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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Activation de la prolifération de fibroblastes pulmonaires par le PDGF: régulation par le système PGE/AMPc

Gillon, Barbara

Award date:
1992

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 28. Apr. 2024

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

Activation de la prolifération de fibroblastes pulmonaires par le PDGF. Régulation par le système PGE_2/AMPc.

GILLON Barbara

Résumé

Le PDGF est un facteur de croissance qui joue un rôle primordial dans les mécanismes de prolifération des cellules mésenchymateuses.
Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux dérivés de l'acide arachidonique. Nous avons ensuite tenté de voir comment ces dérivés de l'acide arachidonique pouvaient médier ou moduler la prolifération induite par le PDGF. Seule la PGE_2 parmi les dérivés testés s'avèra avoir un effet de régulation négative sur la prolifération induite par le PDGF. Nous avons alors vérifié si l'action de la PGE_2 est bien médiée par l'AMPc pour les fibroblastes de poumon. L'utilisation de diverses molécules agissant sur la voie de l'AMPc nous a donné certains éléments de réponse : 1) la PGE_2 pourrait bien contrecarrer les effets du PDGF via l'AMPc, celui-ci agissant alors par feed-back négatif sur les récepteurs au PDGF. 2) Le PDGF lui même nécessiterait de faibles concentrations en AMPc pour exercer pleinement son effet pro-proliératif. Ces observations devront être confirmées respectivement par un dosage de l'AMPc intracellulaire ainsi que par une étude au niveau des récepteurs au PDGF. Nous avons également prospecté la voie de la PKC. Enfin pour voir si l'effet de régulation négative exercé par le système AMPc/PGE_2 sur la prolifération était applicable à d'autres réponses biologiques, nous avons testé l'effet du PDGF en présence ou non du système AMPc/PGE_2 sur la synthèse d'IL-6.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)
Décembre 1992
Promoteur : Dr M. Raes
Co-promoteur : Prof J. Remacle

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur Remacle de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir conseillée par ses idées originales.

Mes remerciements les plus chers s'adressent à Martine Raes pour ses qualités scientifiques et humaines, mais également à Maggi Burton pour m'avoir guidée, encouragée, soutenue et aidée jusqu'au bout. Je n'oublie pas non plus les autres membres de cette petite équipe "synoviale" bien sympahique : Patsy, pour ses petits conseils, sa franchise, son sourire... et Isabelle Knott pour ses idées qui viennent toujours à point, son aide et ses encouragements.

A Andrée, pour m'avoir appris ses secrets des cultures cellulaires ainsi que la patience qu'elles requièrent!

A Marc Dieu pour l'apprentissage en "cours accélérés" de la GC-MS mais surtout pour sa constante disponibilité "Macintosh" qui m'a été bien précieuse pendant cette année...

A Sylviane, Isabelle, Marc, Dominique, Maggi, Thierry, Bobo,... pour leur touche dactylographique finale.

A Marie, Mumu, Fred, Frédérique et Véro ainsi qu'à tous les membres de ce laboratoire qui contribuent chacuns à leur manière à y faire régner une merveilleuse ambiance.

Enfin, je remercie de tout coeur mes parents pour m'avoir toujours soutenue et encouragée pendant ces cinq ans. Sans oublier Tamara et François qui par leurs encouragements discrets, m'ont aidée à surmonter les moments difficiles.

INTRODUCTION

1. La croissance cellulaire 1

1.1. Importance physiologique 1
1.2. Contrôle de la croissance cellulaire 2
1.2.1. Facteurs à action positive 5
1.2.2. Facteurs à action négative 7
1.3. Dérégulation de la croissance cellulaire et fibroses pulmonaires 8
1.3.1. Structure anatomique du poumon 9
1.3.2. Fibroses pulmonaires 10

2. Le PDGF ou Platelet derived growth factor 12

2.1. Caractéristiques biochimiques du PDGF et de son récepteur 12
2.2. La transduction du signal 14
2.2.1. Les différentes voies de transduction de signal 15
2.2.1.1. La voie de l'AMPc 15
2.2.1.2. La voie du DAG et de l'IP3 16
2.2.1.3. La voie du calcium 17
2.2.1.4. La voie de l'acide arachidonique 17
2.2.2. La transduction du signal dans le cas d'une activation au PDGF 19
2.3. Les actions du PDGF 21

3. Modèle *in vitro* 24

4. Objectifs 24

MATERIELS ET METHODES

1. Culture des fibroblastes de poumon 26

1.1. Matériels 26
1.2. Repiquage des fibroblastes pulmonaires 27
1.3. Congélation et décongélation des cellules 28
1.3.1. Congélation 28
1.3.2. Décongélation 28

2. Test de libération de l'AA radioactif préalablement incorporé par les cellules 29

2.1. Matériels 29
2.2. Méthodes 30

3. Chromatographie sur couche mince ou TLC (Thin layer chromatography) 31

3.1. Matériels 31
3.2. Extraction des dérivés de l'AA* sur colonne 32
3.3. Chromatographie sur couche mince 33

4. Dosage de prostaglandines 34

4.1. Matériels 34
4.2. Méthodes 35
4.2.1. Stimulation des cellules 35
4.2.2. Extraction des prostaglandines 36
4.2.3. Dérivatisation des prostaglandines 36
4.2.4. Détection par GC-MS et quantification des prostaglandines 37

5. Test de prolifération cellulaire 39

5.1. Méthode à l'hexoaminidase 39
5.1.1. Matériels 39

5.1.2. Méthode 41

5.2. Méthode à l'iodure de propidium 42
5.2.1. Matériels 42
5.2.2. Méthode 43

6. Dosage de l'IL-6 44

6.1. Matériels 45
6.2. Méthodes 46

7. Test de cytotoxicité au MTT 47

7.1. Matériels 47
7.2. Méthode 48

8. Analyse statistique 49

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Modèle d'activation par le PDGF et/ou l'IL_1 du métabolisme de l'AA 51

1.1. Analyse quantitative 51
1.2. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince ou thin layer chromatography (TLC) 52
1.3. Analyse quantitative et qualitative par GC-MS 53
1.4. Discussion 55

2. Modèle d'activation par le PDGF A/B sur la prolifération cellulaire 57

2.1. Effet du PDGF et/ou de l'IL1β sur la prolifération cellulaire 57
2.1.1. Résultats 57
2.1.2. Discussion 58
2.2. Influence des dérivés de l'AA sur la prolifération cellulaire induite ou non par le PDGF. 59
2.2.1. Résultats 59

2.2.2. Discussion 61
2.3. Rôle de l'AMPc dans la réponse proliférative au PDGF A/B et à la PGE_2.
2.3.1. Effet du db-AMPc 62
2.3.2. Effet de certains activateurs ou inhibiteurs de la voie de l'AMPc : l'aminophylline, la forskoline, la didéoxyadénosine monophosphate et le H_8. 64
2.3.2.1. L'aminophylline 65
2.3.2.2. La forskoline 65
2.3.2.3. La didéoxyadénosine monophosphate et le H_8 66
2.3.2.4. Effet de la concentration en db-AMPc sur la prolifération induit par le PDGF 67
2.3.3. Discussion 69
2.3.4. Hypothèse quant au mécanisme d'action de l'AMPc sur la prolifération cellulaire induite par le PDGF. 71
2.4. Rôle de la PKC dans la prolifération induite par le PDGF. 72
2.4.1. Résultats 72
2.4.2. Discussion 73

3. Effet du PDGF sur la synthèse en IL6. 74

3.1. Résultats 74
3.2. Discussion 74

4. Conclusions générales 76

BIBLIOGRAPHIE

Liste des abréviations

AA :	Acide arachidonique
db-AMPc :	Dibutyryl AMPc
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ACTH :	Hormone corticotrope
AMPc :	Adénosine mono-phosphate cyclique
ARDS :	Syndrôme de détresse respiratoire aigu
BME :	Milieu Basal de Eagle
BSTFA :	Bis (triméthylsilyl) tri fluoro acétamide
CSF-1 :	Colony stimulating factor 1
DAG :	Diacylglycérol
DDAO :	2'-5' didéoxyadénosine monophosphate
DMF :	N,N-diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxide
DPM :	Désintégration par minute
EGF :	Epidermial growth factor
EDTA :	Acide éthylènedinitrilotetraacétique
ELISA :	Enzyme linked immuno sandwich assay
FAF :	Fibroblast activating factor
FGF :	Fibroblast growth factor
GAGs :	Glycosaminoglycanes
GAP :	GTPase activating protein
GC-MS :	Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse.
GSK-3 :	Glycogène synthétase kinase-3
GM-CSF :	Granulocyte/macrophage colony stimulating factor
GDP :	Guanine di-phosphate
GTP :	Guanine tri-phosphate
H7 :	1-(5-isoquirolinylsulfonyl)-2-méthyl pipérazine
H8 :	N-(2-méthylamino)-éthyl-isoquroline sulfonide
HEPES :	Tampon HEPES
HETEs :	Acides hydroxyéïcosatétraénoïques
5-HETE :	Acide 5-hydroxyeïcosatétraénoïque
12-HETE :	Acide 12-hydroxyeïcosatétraénoïque
15-HETE :	Acide 15-hydroxyeïcosatétraénoïque
HLA :	Hydrolysat de Lactalbumine
5-HPETE :	Acide 5-hydroperoxyeïcosatétraénoïque
IFNα :	Interféron α
IFNγ :	Interféron γ

IGF :	Insulin like growth factor
IL-1 :	Interleukine 1
IL-6 :	Interleukine 6
IP_3 :	Inositol tri-phosphate
LTB_4 :	Leucotriène B_4
LTC_4 :	Leucotriène C_4
LTs :	Leucotriènes
MAP-Kinase :	Mitoyen activated protéine kinase
MTT :	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-)-2,5-dipnényl tétrazolium
OPTI-MEM :	Milieu OPTI-MEM
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PDGF :	Platelet derived growth factor
PGD_2 :	Prostaglandine D_2
PGE_2 :	Prostaglandine E_2
d-PGE_2 :	Prostaglandine E_2 deutérée
$PGF_{2\alpha}$:	Prostaglandine $F_{2\alpha}$
d-$PGF_{2\alpha}$:	Prostaglandine $F_{2\alpha}$ deutérée
PGH_2 :	Prostaglandine H_2
PGI_2 :	Prostaglandine I_2
6-kéto-$PGF_{1\alpha}$:	6-kéto prostaglandine $F_{1\alpha}$
d-6-kéto-$PGF_{1\alpha}$:	6-kéto prostaglandine $F_{1\alpha}$ deutérée
PGs :	Prostaglandines
PFB :	(2,3,4,5,6-pentafluor-benzyl), N-éthyldiisopropylamine
PI3K :	Phosphatidyl inositol 3' kinase
PKC :	Protéine kinase C
PIP_2 :	Phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate
PLA_2 :	Phospholipase A_2
PMA :	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PMN :	Polymorphonucléaire neutrophile
RMP :	Rotation par minute
SB :	Serum Bovin
TGFα :	Transforming growth factor α
TGFβ :	Transforming growth factor β
TLC :	Thin Layer Chromatography (chromatographie sur couche mince)
TNFα :	Tumor necrosis factor α
TXA_2 :	Thromboxane A_2
TXB_2 :	Thromboxane B_2

INTRODUCTION

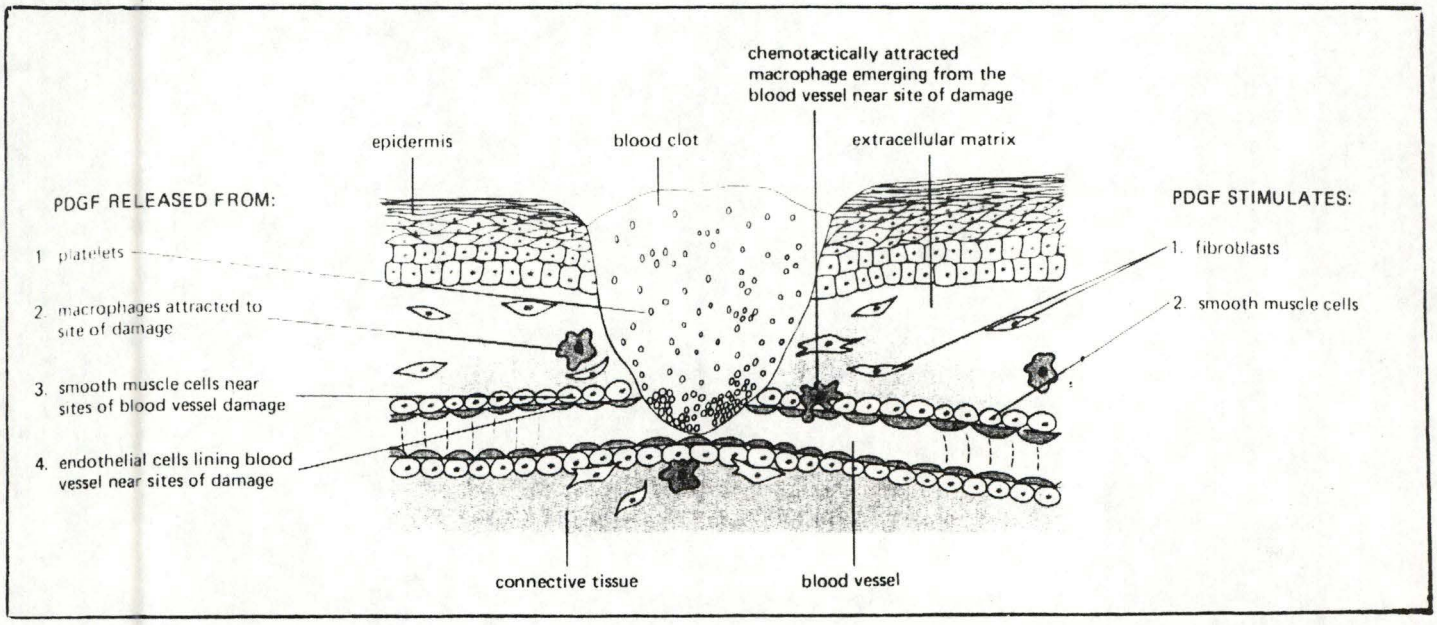


Fig. I.1. : Représentation schématique du rôle joué entre autres par le PDGF lors de la réparation d'une blessure (d'après Alberts *et al.*, 1989)

1. LA CROISSANCE CELLULAIRE

1.1. Importance physiologique

La croissance cellulaire est un phénomène biologique qui joue un rôle important au cours du développement, mais aussi pour assurer le renouvellement et le maintien des tissus chez les organismes pluricellulaires adultes. Hormis les cellules du tissu nerveux, la plupart des cellules des vertébrés ont une durée de vie limitée et sont renouvelées régulièrement. Il existe donc un contrôle de la prolifération cellulaire afin de maintenir une masse cellulaire appropriée. Certains tissus, tels que le poumon ont un turn-over rapide. En effet, sous l'apparente stabilité de structure et de fonction du poumon adulte, se cache une capacité extraordinaire de prolifération cellulaire et de remodelage tissulaire. Ce turn-over cellulaire est accompagné d'un turn-over métabolique rapide puisque le contenu protéinique du poumon est renouvelé en moyenne tous les quatre à cinq jours. Un tel niveau de l'activité de biosynthèse nécessite un ensemble parfaitement équilibré de contrôles qui s'exercent continuellement pour préserver l'architeture et la fonction du tissu normal. Les meilleurs candidats pour assurer ces contrôles semblent être les cytokines et les facteurs de croissance, comme nous le verrons par la suite (Kelley, 1990). Un tel contrôle de la prolifération cellulaire existe également dans des situations de prolifération intense telles que la réparation tissulaire suite à une blessure. La prolifération cellulaire est dans ce cas contrôlée de manière à être limitée dans le temps et dans l'espace. Ainsi, lors d'une blessure au niveau de la peau par exemple, une réaction inflammatoire est enclenchée, entraînant la mise en route de toute une série de cascades comme celle de la coagulation, du complément, ou encore des dérivés de l'acide arachidonique (Fig. I.1.). Rapidement, une stabilisation de la réaction inflammatoire s'installe où des systèmes de régulation contrôlent et neutralisent les réactions au niveau local, régional et systémique. Par exemple, l'interleukine-1 (IL-1) stimule la synthèse de prostaglandine E_2 (PGE_2) qui en plus de

ses propriétés inflammatoires, exerce un effet inhibiteur sur la production d'IL-1. Par ailleurs, l'IL-1 active la secrétion d'ACTH (hormone corticotrope) par les cellules de l'hypophyse. Cette dernière agit alors au niveau des surrénales pour augmenter la sécrétion de corticostéroïdes qui réduisent l'expression de l'IL-1 et exercent une action anti-inflammatoire (Dodet, 1989). Finalement, un processus de réparation se met en place, aboutissant à la phase de restauration et de guérison. Ce processus est contrôlé par divers facteurs de croissance et cytokines dont l'IL-1, l'interleukine-3 (IL-3), le platelet derived growth factor (PDGF), le fibroblast activating factor (FAF), l'epidermal growth factor (EGF), l'interféron γ (IFNγ), le transforming growth factor β (TGFβ)... . Cette étape de réparation est marquée par la prolifération de fibroblastes et la synthèse de collagène. Si la réparation est parfaite, les cellules spécifiques du tissu conjonctif et les cellules parenchymateuses survivantes colonisent le foyer et remplacent parfaitement les cellules détruites. On parle alors de régénération. Mais le plus souvent, la réparation est imparfaite ou incomplète. Celle-ci se fait à partir de fibroblastes, cellules non spécialisées du tissu conjonctif et laisse une cicatrice fibreuse (Dodet, 1989). La régulation de la prolifération s'effectue grâce à un équilibre étroit entre des facteurs positifs et négatifs fournis par des messagers intercellulaires tels que les cytokines, les facteurs de croissance ou les dérivés de l'acide arachidonique (Vignaud et al., 1991). Les signaux positifs ont été décrits par de nombreux auteurs mais peu de choses sont connues quant aux signaux négatifs. Une rupture de l'équilibre entre signaux négatifs et positifs conduirait à une prolifération excessive aboutissant par exemple à la fibrose.

