayant des masses de 434, 524, 526, 569 et 614 correspondent respectivement à la PGB<sub>2</sub>, la PGD<sub>2</sub> et la PGE<sub>2</sub>, la PGE<sub>1</sub>, la PGF<sub>2a</sub>, la TXB<sub>2</sub> et

la 6-céto-PGF<sub>1</sub>α. Rappelons que la PGI<sub>2</sub> se transforme en 6-céto-PGF<sub>1</sub>α dans le milieu cellulaire. La quantité injectée des échantillons varie de 2 à 5 µl.

La quantification des PGs est réalisée avec des PGs deutérées qui servent de standards internes. Ces PGs deutérées sont ajoutées à l'échantillon au départ. La PGE<sub>2</sub>-d<sub>4</sub>, la PGF<sub>2</sub>α-d<sub>4</sub> et la 6-céto-PGF<sub>1</sub>α-d<sub>4</sub> correspondent respectivement aux ions détectés pour des masses de 528, 573 et 618.



## CHAPITRE 3. RESULTATS.

### 3.1. CULTURE DE CELLULES

#### 3.1.1. PRELIMINAIRE.

Comme expliqué dans l'introduction, les synoviocytes sont stimulés dans différentes pathologies inflammatoires et produisent différents enzymes (collagénase, gélatinase, protéoglycanase,...) et facteurs (activateur du plasminogène, PGE<sub>2</sub>, IL-1,...). Nous avons donc voulu mettre ces cellules synoviales en culture pour créer un modèle in vitro de la membrane synoviale qui nous permettra d'étudier son comportement dans différentes conditions.

Nous avons d'abord mis au point la culture sur des cellules synoviales d'origine humaine et nous avons ensuite étudié certains paramètres sur ces cellules. L'influence du sérum humain et du sérum de veau foetal sur les cellules synoviales a notamment été testé à deux niveaux : la croissance et la morphologie. Pour cette étude nous avons réalisé des photographies, des dosages de protéines cellulaires in situ et des clonages .

Nous avons reçu 8 fragments (Tableau 2) que nous avons mis en culture et sur lesquels nous avons réalisé nos expériences.

Dans les primo-cultures, nous observons des cellules fibroblastiques et dendritiques (photos 1 et 2 ). Après plusieurs repiquages, nous ne voyons pratiquement plus que des cellules fibroblastiques. Cependant, si nous stimulons les cellules avec de l'IL-1 à raison de 10 U/ml de milieu, nous constatons qu'une partie des cellules fibroblastiques se transforment en cellules dendritiques (cfr 3.2.4.1.).

#### 3.1.2. MISE EN CULTURE.

Date de réception	Sexe du patient	Âge du patient	Nom de la lignée	Pathologie	comptage des cellules
5 octobre 1987	Féminin	62 ans	1-F-62	Prothèse totale de la hanche.	environ 820 000 cellules
5 octobre 1987	Féminin	73 ans	2-F-73	Prothèse totale du genou (arthrose)	environ 650 000 cellules
12 octobre 1987	Masculin	18 ans	3-M-18	Non communiquée (genou gauche)	environ 1 125 000 cellules
12 octobre 1987	Féminin	53 ans	4-F-53	Prothèse totale du genou	estimation impossible à cause du grand nombre de globules rouges
16 novembre 1987	Féminin	75 ans	5-F-75	Prothèse totale du genou	estimation impossible à cause du grand nombre de globules rouges
30 novembre 1987	Féminin	71 ans	6-F-71	Prothèse totale de la hanche.	estimation impossible à cause du grand nombre de globules rouges
22 février 1988	Féminin	56 ans	7-F-56	Prothèse totale du genou	environ 1 700 000 cellules
19 avril 1988	Féminin	35 ans	8-F-35	Kyste synovial	environ 1 080 000 cellules

**Tableau 2 : Caractéristiques des fragments reçus pour la mise en culture de cellules synoviales.**



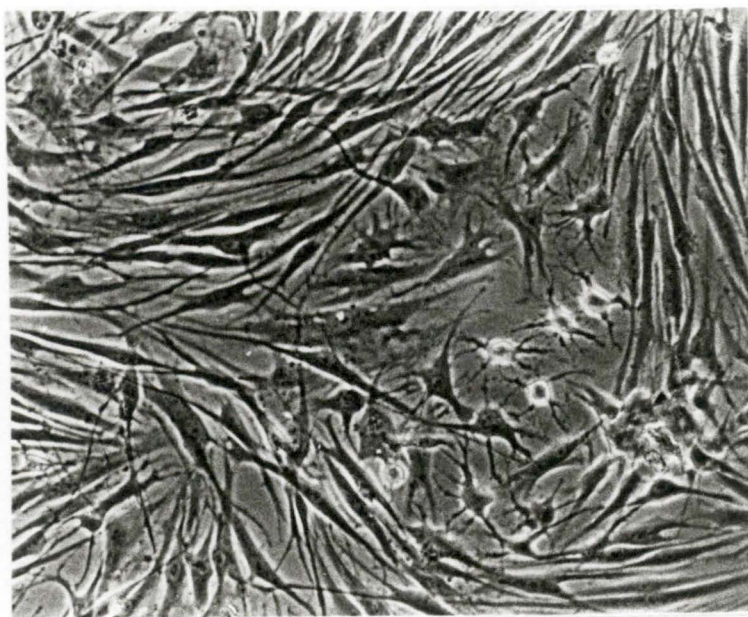


Photo 1 : Primoculture des cellules synoviales de la lignée 1-F-62. Cellules dendritiques et fibroblastiques (X 144).



Photo 2 : Primoculture des cellules synoviales de la lignée 1-F-62. ► Cellule dendritique au centre de la photo (X 144).

**LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES DANS LA PRESENTATION DES LIGNEES  
MISES EN CULTURE.**

cell. : cellules.

CM : changement de milieu.

CL : donages.

DP : dosage des protéines cellulaires in situ pour établir une courbe de croissance.

COLL. : cellules stimulées au PMA 50 ng/ml (cfr 2.1.5.1.).

GX : cellules en X<sup>ième</sup> génération.

M : morphologie (photographies).

OPT + SB + AB : OPTI - MEM contenant 10 % de sérum de veau foetal; de la pénicilline, de la streptomycine et de la fungizone respectivement à des concentrations de 100 U/ml, 100 µg/ml et 2,5 µg/ml.

qq : quelques.

SB : OPTI - MEM contenant 10 % de sérum de veau foetal.

SH1 : OPTI - MEM contenant 10 % de sérum humain du 25-02-88 provenant d'une jeune fille de 21 ans.

SH2 : OPTI - MEM contenant 10 % de sérum humain du 25-02-88 provenant d'une jeune fille de 23 ans.

T25 : boîte de culture Cell-Cult (Stérilin, Grande-Bretagne) de 25 cm<sup>2</sup>.

T75 : boîte de culture Cell-Cult (Stérilin, Grande-Bretagne) de 75 cm<sup>2</sup>.

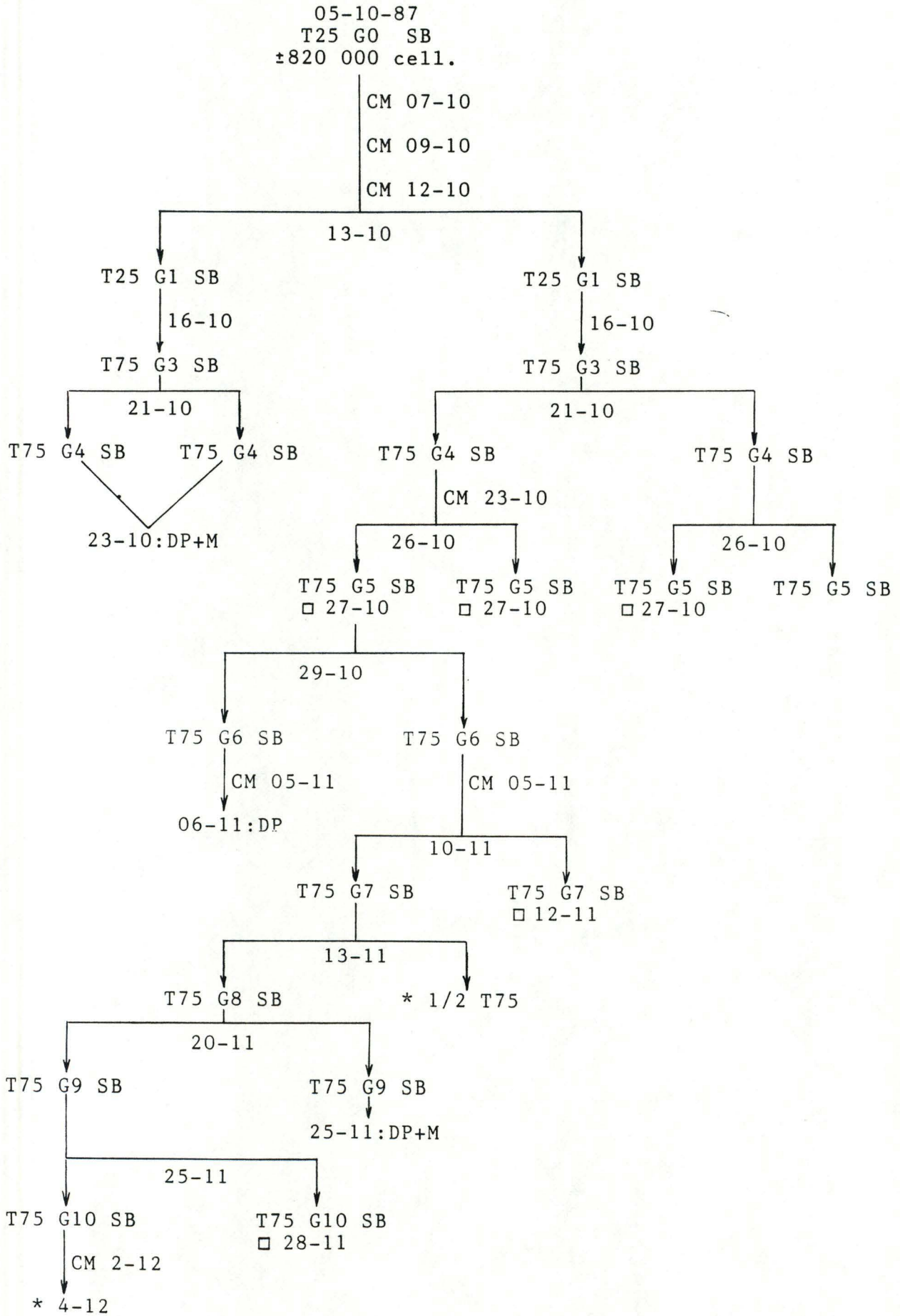
Ø30 : Boîte de Pétri de 30 mm de diamètre (Stérilin, Grande-Bretagne).

Ø60 : Boîte de Pétri de 60 mm de diamètre (Stérilin, Grande-Bretagne).

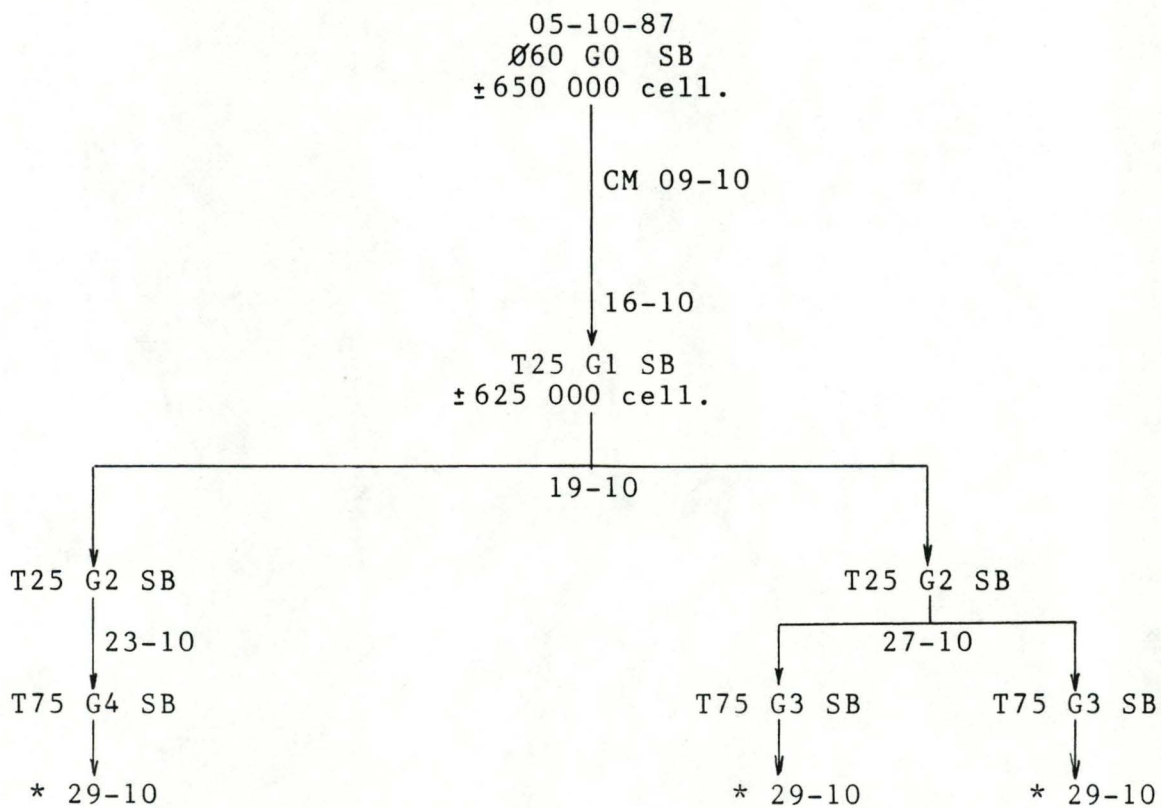
: contamination de la culture.

★ : congélation des cellules.





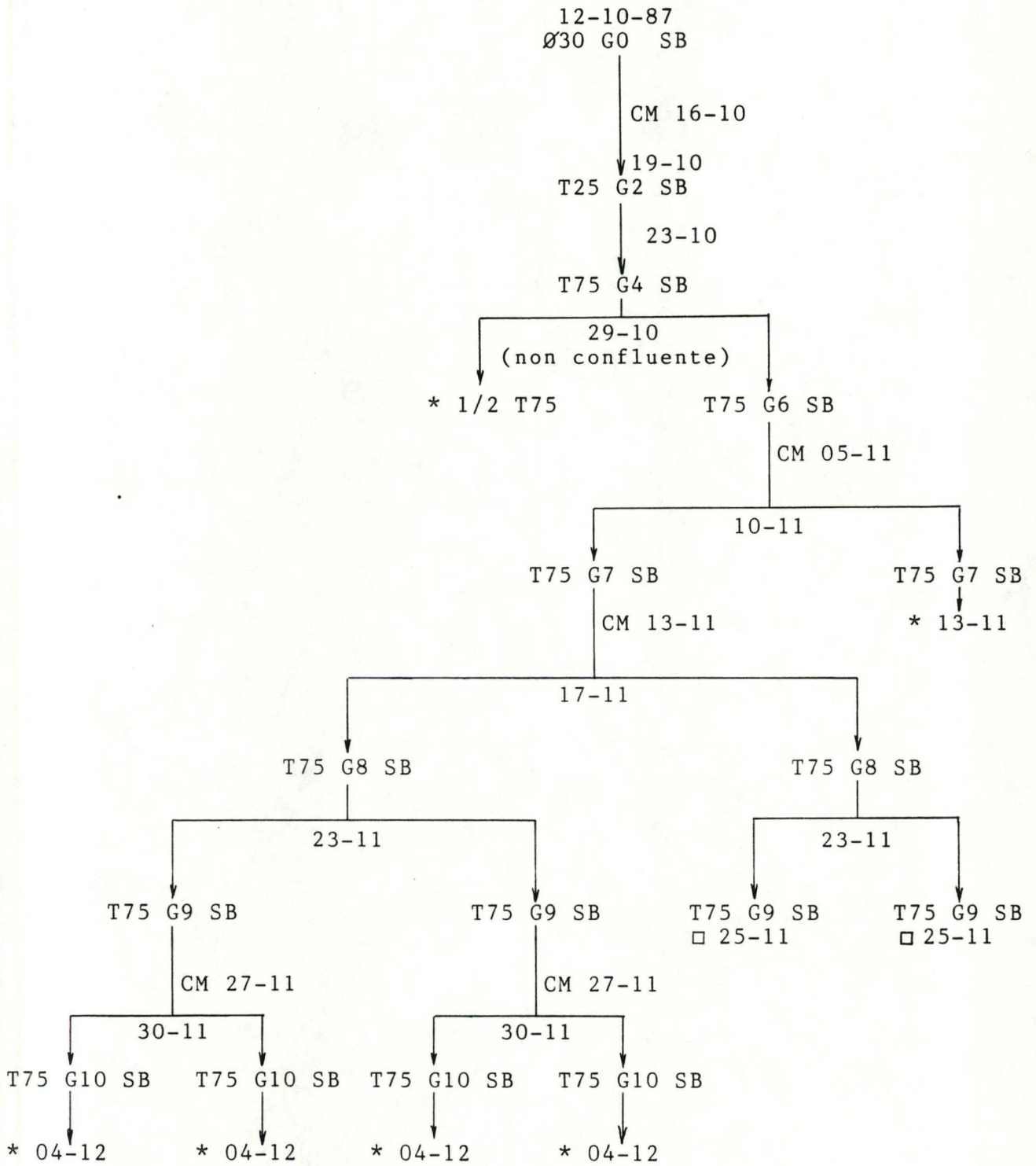
## 3.1.2.2. LIGNEE 2 - F - 73.



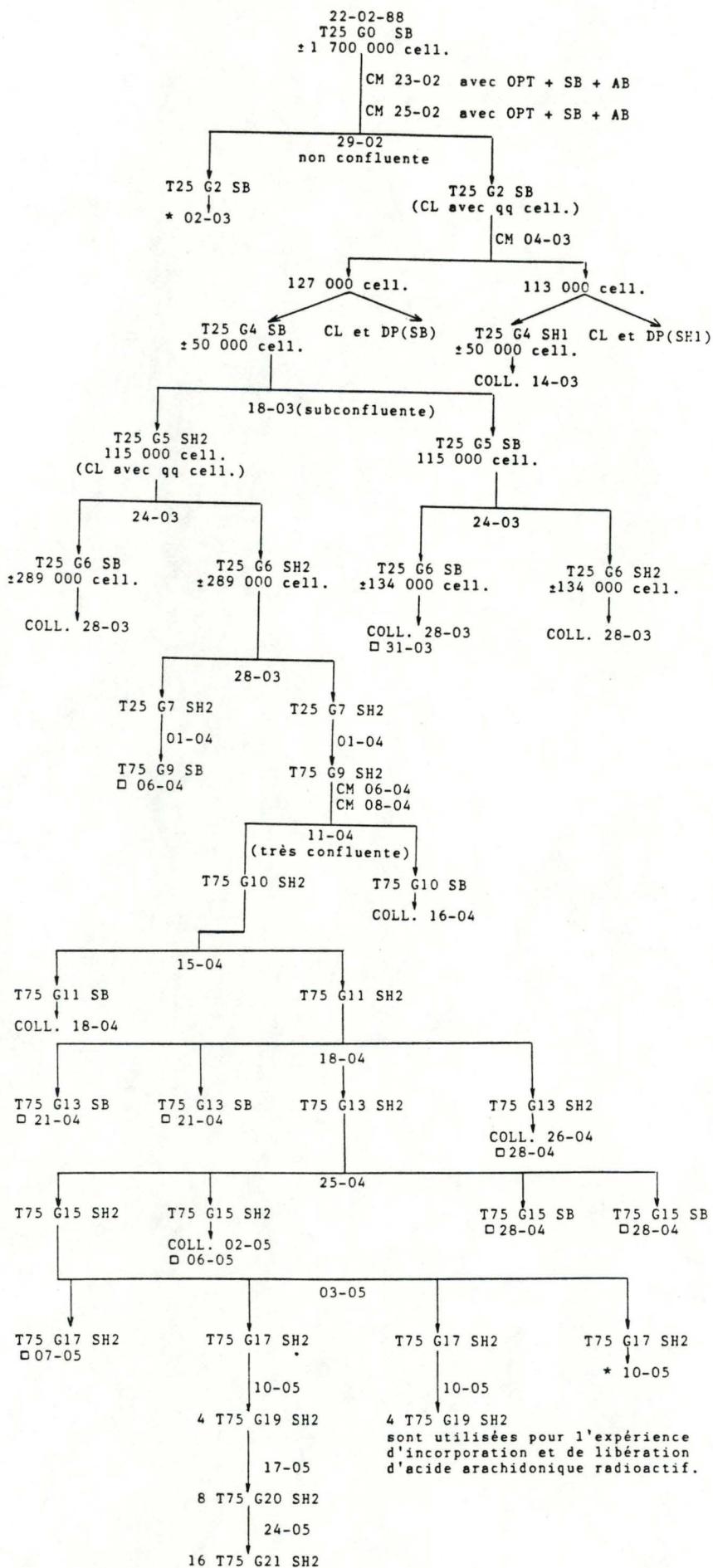


3.1.2.3. LIGNEE 4 - F - 53.

---



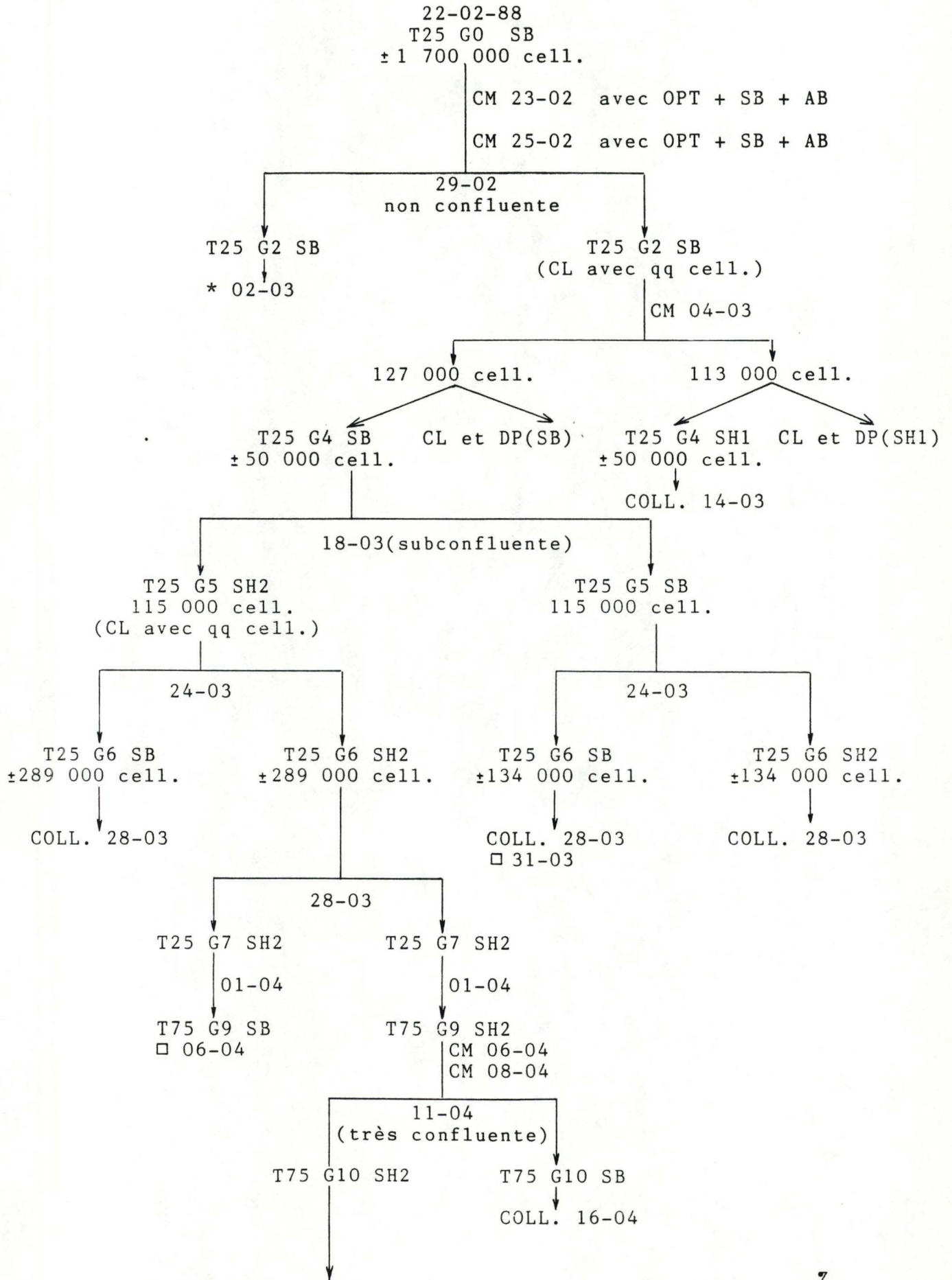
## 3.1.2.4. LIGNEE 7 - F - 56.

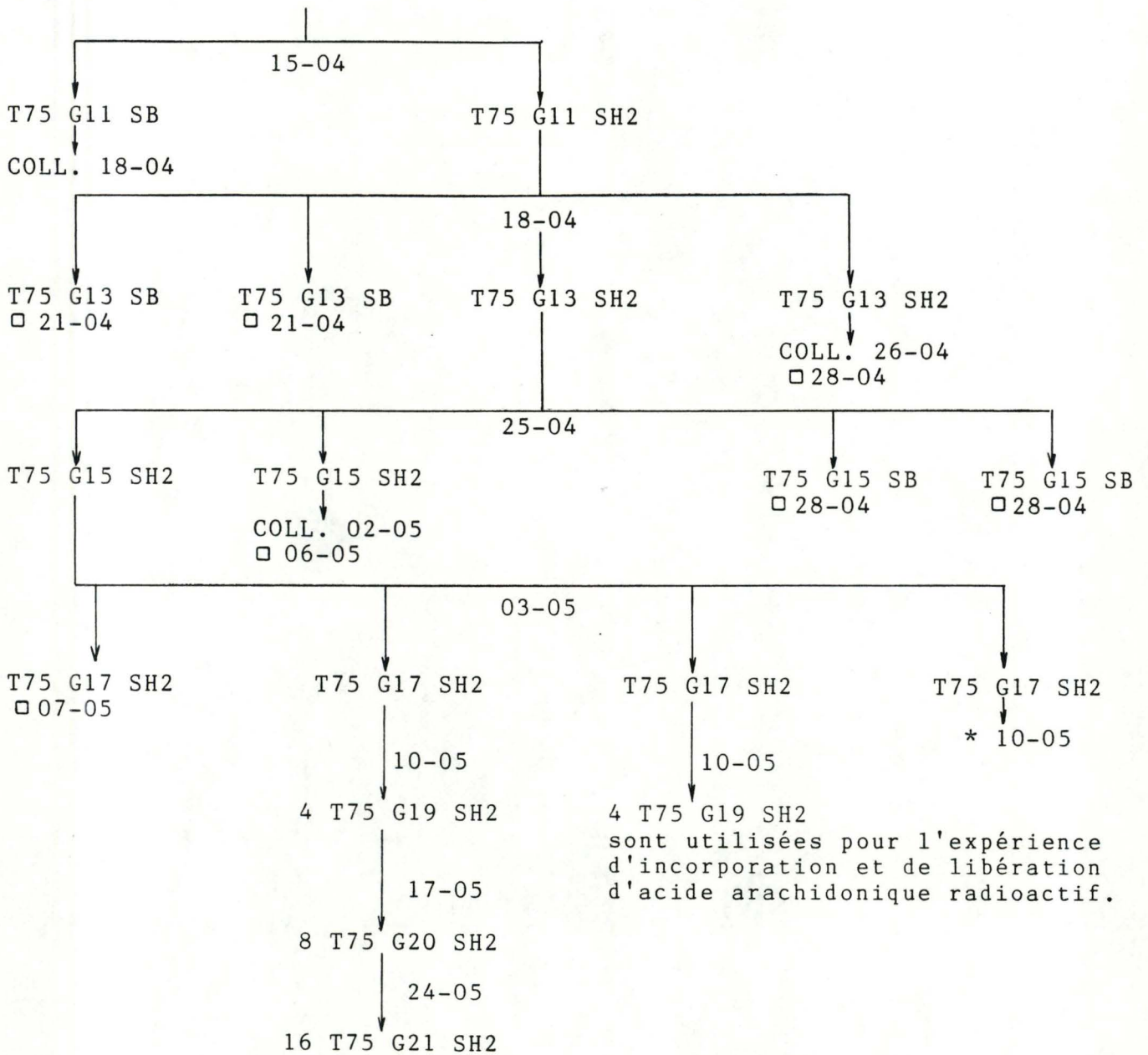


N.B. Nous avons eu un lot de sérum de veau foetal contaminé.  
Cela explique le taux élevé des contaminations dans cette lignée.



3.1.2.4. LIGNEE 7 - F - 56.

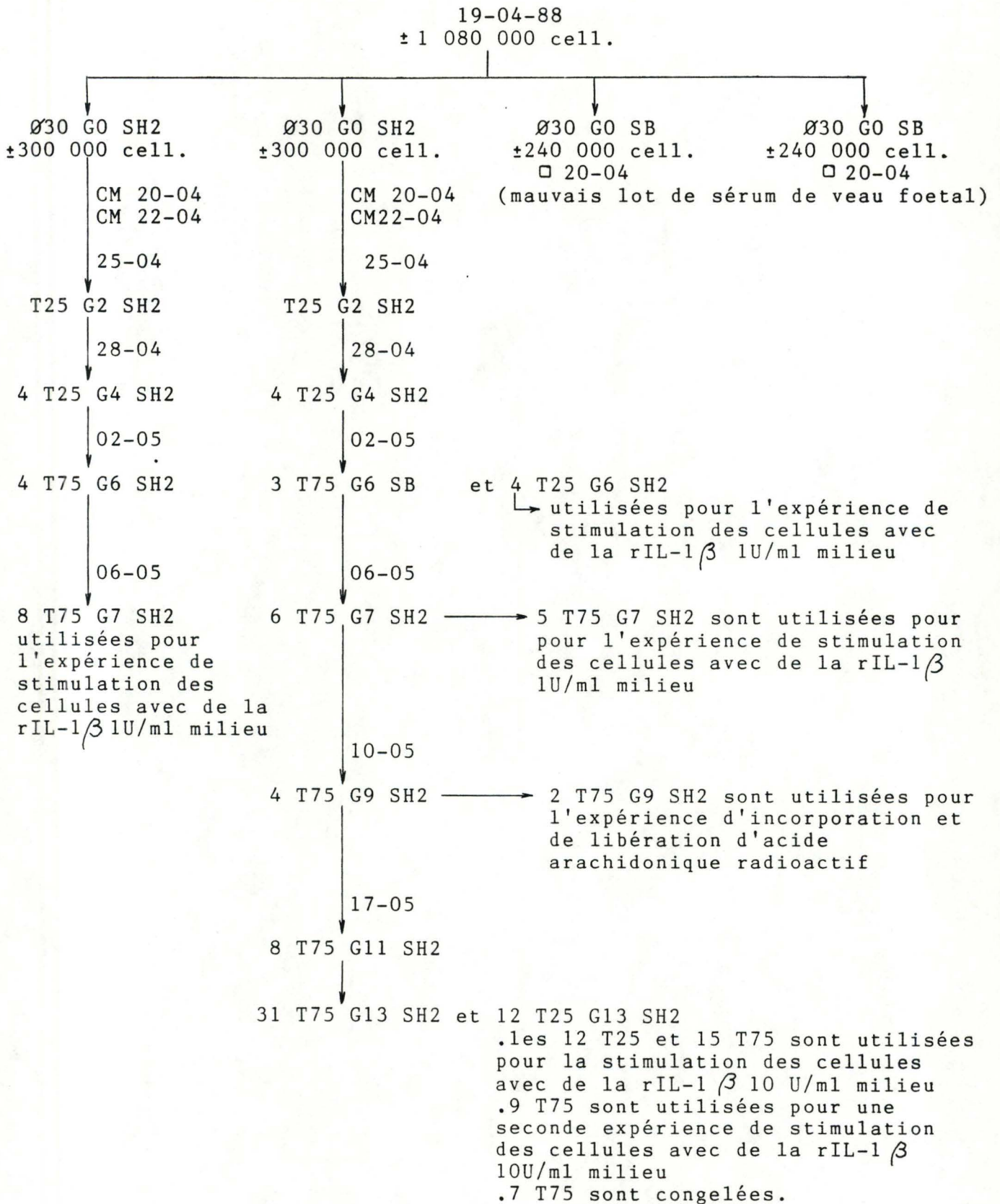




N.B. Nous avons eu un lot de sérum de veau foetal contaminé.  
Cela explique le taux élevé des contaminations dans cette lignée.



## 3.1.2.5. LIGNEE 8 - F - 35.



### 3.1.3. ETUDE DE L'INFLUENCE DES SERA SUR LA MORPHOLOGIE ET LA CROISSANCE DES CELLULES SYNOVIALES.

#### 3.1.3.1. MORPHOLOGIE.

Nous avons suivi la lignée 7-F-56 durant 4 générations en la cultivant soit dans le sérum humain soit dans le sérum de veau foetal. Nous avons observé la morphologie des cellules (Tableau 3.) et nous pouvons faire les observations suivantes :

- en présence de sérum bovin, les cellules ont une morphologie altérée, elles ressemblent à des cellules "vieilles", très aplaties et très larges; elles ont de nombreux prolongements cytoplasmiques. Nous voyons assez peu de cellules ayant un aspect fibroblastique (Photo 3)

- en présence de sérum humain, nous observons beaucoup plus de cellules fibroblastiques, et elles ont beaucoup moins de prolongements. De plus, leur croissance est beaucoup plus rapide.

- les cellules cultivées dans un milieu avec sérum bovin puis dans un milieu avec sérum humain voient leur aspect s'améliorer et leur croissance devient également plus rapide (photo 4).

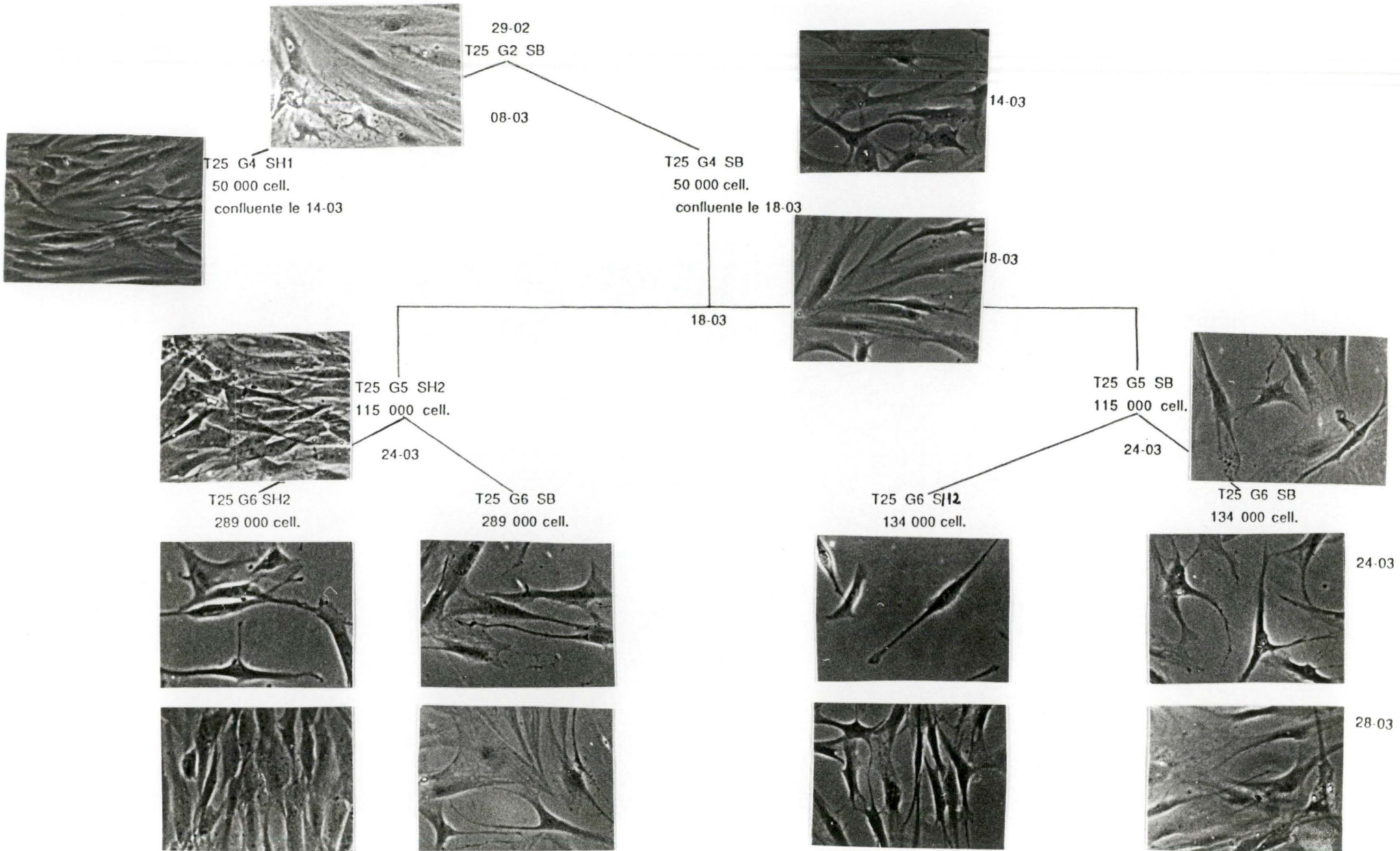
- par contre, les cellules cultivées en présence de sérum humain puis en présence de sérum bovin acquièrent à leur tour un aspect aplati et ont beaucoup plus de prolongements.

Les photos 5 et 6 représentent des cellules synoviales cultivées depuis la cinquième génération jusqu'à la dixième génération dans de l'OPT + SH2 et repiquées après la dixième génération de la façon suivante : - une moitié des cellules a été placée dans de l'OPT + SH2.

- l'autre moitié des cellules a été mise dans de l'OPT + SB.

Nous observons que les deux boîtes sont arrivées à confluence le même jour et que les cellules ont un aspect assez semblable; il semble donc que le





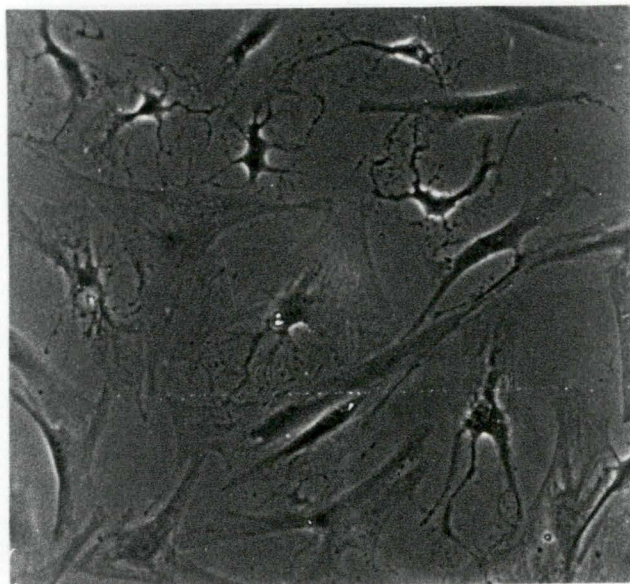


Photo 3 : Culture en monocouche de cellules synoviales en quatrième génération (7-F-56). Les cellules sont cultivées dans de l'OPT + SB 10 % (X 144).



Photo 4 : Culture en monocouche de cellules synoviales en quatrième génération (7-F-56). Les cellules sont passées lors du repiquage de l'OPT + SB 10 % à l'OPT + SH 10 %.(X 144).



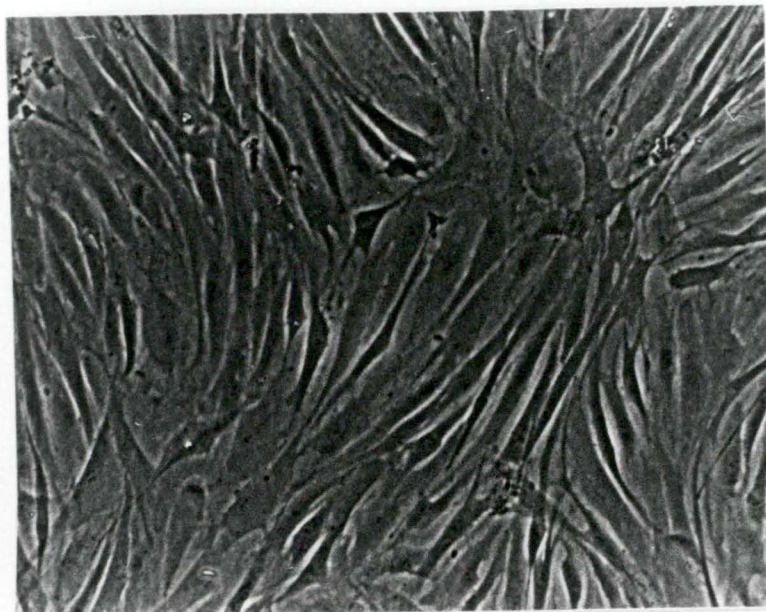


Photo 5 : Culture en monocouche de cellules synoviales en onzième génération (7-F-56). Les cellules ont été cultivées dans de l'OPT + SH<sub>2</sub> de la quatrième à la dixième génération. A la onzième génération, elles ont été cultivées dans l'OPT + SB 10 % (X 144).

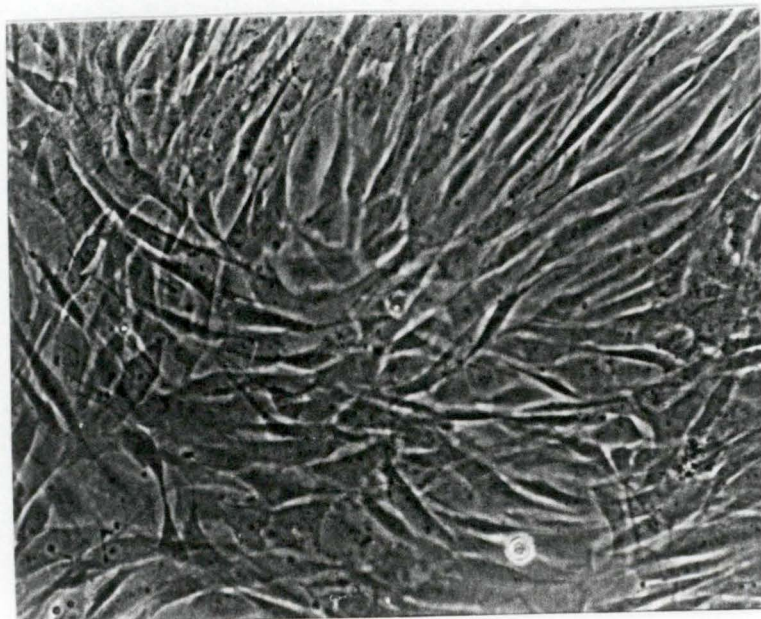


Photo 6 : Culture en monocouche de cellules synoviales en onzième génération (7-F-56). Les cellules ont été cultivées dans de l'OPT + SH<sub>2</sub> depuis la quatrième génération (X 144).

sérum humain a réellement un effet positif sur les cellules et que cet effet se prolonge quelque temps.

### 3.1.3.2.COURBES DE CROISSANCE.

Pour les courbes de croissance,nous avons étudié l'effet de :

- OPT + 5 % SB
- OPT + 10 % SB
- OPT + 5 % SB - 5 % SH
- OPT + 10 % SH

Selon les fabricants, le milieu OPTI - MEM est très performant et d'une grande souplesse d'emploi, même avec des concentrations réduites en sérum de veau foetal. Il permet donc de réaliser une économie de sérum.

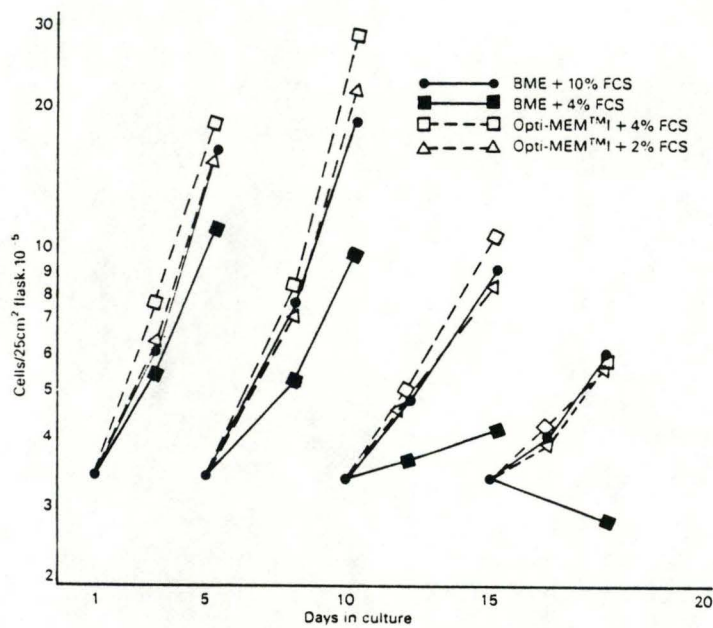
Les résultats des tests réalisés par les fabricants sur les fibroblastes WI-38 sont en effet très significatifs (figure 7.) : les cellules sont placées dans du BME + 10 % ou 4 % SB et dans de l'OPTI - MEM + 4 % ou 2 % SB. Après une incubation de cinq jours, elles sont trypsinisées et comptage est pour chaque condition expérimentale.

Les résultats indiquent que les cellules cultivées dans l'OPT + 4 % SB ou l'OPT + 2 % SB prolifèrent à un rythme comparable au BME + 10 % SB et meilleur que celui du BME + 4 % SB.

Nous avons donc testé si cet effet était également visible sur les cellules synoviales.

Le mélange SB-SH est utilisé pour étudier son efficacité par rapport à du SB ou du SH seul. En fait, ce mélange a déjà été testé sur les cultures de chondrocytes au laboratoire et il donnait de meilleurs résultats que le sérum bovin seul .





Comparison of Growth in Monolayer Culture of WI-38 cells in Opti-MEM™ vs. Basal Medium Eagle's at Reduced Serum Supplementation.

Figure 7 : Effet de la concentration en sérum foetal de veau et du milieu de culture employé sur la croissance des fibroblastes humains Wi-38 en culture (GIBCO , Grande-Bretagne.)

Nous avons réalisé les courbes de croissance sur les cellules synoviales selon la méthode décrite en 2.1.4. Les résultats des dosages de protéines in situ sont consignés dans les figures 8., 9. et 10.

On peut conclure de ces expériences que :

- le sérum humain permet une croissance plus rapide des cellules synoviales et est plus efficace que le mélange SH-SB ou le SB seul.

- en ce qui concerne les cellules synoviales, une concentration en sérum de 5 % est insuffisante. Nous avons donc utilisé une concentration en sérum humain de 10 % pour obtenir une croissance cellulaire optimale

### 3.1.3.3. CLONAGE DE CELLULES SYNOVIALES.

Nous avons aussi testé l'influence des différents séra sur la croissance des cellules lors d'un clonage.