1.2. Le contrôle de la croissance cellulaire

Les cytokines, facteurs de croissance, oncogènes et les dérivés de l'acide arachidonique étant étroitement impliqués dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, ainsi que dans les processus de croissance et de remodelage, toutes les cellules sont vouées à élaborer et à sécréter ces facteurs à un stade de leur vie.

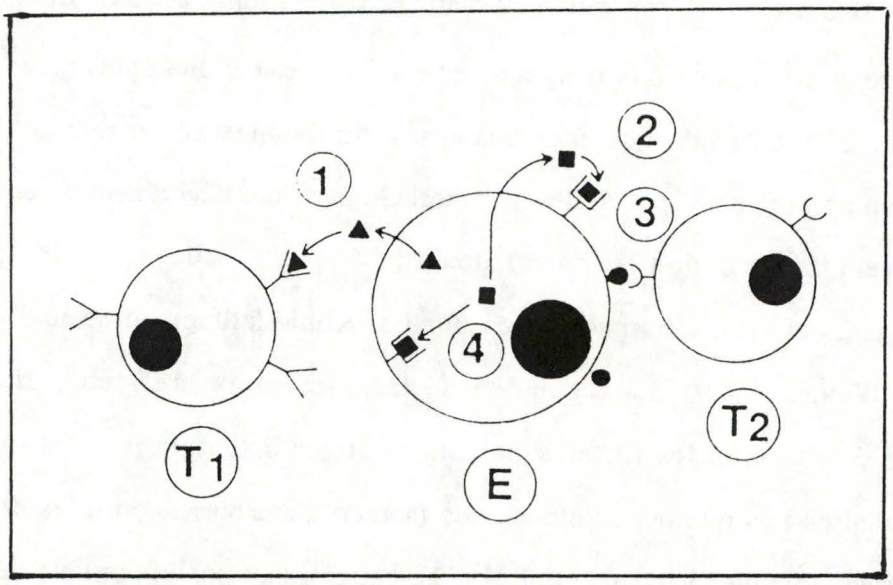


Fig. I.2. : Représentation schématique des différents modes de communication intercellulaire

1/ mode paracrine

2/ mode autocrine

3/ communication directe de cellule à cellule

4/ mode autocrine intracellulaire

(d'après Kelley, 1990).

L'action de ces cytokines et/ou facteurs de croissance peuvent s'exercer suivant un mode autocrine ou paracrine en vue de modifier le comportement des cellules adjacentes (Fig I.2.). Une même cellule peut synthétiser de nombreuses cytokines et/ou facteurs de croissance qui n'induiront pas nécessairement le même effet selon la présence d'autres cytokines et/ou facteurs de croissance, le type ou l'état d'activation des cellules sur lesquelles elles agissent (Elias et al., 1990). La croissance cellulaire est régulée à différents niveaux : la concentration en facteur de croissance, la densité des récepteurs membranaires pour ces facteurs de croissance, la capacité à internaliser et à autoréguler le récepteur en présence de son ligand et la transmission intracellulaire du signal. Si les effets de ces cytokines ou facteurs de croissance sont relativement bien connus, la cascade d'événements qui suit leur liaison au récepteur sont quant à eux souvent méconnus. On sait toutefois qu'il y a activation de toute une série de messagers intracellulaires qui dans certains cas, peut aboutir à l'expression de certains gènes impliqués dans la croissance cellulaire tels que les proto-oncogènes.

Les proto-oncogènes cellulaires sont des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération. Ils codent pour des facteurs de croissance, leurs récepteurs ou encore pour leurs messagers intracellulaires. On connaît des proto-oncogènes régulant positivement la prolifération cellulaire tels que les proto-oncogènes *c-fos* , *c-jun* et *c-myc*, tandis que d'autres tels que le proto-oncogène *Rb-1* codent pour une protéine ayant une action négative sur la prolifération. Diverses altérations de ces gènes peuvent entraîner une dérégulation de la croissance cellulaire. Il y a alors passage du proto-oncogène à l'oncogène. Par exemple : une mutation, une translocation ou la présence d'un promoteur fort, suite à un remaniement chromosomique, provoquant une surexpression de ce gène (Dodet, 1987). L'altération des proto-oncogènes codant pour ces multiples protéines qui interveniennent dans la régulation de la prolifération cellulaire, entraîne leur expression incontrôlée, provoquant une multiplication cellulaire autonome. Quatre mécanismes semblent exister permettant aux cellules de se diviser en l'absence de facteurs de croissance. Le premier est un mécanisme autocrine où la cellule produit ses propres facteurs de croissance qui se fixent aux

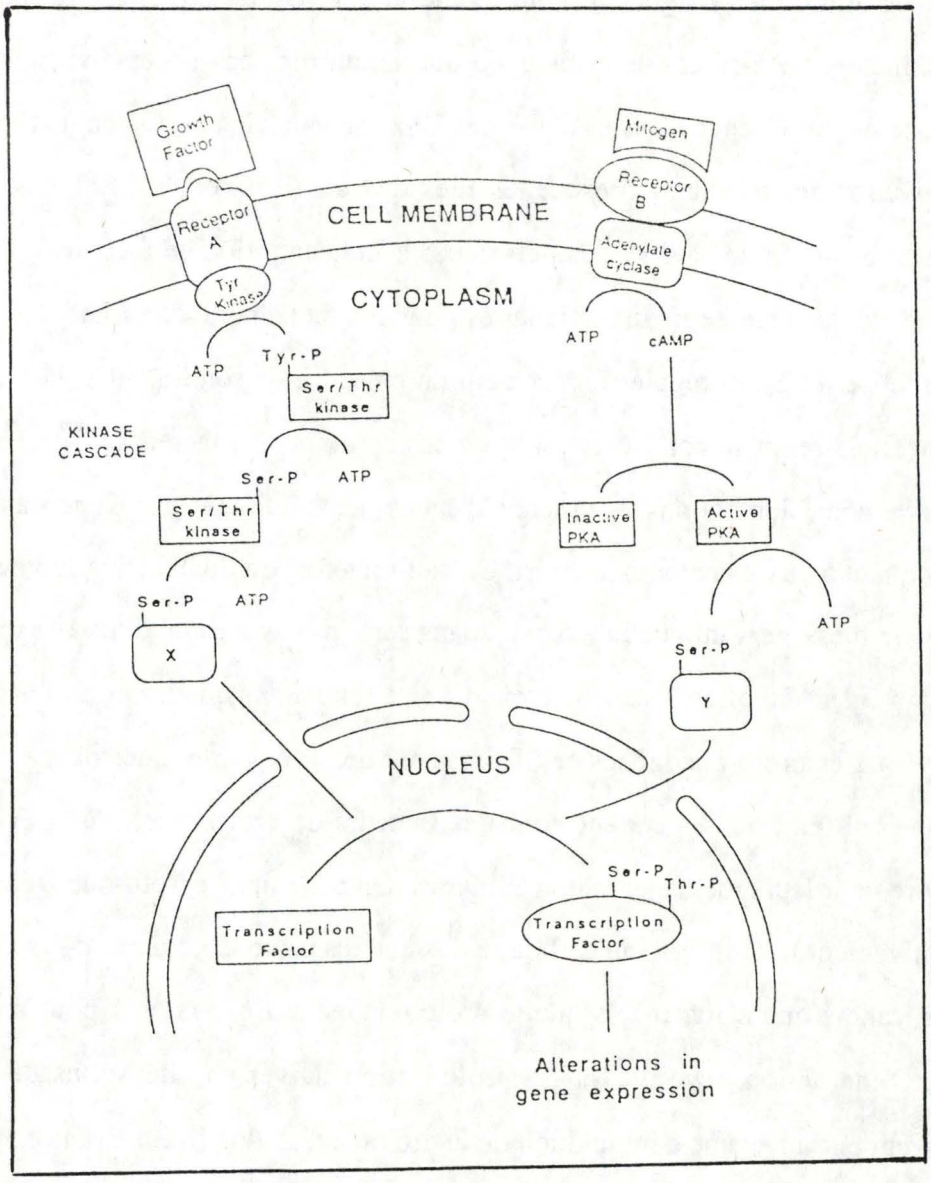


Fig. I.3. : Représentation schématique des voies de transduction du signal intracellulaire modulant l'activité des facteurs de tanscription par le biais de phosphorylations (d'après Jackson, 1992).

récepteurs de la cellule. Le second mécanisme implique des récepteurs membranaires, qui altérés se trouvent être activés en permanence, transmettant des signaux en l'absence même de ligand. Le troisième mécanisme se situe au niveau des protéines de transduction du signal, qui transmettront des messages n'ayant jamais été reçus. Finalement, le dernier mécanisme concerne les oncogènes nucléaires dont l'expression est normalement régulée par des facteurs de croissance. Une dérégulation de la transcription de ces gènes les libère de la dépendance aux facteurs de croissance (Dodet, 1987).

Comme nous l'avons signalé plus haut, peu de choses sont connues quant à la cascade des messagers intracellulaires chargés de transmettre l'information reçue au niveau de la membrane. On sait toutefois qu'un jeu de phosphorylations et de déphosphorylations, ou plus rarement de glycosylations et de déglycosylations joue un rôle dans cette transduction du signal (Fig. I.3.). Diverses expériences ont montré que la phosphorylation est la voie la plus communément utilisée : d'une part, de nombreux facteurs de transcription voient leur activité modulée suite à une phosphorylation, d'autre part, les voies de transduction du signal influençant l'activité des facteurs de transcription, passent souvent par une protéine kinase (Jackson, 1992). Ainsi, la liaison du proto-oncogène *c-jun* à l'ADN dépend d'une déphosphorylation des sites de liaison. Cette déphosphorylation serait médiée par la protéine kinase C (PKC), qui agirait soit en inhibant la glycogène synthétase kinase 3 (GSK-3) (qui in vitro phosphoryle le complexe *c-jun*), soit en activant des phosphatases. Par ailleurs, il a été montré que le remplacement d'un site phosphorylable par un autre qui ne l'est pas, a pour conséquence de provoquer une activation permanente de l'oncogène *c-jun*.. Suite à cela, l'action phosphorylante d'une "mitogen activated protein kinase" (MAP-kinase), active le complexe *c-jun* (Fig. I.4.). Ces MAP-kinases sont elles-mêmes activées par des produits protéiques de proto-oncogènes tels que *c-ras*.. On note également que le PDGF entraîne une cascade de phosphorylations aboutissant entre autres à la phosphorylation de cette MAP-kinase. Ce principe s'applique à de nombreux autres phénomènes biologiques.

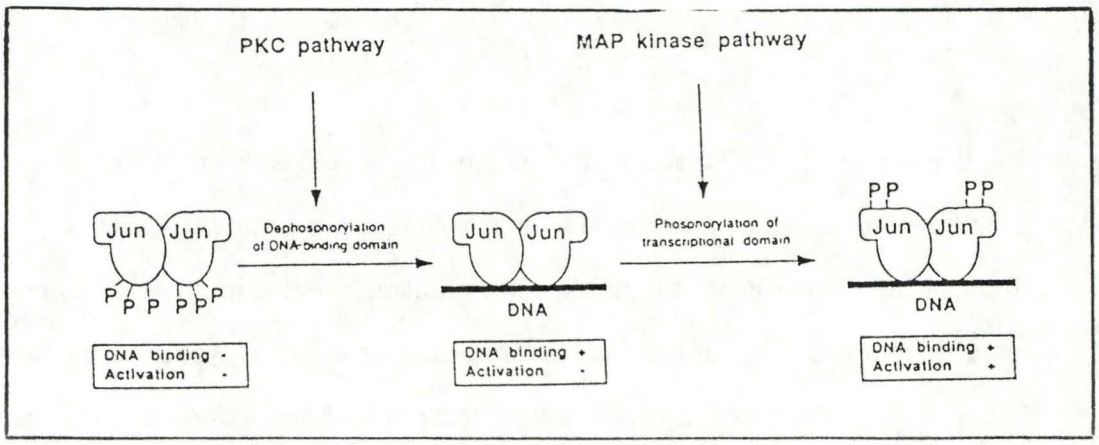


Fig. I.4. : Mécanisme de régulation de l'activité de l'oncogène c-Jun par la phosphorylation (d'après Jackson, 1992).

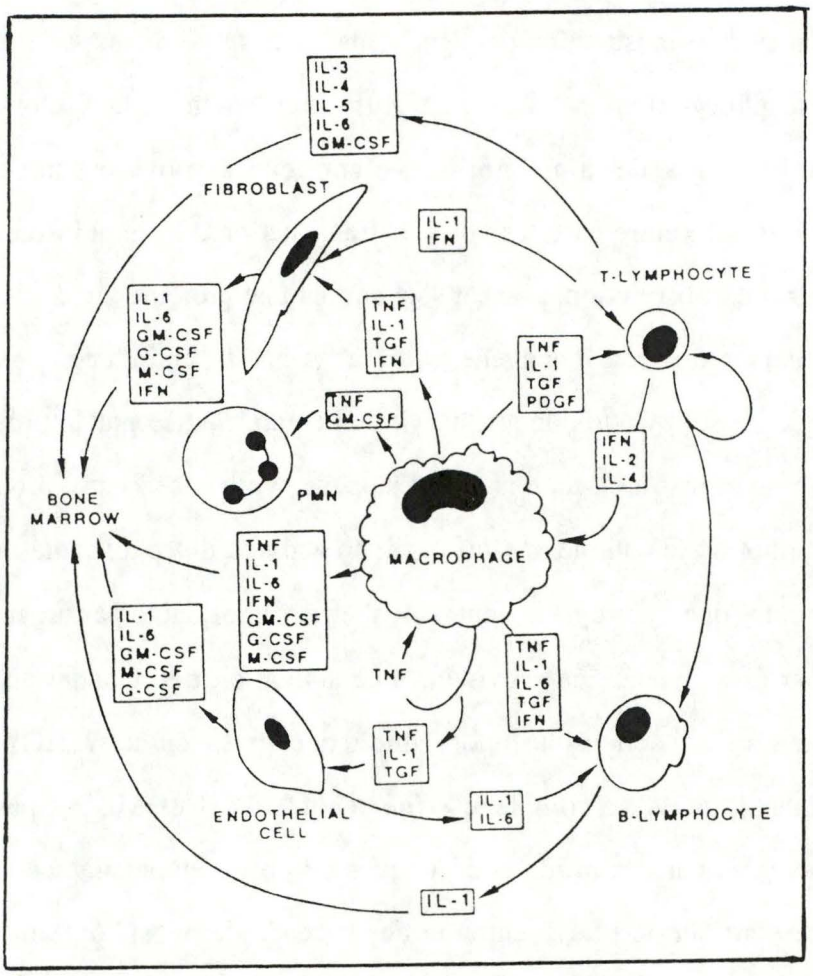
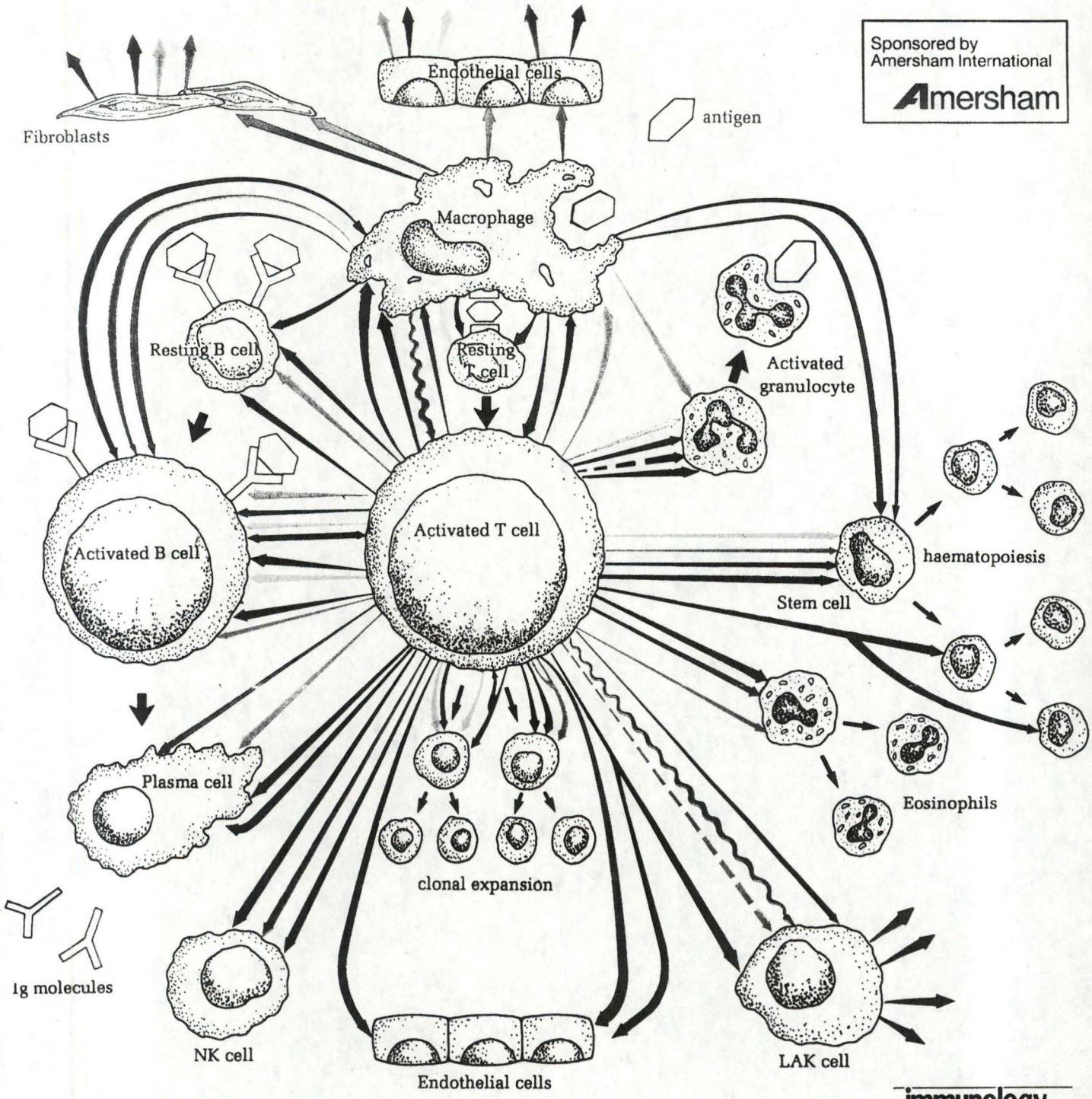


Fig. I.5 A. : Représentation schématique illustrant la complexité du réseau cytokinique (d'après Kelley, 1990).