Nous avons réalisé des clones sur boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre, et pour chaque milieu testé, nous avons réalisé deux cultures : l'une servira à visualiser les clones et l'autre à réaliser un dosage de protéines cellulaires in situ (Photo 7, Tableau 4.).

Cette expérience nous donne à nouveau les mêmes résultats en ce qui concerne la croissance et nous montre de plus qu'il existe une variabilité entre les différents séra humains.

D'autres expériences de clonage ont été réalisées sur des boîtes multicompartimentées à 384 cupules sur les trois mêmes milieux, les résultats sont donnés dans la Figure 11. Nous pouvons plus difficilement tirer des conclusions dans ce cas parce que la différence entre les divers séra est beaucoup moins visible. Nous constatons que le nombre de clones ayant plus de 128 cellules est inférieur dans le sérum de veau foetal par rapport au séra humains.



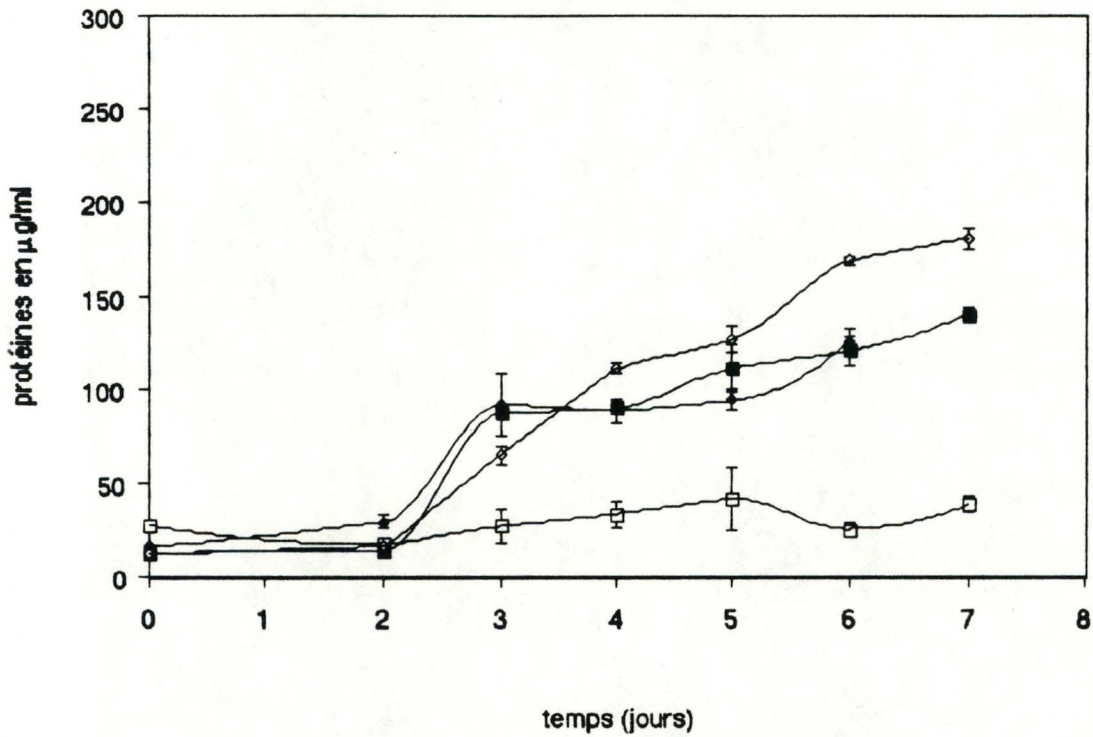


Figure 8 : Effet des séras humains et bovins à différentes concentrations sur la croissance cellulaire. Le dosage des protéines cellulaires a été réalisé in situ sur des cellules synoviales en sixième génération (1-F-62) dans les différents milieux de cultures. Les résultats sont exprimés en donnant la moyenne (en  $\mu\text{g}$  de protéines par ml et pour une surface de  $4\text{ cm}^2$ )  $\pm 2$  écarts-types.

- OPT + 5 % SB
- OPT + 5 % SB-5 % SH
- ◆ OPT + 10 % SB
- ◇ OPT + 10 % SH

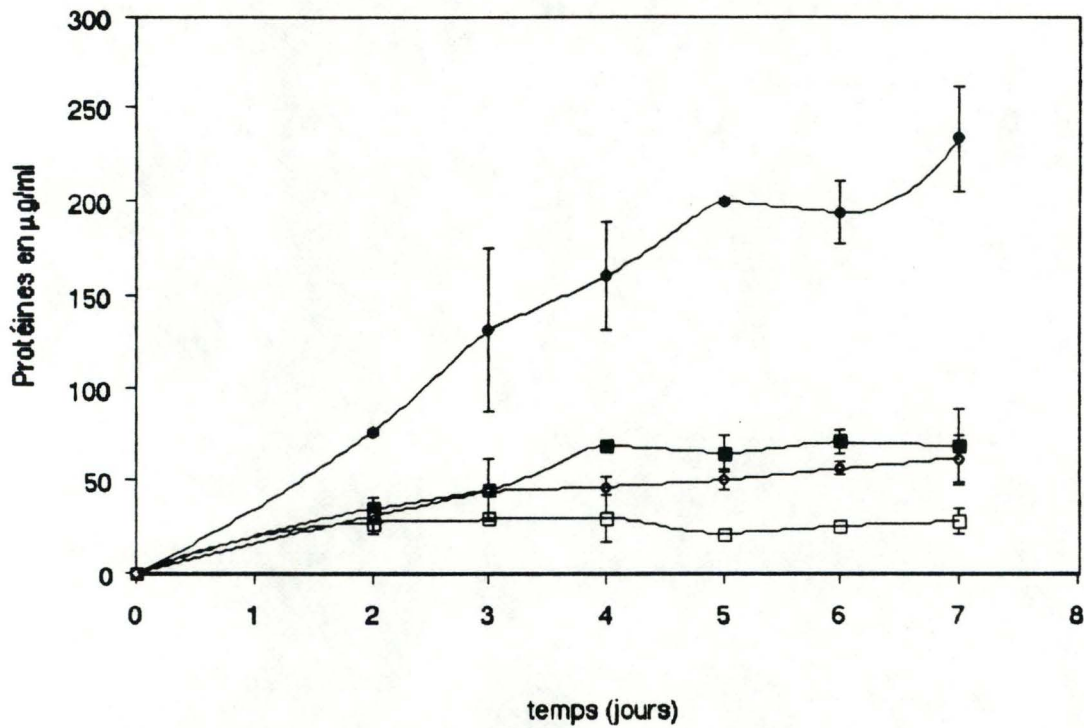


Figure 9 : Effet des séras humains et bovins à différentes concentrations sur la croissance cellulaire. Le dosage des protéines cellulaires a été réalisé in situ sur des cellules synoviales en neuvième génération (1-F-62) dans les différents milieux de cultures. Les résultats sont exprimés en donnant la moyenne (en  $\mu\text{g}$  de protéines par ml et pour une surface de  $4\text{ cm}^2$ )  $\pm$  2écarts-types.

- OPT + 5 % SB
- OPT + 5 % SB-5 % SH
- OPT + 10 % SB
- OPT + 10 % SH



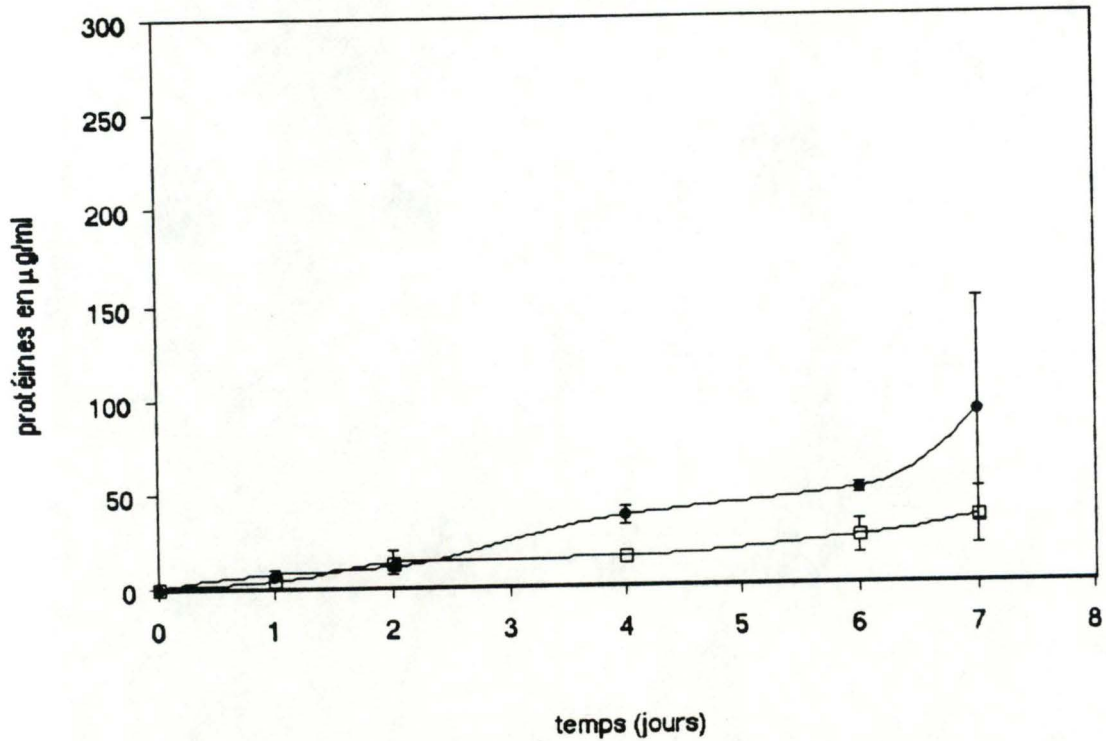


Figure 10 : Effet des séra humains et bovins à différentes concentrations sur la croissance cellulaire. Le dosage des protéines cellulaires a été réalisé in situ sur des cellules synoviales en quatrième génération (7-F-56). Les résultats sont exprimés en donnant la moyenne (en  $\mu\text{g}$  de protéines par ml et pour une surface de  $4\text{ cm}^2$ )  $\pm 2$  écarts-types.

□ OPT + 10 % SB

● OPT + 10 % SH

Milieu utilisé	$\mu\text{g}$ de protéines / ml / boîte de Pétri
OPT + 10 % SB	48,75
OPT + 10 % SH 1	166,25
OPT + 10 % SH 2	271,25

Tableau 4 : Effet du sérum de veau foetal et du sérum humain sur la croissance des synoviocytes. Cet effet est estimé par un dosage des protéines cellulaires in situ sur des clones réalisés dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre. Elles sontensemencées avec environ 200 cellules synoviales (7-F-56) en seconde génération. Le dosage a été réalisé après neufs jours.

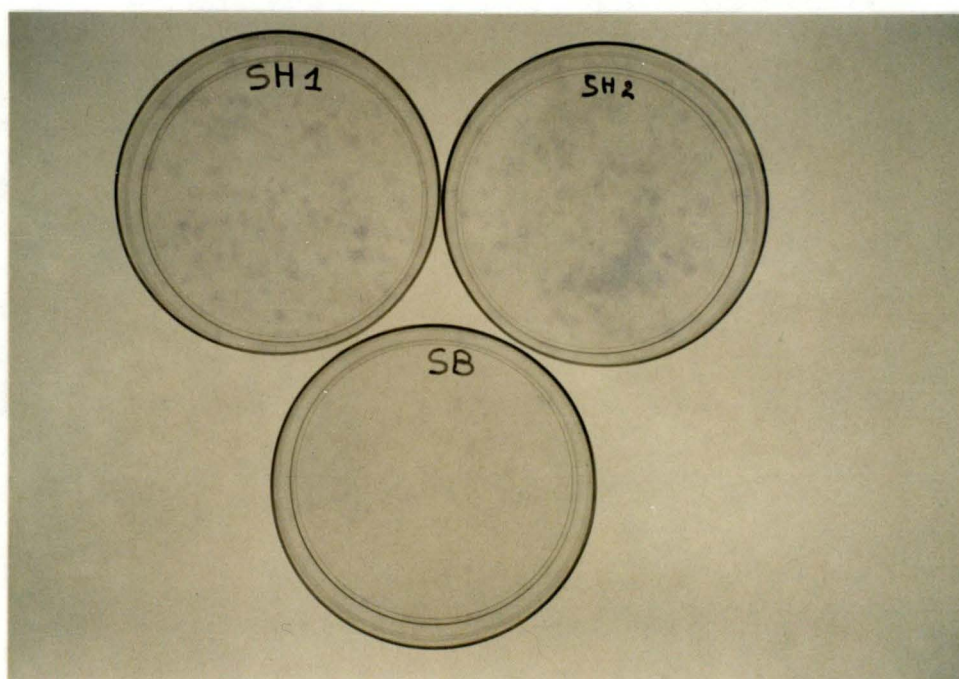


Photo 7 : Clones de cellules synoviales de la lignée 7-F-56 en seconde génération. Les clones sont réalisés dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre. Celles-ci sontensemencées avec environ 200 cellules synoviales. Les cellules ont été fixées après neuf jours.



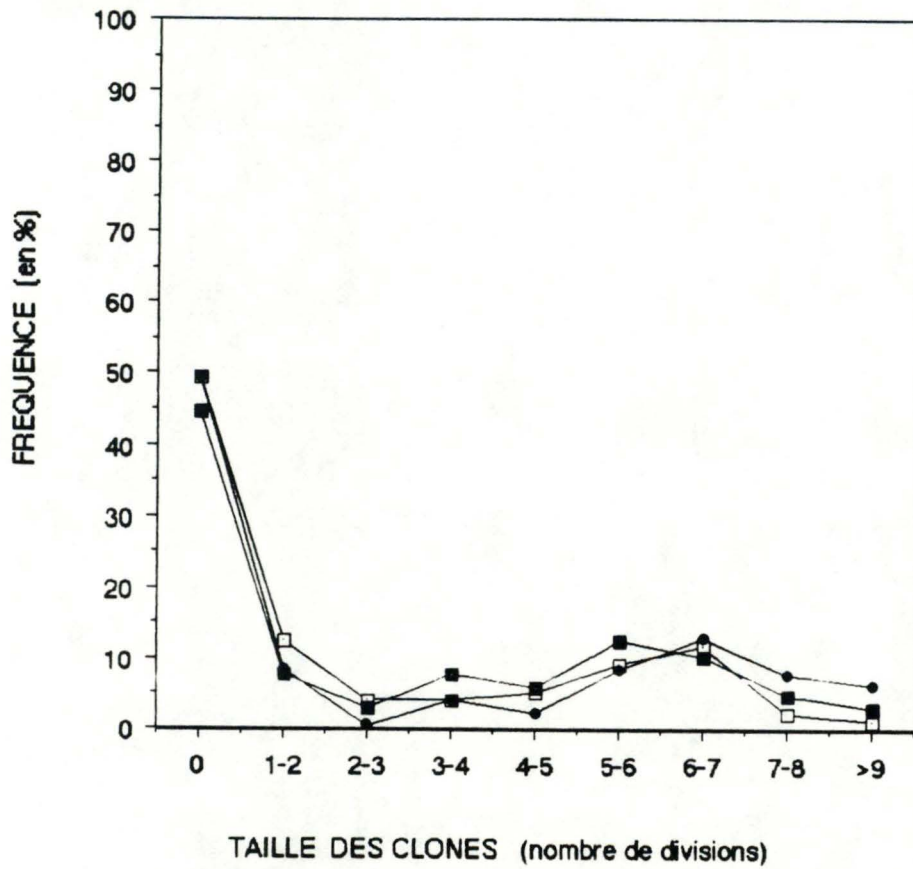


Figure 11 : Effet du sérum de veau foetal et du sérum humain sur le clonage de cellules synoviales en sixième génération (7-F-56). Les cellules ont été repiquées dans les boîtes multidishes à 384 cupules à raison de une cellule en moyenne par petite cupule. Elles sont fixées après neuf jours. La taille des clones est déterminée en comptant les cellules. Dans les résultats, nous donnons la fréquence des clones en %.

- OPT + 10 % SB
- OPT + 10 % SH1
- OPT + 10 % SH2

#### 3.1.3.4. CONCLUSIONS.

Des diverses expériences réalisées sur les cellules synoviales, nous pouvons tirer comme conclusion que la croissance des cellules est plus rapide dans l'OPT + SH et que c'est dans ce milieu que les cellules sont morphologiquement les mieux conservées. Des expériences similaires ont été réalisées au laboratoire sur les chondrocytes humains en culture par I. KNOTT et ses conclusions sont semblables aux nôtres. Nous n'avons pas trouvé d'expérience semblable dans la littérature et nous ne connaissons pas de publications mentionnant l'emploi du milieu de culture OPTI-MEM pour la culture de cellules synoviales.



## **3.2.MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE LA COLLAGENASE.**

### **3.2.1.INTRODUCTION.**

Nous avons voulu doser la collagénase produite par les cellules synoviales dans différentes conditions de culture. Plusieurs possibilités s'offraient à nous : le dosage de la collagénase sur fibrilles (Cawston et coll., 1979), sur gel (Peeters-Joris et coll., 1981), sur film de collagène radioactif (Johnson-Wint, 1980) ou encore sur du collagène radioactif soluble (Mallya et coll., 1986).

Les dosages sont essentiellement basés sur le fait que la collagénase de vertébrés clive de façon tout à fait spécifique le collagène natif, qu'il soit de type I, II ou III et que l'on peut doser l'enzyme de façon indirecte en dosant les produits de son action enzymatique, soit les fragments TC<sup>A</sup> et TC<sup>B</sup> (voir introduction 1.3.1.). Comme le collagène employé est radioactif, nous pouvons effectuer des comptages sur ces fragments et ainsi estimer la quantité de collagénase qu'ils contiennent. Signalons que la collagénase peut agir aussi comme une gélatinase, à pH neutre et à 37°C, sur du collagène dénaturé. Elle agit cependant moins rapidement que les autres protéases non spécifiques (Wooley et coll., 1975).

Dans ces tests, le collagène de type I est généralement le plus utilisé comme substrat pour plusieurs raisons :

- il est clivé plus rapidement que le collagène de type II qui contient un plus grand nombre de liaisons covalentes entre les fibrilles (Barrett et coll., 1985).

- le collagène de type III sous forme de triple hélice est sensible à l'action de sérines protéases à un site proche mais non identique à celui de la collagénase (Harris et coll., 1982).

- le collagène de type I est beaucoup plus abondant que les deux autres types dans l'organisme et est donc plus facile à isoler.

Les modèles sur film, gel et fibrilles reproduisent assez bien les conditions in vivo et leur mise en oeuvre est plus facile car les fragments TC<sup>A</sup> et

$^{14}\text{C}$  sont directement relargués dans le milieu. Il suffit alors de prélever un peu de celui-ci et de faire un comptage de radioactivité.

Le modèle utilisant le collagène radioactif soluble reproduit moins bien les conditions *in vivo*, mais il semble plus sensible et plus approprié pour faire de la cinétique enzymatique (Mallya et coll., 1986). Cependant, il faut ôter les télopeptides du collagène radioactif, sans quoi des fibrilles pourraient se former dans la solution et fausser les résultats (Helseth et coll., 1981). Autre avantage, on utilise de plus petites quantités de collagène radioactif, ce qui est plus économique.

Nous avons choisi de doser la collagénase sur film de collagène radioactif parce que la méthode proposée par Johnson-Wint (1980) paraissait facile à réaliser et suffisamment sensible et spécifique. De plus, elle permet de travailler sur un grand nombre d'échantillons à la fois.

Nous avons donc marqué du collagène de type I de peau de veau avec de l'anhydride acétique tritié (cfr. 2.2.1.). L'anhydride acétique se fixe principalement sur les groupes  $\epsilon$  aminés des lysines. La réaction n'a cependant lieu que si ces groupements ne sont pas protonés (Gisslow et coll., 1975). Il est donc nécessaire de travailler à un pH élevé et à des concentrations élevées en collagène. Pour que, dans ces conditions, le collagène reste soluble, il faut ajouter au tampon du  $\text{CaCl}_2$  (Cawston et coll., 1979) et du  $\text{NaCl}$  de l'ordre de 0,3 M (Mookhtier et coll., 1986).

Nous avons utilisé pour le dosage la solution de collagène radioactif dialysée contre le tampon phosphate de sodium 0,15 M, pH 7,4; cette solution a été clarifiée et le surnageant constitue notre solution finale de collagène(2.2.1.). Pour rappel, ce surnageant contient environ  $2,5 \cdot 10^6$  cpm/ml ou  $5,202 \cdot 10^6$  dpm/ml, soit encore  $2,35 \mu\text{Ci/ml}$  ou  $8,695 \cdot 10^4$  Bq/ml.



### 3.2.2. ESTIMATION DE LA CONCENTRATION DU COLLAGÈNE RADIOACTIF PAR DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE L'HYDROXYPROLINE PAR LA CHLORAMINE T ET PAR ÉTALONNAGE AU SPECTROPHOTOMETRE.

#### 3.2.2.1. DOSAGE DU COLLAGÈNE RADIOACTIF PAR LA CHLORAMINE T.

##### 3.2.2.1.1. INTRODUCTION.

La solution de collagène radioactif que nous avons centrifugée 2 heures 15 min à 20 000 RPM (Rotor Beckman JA 20) (cfr 2.2.1.) contenait environ 2 mg de collagène radioactif par ml de solution. Nous désirions savoir quelle quantité de collagène radioactif restait dans le surnageant avec lequel nous allions travailler.

Comme le collagène possède une composition en acides aminés inhabituelle, il est difficile à doser selon les méthodes classiques. Nous avons opté pour un dosage spécifique de l'hydroxyproline (Huszar G. et coll., 1980), car le collagène est une protéine très riche en cet acide aminé, comparativement aux autres protéines.

##### 3.2.2.1.2. DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE.

Pour mettre au point le dosage de l'hydroxyproline à la chloramine T proposé par Huszar et coll (1980), nous avons d'abord réalisé une droite d'étalonnage pour de l'hydroxyproline pure (Figure 12.).