	IFN-α	IFN-β	IFN-γ	TNF	LT	IL-1	IL-2	IL-3	IL-4		IL-6	IL-7	IL-8	G-CSF		GM-CSF	
Induce cellular antiviral state	YES[1]	YES[1]	YES[1]	YES[2]	YES[2]	YES[3]					NO[4]						
Mitogenic for various cells			YES[8]	YES[4]	YES[4]	YES[3]	YES[4]	YES[4]	YES[6]	YES[7]	YES[4]	YES[8]		YES[9]	YES[9]	YES[9]	YES[10]
Cytostatic for various cells	YES[11]	YES[11]	YES[12]	YES[13]	YES[14]	YES[15]					YES[16]						YES[10] NO[10]
Cytostatic for tumour cells	YES[11]	YES[11]	YES[17]	YES[13]	YES[14]	YES[18]											
Activate macrophages			YES[18]	YES[19]			YES[20]		YES[21]						YES[9]	YES[9]	
Stimulate granulocyte activity				YES[22]	YES[23]	YES[3]							YES[24]	YES[25]		YES[9]	
Stimulate eosinophil activity	NO[26]			YES[27]		NO[26]	NO[26]	YES[28]		YES[7]				NO[29]	NO[29]	YES[30]	
Stimulate NK cell activity	YES[31]	YES[32]	YES[33] NO[31]	NO[34]			YES[35]	NO[36]									inhibit[37]
Stimulate LAK activity	inhibit[38]	inhibit[38]	YES[38]				YES[39]	inhibit[40]	YES[41] NO[42]								NO[43]
Enhance MHC class I	YES[44]	YES[44]	YES[44]	YES[45]	YES[46]	NO[47]											
Enhance MHC class II	YES[48] NO[44]	YES[49] NO[44]	YES[44]	NO[46]					(B CELLS) YES[50]								
Activate B cells			inhibit[51]			????52			YES[53]	mouse YES[54]							
Stimulate B-cell proliferation	YES[55]	YES[55]	YES[55]	YES[56] NO[57]	YES[56]	YES[58]	YES[59]		YES[60]	mouse YES[61] NO[62]		YES[63]					inhibit[64]
Stimulate B-cell differentiation	YES[65]		YES[66]	YES[56] NO[57]	YES[56]	YES[58]	YES[59]	YES[67]	YES[68]	mouse YES[61] NO[62]	YES[69]						inhibit[64]
Stimulate isotype selection			IgG2a YES[70]						IgE,IgG1 YES[71]	IgA YES[72]							IgA YES[73]
Induce IgE receptors on B cells									YES[68]								
Activate T cells			?YES[74]			YES[3]	YES[75]		YES[76]		YES[77]						inhibit[10]
Stimulate T-cell proliferation	inhibit[12]		NO[12]	YES[78]		YES[79]	YES[80]		YES[81]		YES[77]	YES[82]				YES[9]	inhibit[83]
Stimulate T-cell differentiation							YES[80]				YES[84]						inhibit[85]
Induce ICAM-1			YES[86]	YES[87]		YES[88]	YES[4]										
Ind. chemotactic migration of cells				YES[89]									YES[90]			YES[91] NO[91]	NO[92] YES[93]
Activate endothelial cells			YES[93]	YES[93]	YES[93]	YES[93]											
Stim. production of ECM proteins																	YES[10]
Stim. osteoclast bone resorption				YES[94]	YES[95]	YES[96]											YES[10] NO[10]
Membrane form				YES[97]		YES[98] NO[99]											
Induce fever	YES[100]	YES[100]	YES[100]	YES[101]		YES[4]	YES[102]										
Induce acute phase proteins			YES[103]	YES[104]		YES[105]					YES[106]						
Adjuvanticity			YES[107]	YES[79]		YES[108]	YES[109]	YES[110]			YES[111]						
Stimulate angiogenesis *in vivo*				YES[112]	inhibit[113]												YES[10]
Anti-tumour activity	YES[114]	YES[114]	YES[114]	YES[4]	YES[115]	YES[116]	YES[102]										
Stimulate *in vivo* haematopoiesis						YES[117]		YES[118]						YES[119]		YES[120]	

Fig. I.5B. : Représentation du réseau cytokinique et des actions des différentes cytokines (d'après Balkwill, 1989).

Sponsored by
Amersham International
Amersham



immunology today
September 1989

Guide to Figure and Table

straight arrows ⟶ stimulatory wavy arrows ⇝ inhibitory dashed arrows - - - → contentious

Tout ceci montre bien que ces différents mécanismes de régulation ne sont pas simples, d'autant plus que bien souvent ils agissent en interaction les uns avec les autres. La diversité des réponses cellulaires est d'autant plus grande que le réseau "cytokinique" est d'une grande complexité (Fig. I.5.A.). On voit par exemple, qu'une même cytokine peut être mitogénique pour certaines cellules et cytostatique par exemple pour des cellules tumorales (Fig. I.5.B.).

1.2.1. Facteurs à action positive

Parmi le grand éventail de cytokines et de facteurs de croissance, certains ont attiré plus particulièrement l'attention de par leurs propriétés stimulantes. Ainsi, l'interleukine-1 (IL-1), le tumor necrosis factor α (TNFα) et le platelet derived growth factor (PDGF) entre autres, induisent la prolifération cellulaire. Cependant parmi ces facteurs, on distingue les facteurs de compétence comme le PDGF sont à eux seuls stimulateurs de la prolifération des facteurs de progression comme l'IL-1 sont en réalité de facteurs nécessitant au préalable l'action stimulante d'un autre médiateur tel que le PDGF pour exercer leurs effets (Thornton et al., 1990; Kovacs, 1991).

Il a été montré que l'IL-1 et le TNFα induisaient en outre chez les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes humains, la synthèse de prostaglandines, celles-ci contrecarrant par feed-back négatif l'effet pro-prolifératif de ces deux cytokines (Libby et al., 1988; Hori et al., 1991). En effet, lorsqu'on inhibe la synthèse endogène de prostaglandines par l'ajout d'indométhacine aux cellules stimulées par l'IL-1 ou le TNFα, on accentue l'effet pro-prolifératif de ces deux cytokines. En ce qui concerne les effets des prostaglandines ajoutées de manière exogène, leurs effets sur la prolifération cellulaire sont très controversés. Parmi ces prostaglandines, la prostaglandine E_2 (PGE_2) produit l'inhibition la plus forte alors que la prostaglandine D_2 (PGD_2) et la prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) n'ont qu'un faible effet inhibiteur sur la prolifération de fibroblastes (Hori et al., 1991). Par contre, Wickremasinghe (1988) et Durant et al. (1989) ont montré que les prostaglandines

pouvaient jouer un rôle mitogénique. Tel est le cas pour la $PGF_{2\alpha}$, la 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$ et la PGE_2, qui augmentent la prolifération de fibroblastes issus d'embryons de souris (Durant et al., 1989). Des résultats similaires ont été obtenus sur des cellules synoviales humaines en culture (Raes et al., 1993). D'autres résultats ont été obtenus par Tobey et al. (1990) pour lesquels, la PGE_2 stimulait la prolifération de fibroblastes de rats tandis qu'elle exerçait un effet négatif sur les fibroblastes de poumon humains.

Parmi les dérivés lipoxygénasiques de l'acide arachidonique, les leucotriènes B_4, C_4 et D_4 (LTB_4, LTC_4 et LTD_4) s'avèrent stimuler la prolifération de cellules musculaires lisses des artères de rats ainsi que celle de cellules synoviales humaines (Andreasen et al., 1990; Palmberg et al., 1991).

D'autres cytokines telles que le transforming growth factor β (TGFβ) pourraient avoir des effets pro- ou anti-prolifératifs, en fonction de leur concentration. Ainsi à faible concentration, le TGFβ aurait un effet pro-prolifératif tandis qu'à une concentration plus élevée, il contrecarrerait les effets du PDGF et de l'epidermal growth factor (EGF) sur les cellules mésangiales (Floege et al., 1991).

Outre l'action sur la prolifération cellulaire, l'IL-1, le PDGF, le TNF et le TGF stimulent généralement le métabolisme des cellules : on observe une augmentation de la production de divers constituants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, acide hyaluronique,...), d'enzymes dégradant cette matrice telle la collagénase, d'inhibiteurs de protéases et des métabolites de l'acide arachidonique par les fibroblastes pulmonaires (Wahl et al., 1989; Armento et al., 1991).

De nombreuses cytokines sont en outre capables d'induire à leur tour la synthèse d'autres cytokines ou facteurs de croissance par leurs cellules cibles. Ceci a été montré pour le TNF, stimulant la libération d'IL-1 chez les fibroblastes pulmonaires, de fibroblast growth factor (FGF), de PDGF et d'interleukine-6 (IL-6) chez les cellules synoviales humaines et les fibroblastes de poumon; l'IL-6 altère par rétro-action négative l'action de l'IL-1, du TNF, du PDGF et du

granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) sur les fibroblastes pulmonaires (Kelley, 1990; Arend et Dayer, 1990). L'IFNγ quant à lui est capable d'induire la libération d'IL-1, d'IL-6 et de TNF, le TGFβ celle du PDGF, du TNF, de l'IL-1 et du FGF par des macrophages activés (Wahl et al., 1989) et enfin le PDGF celle de l'insulin like growth factor (IGF) et de son récepteur (Antoniades, 1991).

D'autres effets modulateurs sont exercés par l'interleukine-2 (IL-2), l'interleukine-3 (IL-3), l'interleukine-4 (IL-4), l'interféron α (IFNα) mais aussi par l'IL-6, l'IFNγ et le TGFα. sur la prolifération de fibroblastes humains de poumon (Thornton et al., 1990).

Signalons cependant qu'in vitro, on teste généralement l'effet d'une cytokine à la fois; or dans l'organisme, les cellules sont exposées non pas à une cytokine mais à plusieurs. Il convient donc de les étudier en interaction avec d'autres. Vu sous cet angle, leurs actions peuvent être tout à fait inattendues : par exemple, Elias et al. (1990) ont montré que la présence simultanée de l'IL-1 et du TNFα exerçait un effet inhibiteur sur la prolifération des fibroblastes humains de poumon alors que chacune de ces deux cytokines prise individuellement s'avère avoir une action stimulante sur les fibroblastes. Ceci montre bien qu'il faut être très prudent avant d'attribuer un effet strictement pro- ou anti-proliferatif à une cytokine.

1.2.2. Facteurs à action négative

Afin de maintenir l'équilibre physiologique, d'autres médiateurs de la communication intercellulaire sont capables d'exercer un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire. Ainsi, pour l'interféron γ, bien que Butler et al. (1988) aient montré son effet positif sur la croissance de cellules synoviales humaines, en présence de TNFα, il peut diminuer la prolifération de ces mêmes cellules. De plus, Wahl et al (1989), ont montré qu'il pouvait agir comme régulateur de la production de facteurs de croissance par les macrophages et les monocytes.

L'EGF, malgré le rôle capital qu'il joue dans le phénomène de réépithélialisation, peut avoir un effet négatif sur la croissance de fibroblastes synoviaux humains (Butler et al., 1988).

Comme nous l'avons déjà signalé auparavant, certains dérivés de l'acide arachidonique peuvent avoir sur certains types cellulaires un effet anti-prolifératif. Par exemple, le thromboxane A_2 (TXA_2), tout comme la prostacycline (PGI_2) ou la PGE_2, peut inhiber la prolifération de cellules mésangiales de rat entre autres. L'action inhibitrice exercée par les prostaglandines de type E sur les fibroblastes 3T3, les lymphocytes B et les lymphocytes T, semble médiée par l'AMPc (Wickremasinghe, 1988).

Un autre exemple, parmi les dérivés lipoxygénasiques cette fois, est l'acide 15-hydroxyéïcosatétraénoïque (15-HETE) qui semble réguler de façon négative la prolifération de cellules synoviales, et ce par son action inhibitrice sur la 5-lipoxygénase (Andreasen et al., 1990; Herlin et al., 1990).

1.3. Dérégulation de la croissance cellulaire et fibroses pulmonaires

Toute rupture de l'équilibre existant entre les facteurs favorisant ou inhibant la prolifération cellulaire, provoque une dérégulation de la croissance cellulaire. Cette dérégulation peut se situer à différents niveaux : élaboration excessive de médiateurs positifs, augmentation du nombre de récepteurs membranaires aux facteurs positifs, diminution de facteurs négatifs, ...

Il existe malheureusement plusieurs situations pathologiques caractérisées par une dérégulation de la croissance des cellules, telles les tumeurs malignes. Mais dans ce travail nous nous focaliserons sur les fibroses, qui peuvent affecter divers organes tels le foie, rein, poumon, et qui résultent d'une prolifération excessive des cellules mésenchymateuses dans ces organes. Nous l'illustrerons pour les fibroses pulmonaires.

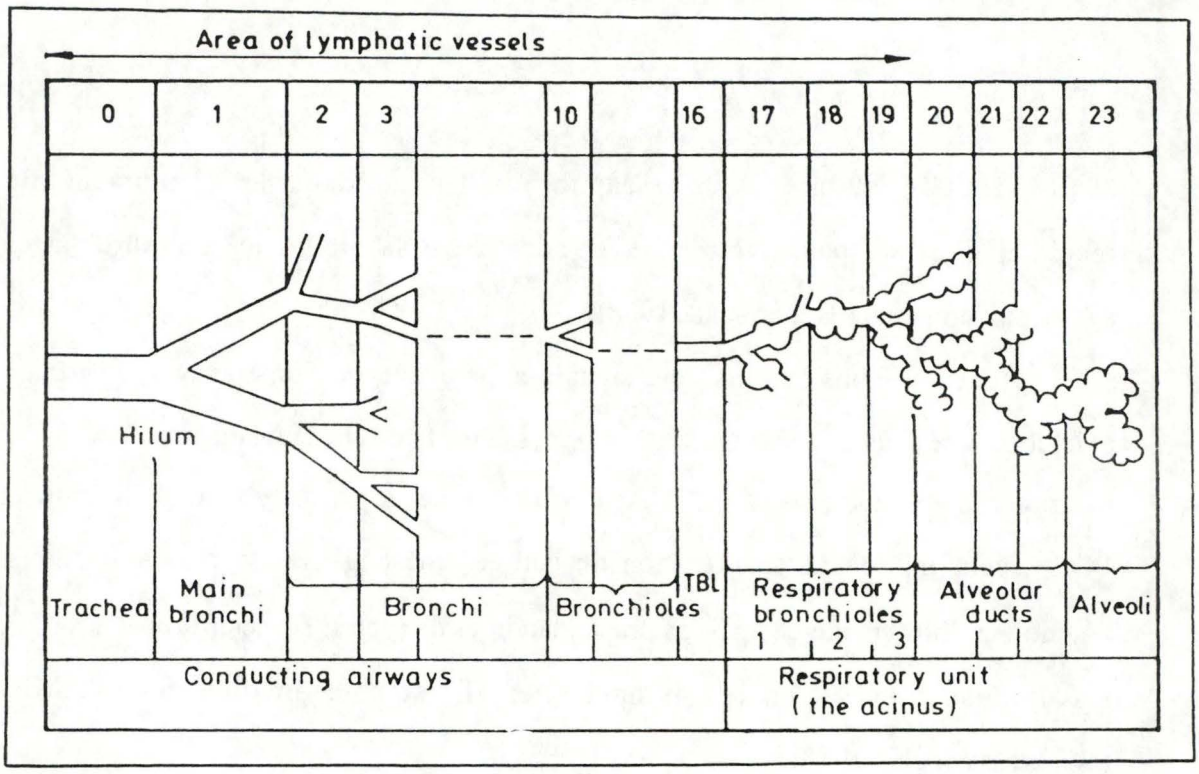


Fig. I.6. : Représentation schématique des voies respiratoires (d'après Parkes et al., 1982).

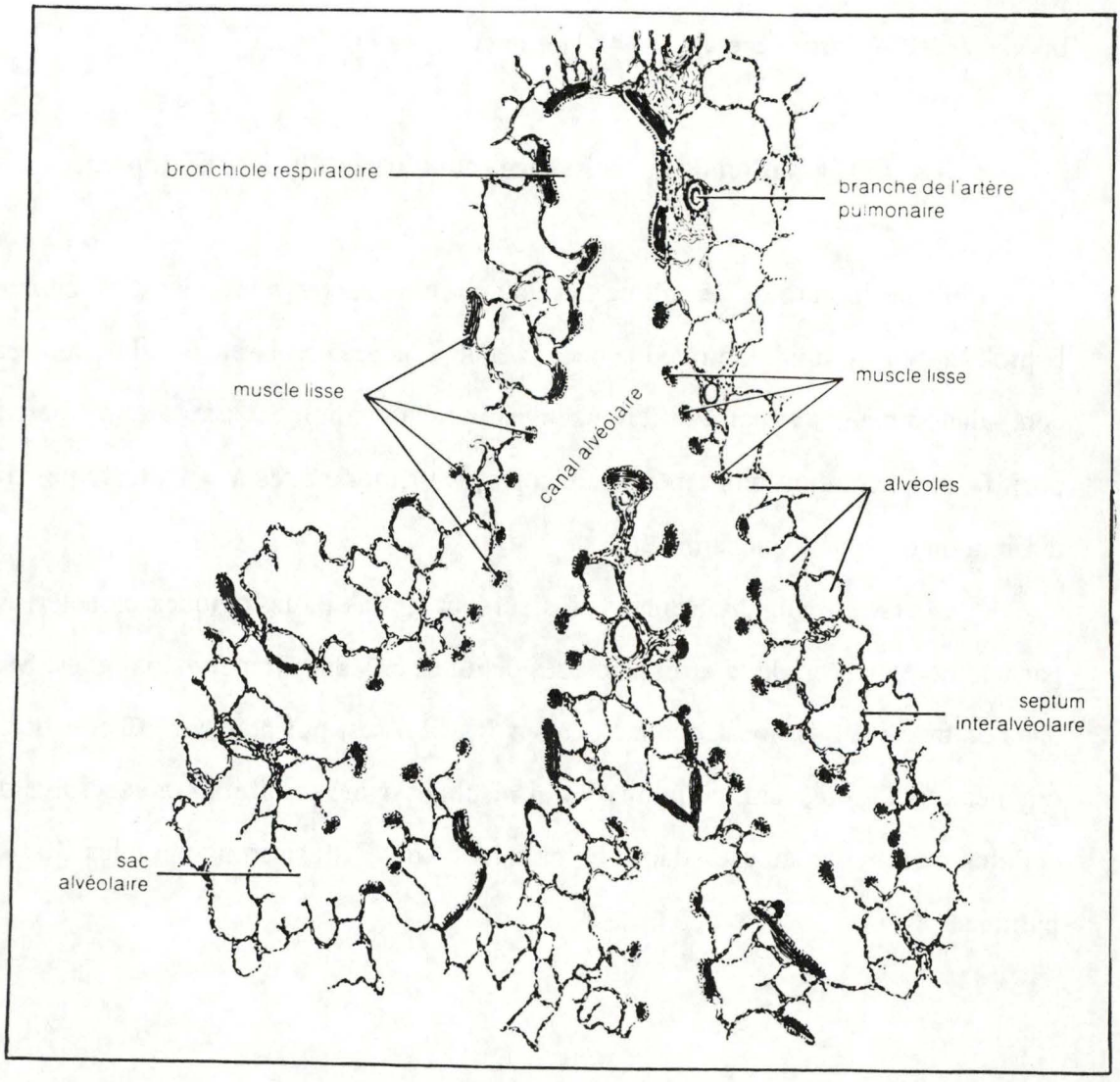


Fig. I.7. : Schéma d'une portion de l'arbre bronchique représentant les alvéoles (d'après Junqueira et Carniero, 1987).

Afin de bien comprendre la pathogenèse des fibroses pulmonaires, faisons un bref rappel de la structure anatomique du poumon en situation normale

1.3.1. Structure anatomique du poumon

L'appareil respiratoire comporte le poumon et un système de conduits qui relie le tissu pulmonaire au milieu extérieur environnant. Sa fonction est d'apporter l'oxygène au sang et de capter puis d'éliminer le gaz carbonique. Ces échanges gazeux se font au niveau des alvéoles respiratoires qui prennent naissance à partir des bronchioles respiratoires, des canaux et des sacs alvéolaires. Les alvéoles respiratoires constituent donc l'étape finale des divisions dichotomiques qu'ont subi les conduits respiratoires du tissu pulmonaire (Fig. I.6.). Du point de vue de leur structure, ce sont de petites poches ouvertes sur une face et semblables aux alvéoles d'une ruche (Junqueira et Carneiro, 1987). La paroi (ou septum) interalvéolaire est constituée de deux couches de cellules, elles-mêmes composées des pneumocytes de type II (qui secrètent le surfactant) dispersées entre les cellules épithéliales ou pneumocytes de type I (Fig. I.7. et I.8.). Ces deux couches de cellules sont séparées par des vaisseaux sanguins, des fibres de collagènes et élastiques, des fibroblastes, des macrophages et des lymphocytes en faible quantité. Toutes les cellules endothéliales sont doublées extérieurement par des pneumocytes de type I, leur membrane basale étant fusionnée aux points de jonction afin de réduire la barrière air/sang. Les capillaires et le tissu conjonctif constituent l'interstitium. Ce tissu conjonctif fournit un réseau de fibres qui définissent et maintiennent la structure des alvéoles (Weinberger et Crystal, 1982). Les fibroblastes interstitiels synthétisent une partie de ces fibres (collagènes et élastiques) ainsi que des glycosaminoglycanes de la structure fondamentale. Le collagène constitue 15 à 20 % du parenchyme pulmonaire; il s'agit essentiellement du collagène de type I et de type III. Une accumulation anormale de ce collagène ainsi que des fibroblastes conduit à la fibrose pulmonaire, phénomène fréquent puisque plus de cent entités pathologiques y sont associées.

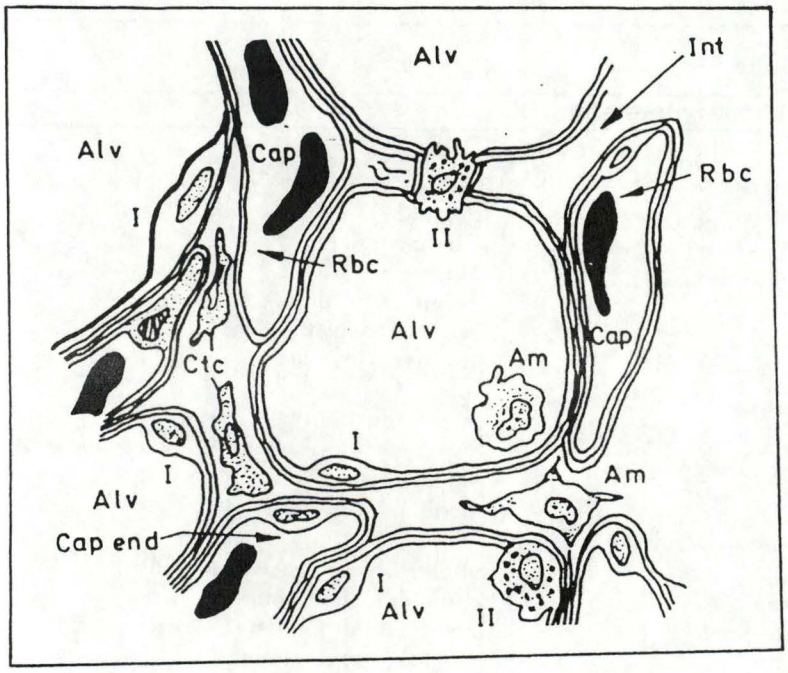


Fig. I.8. : Schéma illustrant les différents types de cellules présentes dans les alvéoles.

I = pneumocytes de type I

II = pneumocytes de type II

Ctc = cellules intersticielles (fibroblastes)

Am = macrophage alvéolaire

RBc = globule rouge

Cap end = capillaire et cellules endothéliales

(d'après Parkes, 1982).

TABLE 63-1

Causes of Pulmonary Interstitial Disease

- Idiopathic
- Environmental dusts
  - Silica
  - Asbestos
  - Sugar cane
  - Talc
  - Coal dust
  - Beryllium
- Drugs
  - Sulfonamides
  - Chlorothiazide
  - Bleomycin
  - Busulfan
  - *N*-Nitroso-*n*-methylurethane
- Infection
  - Miliary tuberculosis
  - Coccidioidomycosis
  - Histoplasmosis
- Physical
  - X-ray irradiation
  - Atelectasis
  - Aspiration of lipid
  - Chronic pulmonary edema
- Immunologic
  - Chronic
    - Sarcoid
    - Rheumatoid lung
    - Scleroderma
    - Sjögren's syndrome
    - Dermatomyositis
    - Lupus erythematosus
  - Acute
    - Hypersensitivity reactions
    - Farmer's lung (vegetable and animal dusts)
    - Bagassosis
    - Bird fancier's lung
- Neoplastic
  - Letterer-Siwe's disease of infants
  - Eosinophilic granuloma
  - Hand-Schüller-Christian disease
  - Lymphangitic carcinoma
- Specific cell reactions
  - Desquamative interstitial pneumonia
  - Lymphocytic interstitial pneumonia

Table I.1. : Tableau reprenant les causes de fibroses pulmonaires intersticielles (d'après Turino, 1980).

1.3.2. Fibroses pulmonaires

Les fibroses pulmonaires correspondent à une abondance anormale de tissu conjonctif dans le parenchyme, associée à des lésions inflammatoires tant septales qu'alvéolaires. Ces fibroses sont l'aboutissement d'affections pulmonaires très diverses et représentent une étape dans le processus de réparation qu'elles suscitent (Table I.1.). On distingue en général trois étapes dans le processus de réparation tissulaire : l'étape aiguë ou d'exsudation, l'étape de prolifération et l'étape de fibrose et de remodelage (Dunnill, 1990).

L'étape d'exsudation est caractérisée par un oedème alvéolaire faisant suite à une infiltration des cellules sanguines dans l'alvéole ainsi que par la formation d'une membrane hyaline. L'augmentation de la perméabilité de la paroi alvéolaire conduit à une exsudation de protéines (dont les immunoglobulines et le fibrinogène) et de débris cellulaires qui vont constituer la membrane hyaline. Cette membrane est soit directement en contact avec la membrane basale soit au dessus des pneumocytes de type II qui se multiplient pour tenter de reconstituer la paroi alvéolaire remplaçant ainsi les pneumocytes de type I nécrotiques (Fig. I.9.) (Spencer, 1982; Dunnill, 1990).

L'exsudat fibrineux intra-alvéolaire ainsi formé subit souvent une fibrinolyse et disparaît mais si la fibrinolyse est incomplète, la fibrine se contracte et la surface interne de l'alvéole ainsi rétractée se recouvre des cellules épithéliales et de fibroblastes proliférants. La maladie évolue dans ce cas vers un état de fibrose. Avant que l'organisation de la fibrine intracellulaire et que la collagénisation soient bien établies, la masse jeune de tissu fibroblastique prend la forme de bourgeons conjonctifs, appelés corps de Masson (Spencer, 1982). Ces derniers ressemblent aux lèvres d'une plaie qui se ressoudent, les fibroblastes se contractant et exprimant l'intégrine $\alpha 5$ (Kuhn, 1991). Dans l'interstice on observe une accumulation de neutrophiles, de lymphocytes, de cellules sanguines, d'éosinophiles et de macrophages.

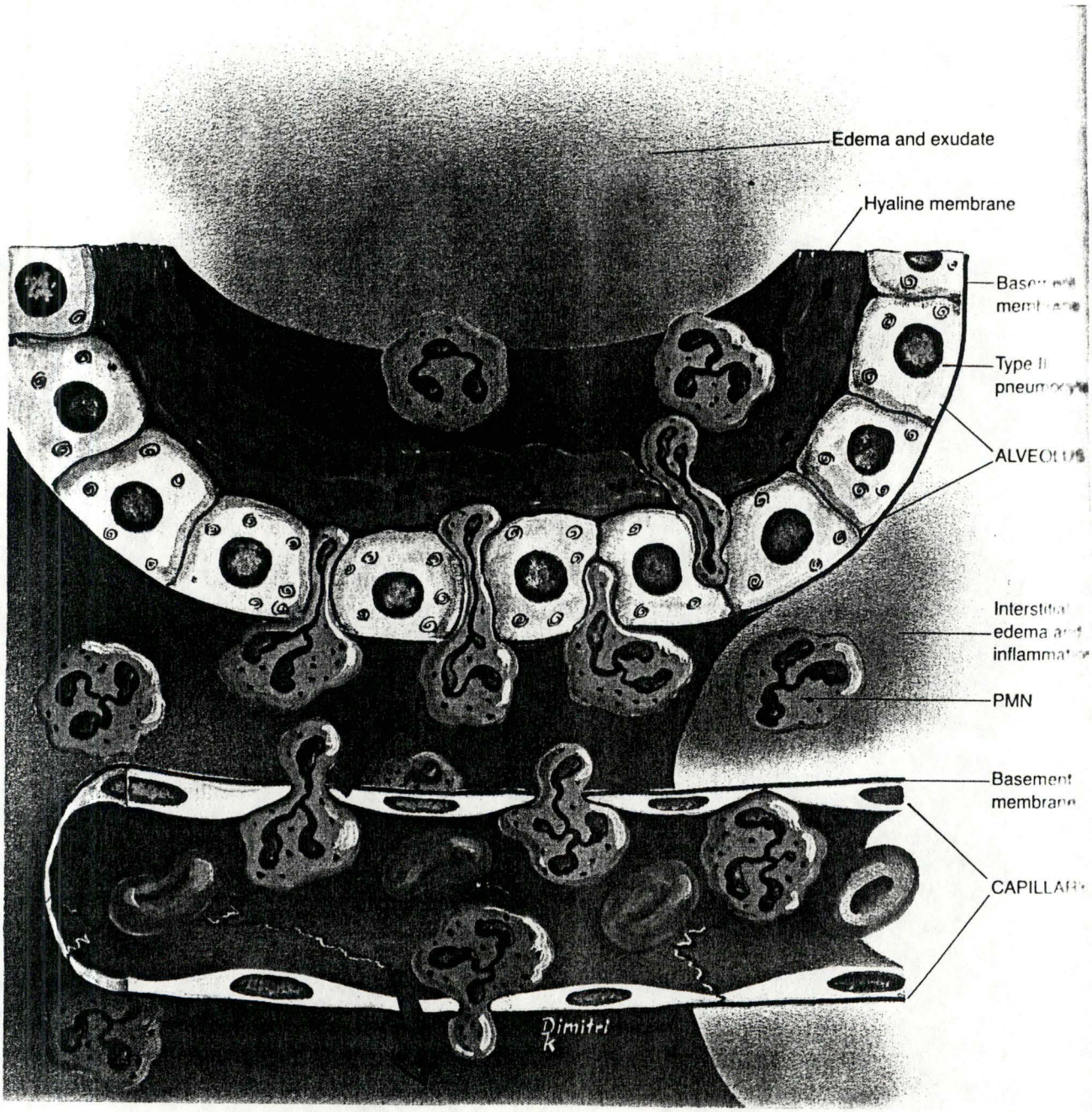


Fig. I.9. : Schéma illustrant les domages alvéolaires susceptibles de conduire à une fibrose (d'après Thurlbeck et Miller, 1988)

L'étape de fibrose et de remodelage est caractérisée par une désorganisation de l'architecture du parenchyme pulmonaire. Trois types d'évolution sont possibles : la première aboutit à la formation de nodules remplissant partiellement les espaces aériens, la seconde provoque une occlusion totale et la troisième correspond à une accumulation murale de l'exsudat intra-luminal et de tissu conjonctif, le tout étant recouvert d'un épithélium.

Le macrophage peut libérer au moins deux facteurs stimulant la prolifération des cellules mésenchymateuses, notamment le PDGF et le macrophage derived growth factor. De plus, le PDGF est un facteur chémotactique pour les neutrophiles, source d'enzymes et de dérivés de l'oxygène (Dunnill, 1990).

Le problème posé est donc de comprendre pourquoi dans certaines circonstances, le processus de cicatrisation aboutit et restitue la structure et la fonction pulmonaire, et pourquoi dans d'autres circonstances, il dégénère en fibrose affectant négativement la structure et la fonction pulmonaire. Le PDGF, facteur important de la phase de réparation tissulaire, a également été impliqué dans les fibroses pulmonaires (Marinelli et al., 1991).