Nous constatons que le dosage est linéaire pour des quantités d'hydroxyproline comprises entre 0,5 et 20  $\mu\text{g}$  par test (50 $\mu\text{l}$ ). Ces résultats nous permettent de doser des solutions d'hydroxyproline à des concentrations de 10 à 400  $\mu\text{g/ml}$ . De plus, le dosage est bien spécifique de l'hydroxyproline car si nous réalisons un test avec des concentrations croissantes en albumine - qui ne contient



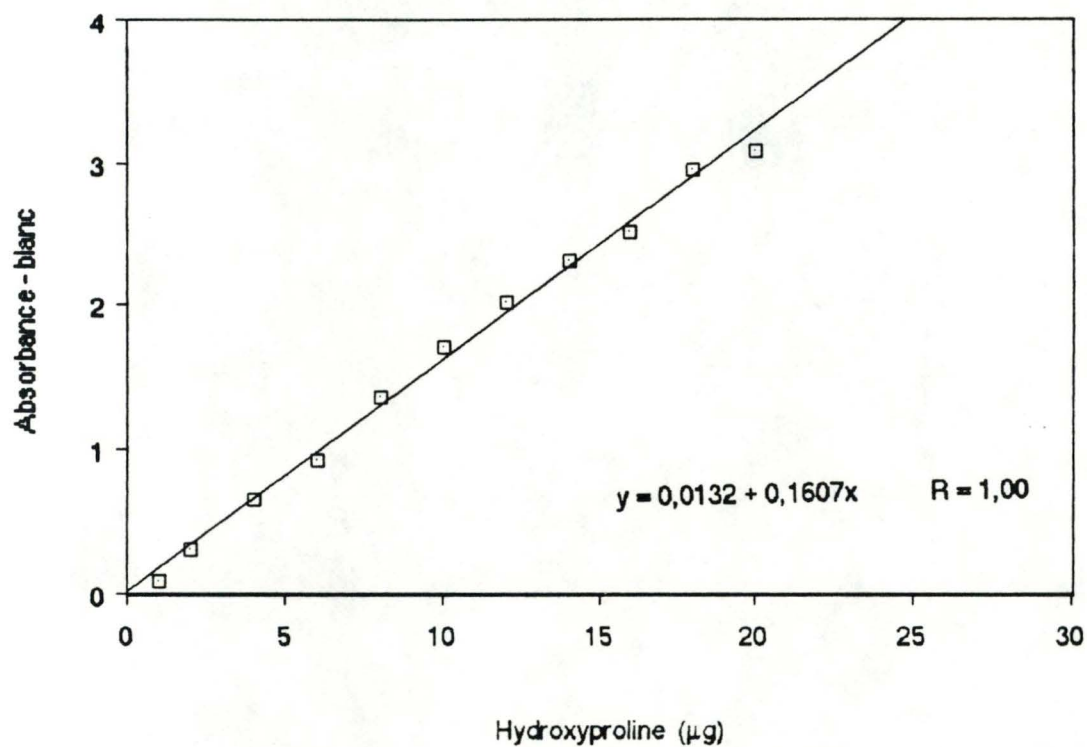


Figure 12 : Droite d'étalonnage de l'hydroxyproline établie par le dosage à la chloramine T. En abscisse est donnée la quantité en hydroxyproline (µg) dans le test (50 µl) et en ordonnée les valeurs de l'absorbance auxquelles on a retiré le blanc.

pas d'hydroxyproline -, l'absorbance lue ne dépasse pas celle obtenue avec le tampon phosphate de sodium 0,15 M pH 7,4 seul.

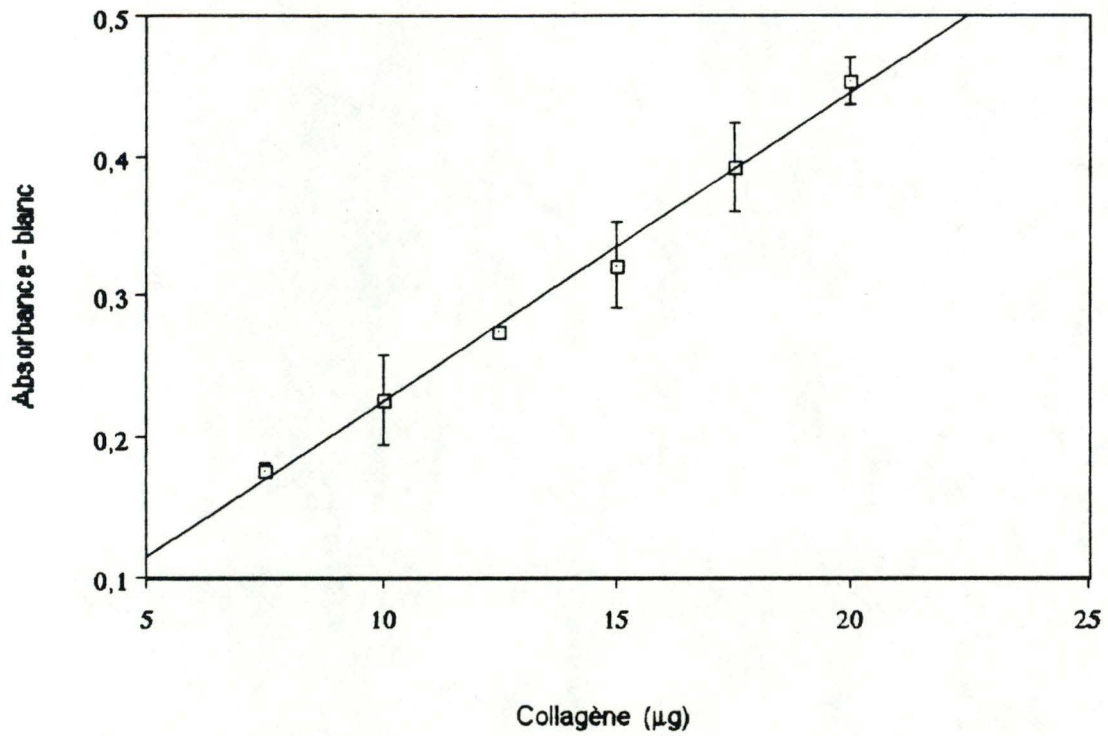
#### 3.2.2.1.3. DOSAGE D'UNE SOLUTION DE COLLAGENE NON RADIOACTIF ET DE CONCENTRATION CONNUE.

Après avoir testé le dosage de l'hydroxyproline, nous avons établi une droite d'étalonnage avec une solution de collagène de type I de peau de veau à différentes concentrations (figure 13.). Les quantités de collagène s'étalent entre 3 et 20  $\mu\text{g}$  par test (50 $\mu\text{l}$ ). La séquence en acides aminés du collagène de type I est connue pour de nombreuses espèces animales (Miller et Gay, 1982, Fujii et Khün, 1975) et on peut donc estimer la quantité d'hydroxyproline dans le collagène de type I. Celle-ci est d'environ 135  $\mu\text{g}$  d'hydroxyproline par mg de collagène. Nous nous situons donc dans la zone de linéarité conforme à l'étalonnage de l'hydroxyproline. Pratiquement, nous pouvons donc doser des solutions de collagène de 60 à plus de 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Nous obtenons une belle droite d'étalonnage dont nous allons nous servir pour estimer la concentration en collagène radioactif. Signalons par ailleurs que nos données sont conformes à celles de Huszar et coll. (1980).

#### 3.2.2.1.4. DOSAGE DE LA SOLUTION DE COLLAGENE RADIOACTIF.

Nous avons testé différentes dilutions de la solution clarifiée de collagène radioactif. Nous nous basons sur la droite d'étalonnage établie en 3.2.2.1.3. pour définir la concentration à partir de l'absorbance lue (figure 13.). La moyenne des concentrations trouvées est de  $964,5 \pm 82,74$   $\mu\text{g}$  par ml de solution.



$$y = 0,00418 + 0,0221x \quad R = 1,00$$

Figure 13 : Droite d'étalonnage d'une solution de collagène non radioactive et de concentration connue au moyen du dosage à la chloramine T. En abscisse, est donnée la quantité de collagène (µg) dans le test (50 µl) et en ordonnée les valeurs de l'absorbance auxquelles on a retiré le blanc.



Cependant, comme le dosage du collagène à la chloramine T est assez fastidieux, nous nous sommes demandé si nous ne pouvions simplement calculer la concentration en collagène en lisant l'absorbance directement au spectrophotomètre.

### 3.2.2.2. DOSAGE DU COLLAGENE AU SPECTROPHOTOMETRE.

#### 3.2.2.2.1. INTRODUCTION.

Nous avons donc voulu savoir si une droite d'étalonnage établie en lisant les valeurs d'absorbance au spectrophotomètre ne serait pas plus simple et tout aussi correcte.

Nous avons utilisé une solution de collagène de type I de peau de veau non radioactive et de concentration connue. Nous avons commencé par établir les spectres d'absorption du collagène dans les trois solutions que nous utilisons le plus souvent dans nos expériences :

- solution A = acide citrique 0,2 M.
- solution B = tampon TRIS-HCl 50 mM, NaCl 0,2 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM à pH 7,4.
- solution C = tampon phosphate de sodium 0,15 M à pH 7,4.

En effet, dans la littérature, nous avons trouvé une grande diversité dans les longueurs d'onde utilisées pour détecter le collagène. Dans le tampon phosphate de sodium 0,15 M pH 7,4, nous obtenons un pic à 207 nm (Figure 14.), dans le tampon Tris un pic à 206 nm (Figure 15.) et dans l'acide acétique un pic principal à 231 nm (Figure 16.).

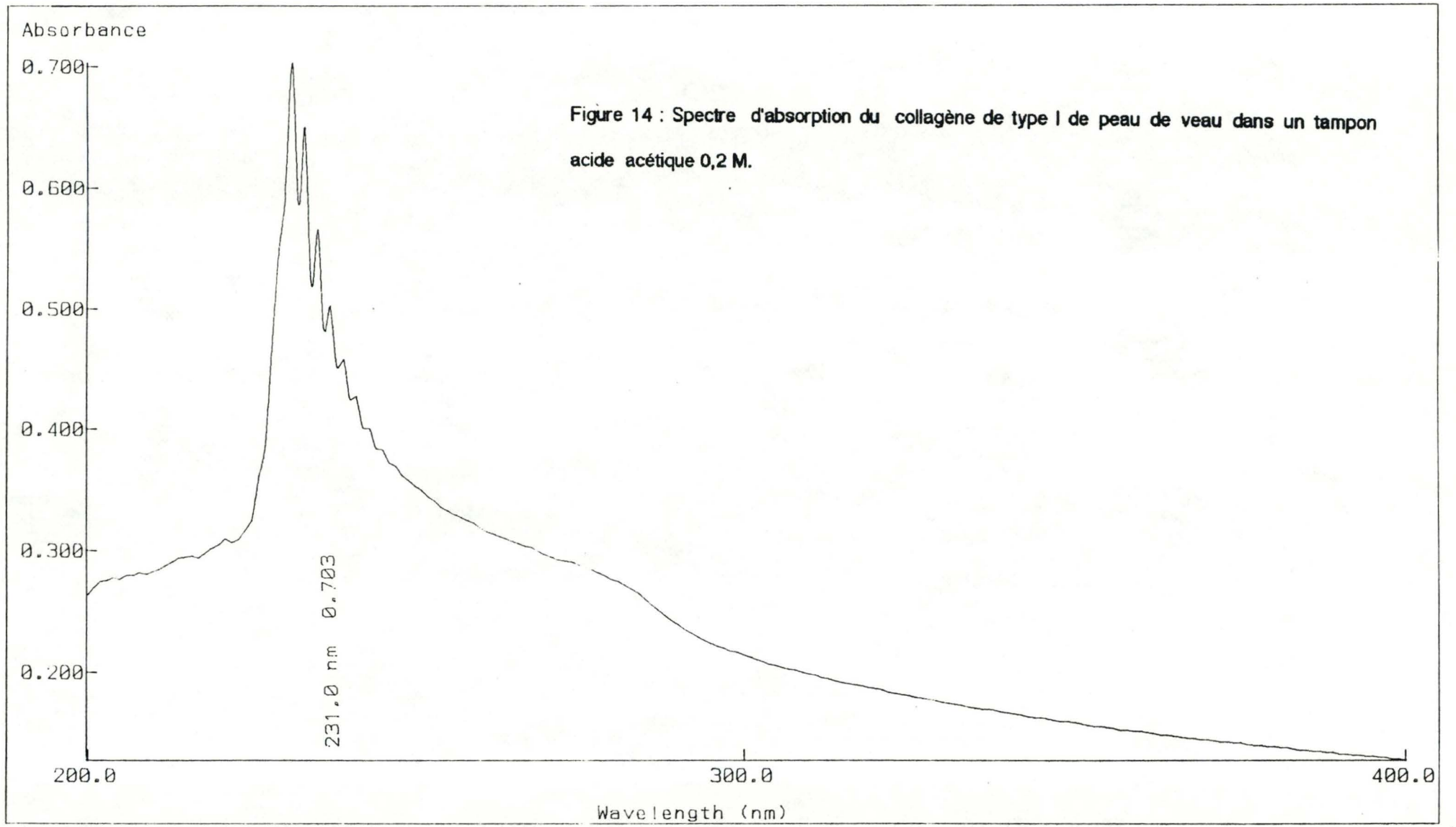


Figure 14 : Spectre d'absorption du collagène de type I de peau de veau dans un tampon acide acétique 0,2 M.

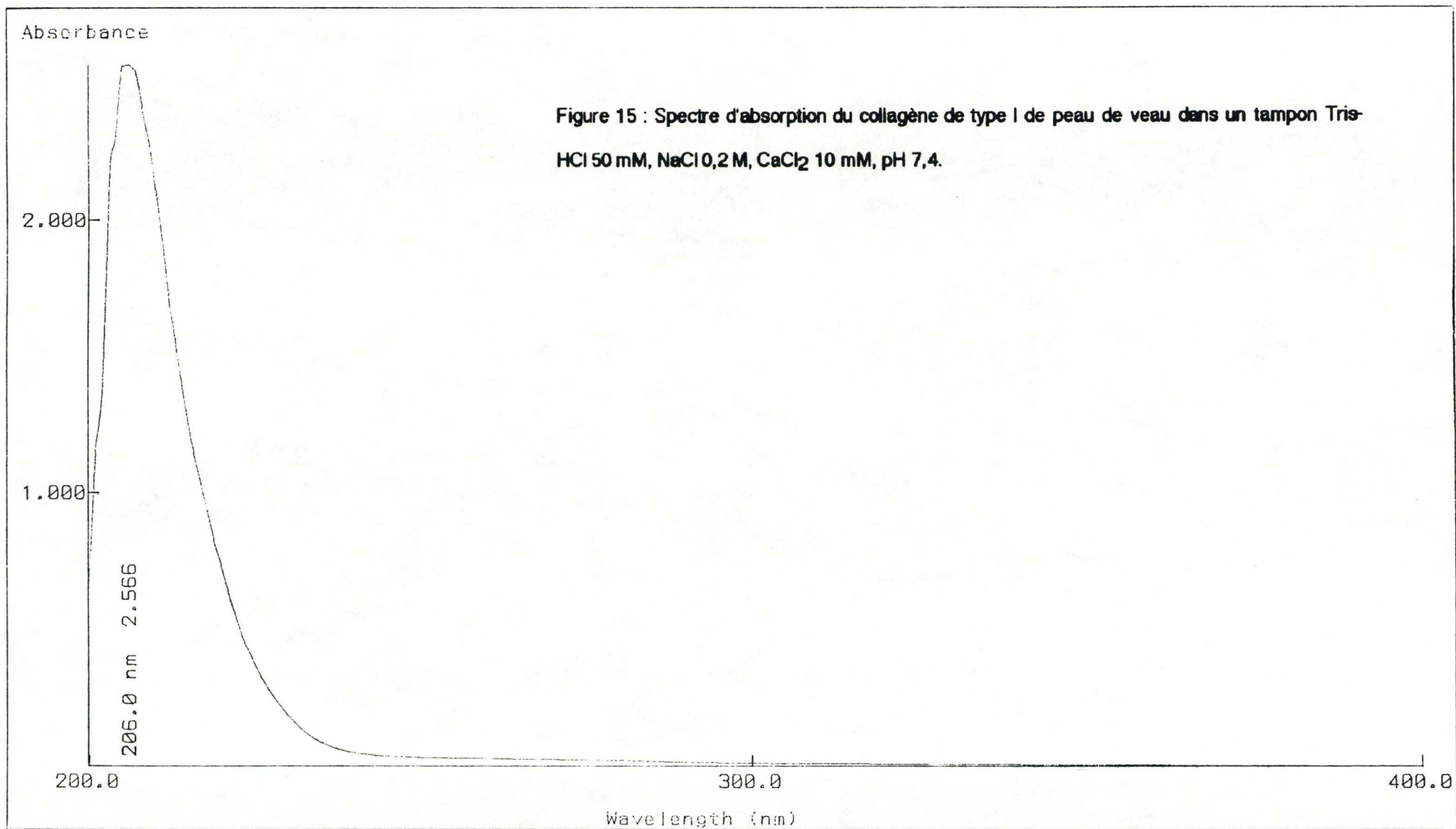


Figure 15 : Spectre d'absorption du collagène de type I de peau de veau dans un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,2 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4.



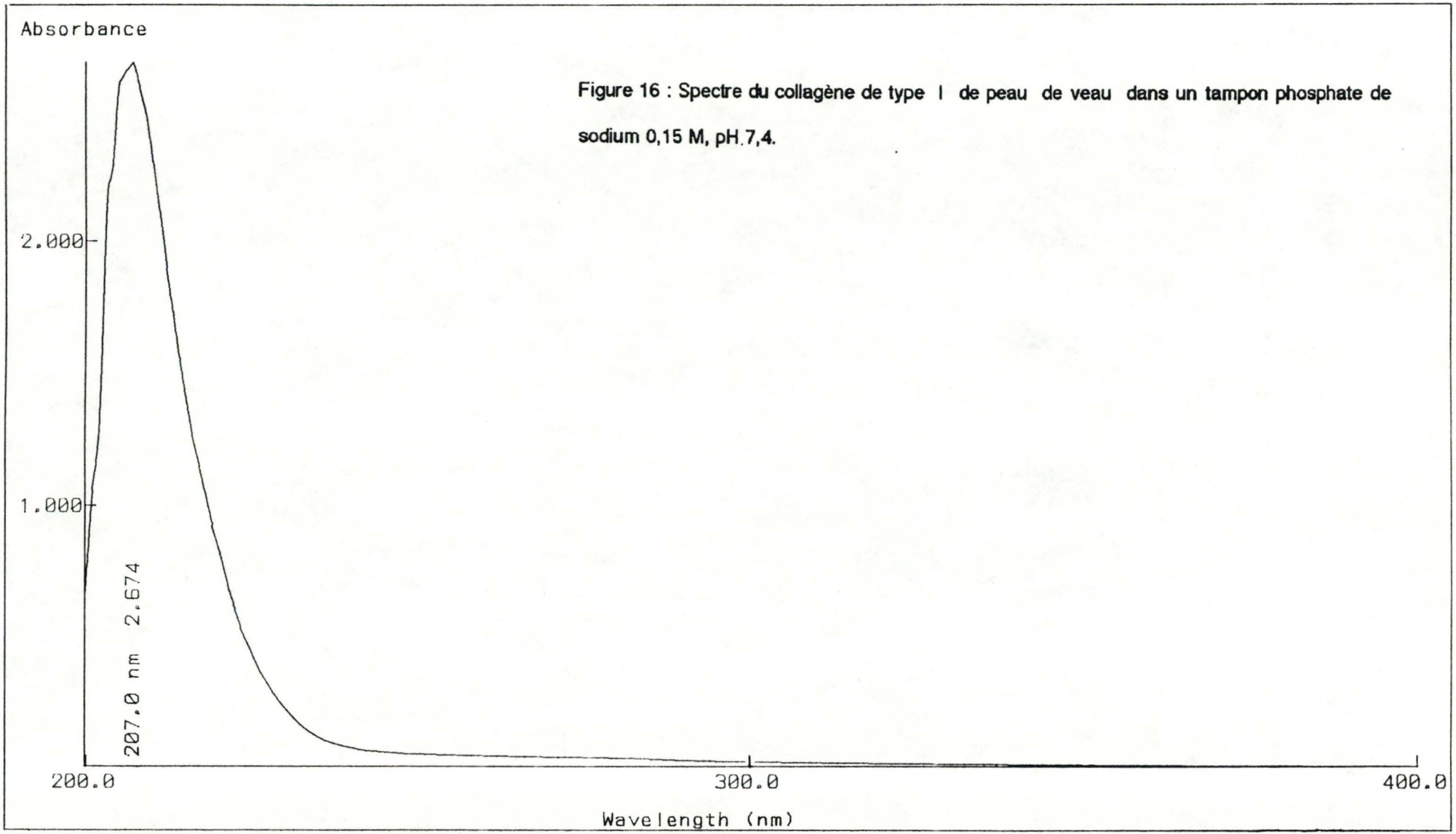


Figure 16 : Spectre du collagène de type I de peau de veau dans un tampon phosphate de sodium 0,15 M, pH 7,4.

#### 3.2.2.2. DROITE D'ETALONNAGE DU COLLAGENE DE TYPE I DE PEAU DE VEAU DISSOUS DANS UN TAMPON PHOSPHATE DE SODIUM.0.15M. pH 7.4.

Nous avons alors établi une droite d'étalonnage pour le collagène de type I de peau de veau dissous dans le tampon phosphate au spectrophotomètre à 207 nm (figure 17.).

Cette courbe d'étalonnage a été utilisée pour estimer la concentration en collagène pour le surnageant de collagène radioactif et nous obtenons une concentration de 509,7 µg par ml de solution.

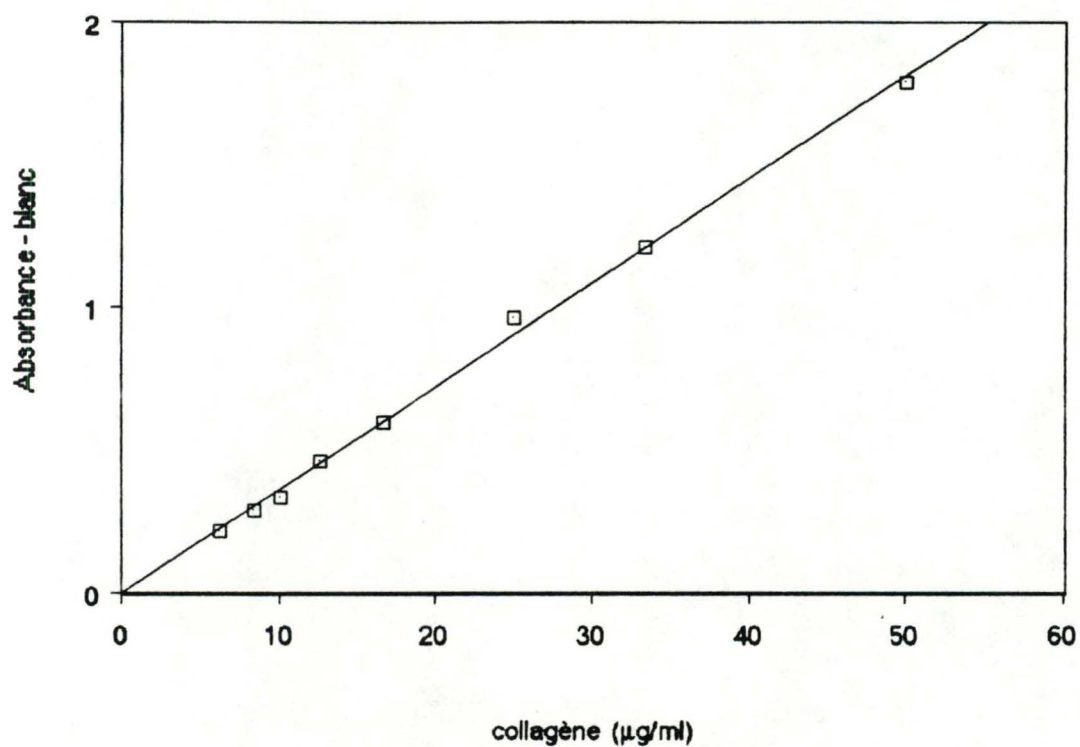
#### 3.2.2.3. CONCLUSIONS.

Nous constatons que la concentration obtenue par lecture au spectrophotomètre est inférieure à celle obtenue par le dosage à la chloramine T. Etant donné toutes les interférences et les nombreux facteurs qui peuvent intervenir dans une lecture de densité optique à une longueur d'onde aussi basse, nous pensons que le dosage à la chloramine T est nettement plus fiable. En conclusion, l'estimation grossière de la concentration en collagène pourra se faire rapidement au spectrophotomètre mais nous réserverons le dosage à la chloramine T pour les estimations précises.

#### 3.2.3. MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE LA COLLAGENASE.

##### 3.2.3.1. PREMIERE EXPERIENCE.

Lors de notre première expérience, nous avons utilisé les modes opératoires expliqués en 2.2.3. Nous avons suivi strictement la méthode décrite



$$y = 0,00144 + 0,0362x \quad R = 1,00$$

Figure 17 : Droite d'étalonnage établie au spectrophotomètre sur une solution de collagène de type I de peau de veau dans un tampon phosphate de sodium 0,15 M, pH 7,4. En abscisse est donnée la concentration en collagène (µg/ml) et en ordonnée l'absorbance à laquelle on a enlevé le blanc.



par Johnson-Wint (1980). Signalons cependant que chez cet auteur, le collagène est marqué au  $^{14}\text{C}$  et plus concentré.