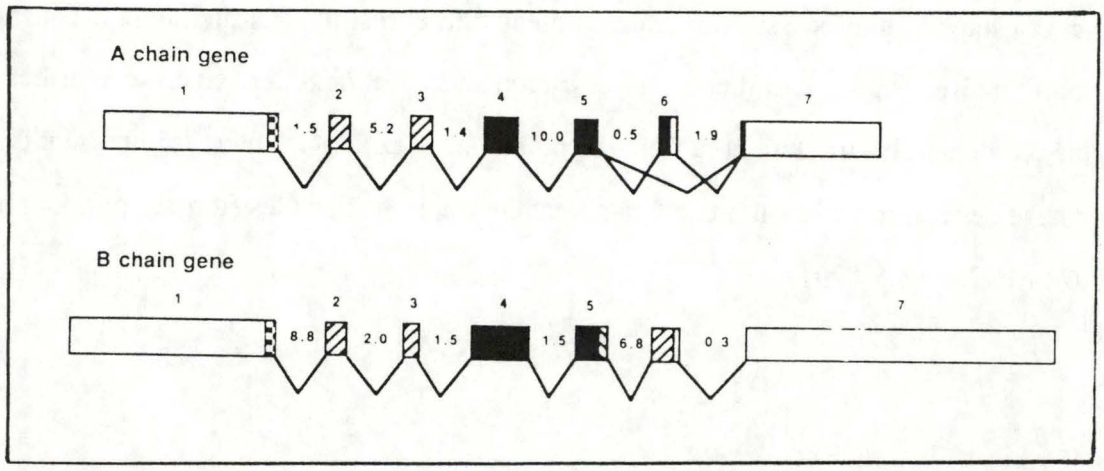


Fig. I.10. : Schéma illustrant l'organisation des gènes codant pour la chaîne A et B du PDGF. Les régions blanches correspondent aux séquences non transcrites. Les régions quadrillées correspondent aux séquences signal. Les régions hachurées correspondent aux séquences qui seront éliminées au cours du processus, et les régions pleines correspondent à ce qui sera transcrit (d'après Heldin et Westermark, 1989).

2. LE PDGF OU PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR

Le PDGF (platelet derived growth factor) ou facteur de croissance d'origine plaquettaire, est un facteur de croissance polypeptidique initialement décrit comme étant produit au niveau des mégacaryocytes et stocké dans les granules α des plaquettes. Il stimule la croissance de fibroblastes in vitro. En effet, on avait observé qu'un sérum riche en plaquettes stimulait la prolifération de fibroblastes tandis qu'un sérum dépourvu en plaquettes n'avait aucune action mitogénique. On sait actuellement que ce facteur est synthétisé par un bon nombre d'autres cellules dont les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales.

2.1. Caractéristiques biochimiques du PDGF et de son récepteur

Dimère de 30 kDa, le PDGF est composé de deux chaînes : A et B. Celles-ci se dimérisent en homodimères AA ou BB ou en hétérodimères AB. Dans les plaquettes humaines, la forme AB est retrouvée à 70 % et la forme BB à 30 % (Heldin et Westermark, 1989). Ces deux chaînes présentant 60 % d'homologie, ce qui plaide en faveur d'une origine ancestrale commune. Remarquons également que la séquence en acides aminés de la chaîne B est homologue de celle du produit du proto-oncogène c-sis (lui-même homologue cellulaire de l'oncogène viral du sarcome simien). La présence de 8 résidus cystéines par monomère, permettant une dimérisation par ponts disulfures, explique que la molécule reste stable même quand elle est exposée à de hautes températures, aux pH extrêmes ainsi qu'à de nombreuses protéases. De plus, cette dimérisation semble nécessaire pour assurer l'activité du PDGF (Pierce et al. 1991). Chez l'homme, le gène codant pour la chaîne A est localisé sur le chromosome 7. Cette chaîne A existe sous deux formes résultant d'un splicing alternatif (Fig. 1.10.). La chaîne B quant à elle est codée par un gène du chromosome 22. La régulation des deux gènes est indépendante et se fait aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel (Marinelli et al., 1991). En effet,

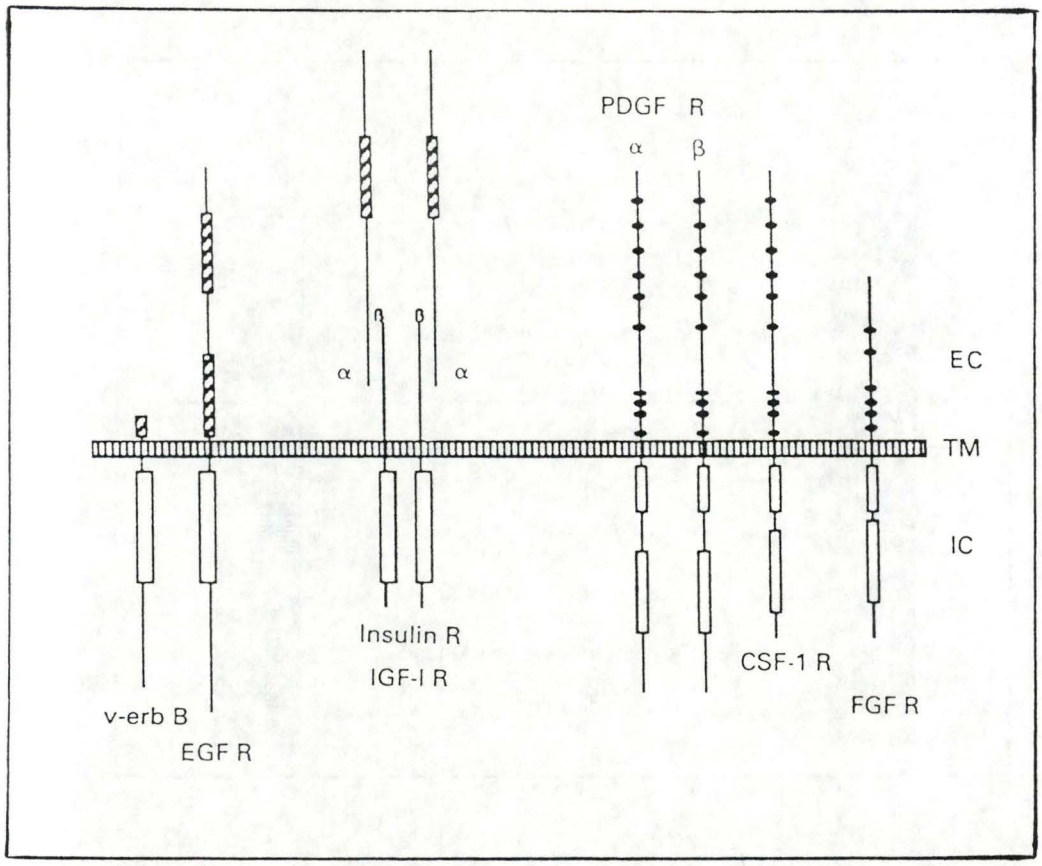


Fig. I.11. : Schéma représentant les différents récepteurs à activité tyrosine-kinase (d'après Daniel et Kumjian, 1992).

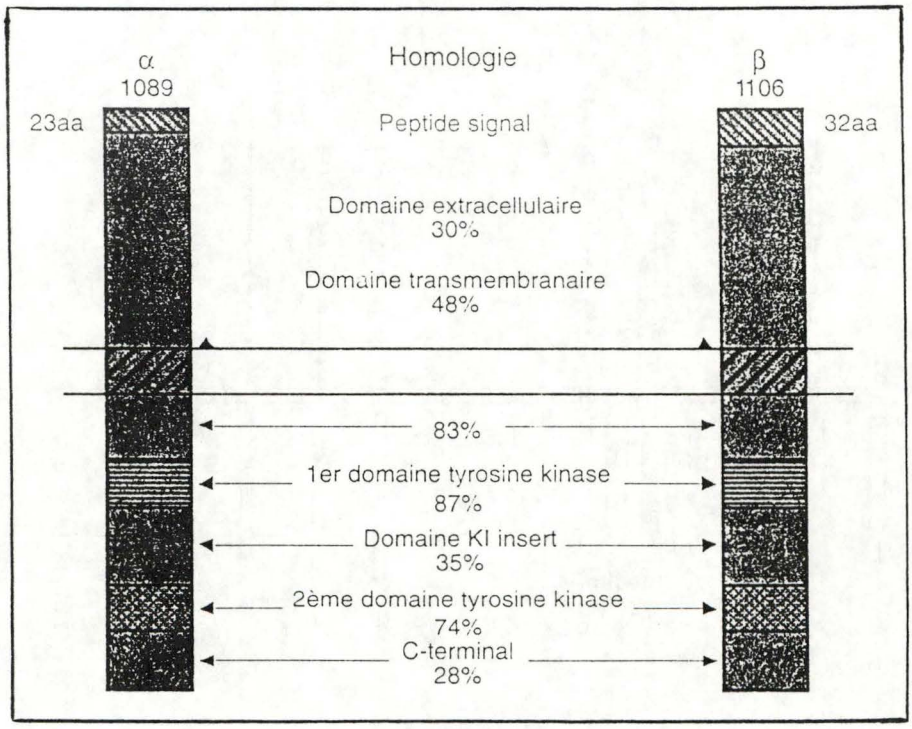


Fig. I.12. : Comparaison de deux sous-unités α et ß du récepteur au PDGF (d'après Bryckaert *et al.*, 1991).

les deux chaînes entrent dans la voie sécrétoire sous la forme de précurseurs et subissent un processing protéolytique.

Les activités biologiques des trois isoformes du PDGF dépendent de leur liaison à un récepteur membranaire exprimé par la cellule-cible. On distingue à l'heure actuelle deux types de récepteurs : le récepteur α et le récepteur β. Ces deux types de récepteurs sont codés par des gènes différents : le récepteur α est codé par un gène du chromosome 4 alors que le récepteur β est codé par un gène situé sur le chromosome 5. Des modifications post-traductionnelles telles que l'ajout d'oligosaccharides, produisent des récepteurs matures associés à la membrane et de taille semblable (de 170 à 180 kDa) (Olashaw et al., 1991). Bien qu'il n'y ait que 30% d'homologie de séquence en acides aminés, les deux récepteurs α et β sont structurellement très semblables (Olashaw at al., 1991). En effet, tous deux comportent trois domaines : un domaine extracellulaire, domaine de liaison du PDGF, comportant 8 sites de N-glycosylation pour le recepteur α et 11 sites pour le récepteur β, un domaine intra-membranaire et un domaine intracellulaire, ce dernier étant pourvu d'un activité tyrosine kinase permettant une auto-phosphorylation du récepteur. Parmi les récepteurs tyrosine kinase, le récepteur au PDGF ainsi que le récepteur du colony stimulating factor (CSF-1), diffèrent des récepteurs à insuline et à l'EGF (ou epidermal growth factor) par la présence au sein du domaine tyrosine kinase d'une région inter-kinasique (Fig. I.12.) (Daniel et Kumjian, 1992). On a localisé deux sites de phosphorylation, l'un sur la tyrosine 751 de la région inter-kinasique, l'autre concerne la tyrosine 857 du deuxième domaine tyrosine-kinase du récepteur au PDGF (Bryckaert et al. 1991). Des différences existent également entre les récepteurs α et β au niveau de leur affinité pour les différentes dimères du PDGF : le récepteur α lie les 3 isoformes du PDGF avec une haute affinité tandis que le récepteur ß lie uniquement le PDGF BB avec une haute affinité et le PDGF AB avec une faible affinité (Eriksson et al., 1992). Des travaux récents ont montré la nécessité pour ces récepteurs d'être sous une forme dimérique pour transduire le signal. Il y a donc trois types de récepteurs dimériques : un hétérodimère αβ et deux homodimères

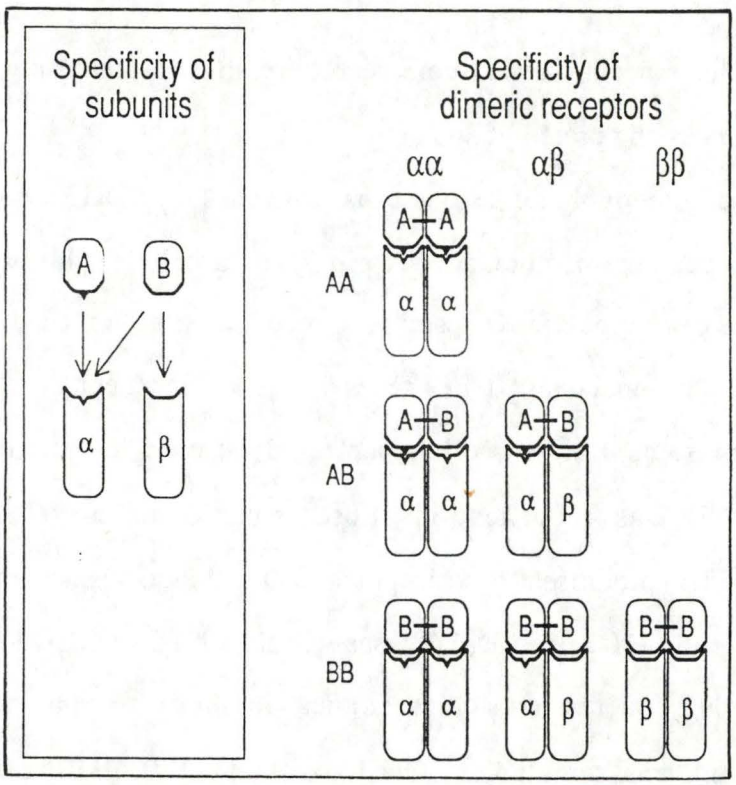


Fig. I.13. : schéma représentant les différents types de récepteurs au PDGF (d'après Bowen-Pope, 1991).

αα et ββ (Kelley, 1991). Ceux-ci montrant des affinités différentes dans la liaison du PDGF, on obtient selon ce modèle, toute une série d'interactions possibles entre les différents récepteurs dimériques et les 3 isoformes du PDGF (Fig. I.13.). La distribution de ces récepteurs varie selon le type cellulaire. Les fibroblastes humains expriment de manière prépondérante les récepteurs monomériques β, formant principalement des dimères ββ (qui ne lient uniquement que le PDGF BB), des dimères αβ (qui lient le PDGF AB et le PDGF BB) en moindre quantité et enfin très peu de récepteurs αα (lesquels peuvent lier les trois isoformes du PDGF) (Bowen-Pope et al., 1989).

2.2. La transduction du signal

Les cellules des organismes pluricellulaires, afin de maintenir une harmonie globale, communiquent entre elles et ce par l'intermédiaire de signaux chimiques. La plupart d'entre eux ne pouvant traverser la membrane plasmique de par leurs propriétés physico-chimiques, nécessitent des mécanismes de transduction, transformant les signaux externes en signaux internes à la cellule. Ces derniers portent le nom de messagers secondaires. Les signaux externes se fixent à des récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique, provoquant leur activation. Le récepteur ainsi activé transmettra l'information reçue par l'intermédiaire de protéines intracellulaires à des enzymes amplificatrices capables de générer des messagers secondaires. Cette amplification est capitale, générant des milliers de molécules effectrices suite à l'activation par une molécule signal externe (Fig. I.14.). La diffusion de ces seconds messagers permet une propagation rapide du signal à travers toute la cellule. Ensuite, l'inactivation rapide de ces messagers assure le retour des cellules à leur état de repos. Un nombre étonnamment petit de seconds messagers commandent des réponses cellulaires très diverses, indiquant que les voies de communication intracellulaires sont remarquablement universelles (Berridge, 1985).