Dans cette expérience préliminaire, nous avons travaillé sur le milieu d'une boîte de culture de fibroblastes WI-38 à la génération 34. Les cellules ont été activées pendant 48 heures avec du PMA 50 ng/ml qui est connu pour sa propriété de stimuler la production de collagénase. La collagénase libérée dans le milieu de culture a été activée par la trypsine comme indiqué en 2.2.3.3.. Le film de collagène radioactif a été coulé le jour précédent, incubé à 37°C dans une étuve, lavé dans de l'eau distillée et séché une nuit. Nous avons testé la collagénase activée, le tampon A, la trypsine 0,01 % et la collagénase bactérienne et après avoir recouvert le film de collagène avec 200  $\mu\text{l}$  de chacune de ces solutions, nous avons fermé la plaque au moyen d'un parafilm pour éviter toute évaporation et l'avons incubée à 37°C 1 h et 2 h.

Les résultats, consignés dans le tableau 5., sont exprimés en pourcentage de radioactivité relarguée, 100 % correspondant à la radioactivité du film de collagène. Nous supposons donc que tout le collagène se fixe dans les cupules au moment de la gélification. Nous constatons en comparaison avec les données de Johnson-Wint (1980) que :

- pour la collagénase bactérienne, les pourcentages d'hydrolyse sont peu élevés.
- les pourcentages relargués dans les cupules avec de la trypsine sont élevés, ce qui indiquerait qu'une partie du collagène radioactif est dénaturé.
- les pourcentages relargués dans les cupules avec la collagénase activée sont bas et ne commencent à augmenter faiblement qu'après cinq heures.

Nous avons essayé de comprendre ces divergences par rapport aux résultats de Johnson-Wint et nous avons procédé point par point en commençant par la collagénase bactérienne, puis la trypsine et enfin la collagénase activée.

Temps (heures)	Tampon A	Trypsine 0,01%	collagénase activée	Collagénase bactérienne
1	0,49 %	16,77 %	0,96 %	10,74 %
2	0,54 %	16,14 %	2,63 %	27,80 %
3	0,83 %	13,41 %	2,33 %	38,92 %
4	1,43 %	23,20 %	2,67 %	40,52 %
5	1,77 %	29,59 %	5,04 %	37,64 %
6	1,64 %	34,75 %	11,19 %	41,14 %

Tableau 5 : Expérience de dosage de la collagénase sur film de collagène radioactif selon la méthode de Johnson-Wint (1980). Pour la technique, se référer au point 2.2.3. du chapitre 2. Matériels et Méthodes..Les résultats sont exprimés en % de collagène radioactif dégradé, et les pourcentages sont calculés par rapport à la quantité de radioactivité introduite dans la cupule. La collagénase activée provenait de fibroblastes WI-38 en 34<sup>ème</sup> génération stimulés 48h00 par du PMA 50 ng/ml

### 3.2.3.2. PROBLEME DE LA COLLAGENASE BACTERIENNE.

#### 3.2.3.2.1. INTRODUCTION.

Le pourcentage de dégradation du film de collagène radioactif par la collagénase bactérienne étant faible, nous nous sommes demandé si nous ne perdions pas une partie de notre collagène radioactif au moment du rinçage des cupules dans l'eau distillée.

Dès lors, nous avons effectué des comptages de radioactivité sur l'eau de rinçage et nous avons essayé de quantifier le collagène radioactif sous forme de film après rinçage à l'eau. Pour ce faire, nous détachons le film de collagène dans du NaOH 0,5 N et réalisons ensuite un comptage de radioactivité.

Pour être sûrs que les différentes solutions employées dans ce test et mélangées au liquide scintillant (Aqua-Luma, Lumac/3M, Pays-Bas) ne modifiaient pas les propriétés de celui-ci, nous avons tout d'abord réalisé un test de "quenching".

#### 3.2.3.2.2. TEST DE "QUENCHING".

Le comptage à scintillation liquide se définit schématiquement comme la mesure de la lumière émise par les photons provenant d'atomes qui ont été excités directement ou indirectement par les rayonnements  $\beta$ .

Le "quenching" est dû à la présence de molécules qui diminuent l'efficacité de la scintillation en désactivant les molécules excitées du scintillant. Le transfert d'énergie des molécules radioactives vers les molécules de scintillant se fait moins bien et la quantité de radioactivité mesurée est sous-estimée (Bransome, 1970).

Nous avons testé le "quenching" sur les différentes molécules qui seront employées dans nos tests : l'eau, le tampon A, le NaOH 0,5 N et le NaOH 0,5 N en combinaison avec de l'HCl 0,5 N.



Agent supposé quenchant	Indice de quenching
eau (0,5 ml)	1,026
Tampon A (50 $\mu$ l)	1,000
NaOH 0,5N (100 $\mu$ l)	1,013
NaOH 0,5 N (100 $\mu$ l) + HCl 0,5 N (100 $\mu$ l)	1,006
NaOH 2 N (100 $\mu$ l)	1,420
NaOH 2 N (100 $\mu$ l) + HCl 0,5 N (100 $\mu$ l)	1,261

Tableau 6 : Tests de "quenching" sur les différentes solutions employées dans le dosage de la collagénase.

Le principe de ce test est le suivant : dans une fiole de comptage, nous plaçons 10  $\mu$ l de la solution de collagène radioactif et 5 ml de liquide scintillant; nous l'appelons la fiole de contrôle . Dans les fioles tests, une solution supposée "quençante" est ajoutée au liquide scintillant. L'indice de "quenching" (I) est calculé comme suit :

$$I = \frac{\text{cpm dans la fiole contrôle}}{\text{cpm dans la fiole test}}$$

Les résultats (tableau 6 ) montrent que le liquide scintillant que nous employons est très stable parce qu'il n'y a pratiquement aucun "quenching" même en présence de NaOH 0,5 N seul. Remarquons cependant une diminution importante de l'efficiencia de comptage en présence de NaOH 2N, même après neutralisation.

#### 3.2.3.2.3. COMPTAGE DE LA RADIOACTIVITE DANS L'EAU DE RINÇAGE.

Pour vérifier si nous ne perdions pas une partie de notre collagène radioactif dans l'eau de rinçage, nous avons compté la radioactivité de celle-ci. Le pourcentage de collagène radioactif perdu dans cette eau est déterminé comme suit :

$$\frac{\text{cpm dans la totalité de l'eau de rinçage}}{\text{cpm introduits / cupule X nombre de cupules}} \times 100$$

Les résultats (tableau 7) indiquent effectivement que l'on perd généralement entre 26 et 41 % de collagène radioactif dans cette étape, ce qui est élevé . Signalons que Johnson-Wint (1980) n'évoque pas ce problème .

cpm totaux introduits	cpm dans l'eau de rinçage	% perdus	cpm récupérés dans NaOH 0,5 N	% récupérés	rendement en %
3 300 055,0	885 000,0	26,82	1 312 908,6	39,78	66,60
3 280 021,9	1 038 825,0	31,67	1 180 238,6	35,98	67,65
3 280 021,9	1 345 855,0	41,03	1 157 545,0	35,29	76,32
443 246,2	148 796,0	33,57	189 150,5	42,67	76,24
443 246,2	161 569,0	36,45	222 883,8	50,28	86,73

Tableau 7 : Pourcentages de collagène radioactif perdu dans l'eau de rinçage et de collagène radioactif récupéré au moyen du NaOH 0,5 N dans la cupule, ainsi que le calcul du rendement total.



#### 3.2.3.2.4. RECUPERATION DU FILM DE COLLAGENE RADIOACTIF AVEC DU NaOH 0,5 N.

Nous avons à ce moment essayé d'estimer quel pourcentage de collagène radioactif nous retrouvons sur le film afin de pouvoir calculer un rendement.

Pour ce faire, nous avons préparé quelques cupules dans lesquelles nous avons placé 200 µl de NaOH 0,5 N au lieu de 200 µl d'échantillon, . Ensuite, nous avons laissé agir le NaOH deux heures. Après avoir bien mélangé le contenu de la cupule, nous prélevons 100 µl que nous plaçons dans une fiole et ajoutons 100 µl d'HCl 0,5 N pour neutraliser, puis 5 ml de liquide scintillant. Nous effectuons alors un comptage.

Le pourcentage de collagène radioactif récupéré est donné comme suit :

$$\frac{\text{cpm totaux / cupule après action du NaOH 0,5 N}}{\text{cpm totaux introduits / cupule}} \times 100$$

Les résultats sont donnés au tableau 7.

Le rendement peut alors être calculé en additionnant le pourcentage perdu dans l'eau et le pourcentage récupéré dans le film.

Nous constatons que les rendements sont de l'ordre de 66 % à 87 % (Tableau 7). Ces faibles rendements pourraient être dûs à une sous-estimation de la quantité de collagène solubilisé par le NaOH dans la cupule.

#### 3.2.3.2.5. NOUVEAU TEST SUR LA COLLAGENASE BACTERIENNE.

Nous avons fait de nouveaux tests sur la collagénase bactérienne en tenant compte pour les calculs d'activité de la perte de collagène lors des rinçages

Temps (heures)	% collagène radioactif dégradé par la collagénase bactérienne	
	1	2
0	0,43	0,46
2	105,21	117,11
4	121,74	122,20

Tableau 8 : Estimation du pourcentage de collagène radioactif dégradé par la collagénase bactérienne. Ces pourcentages sont calculés par rapport à la radioactivité récupérée sur la cupule au moyen du NaOH 0,5 N.

Nous donnons les résultats obtenus pour deux expériences différentes.

dans l'eau. Un exemple est donné dans le tableau 8. Nous constatons que nous approchons et même parfois nous dépassons 100 % de dégradation. Ces valeurs supérieures à 100 % sont probablement dues, comme nous l'avons vu ci-dessus, à une sous-estimation du collagène resté dans la cupule.

### 3.2.3.2.6. CONCENTRATION DU COLLAGÈNE RADIOACTIF.

Nos résultats montrent que nous perdons une grande quantité de collagène radioactif dans l'eau de rinçage. Comme la gélification du collagène est un processus qui dépend de la concentration, nous nous sommes demandé si, à plus forte concentration, il n'était pas possible de réduire les pertes dans l'eau de rinçage.

Nous avons donc concentré plus ou moins deux fois notre solution de collagène sur système Amicon.

La concentration obtenue est de  $1,876 \pm 0,143$  mg/ml. Cette nouvelle solution de collagène radioactif correspond à environ  $5,815 \cdot 10^6$  cpm/ml c'est-à-dire  $21,65 \cdot 10^4$  Bq ou  $5,84 \mu\text{Ci}$  ou  $12,922 \cdot 10^6$  dpm/ml

Nous essayons d'établir, comme pour la première solution de collagène radioactif, le pourcentage perdu dans l'eau de rinçage et le pourcentage récupéré dans la cupule, ainsi que le rendement (tableau 9).

Nous constatons que nous perdons beaucoup moins de collagène radioactif dans l'eau (de 5 à 13 %). La concentration plus élevée en collagène améliore donc la fixation du film sur la cupule. Nous observons également de meilleurs rendements : entre 90 et 98 %.



cpm introduits au départ	pertes dans l'eau de rinçage	% de pertes	récupération avec NaOH 0,5 N (en %)	% de récup.	rendement en %
6 335 498,7	341 487,0	5,39	5 769 616,5	91,07	96,46
1 898 968,0	251 625,0	13,25	1 522 499,6	80,17	93,40
6 589 902,0	349 695,0	5,31	6 114 577,5	92,79	98,10

Tableau 9 : Pourcentage de collagène radioactif perdu dans l'eau de rinçage, pourcentage de collagène radioactif récupéré sur la cupule au moyen du NaOH 0,5 N et rendement pour des plaques coulées avec la solution de collagène radioactif concentré à 1,876 mg/ml.

#### 3.2.3.4. PROBLEME DE LA TRYPSINE.

Lors de notre première expérience, nous avons constaté que le pourcentage de collagène radioactif dégradé par la trypsine était trop élevé. D'après Johnson-Wint (1980), ce pourcentage ne doit pas dépasser de 5 à 10 % les valeurs obtenues pour le tampon A. Sinon, la quantité de collagène radioactif dénaturé devient trop importante et risque d'interférer avec le dosage de la collagénase, qui nécessite un substrat natif.

Nous nous sommes alors demandé si le fait de gélifier et d'incuber à 37°C n'était pas la cause de nos ennuis. Il semble en effet que 37°C soit une température critique du point de vue de la dénaturation du collagène *in vitro*. Nous avons dès lors essayé de trouver un compromis entre une température suffisamment basse pour éviter la dénaturation et suffisamment élevée pour permettre à l'enzyme d'agir. C'est pourquoi nous avons choisi la température de 35°C. A cette température, nous avons constaté que si nous travaillons entre 0 et 2 heures, nous avons des valeurs trypsine raisonnablement acceptables et meilleures que celles obtenues à 37°C (Figure 18). Ces résultats sont obtenus à la fois avec la solution de collagène radioactif à 964,5 µg/ml et avec celle à 1,876 mg/ml. Après ce délai de 2 h, les valeurs trypsine deviennent beaucoup trop élevées pour être utilisables (Figure 19). Ces résultats ont été obtenus de manière reproductible comme illustré à la Figure 20 pour deux expériences réalisées à 35°C.

Nous avons donc décidé de travailler à 35°C pour la gélification et pour l'incubation et de ne plus dépasser des temps d'incubation de deux heures.

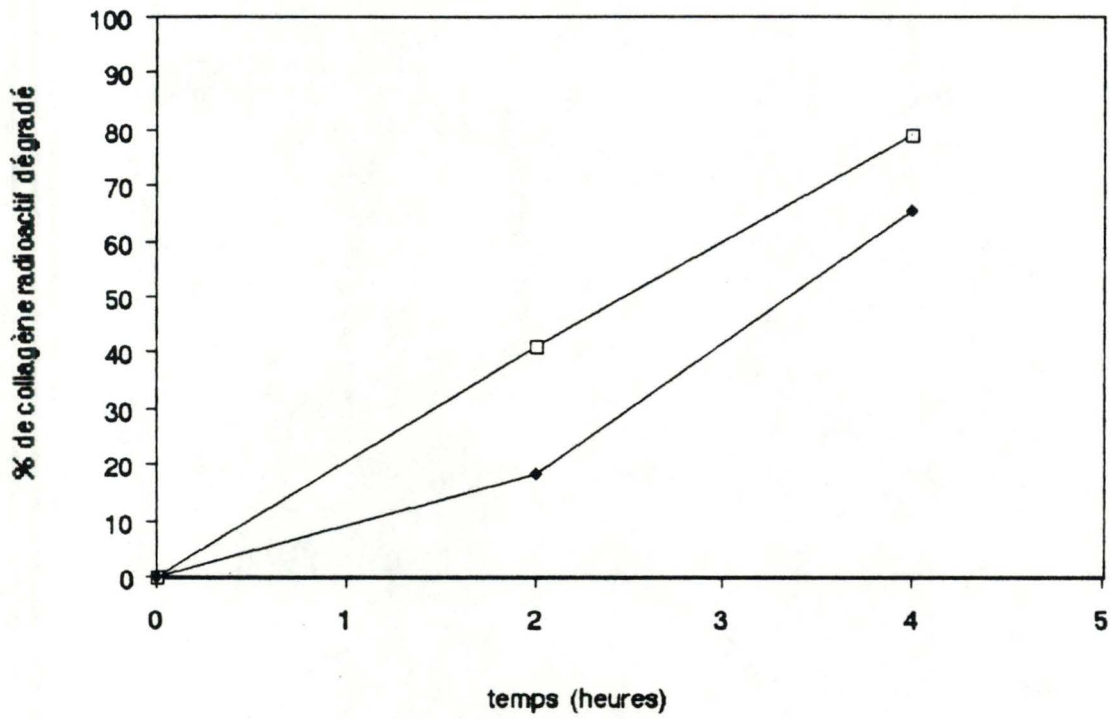


Figure 18 : comparaison entre les pourcentages de collagène radioactif dégradé par la trypsine pour une plaque gélifiée et incubée à 37°C (□) et pour une plaque gélifiée et incubée à 35°C (◆). Le film de collagène radioactif a été obtenu par gélification du collagène radioactif à 964.5  $\mu\text{g/ml}$ . Ces pourcentages sont calculés par rapport à la radioactivité récupérée sur la cupule au moyen du NaOH 0,5 N.



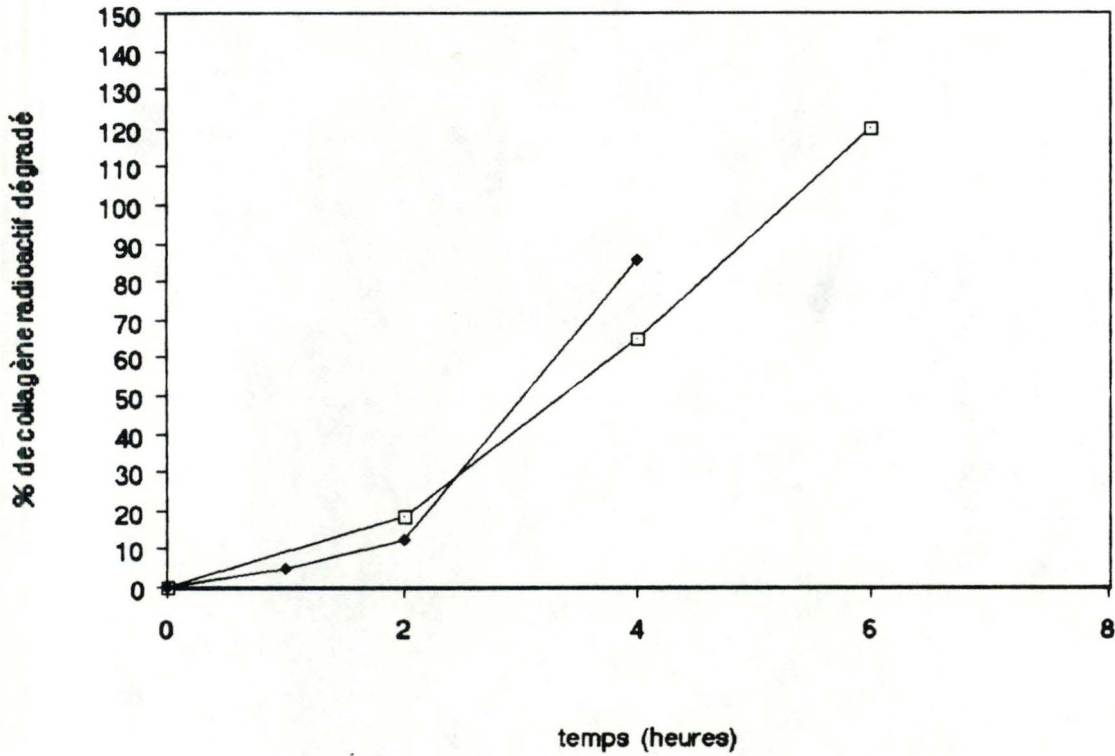


Figure 19 : Comparaison entre les pourcentages de collagène radioactif dégradé par la trypsine pour deux plaques gélifiées et incubées à 35°C en fonction du temps d'incubation. Une des deux plaques a été coulée avec la solution non concentrée (964,5 µg/ml) (□) et l'autre avec la solution concentrée (1,876 mg/ml) (◆) de collagène radioactif. Ces pourcentages sont calculés par rapport à la radioactivité récupérée sur la cupule au moyen du NaOH 0,5 N.

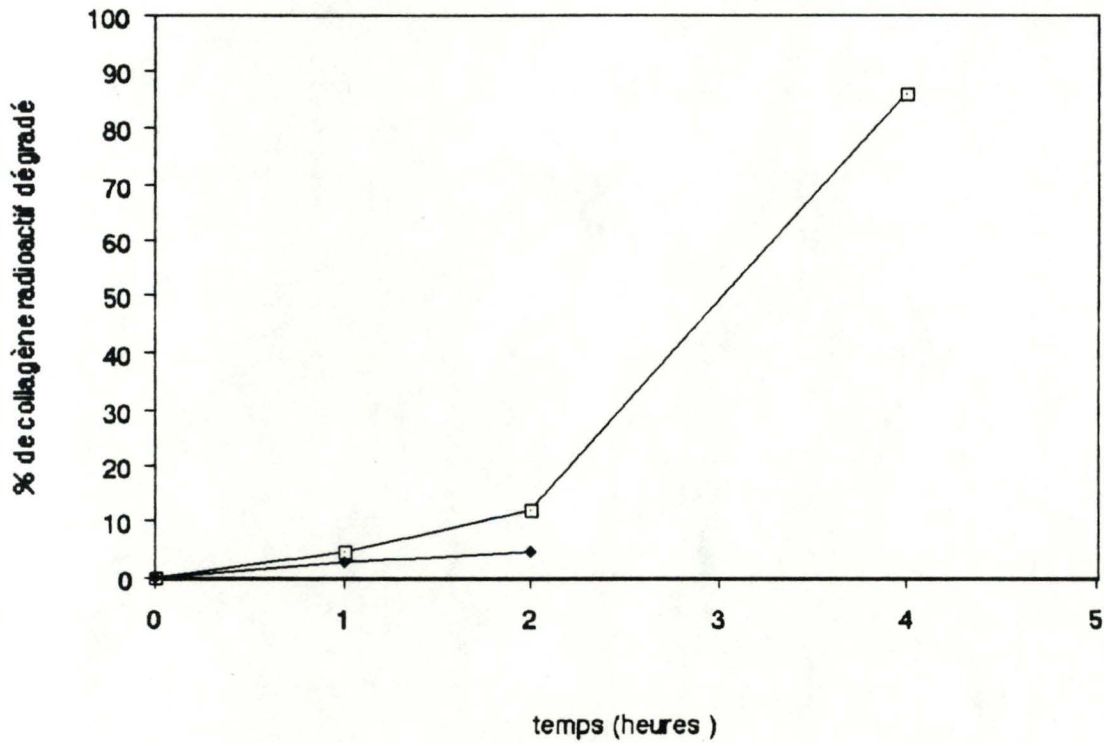


Figure 20 : Pourcentage de collagène radioactif dégradé par la trypsine pour deux plaques gélifiées et incubées à 35°C en fonction du temps. Les deux plaques ont été coulées avec la solution de collagène radioactif concentrée (1,876 mg/ml). Nous exprimons les résultats obtenus pour deux expériences différentes.

Ces pourcentages sont calculés par rapport à la radioactivité récupérée sur la cupule au moyen du NaOH 0,5 N.

### 3.2.3.5. PROBLEME DE LA COLLAGENASE ACTIVEE.

#### 3.2.3.5.1. INTRODUCTION.

Les pourcentages d'hydrolyse du collagène obtenus dans la première expérience d'activation de la collagénase des cellules étaient faibles, nous nous sommes demandé si nous avions une quantité suffisante de collagénase. Johnson-Wint (1980) travaillant sur des milieux concentrés, nous avons décidé de faire de même pour augmenter l'activité de la collagénase.