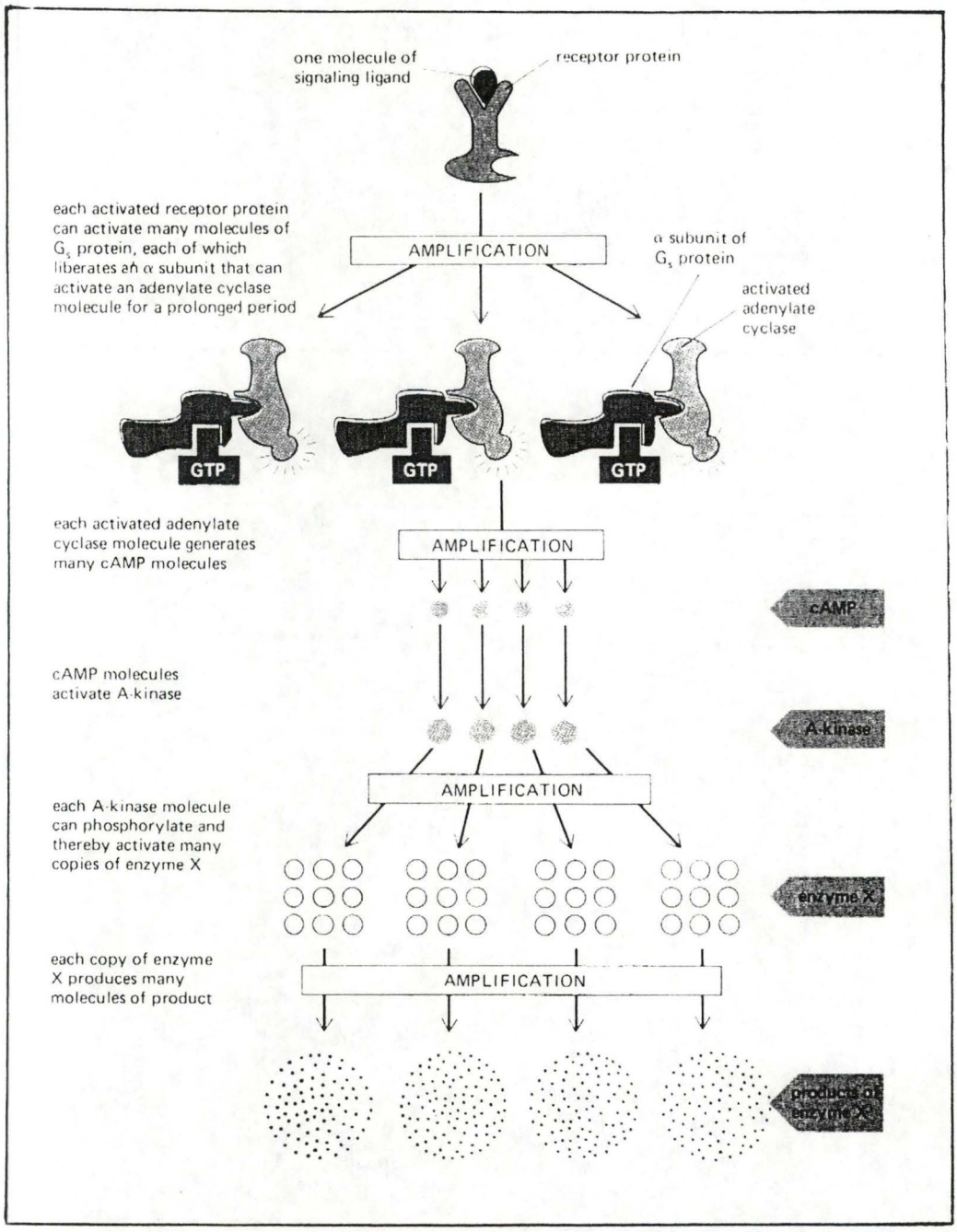


Fig. I.12. : Représentation schématique de la transduction du signal par les protéines G et de l'amplification intracellulaire du message via des enzymes amplificatrices (d'après Alberts *et al.*, 1989).

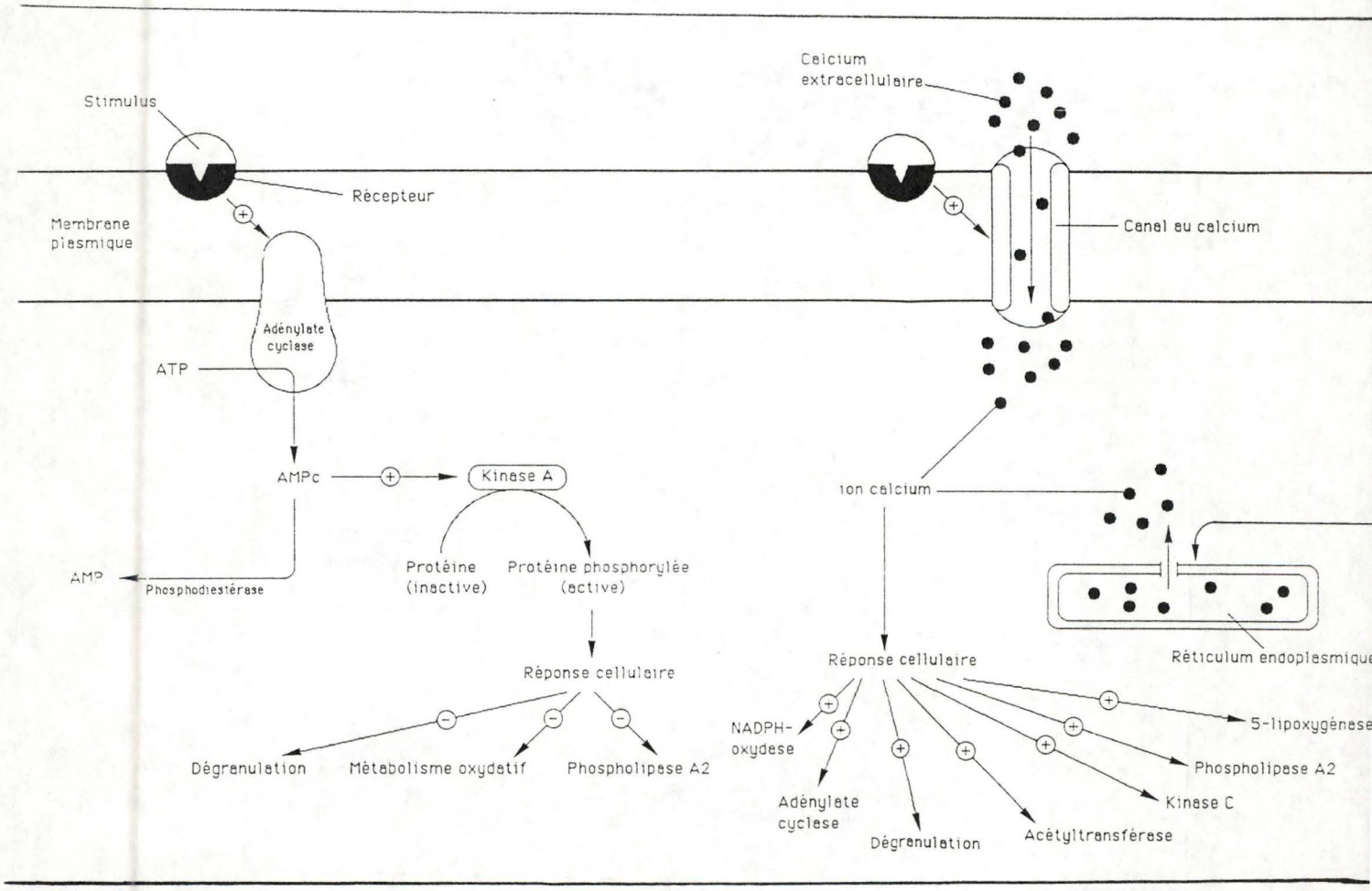
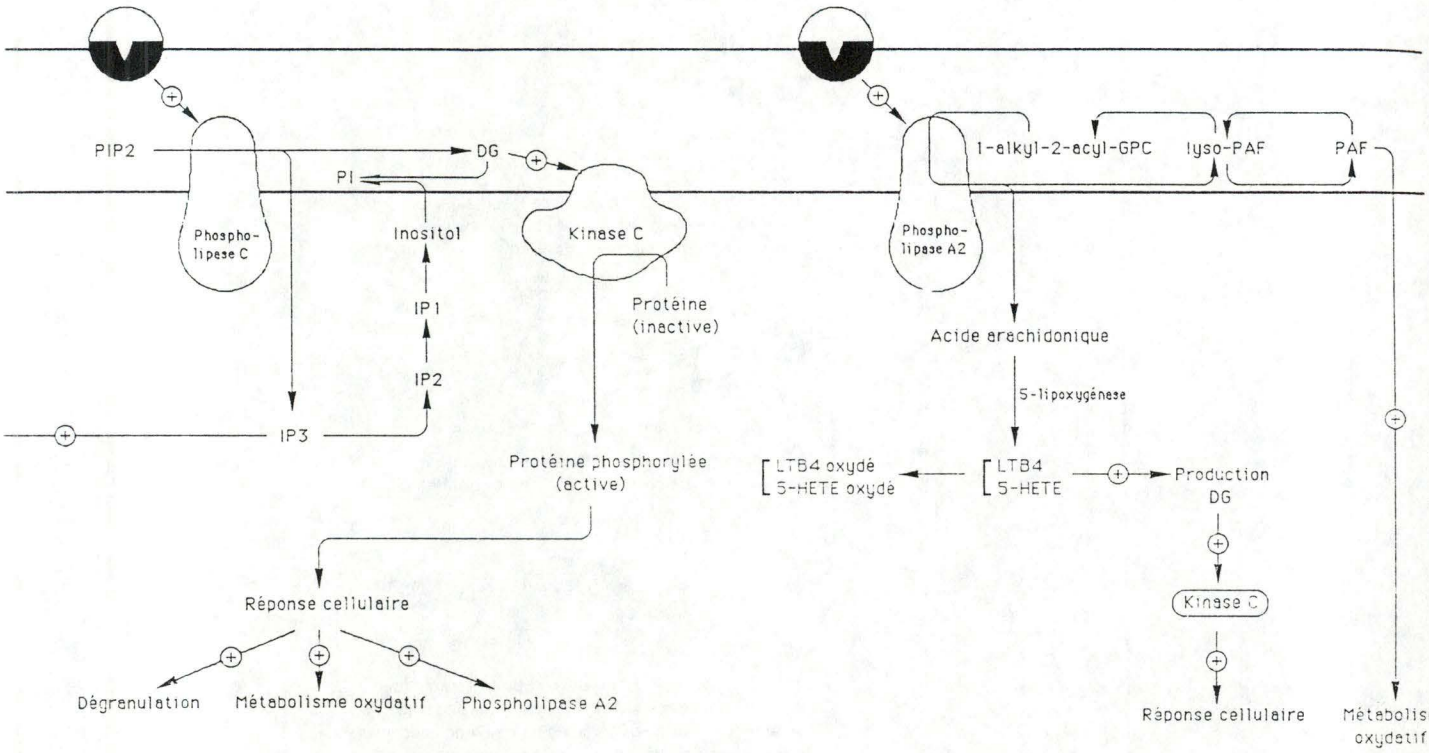


Fig. I.15. : Représentation schématique des voies de communication intracellulaire et de leurs interactions (d'après Remy, 1990).


PIP2
DG
PI
Phospho-
lipase C
Inositol
Kinase C
IP1
IP2
IP3
Protéine
(inactive)
Protéine phosphorylée
(active)
Réponse cellulaire
Dégranulation
Métabolisme oxydatif
Phospholipase A2
1-alkyl-2-acyl-GPC
lyso-PAF
PAF
Phospho-
lipase A2
Acide arachidonique
5-lipoxygénese
LTB4 oxydé
5-HETE oxydé
LTB4
5-HETE
Production
DG
Kinase C
Réponse cellulaire
Métabolisme
oxydatif

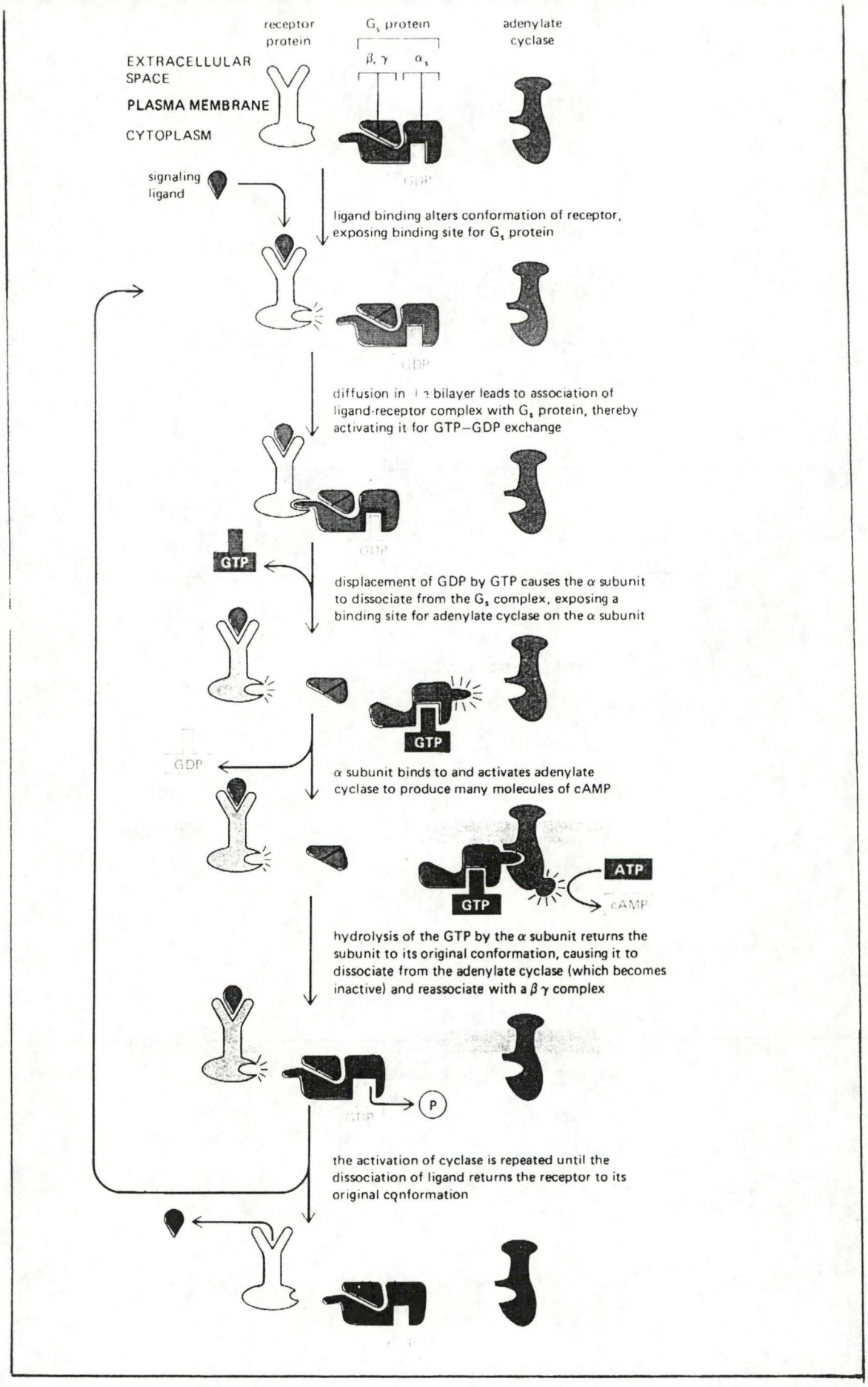


Fig. I.16. : Modèle décrivant la transduction du signal via les protéines G (d'après Alberts *et al.*, 1989).

2.2.1. Les différentes voies de transduction du signal

Actuellement, on connaît quatre voies principales d'activation cellulaire, la première faisant intervenir l'AMPc comme messager secondaire, la seconde le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP_3), la troisième l'ion calcium et la dernière l'acide arachidonique (AA) et ses dérivés. Ces voies ne sont pas exclusives l'une de l'autre. Au contraire, de nombreuses interférences sont décrites, ce qui complique l'étude des mécanismes d'activation cellulaire (Fig. I.15.).

2.2.1.1. La voie de l'AMPc

Lorsque le ligand se fixe à sa protéine réceptrice, il se produit un changement de conformation de celle-ci, qui en se repercutant à travers la membrane, permet l'association de ce récepteur avec le complexe des protéines de type G (Fig. I.16.). Le GDP qui se trouvait fixé à la protéine G inactive, pourra dès lors être phosphorylé pour donner un GTP. Cela provoquera la dissociation du complexe de la protéine G. La sous-unité α ayant fixé le GTP, ira à son tour moduler l'activité de l'adénylate cyclase, laissant derrière elle les sous-unités β et γ. Il existe deux types de protéines G, celles à effet stimulateur (Gs) et celles à effet inhibiteur (Gi) qui respectivement activent ou inactivent l'adénylate cyclase (Berridge, 1985) (Fig. I.17.). Cette enzyme, lorsqu'elle est activée, transforme l'ATP en AMPc. L'AMPc exerce alors ses effets en activant des enzymes spécifiques appelées protéine kinases AMPc dépendantes (PKA). En effet, en se fixant à la sous-unité régulatrice de ces protéines, l'AMPc provoque la libération de la sous-unité catalytique, qui peut dès lors phosphoryler des protéines (Scott, 1991). Bien que dans de nombreux cas les substrats de la PKA ne soient pas connus, il semblerait qu'ils diffèrent suivant le type cellulaire, ce qui explique les effets très variés de l'AMPc suivant la cellule cible (Burch et al., 1989; Hurme, 1990).