#### 3.2.3.5.2. CONCENTRATION DES MILIEUX CONTENANT LA COLLAGENASE.

Nous nous sommes basés sur la méthode préconisée par Harris et coll. (1982). Nous mélangeons les milieux cellulaires récupérés sur des boîtes de fibroblastes WI-38 de même génération activés au PMA à 50 ng/ml comme décrit en 2.1.5.1. Ensuite, les protéines sont précipitées à 4°C avec du sulfate d'ammonium à une concentration finale de 60 %. Nous centrifugeons 30 min. à 11 000 RPM (Beckman, rotor JA-20) et le culot est resuspendu dans du tampon Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM pH 7,5 et dialysé contre ce tampon avant d'être concentré sur Amicon Diaflo PM-10. Dans ces conditions, un précipité se forme. Nous nous sommes demandé si cette précipitation au sulfate d'ammonium ne dénaturait pas une partie de l'enzyme; en effet, nous n'avons obtenu aucune activité de collagénase sur ces préparations. C'est pourquoi nous avons décidé pour les expériences ultérieures, de concentrer sur le système Amicon, les milieux de culture après dialyse, sans passer par la précipitation au sulfate d'ammonium, cela pour éviter au maximum la perte de l'enzyme.

Après avoir activé des cellules au PMA, nous avons réalisé un test de dosage sur la collagénase concentrée et activée (cfr 2.2.3.). Les résultats nous



### 3.2.4. STIMULATION DES CELLULES SYNOVIALES PAR L'IL-1 $\beta$ .

Nous avons donc stimulé les cellules synoviales avec de l'IL-1  $\beta$ . Nous avons dans une première expérience employé de l'IL-1  $\beta$  à raison de 1 U/ml dans le milieu de culture afin de tester la production de collagénase et de PGs. Cette concentration a été choisie parce que, d'après la littérature, elle semblait effective pour stimuler les synoviocytes (Heino, 1986) et les fibroblastes de peau (Raz et coll., 1988). L'utilisation de l'appareil GC-MS nous permet de détecter la production de plusieurs PGs. Nous avons stimulé certaines cellules pendant un temps court (12 h) et d'autres pendant un temps plus long (48 h).

Nous n'avons vu aucun effet de l'IL-1 $\beta$  ni sur la production de la collagénase ni sur celle des PGs. Nous nous sommes alors demandé si la concentration en IL-1  $\beta$  employée était suffisante pour stimuler les cellules. L'IL-1  $\beta$  stimule non seulement la production de collagénase et de PGE<sub>2</sub> mais elle active aussi la libération de l'acide arachidonique par les phospholipases, et en particulier la phospholipase A<sub>2</sub>. De manière générale, pour suivre la libération de l'acide arachidonique, on procède comme suit : les cellules sont préincubées avec de l'acide arachidonique radioactif pendant 18 h. Elles sont ensuite stimulées ou non (pour le contrôle) avec de l'IL-1  $\beta$  et on détermine la radioactivité libérée dans le milieu de culture après des temps croissants (Godfrey et coll., 1987). C'est donc un test facile à mettre en oeuvre et qui requiert beaucoup moins de cellules que les dosages de la collagénase et des PGs. C'est pour ces raisons que nous l'avons choisi pour tester plusieurs concentrations en IL-1 $\beta$ .

donnent toujours des valeurs faibles même en concentrant la collagénase (figure 21).

Etant donné les résultats peu encourageants obtenus avec le PMA, même après concentration de la collagénase, nous avons préféré faire appel à un autre stimulateur. Nous avons choisi l'IL-1 $\beta$  qui est un activateur physiologique présent dans le liquide synovial inflammatoire (Fontana, 1982). D'autre part, dans la littérature, on trouve que non seulement la production de collagénase mais aussi la production de PGE<sub>2</sub> augmentent lors de la stimulation des cellules synoviales par l'IL-1  $\beta$ . Nous décidons donc de stimuler nos cellules avec de l'IL-1  $\beta$  et d'étudier son effet sur la production de la collagénase et des prostaglandines.

#### 3.2.4.1. EFFET DE L'IL-1 $\beta$ SUR LA LIBÉRATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE.

Nous avons testé les effets de l'IL-1 $\beta$  à 1 U/ml et à 10 U/ml ajouté dans le milieu de culture sur des cellules synoviales de la lignée 8-F-35 à la génération 9 (Figure.22) et 7-F-56 à la génération 19 (Figure.23) ainsi que sur des fibroblastes de poumon foetal WI-38 à la génération 37 (Figure 24). Elles avaient au préalable incorporé l'AA radioactif comme expliqué au point 2.2.4.

Pour les synoviocytes de manière générale, nous observons que la libération de l'AA radioactif incorporé dans les cellules, augmente avec le temps même pour le contrôle (Figures 22 et 23)

Dans la lignée 8-F-35, pour le contrôle et pour la stimulation à l'IL-1 $\beta$  à 1U/ml, la libération de l'AA radioactif n'excède pas 25 % du total même après 48 h ; par contre en présence de 10 U d'IL-1 $\beta$  par ml, nous observons jusqu'à 80 % de libération de l'AA radioactif. Pour la lignée 7-F-56, nous observons environ 9 % de libération en 24h pour le contrôle et l'IL-1  $\beta$  à 1U/ml alors que pour l'IL-1  $\beta$  à 10 U/ml, nous avons 35 % de libération.

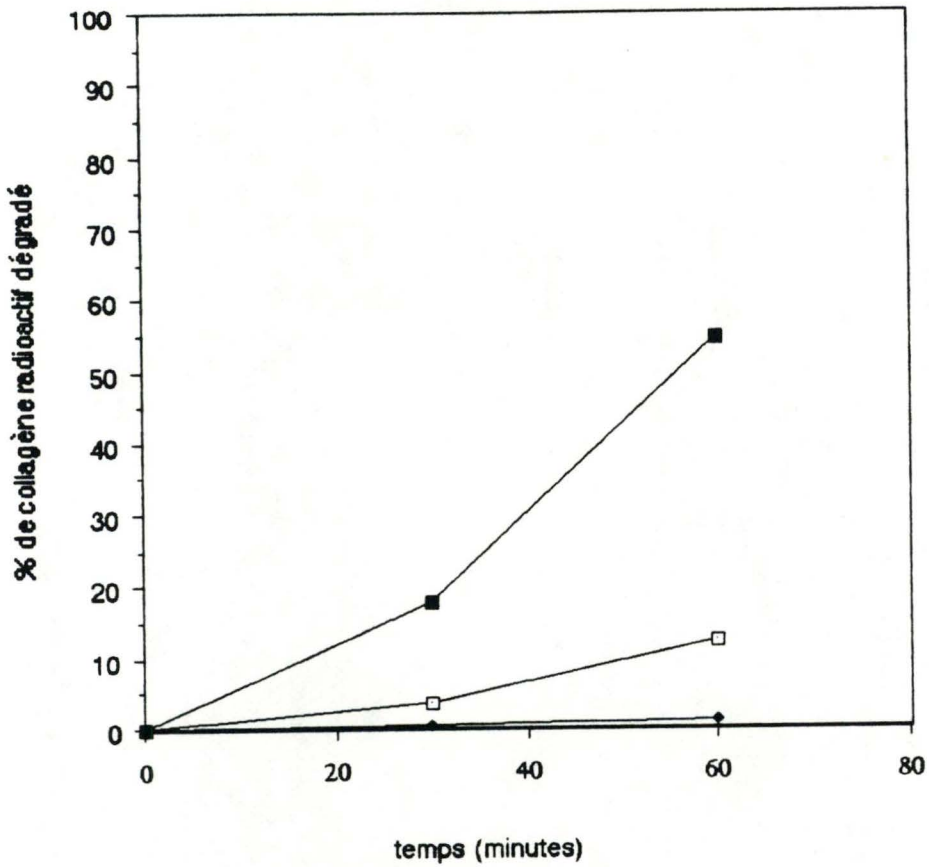


Figure 21 : Expérience de dosage de la collagénase sur film de collagène radioactif selon la méthode de Johnson-Wint (1980) (voir Matériels et Méthodes, 2.2.3.). Les résultats sont exprimés en % de collagène radioactif dégradé, et les pourcentages sont calculés par rapport à la radioactivité récupérée sur la cupule au moyen du NaOH 0,5 N. La collagénase activée provenait de fibroblastes WI-38 en 38<sup>ème</sup> génération stimulés 48h00 par du PMA 50 ng/ml. La collagénase a été concentrée 5,4 fois sur Amicon (cfr 3.2.3.5.1)

- contrôle trypsine 0,01 %
- ◆ collagénase de WI-38 stimulés au PMA. Elle est concentrée et activée.
- contrôle collagénase bactérienne (4mg/ml de tampon A)



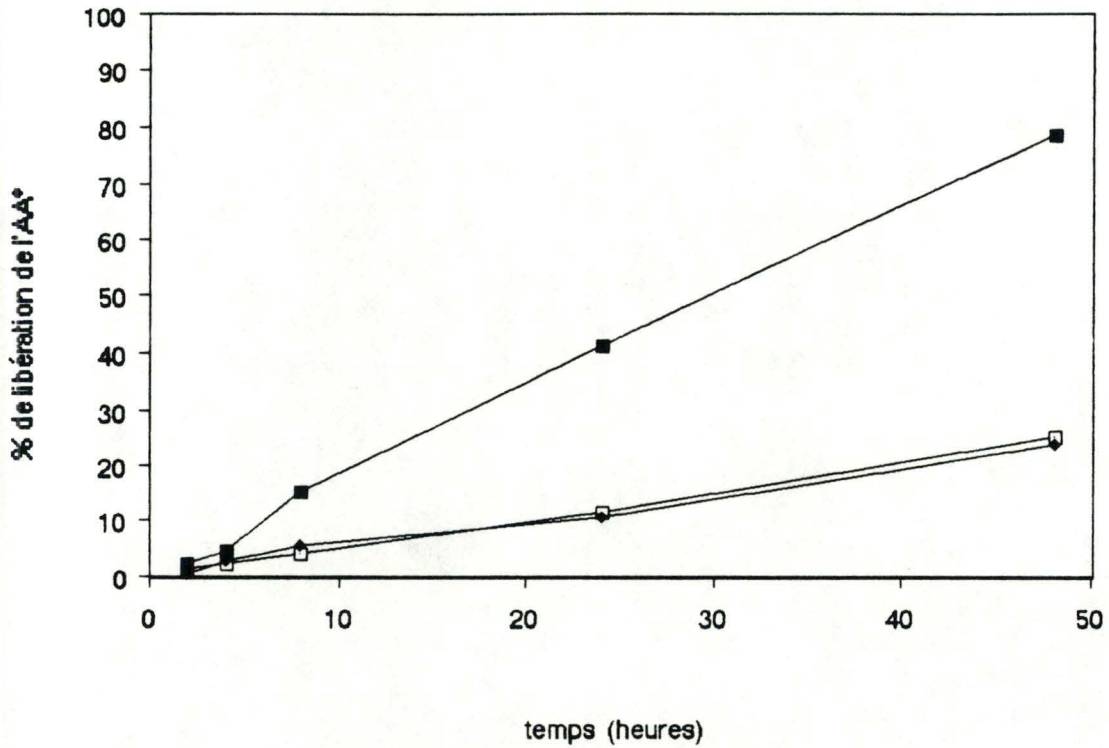


Figure 22 : Comparaison de la stimulation des cellules synoviales (8-F-35) avec de l'IL-1 à 1 U/ml (◆) et avec de l'IL-1 à 10 U/ml (■). Le contrôle (□) contient des cellules non stimulées. La stimulation des cellules est mesurée par la libération de l'acide arachidonique  $^3\text{H}$  préalablement incorporé par les cellules.

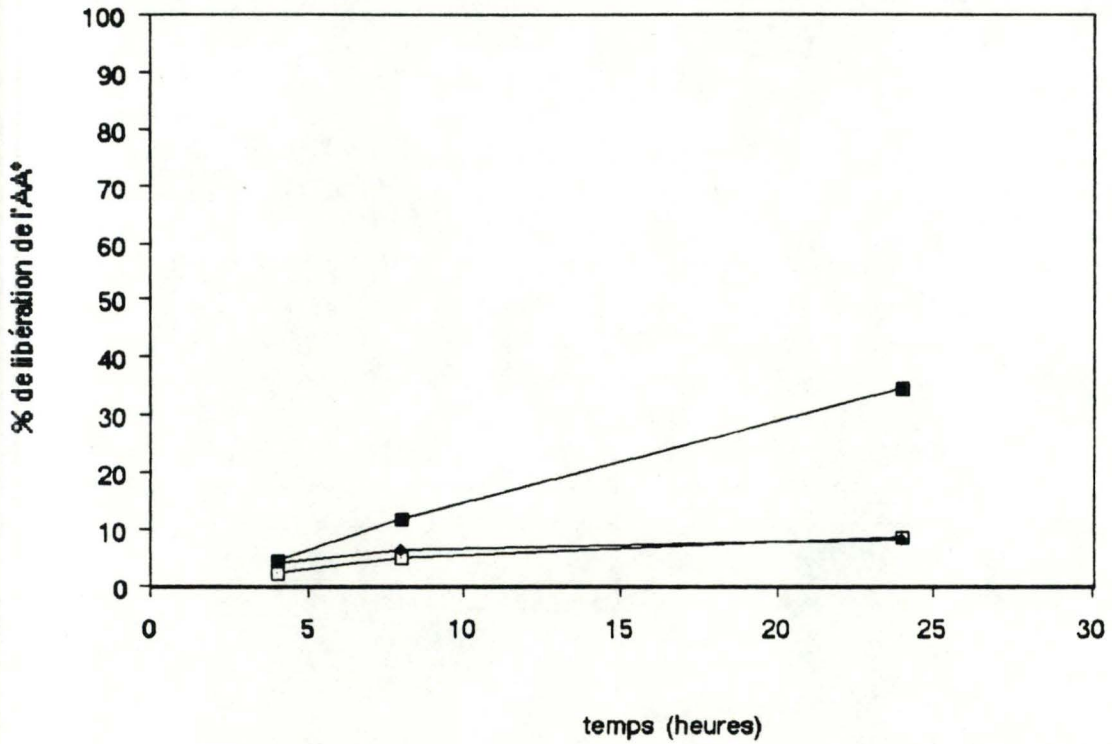


Figure 23 : Comparaison de la stimulation des cellules synoviales (7-F-56) avec de l'IL-1 à 1 U/ml (◆) et avec de l'IL-1 à 10 U/ml (■). Le contrôle (□) contient des cellules non stimulées. La stimulation des cellules est mesurée par la libération de l'acide arachidonique  $^3\text{H}$  préalablement incorporé par les cellules.

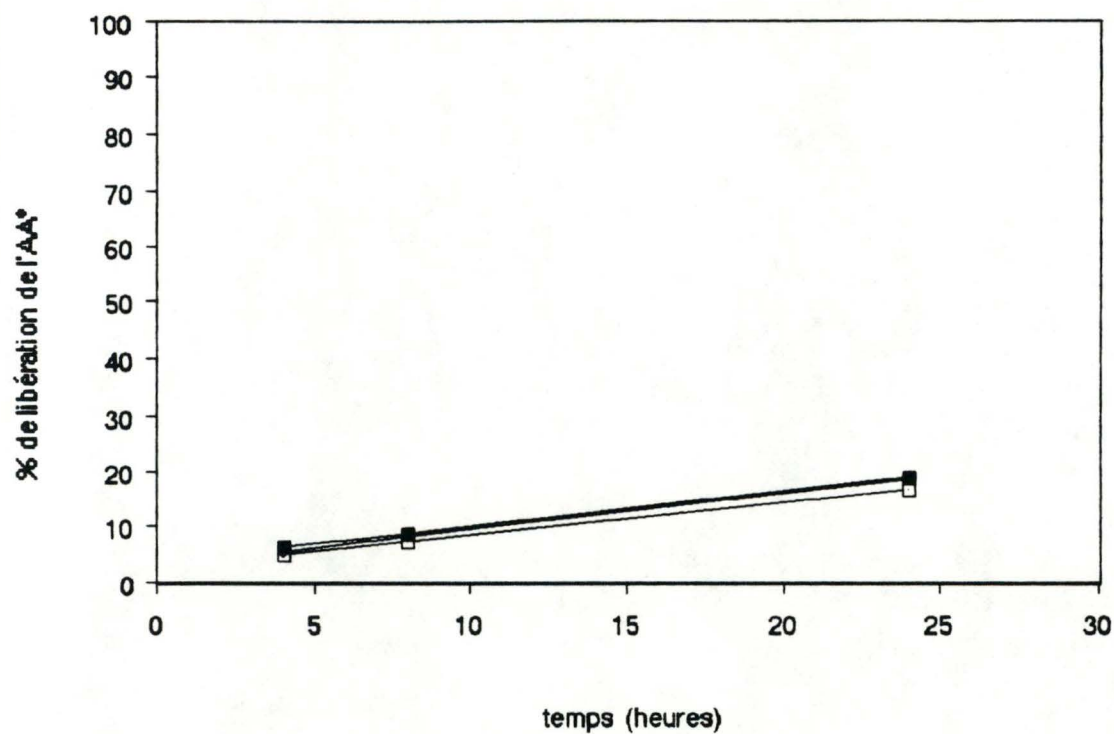


Figure 24 : Comparaison de la stimulation des fibroblastes WI-38 avec de l'IL-1 à 1 U/ml (◆) et avec de l'IL-1 à 10 U/ml (■). Le contrôle (□) contient des cellules non stimulées. La stimulation des cellules est mesurée par la libération de l'acide arachidonique  $^3\text{H}$  préalablement incorporé par les cellules.



Les résultats que nous obtenons corroborent ceux de Godfrey et coll (1987) et semblent donc montrer que l'IL-1 $\beta$  stimule bien une activité phospholipasique qui d'après ces auteurs, serait principalement celle de la phospholipase A<sub>2</sub>. Cependant, contrairement à ce que propose Heino (1986) et Godfrey et coll. (1987), il faut employer des concentrations plus élevées que 1 U/ml d'IL-1 pour constater une stimulation de nos cellules.

Nous observons donc une stimulation importante et assez semblable pour les lignées 7-F-56 et 8-F-35 : en effet, après 24h de stimulation avec l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml, nous trouvons des pourcentages de libération de l'AA radioactif incorporé par les cellules respectivement de 34,8 et 41,5 % alors que pour les boîtes contrôles et traitées avec de l'IL-1 $\beta$  à 1U/ml, on obtient environ 8,5 et 10 %.

Ces résultats sont très intéressants étant donné la différence de génération entre les deux lignées. Il semble donc que les cellules synoviales ont gardé toute leur "réceptivité" à l'IL-1 $\beta$  au cours des différentes générations in vitro.

Ces observations expliquent les résultats négatifs obtenus sur la production de collagénase et de PGE<sub>2</sub> dans l'expérience précédente où n'avions utilisé qu'1 U/ml d'IL-1 $\beta$ . Nous avons également pu observer au cours de ces expériences de stimulation qu'une partie des cellules retrouvait une morphologie dendritique (Photo 8). Or, depuis plusieurs générations, nous n'observons pratiquement plus que des cellules de type fibroblastique pour les deux lignées. Cette modification confirme bien que les cellules synoviales sont toujours sensibles à l'IL-1 $\beta$ .

Quant aux fibroblastes WI-38 (Figure 24), nous ne voyons aucun effet de l'IL-1 $\beta$  ni sur la morphologie, ni sur la libération de l'AA radioactif préalablement incorporé par les cellules même avec 10 U/ml, puisqu'après 24 heures dans les cupules contrôles et celles en présence d'IL à 1U/ml et à 10U/ml, on trouve respectivement 16,7, 18,7 et 19,3 % de libération d'AA radioactif. Aux temps 4 et 8h, les pourcentages sont également semblables. Ce résultat est d'ailleurs très intéressant car il souligne la différence entre cellules synoviales et fibroblastes WI-38; mais il semble étonnant au vu des résultats de Raz et coll. (1988) qui montrent

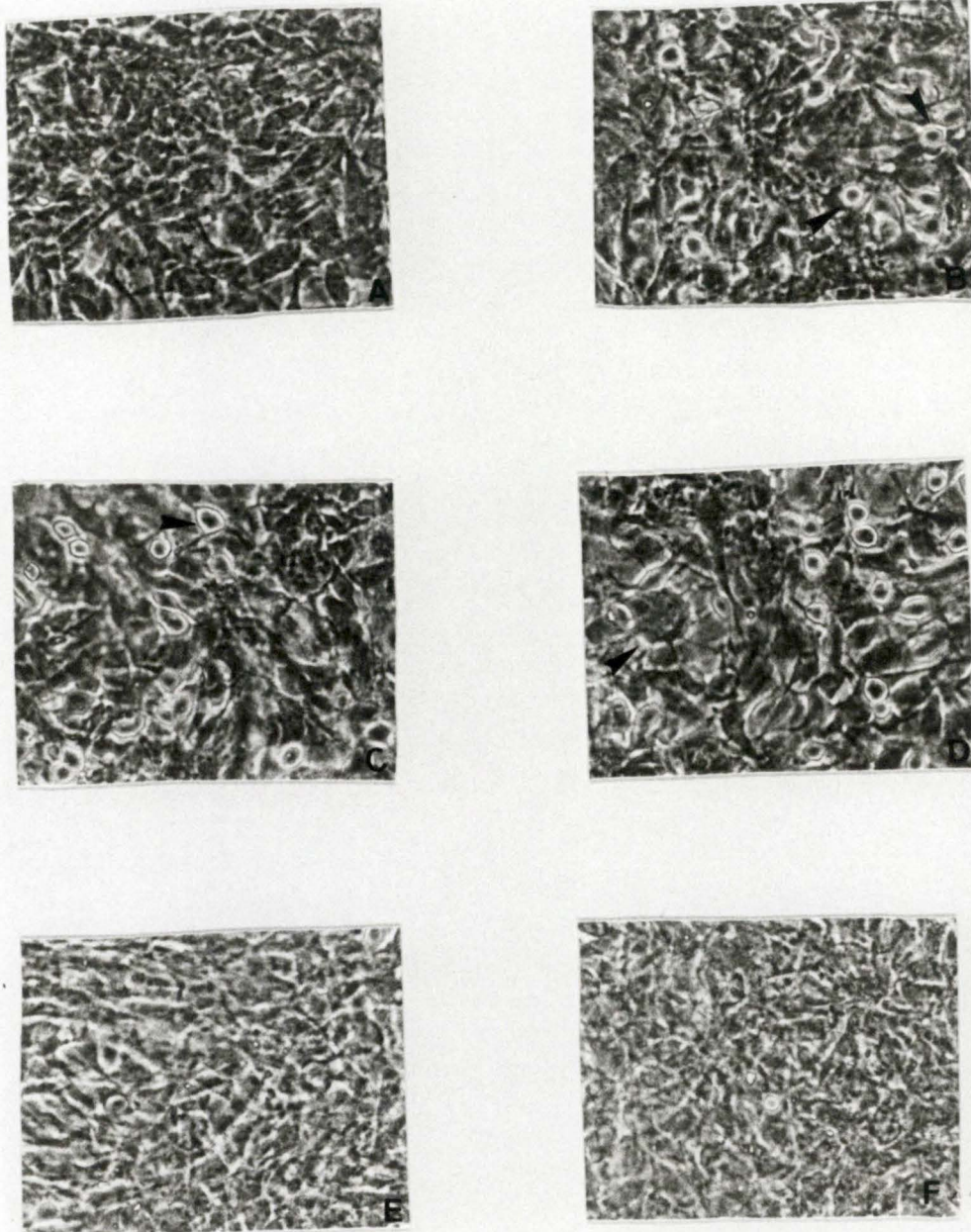


Photo 8. : monocouche de cellules synoviales en treizième génération (8-F-35) repiquées à très haute densité cellulaire. Effet de l'interleukine-1 à 10 U/ml sur la morphologie des cellules.

- cellules contrôles (A)

**x144**

- cellules stimulées avec de l'IL-1 à 10 U/ml : - après 2h00 (B)

- après 4h30 (C)

- après 6h00 (D)

- après 24h00 (E)

- après 48h00 (F)

► Cellule dendritique.



clairement l'effet de l'IL-1 sur des fibroblastes, et en particulier sur la cyclooxygénase. Mais dans ce cas, il s'agissait de fibroblastes de derme humain. Cette divergence entre différents types de fibroblastes reste à confirmer.

#### 3.2.4.2. EFFET DE L'IL-1 $\beta$ SUR LA PRODUCTION DES PROSTAGLANDINES SYNERGIE AVEC L'ACIDE ARACHIDONIQUE.

Etant donné les résultats sur l'activation de la PLA<sub>2</sub>, nous avons testé l'effet de l'IL-1 $\beta$  à raison de 10 U/ml sur la production des prostaglandines. Nous avons aussi voulu tester l'effet de l'acide arachidonique. O'Neill et coll. (1987) suggèrent une synergie possible entre l'IL-1 $\beta$  et l'acide arachidonique. Ces expériences ont été réalisées sur les cellules synoviales de la lignée 8-F-35 en treizième génération.

Les cellules ont été stimulées de diverses manières (O'Neill et coll., 1987) : soit avec de l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml dans de l'OPT + HLA 0,2 %, soit avec de l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml mais en ajoutant de l'AA 10  $\mu$ M une heure avant de prélever les milieux, soit avec de l'AA 10  $\mu$ M seul dans de l'OPT + HLA 0,2 %. Les cellules contrôles sont cultivées dans de l'OPT + HLA 0,2 % sans IL-1 $\beta$  et sans AA. Les temps de stimulation sont de 2, 8 et 24h.

Nous avons suivi non seulement la synthèse de PGE<sub>2</sub>, comme c'est le cas le plus souvent (Dayer et coll., 1986; Godfrey et coll., 1988...), mais aussi de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  et la PGI<sub>2</sub>, mesurée en fait sous une forme transformée, la 6-céto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$ . Moilanen et coll., (1987) ont mis en évidence la présence de ces deux prostaglandines dans des cultures de cellules synoviales saines et arthritiques.

Les résultats que nous obtenons sont étonnants (Tableau 10). Contrairement à O'Neill et coll. (1987), nous observons une production plus importante de PGE<sub>2</sub> avec l'acide arachidonique (AA) seul qu'avec l'IL-1 $\beta$ , du moins pour les stimulations courtes. Effectivement, la production de PGE<sub>2</sub> en présence d'IL-1 $\beta$  seule est non décelable à 2 h et 8 h alors qu'après 24 h nous



temps (heures)	contrôle (1)	IL-1 $\beta$ (10 U/ml) (2)	AA 10 $\mu$ M (3)	IL-1 + AA (2+3)	IL-1 et AA (4)
2	-	-	15,069	15,069	32,876
8	-	-	22,315	22,315	27,799
24	-	18,485	18,289	36,774	65,798

PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 

temps (heures)	contrôle (1)	IL-1 $\beta$ (10 U/ml) (2)	AA 10 $\mu$ M (3)	IL-1 + AA (2+3)	IL-1 et AA (4)
2	0,194	0,194	0,476	0,670	0,915
8	0,247	0,274	0,813	1,087	3,091
24	0,164	0,437	0,731	1,168	0,625

6-céto PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 

temps (heures)	contrôle (1)	IL-1 $\beta$ (10 U/ml) (2)	AA 10 $\mu$ M (3)	IL-1 + AA (2+3)	IL-1 et AA (4)
2	0,403	0,553	30,659	31,212	51,458
8	0,494	5,861	41,443	47,304	130,821
24	0,574	15,967	39,904	55,871	37,834

Tableau 10 : Comparaison de la production de PGE<sub>2</sub>, de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  et de 6-céto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  par les cellules synoviales (8-F-35) en treizième génération, à confluence. Les cellules ont été stimulées soit avec de l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml (2), soit avec de l'AA 10  $\mu$ M (3), soit avec de l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml à laquelle on ajoute de l'AA 10  $\mu$ M 1h00 avant la récolte du milieu (4). Les cellules contrôles ne sont pas stimulées (1). Les temps de stimulation des cellules sont de 2, 8 et 24h00. Les résultats sont exprimés en ng de prostaglandines par mg de protéines.

obtenons à peu près 18,485 ng de PGE<sub>2</sub> par mg de protéines. La latence aux temps 2h et 8h est probablement due au fait que la synthèse protéique doit être induite en réponse à la stimulation; O'Neill et coll. (1987) suggèrent en effet par leurs expériences, que l'IL-1 $\beta$  agirait sur les cellules, en induisant d'abord la production de la cyclooxygénase.

Par contre, pour les cellules incubées avec de l'AA 10  $\mu$ M seul, nous détectons déjà de la PGE<sub>2</sub> après 2h (15,069 ng/mg de protéines). Cette production est maximale après 8h (22,315 ng/mg de protéines) puis elle diminue et retombe à 18,289 ng/mg de protéines après 24h. L'augmentation du temps de stimulation ne correspond donc pas à une production accrue de PGE<sub>2</sub>. De plus, après 24 h, les quantités de PGE<sub>2</sub> dosées sont similaires pour la stimulation à l'AA seul (18,289 ng/mg de protéines) et à l'IL-1 $\beta$  seule (18,485 ng/mg de protéines).

Nous constatons aussi qu'il semble exister une synergie entre l'IL-1 $\beta$  et l'AA. En effet, en présence des deux molécules, nous détectons des quantités de PGE<sub>2</sub> de 32,876 ng/mg de protéines après 2h, de 27,799 ng/mg de protéines après 8h et de 65,798 ng/mg de protéines après 24h; ces quantités sont supérieures à celles que l'on obtiendrait en additionnant la PGE<sub>2</sub> induite et par l'IL-1 $\beta$  et par l'AA seuls (tableau 10). Nous n'observons pas non plus de diminution de la production aux temps longs.

La production de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  et de 6-céto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  est aussi importante. En ce qui concerne la PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , il n'y a pas de temps de latence pour la production puisque des quantités similaires sont produites aux temps 2 h et 8 h dans les boîtes contrôles et les boîtes stimulées à l'IL-1 $\beta$ ; cependant, après 24 h, les cellules stimulées à l'IL-1 $\beta$  semblent en produire un peu plus. Pour les cellules stimulées à l'AA 10  $\mu$ M seul, nous constatons pour 2, 8 et 24h des concentrations en PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  environ deux fois plus élevées par rapport aux cellules stimulées à l'IL-1 $\beta$  (Tableau 10). Par contre, pour les boîtes stimulées à l'IL-1 $\beta$  auxquelles l'AA 10  $\mu$ M a été additionné, on obtient une stimulation maximale à 8h (3,091 ng/mg de protéines) puis la concentration redescend de nouveau après 24h (0,625 ng/mg



de protéines). L'effet de synergie entre l'IL-1 $\beta$  et l'AA se manifeste surtout après 8 h; nous constatons en effet que l'addition des résultats obtenus pour l'IL-1  $\beta$  seule et pour l'AA seul, donne des valeurs nettement inférieures (1,087 ng/mg de protéines) à celles obtenues pour la stimulation des cellules avec les deux molécules combinées (3,091 ng/mg de protéines). La diminution de la concentration de PGF $_{2\alpha}$  observée après 24 h de stimulation en présence des deux agents est étonnante; elle pourrait s'expliquer par un mécanisme de feed back négatif dû aux concentrations plus élevées de PGF $_{2\alpha}$  produites après 8 h (3,091 ng/ml). Cette hypothèse reste à vérifier.

De même, les cellules stimulées à l'IL-1 $\beta$  en présence de l'AA 10  $\mu$ M, produisent plus de 6-céto-PGF $_{1\alpha}$  que les cellules stimulées avec de l'IL-1 $\beta$  ou de l'AA seuls; l'effet de synergie entre l'IL-1- $\beta$  et l'AA est de nouveau visible et en particulier après 8 h. Nous observons pour ces boîtes un maximum après 8h (130,821 ng/mg de protéines) puis une diminution après 24h (37,834 ng/mg de protéines). Cette diminution pourrait de nouveau s'expliquer par un mécanisme de feed back négatif.

Nous voyons de plus que la production de 6-céto-PGF $_{1\alpha}$  (PGI $_2$ ) est nettement supérieure à celle de la PGE $_2$  ce qui justifie la nécessité de réaliser des profils de PGs plutôt que de mesurer simplement la production de la PGE $_2$ .

En conclusion, ces résultats montrent une cinétique différente pour chacune des PGs, une synergie entre l'IL-1  $\beta$  et l'AA, et dans ce cas, nous constatons que son effet s'exerce surtout après 8h de stimulation et plus particulièrement pour la PGF $_{2\alpha}$  et la 6-céto-PGF $_{1\alpha}$  (Figure 25).

#### 3.2.4.3. EFFET DE L'IL-1 $\beta$ SUR LA PRODUCTION DE LA COLLAGENASE.

Nous avons testé l'effet de l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml sur la production de la collagénase par les cellules synoviales de la lignée 8-F-35 en treizième génération.



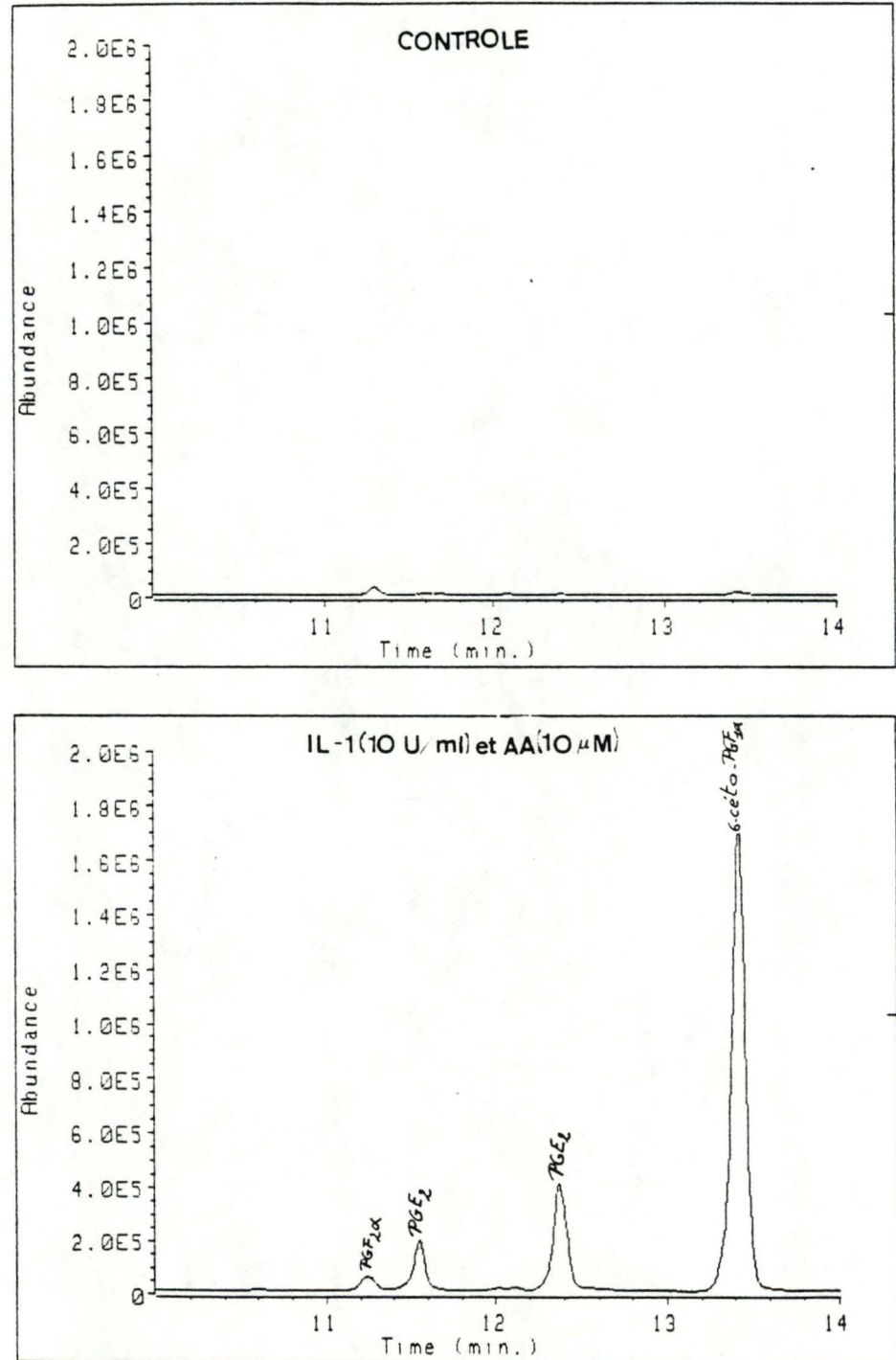


Figure 25 : Chromatogramme de prostaglandines.

Les cellules synoviales (8-F35) en treizième génération, à confluence, ont été stimulées avec de l'IL-1 à 10 U/ml pendant 8h. Nous y avons ajouté de l'AA 10 $\mu$ M avant la récolte du milieu. Les cellules contrôles n'ont pas été stimulées.

temps (heures)		contrôle		activation à l'IL-1 10U/ml	
activation	incubation	non activé	activé	non activé	activé
2	1	2,90	2,77	3,79	4,59
	2	2,32	4,93	5,05	5,79
8	1	4,82	5,19	4,49	3,22
	2	5,76	5,84	6,45	4,10
24	1	4,08	5,63	3,20	5,60
	2	3,79	7,20	3,97	6,40
48	1	3,59	4,59	3,15	3,94
	2	4,55	5,35	4,61	6,16

N. B. : trypsine

collagénase bactérienne

1h00 2,8

106,2

2h00 4,8

117,8

Tableau 11

Dosage de la collagénase produite par les cellules synoviales (8-F-35) en treizième génération, à confluence. Les cellules ont été stimulées avec de l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml. Nous n'avons placé que 10 ml d'OPT + HLA 0.2 % + IL-1 $\beta$  à 10 U/ml dans la boîte de culture (T75) pour concentrer la collagénase sans recourir au système Amicon. Après ajustement des concentrations en NaCl et en CaCl<sub>2</sub>, la collagénase a été activée ou non à la trypsine et dosée. Dans les boîtes contrôles, les cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions mais sans IL-1 $\beta$ . La collagénase produite par ces cellules contrôles est activée <sup>ou non</sup> par la trypsine puis dosée. Nous réalisons également dans cette expérience des tests trypsine et collagénase bactérienne.

Cette expérience a été réalisée sur des cellules confluentes et sur des cellules repiquées à très haute densité cellulaire.

#### 3.2.4.3.1. EXPERIENCE SUR LES CELLULES A CONFLUENCE.

Les cellules proviennent d'un repiquage en quatre de cellules en onzième génération. Nous avons réalisé des boîtes contrôles où nous avons uniquement mis de l'OPT + HLA 0.2 % et des boîtes stimulées où nous avons placé de l'OPT + HLA 0.2 % + IL-1 $\beta$  à 10 U/ml. Nous avons choisi des temps de stimulation de 2,8,24 et 48h

Dans les boîtes, nous plaçons 10 ml de milieu de culture. De cette manière, nous devrions pouvoir obtenir une solution de collagénase plus concentrée sans passer ni par la dialyse ni par la concentration de l'enzyme sur Amicon (cfr 3.2.3.5.2.). Cependant, puisque nous ne dialysons pas le milieu récolté après la période de stimulation, nous avons ajusté les concentrations en NaCl et en CaCl<sub>2</sub> dans ce milieu respectivement à 0,2 M et à 10 mM (concentrations finales) comme dans le tampon de dialyse. Après cet ajustement de concentration, nous pouvons réaliser le dosage de la collagénase (cfr 2.2.3.).

Pour chaque temps de stimulation, nous testons les milieux contrôles et les milieux stimulés à l'IL-1  $\beta$  non activés et activés pour la collagénase. Les comptages de radioactivité sont effectués après 1h et 2h d'incubation des échantillons à 35°C en présence d'un film de collagène radioactif concentré (cfr 2.2.3.). Même pour l'échantillon stimulé 48h avec de l'IL-1  $\beta$  et dont la collagénase a été activée à la trypsine et incubées 2h à 35 °C en présence du film (Tableau 11), nous n'obtenons pas une activité très élevée (6,16 %), quoique celle-ci soit tout de même plus élevée que celle obtenue dans les expériences précédentes. Ces résultats sont donc encourageants même s'ils ne sont pas encore tout à fait satisfaisants.



### 3.2.4.2. EXPERIENCE SUR LES CELLULES REPIQUEES A UNE HAUTE DENSITE CELLULAIRE.

Les cellules de 9 boîtes de culture T75 de la lignée 8-F-35 en treizième génération ont été repiquées dans 3 boîtes T25. 18h après le repiquage, nous avons ajouté de l'OPT + HLA 0.2 % + IL-1 $\beta$  à 10 U/ml dans 2 T25 et dans la troisième, nous avons simplement mis de l'OPT + HLA 0.2 % pour avoir un contrôle. Nous incubons pendant 24h, puis nous prélevons le milieu de culture.

Ce repiquage à forte densité cellulaire devrait nous permettre d'obtenir une solution plus concentrée en collagénase puisque nous avons plus de cellules pour un même volume d'OPT + HLA 0.2 % + IL-1 $\beta$  à 10 U/ml. Nous voulons par cette procédure éviter à nouveau la dialyse et la concentration sur Amicon; nous devons donc à nouveau ajuster les concentrations en NaCl et en CaCl<sub>2</sub> comme décrit dans le point précédent.

Nous avons testé les milieux contrôles et les milieux stimulés sans activation de la collagénase et avec activation de la collagénase à la trypsine. Nous procédons comme au point précédent pour le dosage de la collagénase. Les résultats consignés dans la Figure 26 nous donnent des valeurs faibles même après 24h de stimulation et activation de la collagénase latente. Cependant, pour les cellules stimulées à l'IL-1 $\beta$ , nous observons une légère différence entre la collagénase activée à la trypsine (5,23 %) et la collagénase non activée (4,10 %). Nous n'observons pratiquement pas de différence pour la collagénase produite par les cellules stimulées à l'IL-1 $\beta$ , non activée et celle produite par les cellules contrôles, après activation à la trypsine : après deux heures d'incubation à 35°C, nous obtenons respectivement 4,10 et 4,00 %.

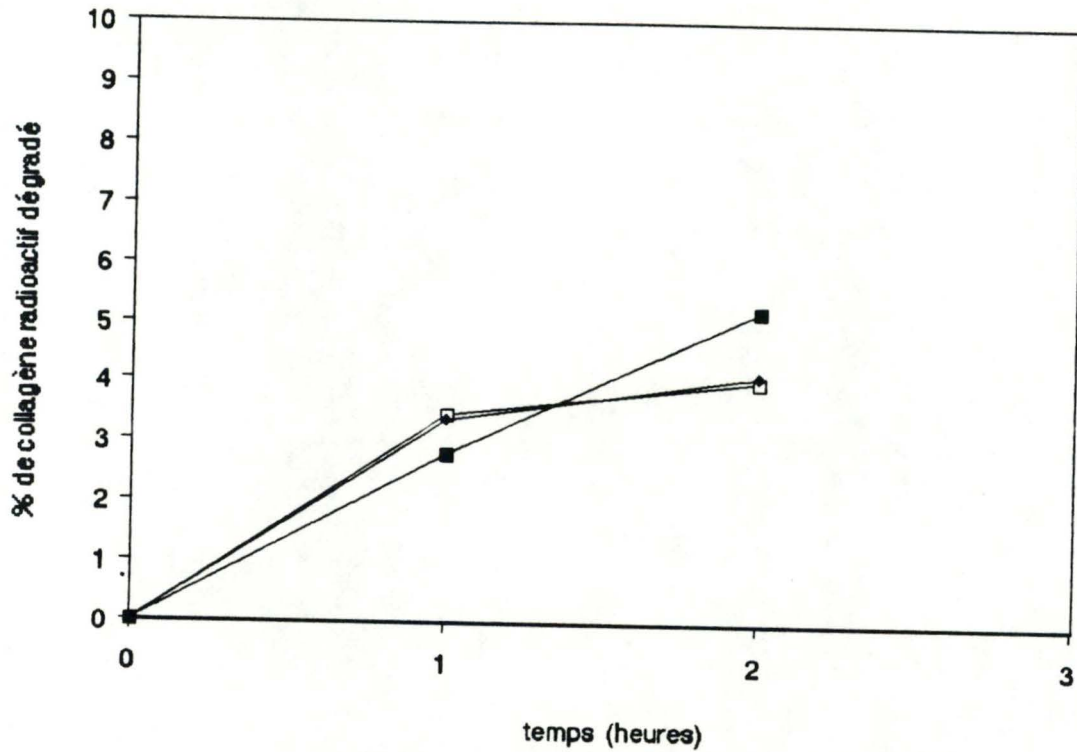


Figure 26: Dosage de la collagénase produite par des cellules synoviales (8-F-35) en treizième génération, repiquées à haute densité. Dans une boîte T25, les cellules ont été stimulées pendant 24h00 avec de l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml. Après ajustement des concentrations en NaCl et en CaCl<sub>2</sub>, la collagénase a été activée (■) ou non (◆) à la trypsine et dosée. Dans la boîte contrôle, les cellules ont été cultivées sans IL-1 $\beta$  et la collagénase produite, activée par la trypsine (□) et dosée.

#### 3.2.4.4. CONCLUSIONS.

Dans ces expériences préliminaires, nous avons défini des conditions de stimulation des cellules synoviales en présence d'IL-1  $\beta$ . Nous constatons une production importante de PGs alors que pour la collagénase, même après plusieurs approches systématiques des problèmes nous n'obtenons pas une stimulation importante de la collagénase.



## CHAPITRE 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Dans la première partie de ce travail, nous avons réalisé la mise au point de la culture de cellules synoviales. Ces cellules ont été cultivées dans le milieu OPTI-MEM qui apparemment n'avait pas encore été utilisé pour la culture de ces cellules et nous avons pu mettre en évidence l'effet positif du sérum humain sur la morphologie et la croissance des cellules synoviales.

Nous avons également pu constater que les cellules synoviales même après 10 à 20 générations conservent la capacité d'être stimulées par l'IL-1 $\beta$ . Cette observation montre que les synoviocytes en culture conservent en tout cas certains de leurs caractères de différenciation, même à long terme.

Dans une seconde étape, nous nous sommes intéressés à la stimulation des cellules synoviales par l'IL-1 $\beta$  qui est une cytokine effectivement présente dans certaines pathologies inflammatoires : dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde par exemple, l'IL-1 $\beta$  a été mise en évidence (Fontana et coll., 1982) mais elle est également décelée chez des patients souffrants d'ostéoarthritis, bien que en quantités plus faibles. Rappelons qu'il existe une composante inflammatoire dans l'ostéoarthritis mais elle n'est pas majeure dans cette pathologie (pour une revue : Bland et Cooper., (1984); Pujol et Loyau (1987)).

Pour tester une stimulation effective des cellules synoviales par l'IL-1 $\beta$ , nous avons choisi plusieurs tests différents :

1) Nous avons d'abord essayé de mettre au point une méthode de dosage de la collagénase et, quoiqu'ayant essayé de résoudre systématiquement les problèmes, cette méthode reste difficile à appliquer sur les milieux de culture. Le contrôle de ce dosage passe par un série d'expériences complémentaires dont les perspectives dépassaient le cadre de ce mémoire mais qui devront être continuées. Il faudrait d'abord repurifier du collagène et refaire un lot de collagène radioactif dans lequel la proportion de collagène dénaturé soit minimale, ceci afin de diminuer les valeurs des contrôles à la trypsine. De plus, il faudrait disposer d'un

échantillon de collagénase de vertébrés purifiée et d'activité connue. Sur cet échantillon, il faudrait réaliser une activation de la collagénase à la trypsine afin de vérifier si l'activation de la collagénase latente est bien réalisée. Il faudrait aussi pouvoir comparer ce dosage avec ceux effectués dans d'autres laboratoires utilisant la même technique mais aussi faire appel à d'autres méthodes de dosage. Enfin, il faudrait optimiser les conditions de synthèse et d'activation de la collagénase des cellules synoviales en culture.