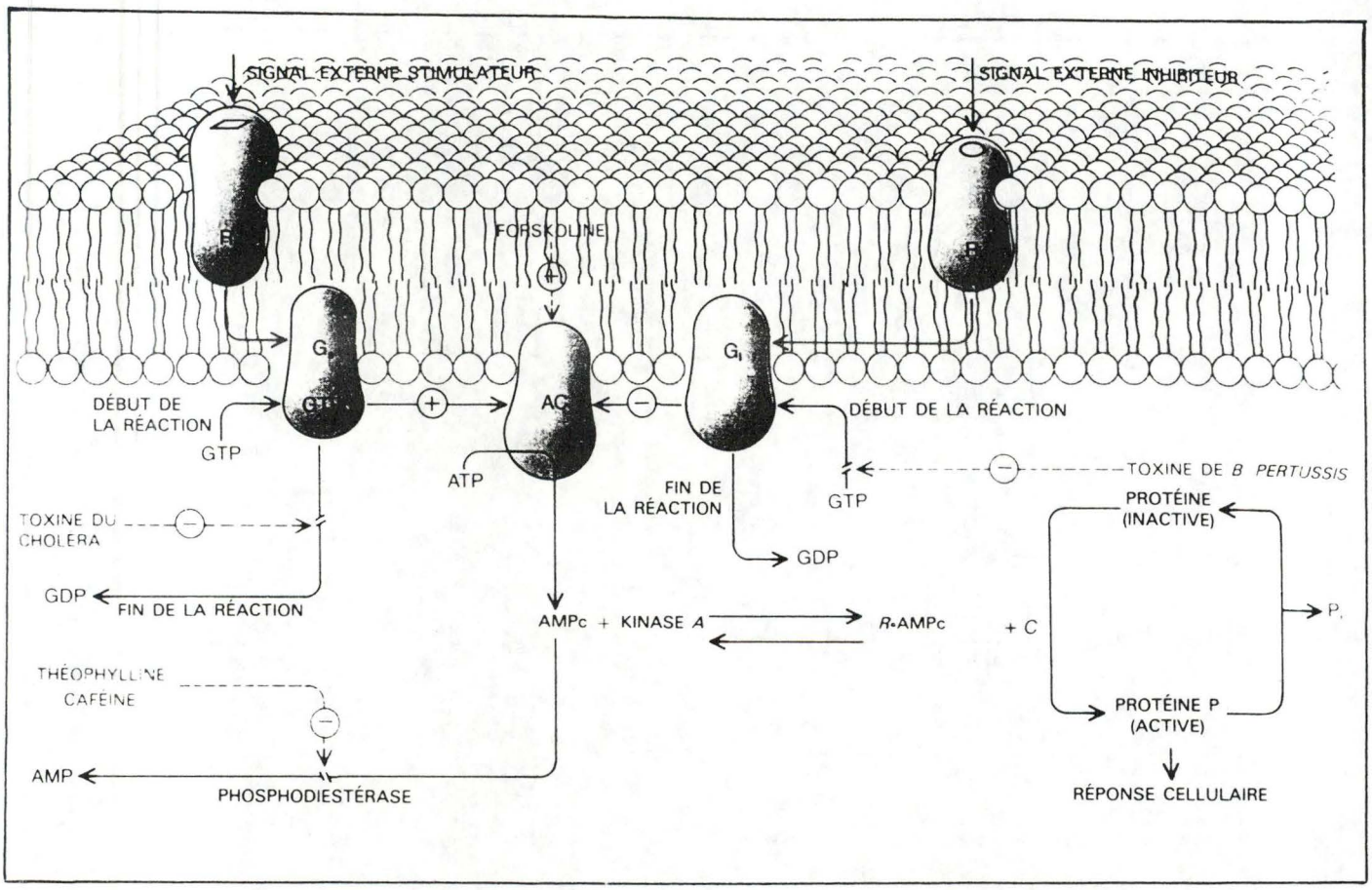


Fig. I.17. : Transmission du signal externe par voie de l'AMPc. Les signaux provenant des récepteurs stimulateurs (Rs) ou inhibiteurs (Ri) convergent vers l'adénylate cyclase qui transforme l'ATP en AMPc. Les protéines G, qui assurent ce couplage, sont activées par le GTP (début de la réaction) et inactivées lorsque le GTP est hydrolysé en GDP (fin de la réaction). Quant à l'AMPc, il se lie à la sous-unité de régulation (Rs) de sa protéine kinase dont il libère la sous-unité catalytique (c), qui peut alors phosphoryler des protéines responsables d'une réponse cellulaire donnée (d'après Berridge, 1985).

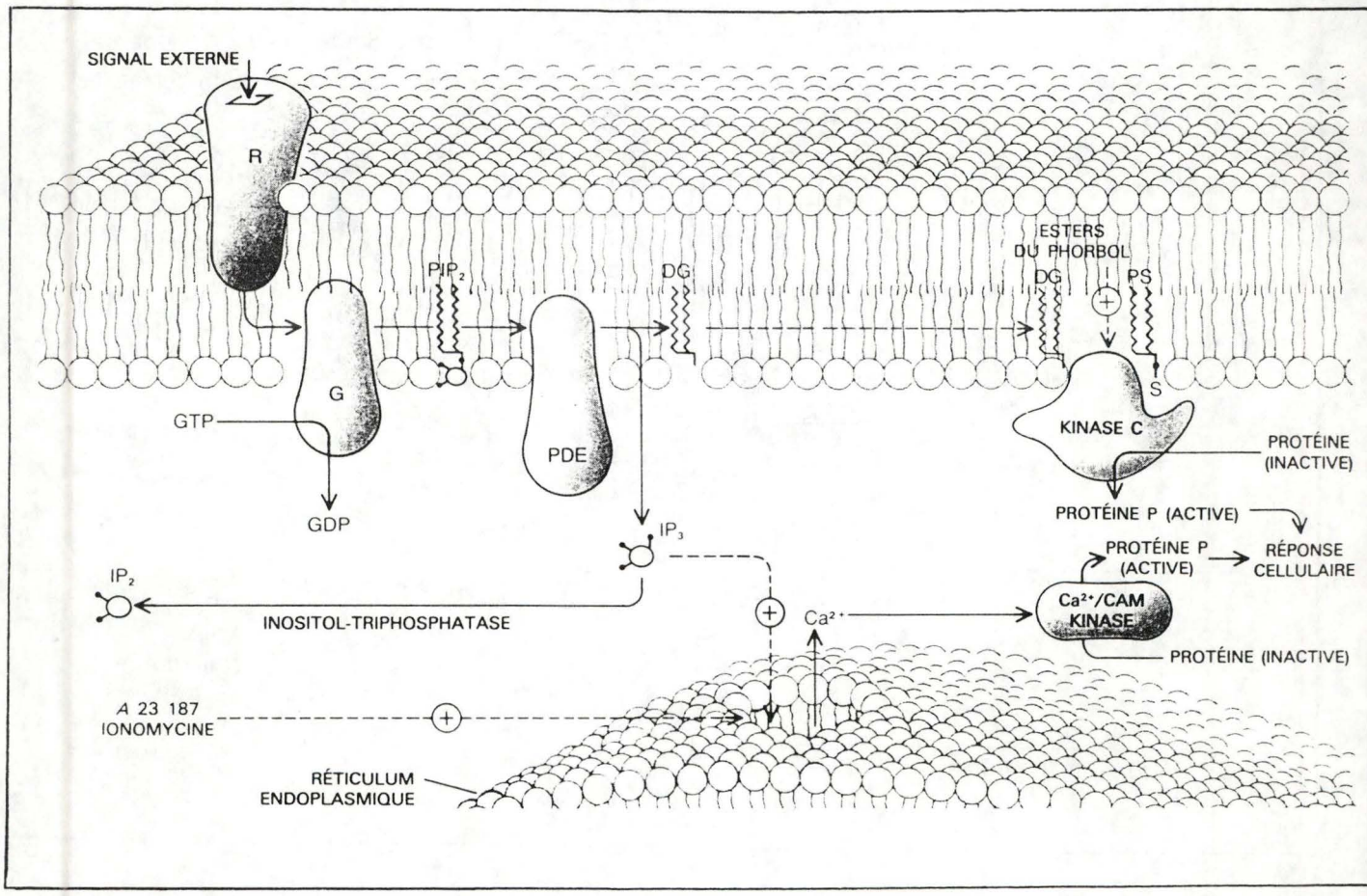


Fig. I.18. : Transmission d'un signal externe par l'intermédiaire de la voie des phosphatidyl inositols. Le messager externe se lie à des récepteurs (R) qui transmettent l'information par l'intermédiaire d'une protéine G (G) pour activer la phospholipase C ou la phosphodiestérase (PDE). La phospholipase C scinde le PIP_2 en deux messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate ou IP_3. Ce dernier est hydrosoluble et diffuse dans le cytoplasme où il libère les ions calcium stockés dans le réticulum endoplasmique ; les ions calcium libérés stimulent alors une série de réponses cellulaires. De son côté, le DAG reste dans la membrane où il active une protéine kinase C (PKC). Un phospholipide de la membrane, la phosphatidylsérine (PS), est un cofacteur . La PKC phosphoryle alors certaines protéines qui, rendues actives, peuvent initier certaines fonctions cellulaires (d'après Berridge, 1985).

2.2.1.2. La voie du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol tri phosphate (IP_3)

Le phosphatidyl inositol, phospholipide présent dans la couche interne de la membrane peut être transformé en phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate (PIP_2), possèdant trois groupements phosphates au lieu d'un seul (Berridge, 1985).

En réponse à des signaux externes, la phospholipase C (PLC) activée via une protéine G, hydrolyse le PIP_2, conduisant à la formation de deux messagers intracellulaires : l'inositol triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG) (Fig. I.18).

Le diacylglycérol provoque la translocation membranaire de la protéine kinase C (PKC) du cytoplasme à la face interne de la membrane plasmique. L'activation de la PKC est promue par le calcium et la phosphatidylsérine. La PKC ainsi activée phosphorylera de nombreux substrats. Parmi ceux-ci, on compte le complexe lipocortine-phospholisase A_2 (PLA_2). La PKC phosphorylerait la lipocortine, entraînant la dissociation du complexe. La PLA_2 ainsi libérée de la lipocortine se trouverait alors activée (Kaiser et al., 1990). Sous cette forme, la PLA_2 est capable d'hydrolyser des phospholipides membranaires libérant l'acide arachidonique (AA) qui pourra être métabolisé suivant différentes voies donnant lieu aux prostaglandines, aux leucotriènes et aux acides hydroxyéïcosatétraénoïques. L'activation de la PLA_2 dépendrait donc de la voie de l'IP_3 et du DAG et par conséquent de la voie du calcium.

L'IP_3 quant à lui provoque une décharge calcique à partir des sites de stockage intracellulaires (Downes et Carter, 1990).

Ayant rempli leur fonction de messagers secondaires, le DAG et l'IP_3 sont recyclés, l'un par le cycle des lipides, l'autre par une série de réactions constituant le cycle de l'inositol phosphate. Les deux branches du cycle se rejoignent afin de reconstituer le PIP_2 (Fig. I.19.) (Berridge, 1985).

On connaît actuellement au moins cinq isoenzymes de la PLC, chaque forme aurait une fonction différente et serait soumise à une régulation via des récepteurs

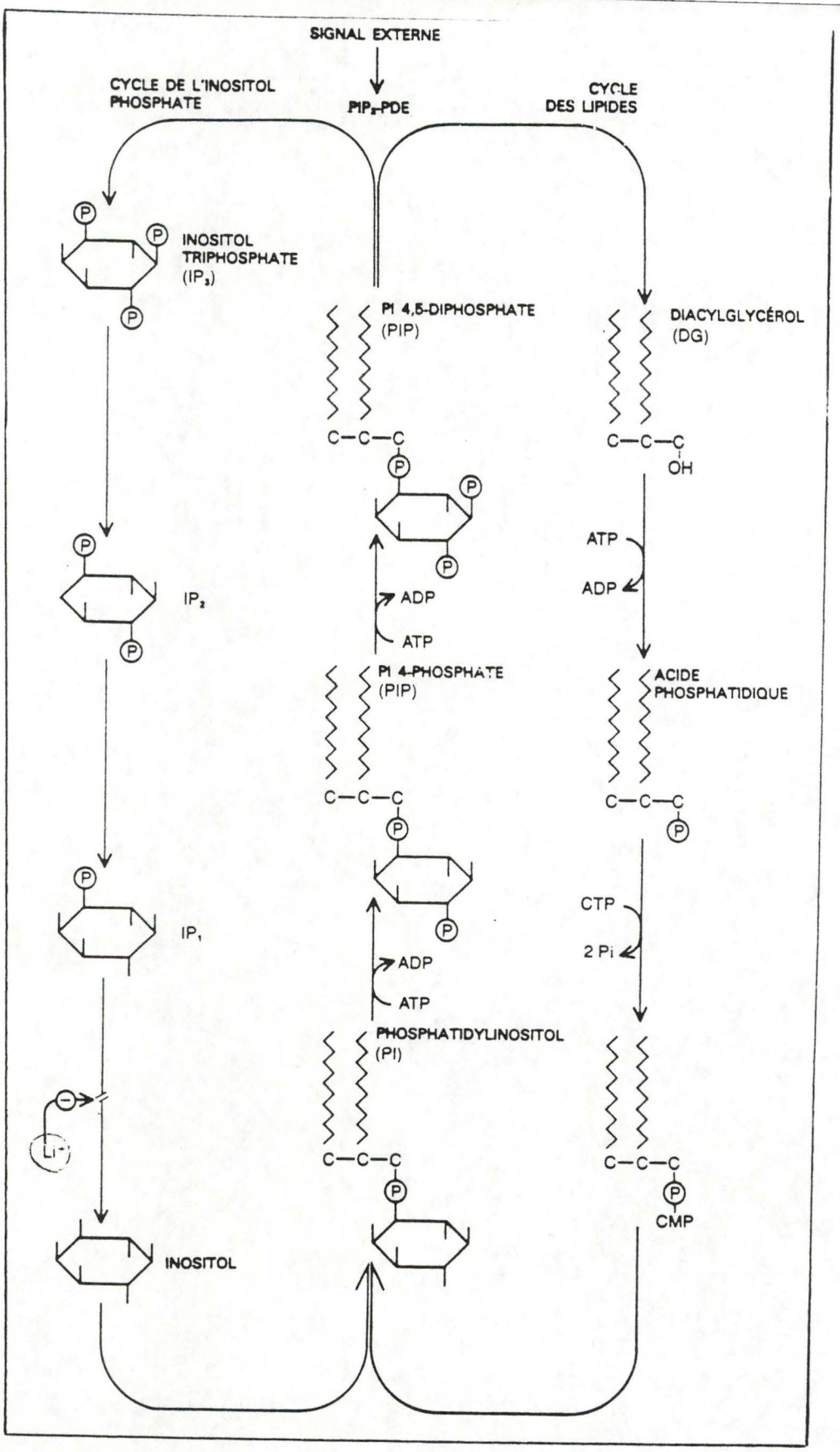


Fig. I.19. : Représentation du cycle métabolique des phosphatidyl inositols mis en route par l'intermédiaire de l'enzyme PIP2-phosphodiesterase (PIP2-PDE) ou phospholipase C. CTP = cytosine triphosphate (d'après Berridge, 1985).

différents. Ainsi on admet que la PLCγ soit un substrat pour des récepteurs de type tyrosine kinase tels que les récepteurs au PDGF ou à l'EGF (Downes et Carter, 1990).

2.2.1.3. La voie du calcium

Un troisième mode de transduction du signal à travers la cellule est celui faisant intervenir le calcium (Ca^{2+}).

Les cellules disposent d'un ensemble de mécanismes pour moduler la concentration en ions calcium : elles établissent le passage de ces ions a travers la membrane plasmique, la membrane interne des mitochondries et les membranes des compartiments de réserves en calcium que sont les calciosomes et le réticulum sarcoplasmique (Rasmussen, 1989).

La sensibilité élevée des cellules à de petites modifications en calcium résulte d'une concentration intracellulaire très faible (de l'ordre de 10^{-7} M).

Suite à une stimulation par un signal externe, il se produit une augmentation intracellulaire en ions calcium. Ces ions se fixent alors à des protéines du cytosol telles que la calmoduline (récepteur spécifique du calcium). Les complexes calcium-protéines ainsi formés interagiraient à leur tour avec d'autres protéines, modifiant ainsi leur fonctionnement (Rasmussen, 1989). La PKC par exemple est une protéine kinase calcium dépandente qui une fois activée, phosphorylera d'autres substrats. Lorsque la concentration intracellulaire en calcium redevient normale, les ions calcium se détachent de leurs protéines "réceptrices" et le système s'arrête.

2.2.1.4. La voie de l'acide arachidonique

Une autre voie d'activation cellulaire connue surtout chez les cellules inflammatoires telles que les neutrophiles, mastocytes ou macrophages, est la voie de l'acide arachidonique.