Remarquons malgré tout que nous avons travaillé sur des cultures assez vieilles et bien qu'elles répondent à l'IL-1 $\beta$  pour produire des PGs, il se pourrait que l'absence de production de collagénase que nous avons observée soit une caractéristique de ces cellules ayant effectué un grand nombre de passage en culture. Nous pensons qu'il serait utile de doser la production de collagénase sur des primocultures ou tout au moins sur des cultures jeunes, mais nous avons été limités par la quantité de tissus synoviaux humains disponibles.

2) un test de libération d'AA radioactif préalablement incorporé par les cellules. Ce test est facile à réaliser et requiert peu de cellules. Nous pensons qu'il serait intéressant de l'utiliser pour établir un parallélisme entre le changement de morphologie cellulaire et la libération de l'AA radioactif incorporé par des cellules. Cela nous permettrait par exemple de voir s'il existe une différence entre l'effet des deux types de séra humain et bovin sur la libération de l'AA radioactif par les cellules synoviales, étant donné leur effet observé sur la morphologie.

Ce test pourrait aussi être utilisé pour comparer la réceptivité des cellules synoviales à l'IL-1  $\beta$  d'un échantillon à l'autre et au cours des générations in vitro.

3) la détection des PGs. Ce test est à notre avis le plus intéressant même s'il ne s'agit que d'expériences préliminaires. Nous avons constaté qu'il était nécessaire de suivre un profil de PGs plutôt que de mesurer la production de PGE<sub>2</sub> par les cellules synoviales comme on le fait généralement dans la littérature.

Il serait intéressant de faire des profils de PGs sur des primocultures pour estimer la quantité et la nature des PGs qui sont produites selon le type de



pathologies dont souffre le donneur. Cette analyse pourrait peut-être permettre d'établir des profils types de PGs.

Enfin, l'effet des séra (bovin et humain) sur la production des PGs pourrait aussi être étudiés sur pour compléter l'étude des effets des deux séra sur les synoviocytes en culture.

Certains aspects de ces premiers résultats méritent d'être approfondis par exemple, nous observons, dans la cinétique de production de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et de la 6-céto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ , un maximum après 8h puis une diminution de la production après 24h, pour les cellules stimulées par de l'IL-1 $\beta$  à 10 U/ml auxquelles nous avons additionné de l'AA 10  $\mu\text{M}$  1h avant la prélèvement du milieu. Il serait intéressant de confirmer cette observation et d'essayer de voir si l'hypothèse de feed back négatif des PGs sur l'action de l'IL-1  $\beta$  est plausible ou non.

Nous aimerions aussi vérifier la synergie observée entre l'IL-1 $\beta$  et l'AA d'autant plus que ces résultats diffèrent de ceux de O'Neill et coll.(1987).

Il semble aussi que d'autres synergies puissent exister par exemple, entre l'IL-1 $\beta$  et le PMA et entre l'IL-1 $\beta$  et le TNF (Tumor Necrosis Factor) pour ce qui est de la stimulation de la libération de l'AA et de l'augmentation des produits de la voie cyclooxygénasique du métabolisme de l'AA (Levine et coll.,1985). La synergie avec le TNF est par ailleurs encore controversée. En effet, d'après Godfrey et coll. (1988) il n'existerait pas de synergie entre l'IL-1 $\beta$  et le TNF au niveau de la production de  $\text{PGE}_2$  et de la libération de l'AA : ils expliquent leurs résultats par le fait que l'IL-1  $\beta$  peut stimuler la cyclooxygénase mais pas le TNF.

La capacité de l'IL-1 $\beta$  d'induire la biosynthèse de la  $\text{PGE}_2$  par les cellules synoviales, les chondrocytes et les fibroblastes est acceptée mais le mécanisme par lequel l'IL-1  $\beta$  agit sur le métabolisme de l'AA n'est pas encore connu. Gilman et coll.(1988) observent une sécrétion effective de  $\text{PLA}_2$  par les cellules synoviales après traitement à l'IL-1 $\beta$  aussi bien dans des lignées saines que dans des lignées provenant de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde ou d'ostéoarthritis. D'après ces auteurs, il est difficile de déterminer si les cellules synoviales d'origine arthritique produisent des quantités de  $\text{PLA}_2$  différentes de



celles des cellules synoviales normales. Ils montrent aussi dans des expériences préliminaires que la sécrétion de PLA<sub>2</sub> induite par l'IL-1  $\beta$  n'est pas inhibée par la cytochalasine B ni par le cycloheximide dans les cellules synoviales contrairement à ce qui se passe pour les chondrocytes de lapin. Toujours selon ces auteurs, la PLA<sub>2</sub> occuperait un rôle central dans la mobilisation de l'AA mais celui-ci pourrait aussi être libéré par action de la phospholipase C et de la diglycérade lipase.

## **BIBLIOGRAPHIE.**

**BARRETT, J. & SAKLATVALA, J. (1985)**

Proteinases in joint disease.

in Textbook of rheumatology, Kelley et coll. Eds, 182-196.

**BLAND, J.H. & COOPER, S.M. (1984)**

Osteoarthritis : a review of the cell biology involved and evidence for reversibility.

Management rationally related to known genesis and pathophysiology.

Sem. Arthr. Rheum., 14, 106-133.

**BRANSOME, E.D. (1970)**

in The current status of liquid scintillation counting.

Grine and Straton, Ed., New York-London.

**BROWN, M.F., HAZLEMAN, B.L., DINGLE, J. T., DANDY, D.J. & MURLEY, A.H.G. (1987).**

Production of cartilage degrading activity by human synovial tissues.

Ann. Rheum. Dis., 46, 319-323.

**BURMESTER, G.R., DIMITRIU-BONA, A., WATERS, S.J. & WINCHESTER, R.J. (1983)**

Identification of three major synovial lining cell populations by monoclonal antibodies directed to Ia antigens and antigens associated with monocytes/macrophages and fibroblasts.

Scand. J. Immunol, 17, 69-82.

**BUNNING, R.A.D., RICHARDSON, H.J., CRAWFORD, A., SKJODT, H., HUGHES, D.,**

**EVANS, D.B., GOWEN, M., DOBSON, P.R.M., BROWN, B.L & RUSSEL, R.G.G. (1986)**

The effect of interleukin-1 on connective tissue metabolism and its relevance to arthritis.

Agents and Actions, Suppl.18, 131-152.

**CAWSTON, T.E. & BARRETT, A.J. (1979)**

A rapid reproducible assay for collagenase using  $[1-^{14}C]$  acetylated collagen.

Anal. Biochem., 99, 340-345.

**CAWSTON, T.E., MERCER, E. & TYLER, J.A. (1981)**

The activation of latent pig synovial collagenase.

Biochim. Biophys. Acta, 657, 73-83.

**CHANG, J., GILMAN, S.C. & LEWIS, A.J. (1986)**

Interleukin-1 activates phospholipase A<sub>2</sub> in rabbit chondrocytes : a possible signal for IL-1 action.

J. Immunol., 136, 1283-1287.

**CHEN, P.C., GAETJENS, E. & BROOME, J.D. (1987)**

Mercaptoethanol protects glutathione depleted cells.

Agents and Actions, 22, 170-175.

**CRASTES de PAULET, A. (1983)**

Les grandes voies métaboliques de l'acide arachidonique.

in Biochimie de l'inflammation, Eds Masson, Paris, 1-39

**DAYER, J.M. & DEMECZUK, S. (1984)**

Cytokines and other mediators in rheumatoid arthritis.

Springer Sem. Immunopathol., 7, 387-413.

**DAYER, J.M., de ROCHEMONTEIX, B., BURRUS, B., DEMCZUK, S. & DINARELLO, C.A. (1986).**

Human recombinant interleukin-1 stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by human synovial cells.

J. Clin. Invest., 77, 645-648.

**DAYER, J.M., GOLDRING, S.R., ROBINSON, D. R. & KRANE, S.M. (1979)**

Effects of human mononuclear cell factor on cultured rheumatoid synovial cells : interaction of PGE<sub>2</sub> and 3'5' cyclic AMP.

Biochim. Biophys. Acta, 586, 87-105.

**DAYER, J.M., KRANE, S.M., RUSSEL, G.G.R. & ROBINSON, D.R. (1976)**

Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid cells

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 945-949.

**DINARELLO, C. A. (1987)**

The biology of interleukin-1 and comparison to tumor necrosis factor.

Immunol. Lett., 16, 227-232.



**DINARELLO, C.A. (1988)**

Biology of interleukin-1.

FASEB J., 2, 108-115.

**DINGLE, J.T., PAGE THOMAS, D.P., KING, B. & BARD, D.R. (1987)**

In vivo studies of articular tissue damage mediated by catabolin/interleukin-1.

Ann. Rheum. Dis., 46, 527-533.

**FONTANA, A., HENGARTNER, H., WEBER, E., FEHR, K., GROB, P.J. & COHEN, G. (1982)**

Interleukin-1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.

Rheumatol. Int., 2, 49-53.

**FUJII, T. & KHON, K. (1975)**

Isolation and characterization of pepsin-treated type III collagen from calf skin.

Physiol. Chem., 356, 1793-1801.

**GAY, S. & MILLER, E.J. (1983)**

What is collagen, what is not.

Ultrastruct. Pathol., 4, 365-377.

**GILMAN, S.C., CHANG, J., ZEIGLEIR, P.R., UHL, J. & MOCHAN, E. (1988)**

Interleukin-1 activates phospholipase A<sub>2</sub> in human synovial cells.

Arthr. Rheum., 31, 126-130.

**GISSLOW, M.T. & MAC BRIDE, B.C. (1975)**

A rapid sensitive collagenase assay.

Anal. Biochem., 68, 70-78.

**GODFREY, R.W., JOHNSON, W.J. & HOFFSTEIN, S.T. (1987)**

Recombinant tumor necrosis factor and interleukin-1 both stimulate human synovial cell arachidonic acid release and phospholipid metabolism.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 142, 235-241.

**GODFREY, R.W., JOHNSON, W.J., NEWMAN, T. & HOFFSTEIN, S.T. (1988)**

Interleukin-1 and tumor necrosis factor are not synergistic for human synovial fibroblast PLA<sub>2</sub> activation and PGE<sub>2</sub> production.

Prostaglandins, 35, 107-114.

**GOLDS, E.E., SANTER, V., KILLACKREY, J. & ROUGHLEY, P.J. (1983)**

Mononuclear cell factor stimulate the concomitant secretion of distinct latent proteoglycan, gelatin and collagen degrading enzymes from human skin fibroblasts and synovial cells.

J. Rheumatol., 10, 861-871.

**GOTO, M., SASANO, M., YAMANAKA, H., MIYASAKA, N., KAMATANI, N., INOUE, K., NISHIOKA, K. & MIYAMOTO, T. (1987)**

Spontaneous production of interleukin-1-like factor by cloned rheumatoid synovial cells in long term cultures.

J. Clin. Invest., 80, 786-796.

**HARRIS, E.J. (1985)**

Biology of the joint.

in Textbook of rheumatology, Kelley, W.N. et coll., Eds., 254-271.

**HARRIS, E.D., VATER, Jr & VATER, C. (1982)**

Vertebrate collagenases.

Meth. Enzymol., 82, 423-452.

**HARRIS, E.D., WELGUS, H.G. & KRANE, S.M. (1984)**

Regulation of the mammalian collagenases.

Collagen. Rel. Res., 4, 493-512.

**HAYFLICK, L. (1965)**

The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains

Exp. Cell Res., 37, 614-636.

**HEINO, J. (1986)**

Connective tissue components in synovial fibroblast cultures exposed to interleukin-1 and prostaglandin E2.

Virchows Arch. (Cell Pathol.) 50, 313-320.

HELSETH, D.L. Jr. & VEIS, A. (1981)

Collagen self-assembly in vitro : differentiating specific telopeptide-dependent interactions using selective enzyme modification and the addition of free amino telopeptide.

J. Biol. Chem., 256, 7118-7128.

HENDERSON, B., PETTIPHER, E.R. & HIGGS, G.A. (1987)

Mediators of rheumatoid arthritis.

Br. Med. Bull., 43, 415-428.

HENDLER, P.L., LAVOIE, P.E., WERB, Z., CHAN, J. & SEAMAN, W.E. (1985)

Human synovial dendritic cells: direct observation of transition to fibroblasts.

J. Rheumatol., 12, 660-664.

HERBAGE, D. (1986)

Les collagènes de l'articulation.

Ann. Biol. Clin., 44, 152-155.

HOWAT, D.W., GLYNN, L.E., BITENSKY, L. & CHAYEN, J. (1987)

The origin of the apparent synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis: evidence for a deep stem cell.

Br. J. Exp. Path., 68, 259-266.

HUSZAR, G., MAIOCCO, J. & NAFTOLIN, F. (1980)

Monitoring of collagen and collagen fragments in chromatography of protein mixtures.

Anal. Biochem., 105, 424-429.

JACKSON, D.S. & CLEARY, E.G. (1967)

The determination of collagen and elastin.

Meth. Biochem. Anal., 15, 25-75.

JHONSON-WINT, B. (1980)

A quantitative collagen film collagenase assay for large numbers of samples.

Anal. Biochem., 104, 175-181.



**KANDEL, R.A., DINARELLO, C.A. & BISWAS, C. (1987)**

The stimulation of collagenase production in rabbit articular chondrocytes by interleukin-1 is increased by collagens.

Biochem. Int., 15, 1021-1031.

**KEIL, B. (1986)**

Structure et propriétés des collagénases animales et bactériennes.

Ann. Biol. Clin., 44, 168-175.

**KLARESKOG, L., FORSUM, U., TJERNLUND, M., KABELITZ, D. & WIGREN, A. (1981)**

Appearance of anti-HLA-DR reactive cells in normal and rheumatoid synovial tissue.

Scand. J. Immunol., 14, 183-192.

**KRANE, S.M. (1981)**

Aspects of the biology of the rheumatoid synovial lesion.

Ann. Rheum. Dis., 40, 433-448.

**LEVINE, L. & XIAO, D.M. (1985)**

The stimulations of arachidonic acid metabolism by recombinant murine interleukin-1 and tumor promoters or 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol are synergistic.

J. Immunol., 135, 3430-3433.

**LINDBLAD, S. & HEDFORS, E. (1987)**

The synovial membrane of healthy individuals—immunohistochemical overlap with synovitis.

Clin. Exp. Immunol., 69, 41-47.

**LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951)**

Protein measurement with Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193, 265-275.

**LOYAU, G. & PUJOL, J.P. (1986)**

Collagénases en rhumatologie.

Ann. Biol. Clin., 44, 275-280.

**MAINARDI, C.L. (1985)**

Collagenase in rheumatoid arthritis.

Ann. N-Y Acad. Sci., 460, 345-354.

**MALLYA, S.K., MOOKHTIAR, K.A. & VAN WART, H.E. (1986)**

Accurate, quantitative assays for the hydrolysis of soluble type I, II and III  $^3\text{H}$ -acetylated collagens by bacterial and tissue collagenases.

Anal. Biochem. , 158, 334-345.

**MARSH, J.M., RAVINDER, N.M., WIEBKIN, O.W. & DUMONDE, D.C. (1978)**

Rheumatoid and normal synovial tissue in longterm culture : evidence of cell heterogeneity and an approach to quantitation of populations and the effect of passage.

J. Rheumatol., 5, 148-161.

**MASUI, Y., TAKAMETO, T., SAKAKIBARA, S., HORI, H. & NAGAI, Y. (1977)**

Synthetic substrates for vertebrate collagenase.

Biochem. Med. , 17, 215-221.

**MILLER, E.J. & GAY, S. (1982)**

Collagen:an overview.

Meth. Enzymol, 82A, 3-30.

**MIOSSEC, P. (1987)**

The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

Clin. Exp. Rheum., 5, 305-308.

**MITROVIC, D. (1986)**

Cartilage et collagénases.

Ann. Biol. Clin., 44, 281-284.

**MOILANEN, E., SEPPÄLÄ, E., NISSILÄ, M. & VAPAATALO, H. (1987)**

Differences in prostanoid production between healthy and rheumatic synovia in vitro.

Agents and Actions, 20, 98-103.

**MOOKHTIAR, K.A., MALLYA, S.K. & VAN WART, H.E. (1986)**

Properties of radiolabeled type I, II, III, collagens related to their use as substrates in collagenase assays.

Anal. Biochem. , 158, 322-333.

**O'DONNELL-TORMEY, J., NATHAN, C.F., LANKS, K., DE BOER, C.J. & DE LA HARPE, J. (1987)**

Secretion of pyruvate : an antioxidant defense of mammalian cells.

J. Exp. Med., 165, 500-514.

**O'NEILL, L.A.J., BARRETT, M.L. & LEWIS, G.P. (1987)**

Induction of cyclo-oxygenase by interleukin-1 in rheumatoid synovial cells.

FEBS Lett., 212, 35-39.

**PARKS, D.R., BRYAN, M.V., OI, V.T. & HERZENBERG, L.A. (1979)**

Antigenic specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence activated cell sorter.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1962-1966.

**PEETERS-JORIS, C., EDMOND-ALT, X. & VAES, G. (1981)**

A direct simultaneous plate assay of proteoglycan and collagen degradation by cells in culture and its application to synovial cells.

Biochem. J., 196, 95-104.

**PUJOL, J.P. & LOYAU, G. (1987)**

Interleukin-1 and osteoarthritis (minireview).

Life Sciences, 41, 1187-1198.

**RAZ, A., WYCHE, A., SIEGEL, N. & NEEDLEMAN, P. (1988)**

Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1.

J. Biol. Chem., 263, 3022-3028.

**ROBERT, L. & LABAT-ROBERT, J. (1986)**

Les collagènes et collagénases en pathologie rhumatismale : Les macromolécules de la matrice extracellulaire.

Ann. Biol. Clin., 44, 145-151.

**SAKLATVALA, J., SARSFIELD, S.J. & PILSWORTH, L.M.C. (1983)**

Characterization of proteins from human synovium and mononuclear leucocytes that induce resorption of cartilage proteoglycan in vitro.

Biochem. J., 209, 337-344.



**SIMON, L., BLOTMAN, F. & CLAUSTRE, J. (1983)**

Exploration en pathologie articulaire  
in Rhumatologie, Eds Masson, Paris.

**STEPHENSON, M.L., GOLDRING, M.B., BIRKHEAD, J.R., KRANE, S.M., RAHMSDORF, H.J.  
& ANGEL, P. (1987)**

Stimulation of procollagenase synthesis parallels increases in cellular procollagenase mRNA in human articular chondrocytes exposed to recombinant interleukin-1  $\beta$  or phorbol ester.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 144, 583-590.

**WADDEL, K.A., BLAIR, I.A. & WELLBY, J. (1983)**

Combined capillary column gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry of prostanoids.

Biomed. Mass. Spectrom., 10, 83-88.

**WERB, Z., MAINARDI, C.L., VATER, C.A., HARRIS, B.A. & E.D.Jr. (1977)**

Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator.

N. Engl. J. Med., 296, 1017-1023.

**WIGLEY, F.M., FINE, I.T. & NEWCOMBE, D.S. (1983)**

The role of the human synovial fibroblast in monosodium urate crystal-induced synovitis.

J. Rheumatol., 10, 602-611.

**WOOLEY, D.E., BRINCKERHOFF, C.E., MAINARDI, C.L., VATER, C.A., EVANSON, J.M. & HARRIS, E.D.Jr. (1979)**

Collagenase production by rheumatoid synovial cells : morphological and immunohisto-chemical studies of the dendritic cells.

Ann. Rheum. Dis., 38, 262-270.

**WOOLLEY, D.E., CROSSLEY, M.J. & EVANSON, J.M. (1977)**

Collagenase at sites of cartilage erosion in the rheumatoid joint.

Arthr. Rheum., 20, 1231-1239.

WOOLLEY, D.E., GLANVILLE, R.W., CROSSLEY, M.J. & EVANSON, J.M. (1975)

Purification of rheumatoid synovial collagenase and its action on soluble and insoluble collagen.

Eur. J. Biochem., 54, 611-622.

## **LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES :**

- AA : acide arachidonique.
- BME (Basal Medium Eagle) : milieu basal d'Eagle.
- BSTFA : Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide.
- 6- cétó-PGF<sub>1α</sub> : produit de transformation de la prostaglandine I<sub>2</sub>.
- DMSO : diméthylsulfoxyde.
- EDTA : tétraacétate d'éthylène diamine.
- GC- MS : Gas Chromatography - Mass Spectrophotometer.
- Gly : glycine
- HBSS + AB : Solution saline tamponnée de Hanks contenant de la pénicilline, de la streptomycine et de la fungizone à raison respectivement de 200 U/ml, 200 µg/ml et 5 µg/ml.
- HBSS : solution saline tamponnée de Hanks.
- HEPES : [4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid]
- HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque.
- HLA : hydrolysate de lactalbumine
- HPETE : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque.
- IL- 1 β : forme β de l'interleukine-1
- LTs : leucotriènes.
- MCF : Mononuclear cell factor (facteur produit par les monocytes- macrophages).
- OA : ostéoarthritis.
- OPT + 5 % SB - 5 % SH : OPTI - MEM auquel on ajoute 5 % sérum de veau foetal et 5 % de sérum humain.
- OPT + 5 % SB : OPTI - MEM auquel on ajoute 5 % de sérum de veau foetal.
- OPT + 10 % SB ou OPT + SB : OPTI - MEM auquel on ajoute 10 % de sérum de veau foetal.
- OPT + 10 % SH ou OPTI + SH : OPTI - MEM auquel on ajoute 10% de sérum humain
- OPT. : milieu de culture OPTI - MEM.
- PAR : polyarthrite rhumatoïde



- PBS (Phosphate buffer solution) : tampon phosphate de potassium 10 mM  
contenant 0,9 % NaCl, pH 7,4
- pC : propeptide carboxy- terminal.
- PFB : 2,3,4,5,6 -pentafluorobenzyl 99 % +  $\alpha$ -bromo-2,3,4,5,6-  
pentafluorotoluène
- PGB<sub>2</sub> : prostaglandine B<sub>2</sub>
- PGD<sub>2</sub> : prostaglandine D<sub>2</sub>
- PGE<sub>1</sub> : prostaglandine E<sub>1</sub>
- PGF<sub>2 $\alpha$</sub> : prostaglandine F<sub>2 $\alpha$</sub>
- PGI<sub>2</sub> : prostaglandine I<sub>2</sub>
- PGs : prostaglandines
- PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>
- PMA : 12-phorbol 13-myristate acetate
- PMNs : polymorphonucléaires.
- pN : propeptide amino- terminal.
- SBTI (soy bean trypsin inhibitor) : inhibiteur de la trypsine.
- SH, SB : sérum humain, sérum de veau foetal.
- T+E : solution saline de Puck modifiée contenant 0,5 g de trypsine et 0,2 g  
d'EDTA / litre.
- T25 : boîte de culture dont la surface est égale à 25 cm<sup>2</sup>.
- T75 : boîte de culture dont la surface est égale à 75 cm<sup>2</sup>.
- TCA et TCB : fragments résultant de la dégradation du collagène natif par la  
collagénase de vertébrés.
- TIMP (tissue inhibitor metalloproteinase) : inhibiteur tissulaire des  
métalloprotéinases.
- TNF (tumor necrosis factor) : cachectine
- Trypsine TPCK : trypsine traitée par L-1-Tosylamide-2-phenylethylchloromethyl  
ketone, inhibiteur de la chymotrypsine.
- TXB<sub>2</sub> : produit de transformation du thromboxane A<sub>2</sub>.