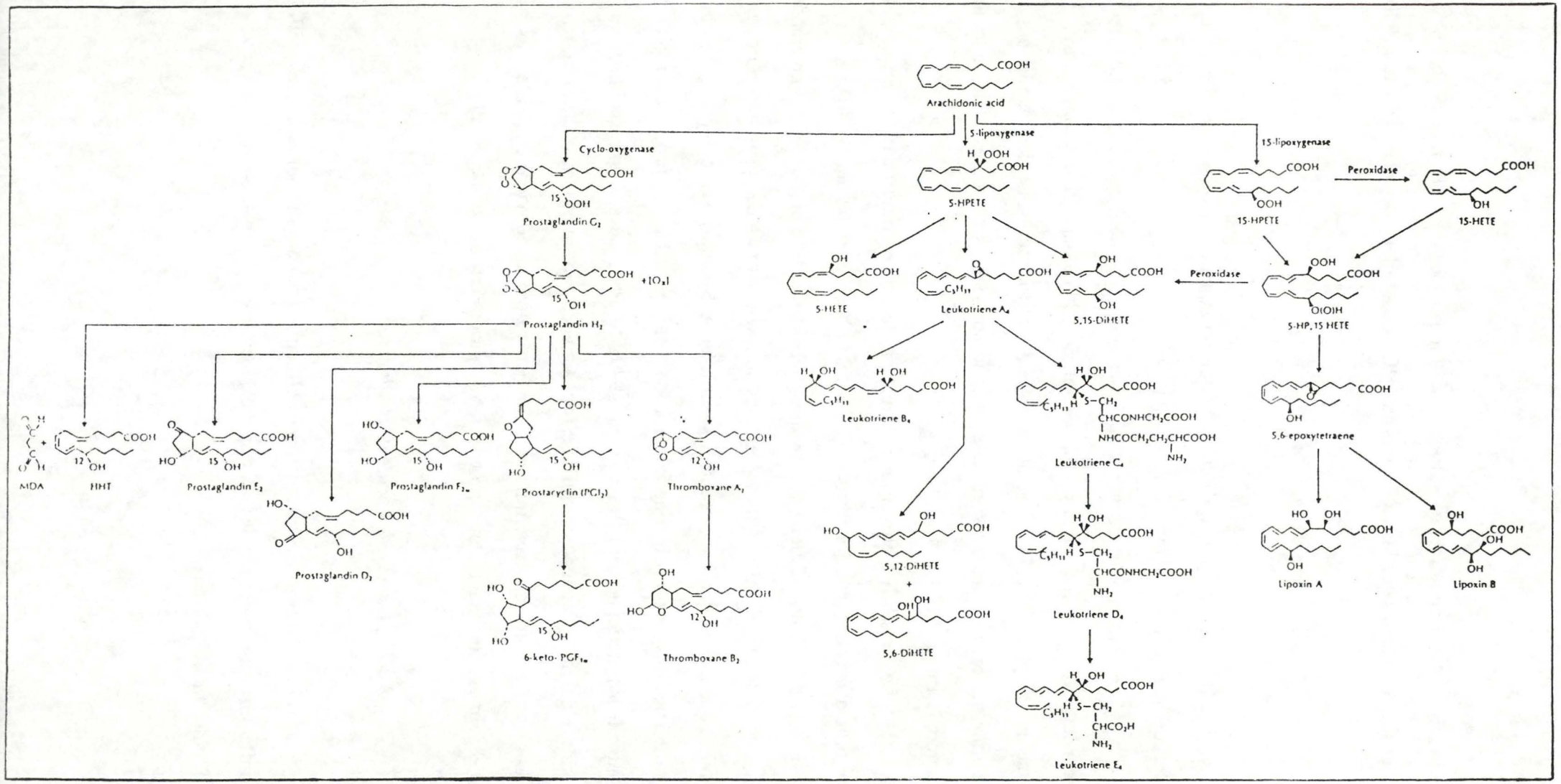


Fig. I.20. : Voies métaboliques de l'acide arachidonique via la cyclo-oxygénase et les lipoxygénases (d'après Klein, 1990).

Une phospholipase A_2 (PLA_2), localisée généralement dans la membrane plasmique et dans la membrane du réticulum endoplasmique, hydrolyse le groupement 2-acyl des phospholipides. L'acide arachidonique est le phospholipide préférentiellement libéré du fait de sa position en 2-acyl des phospholipides (Crastes de Paulet, 1983). L'acide arachidonique peut ensuite être métabolisé suivant deux voies enzymatiques différentes.

La première voie dite cyclooxygénasique, provoque une cyclisation de la molécule d'acide arachidonique, à partir de laquelle sont fabriquées les prostaglandines et le thromboxane.

La seconde voie, lipoxygénasique, induit la synthèse de leucotriènes et d'acides mono hydroxyéïcosatétraénoïques (Gualde, 1986) (Fig. I.20.).

Dans le premier cas, la cyclooxygénase ou prostaglandine endoperoxyde synthétase convertit, par un mécanisme radicalaire, l'acide arachidonique en PGH_2, prostaglandine instable, qui à son tour sera convertie par les prostaglandines-endoperoxyde isomérase en PGD_2, PGE_2 et $PGF_{2\alpha}$. Il existe deux autres possibilités de transformation de la PGH_2 : d'une part sa transformation par la TXA synthétase en TXA_2, se stabilisant en tromboxane B_2 (TXB_2) (cette synthèse ne se réalisant que dans certaines cellules dont les plaquettes), et d'autre part son utilisation comme substrat par la prostacycline synthétase aboutissant à la synthèse de PGI_2, rapidement transformée en son dérivé stable la 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$.

Dans le second cas, la 5-lipoxygénase convertit l'acide arachidonique en acide 5-hydroperoxyéïcosatétraénoïque (5-HPETE). Cet intermédiare instable peut soit être réduit en acide 5-hydroxyéïcosatétraénoïque (5-HETE) soit subir à nouveau l'action de la 5-lipoxygénase, donnant lieu à la formation de LTA_4. Ce dernier étant instable, il sera transformé en LTB_4, LTC_4, LTD_4 ou LTE_4. D'autres dérivés tels que l'acide 15-hydroxyéïcosatétraénoïque (15-HETE) ou l'acide 12-hydroxyéïcosatétraénoïque (12-HETE) sont produits respectivement par les 15- et 12-lipoxygénases.

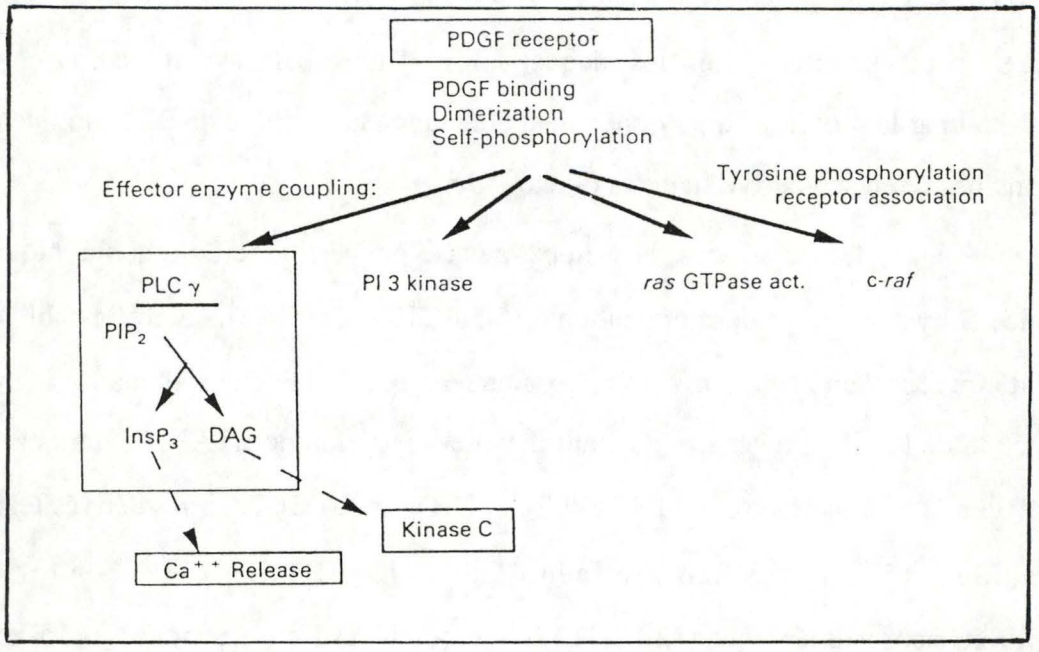


Fig. I.121. : Voies de transduction du signal mises en jeu lors d'une activation par le PDGF (d'après Daniel et Kumjian, 1992).

Les effets métaboliques des dérivés de l'acide arachidonique sont vastes et interviennent surtout dans les réactions inflammatoires. Cependant, ils semblent jouer également un rôle important dans la médiation de processus cellulaires tels que la croissance cellulaire (Tobey et al., 1990; Palmberg et al., 1991), la régulation de synthèse de certaines cytokines (Hori et al., 1989) ainsi que dans la communication intracellulaire en tant que messagers secondaires (Picquet-Pellorce et al., 1991).

2.2.2. La transduction du signal dans le cas d'une activation au PDGF

Lorsque le PDGF se lie à son récepteur, il se produit une autophosphorylation de ce récepteur au niveau des tyrosines 751 et 857, qui active son activité tyrosine kinase intramoléculaire. Suite à cela, le récepteur activé, phosphoryle lui-même divers substrats qui viennent se complexer au récepteur et qui contribuent à la transduction du signal (Fig. I.21.).

Le premier substrat est la PLCγ. Cette isoforme contiendrait dans sa structure un domaine SH2, caractéristique des protéines établissant une liaison avec une protéine tyrosine-kinase (Rozengurt, 1992). Cette PLCγ, phosphorylée sur la tyrosine 783, catalyse alors la dégradation du PIP_2 en IP_3 et en DAG, responsables respectivement de la libération de calcium et de l'activation de la PKC (Fig. I.22.) (Bryckaert et al., 1991).

Chez les BALBc/3T3, on a constaté qu'une petite fraction seulement du pool total en PLCγ de la cellule interagissait avec les récepteurs au PDGF après activation.. Dans le cas précis où 35 % des récepteurs au PDGF subissent une activation, 5 à 7 % seulement du pool en PLCγ seraient tyrosine-phosphorylés ou co-précipiteraient avec les récepteurs au PDGF (Daniel et Kumjian, 1992). Ces mêmes auteurs ont également montré que la PLCγ interviendrait pour 60 % dans la transmission du signal suite à une stimulation au PDGF. Ils ont mis en évidence l'importance de la liaison du PDGF à son récepteur ainsi que celle de la phosphorylation de la PLCγ et du récepteur au PDGF, dans la formation d'IP_3. Pour transformer son substrat le PIP_2, lipide

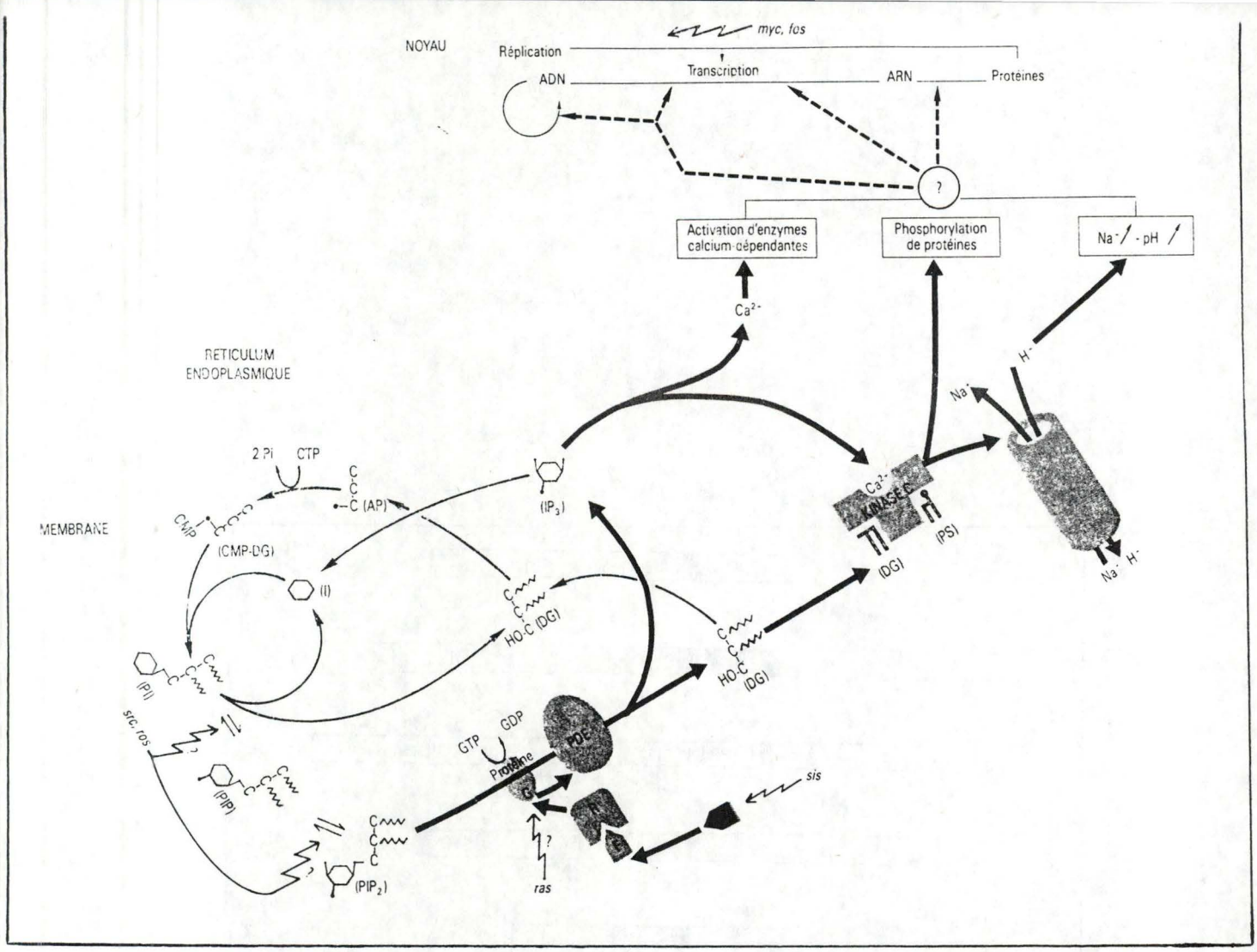


Fig. I.22. : Transmission du signal par la voie des inositol phosphates suite à une activation au PDGF (d'après Dodet, 1987).

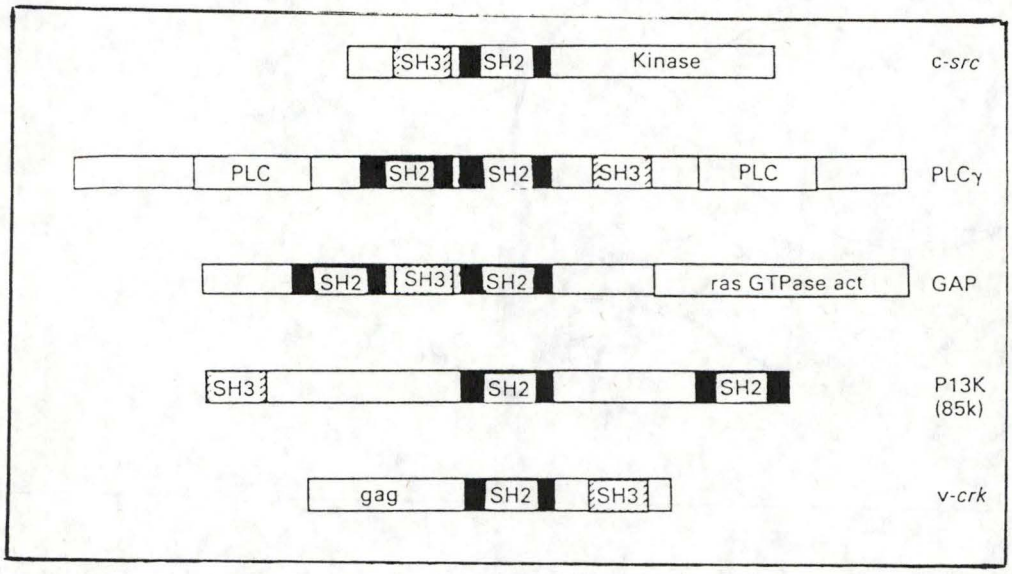


Fig. I.23. : Représentation des protéines réalisant des associations avec la membrane plasmique par l'intermédiaire du domaine SH3 et avec des tyrosines kinases par l'intermédiare du domaine SH2 (d'après Daniel et Kumjian, 1992).

membranaire en IP_3, la PLCγ phosphorylée et détachée du récepteur au PDGF, interagirait alors avec la membrane plasmique. On ignore encore les mécanismes exacts permettant cette interaction : la PLCγ pourrait interagir d'une part par son domaine SH3, domaine présent dans de nombreuses protéines réalisant des associations avec la membrane plasmique (Fig. I.23.); la phosphorylation en position 783, adjacente aux domaines SH3 pourrait également jouer un rôle (Daniel et Kumjian, 1992). D'après ces auteurs, seule une fraction (± 1/3) de la PLC activée se lierait à la membrane plasmique.

Une seconde voie d'activation impliquerait une phosphatidylinositol 3' kinase (PI3K). Phosphorylée, elle ajouterait un phosphate au phosphatidylinositol en position D_3 (Rozengurt, 1992). Cette enzyme est constituée de deux sous-unités de 85 et 110 kDa respectivement. La sous-unité de 85 kDa contient les domaines SH2 qui tout comme pour la PLCγ médierait sa liaison au récepteur phosphorylé mais serait dépourvue de toute activité catalytique. Il a été montré que l'association de la PI3K à la sous-unité β du récepteur au PDGF est nécessaire à la transduction du signal tandis que l'association à la sous-unité α serait sans effet (Rozengurt, 1992). Après activation de la PI3K, le PDGF induit la formation de nouveaux phosphoinositides phosphorylés en position 3 : le phosphatidylinositol-3-phosphate, le PIP_2 et l'IP_3, ce dernier remplissant le rôle de messager secondaire (Bryckaert et al., 1991).

Un troisième substrat de l'activité tyrosine kinase du récepteur au PDGF est la protéine GAP (GTPase activating protein) et interagissant spécifiquement avec les protéines $p21^{ras}$. La GAP, phosphorylée s'associe également avec deux autres protéines cellulaires, la p62 et la p190. De plus, sous sa forme non phosphorylée elle modulerait le complexe p21-GTP/p21-GDP, favorisant la formation du complexe p21-GDP par l'activation de la GTPase. Le PDGF en diminuant l'activité de la GAP, suite à sa phosphorylation, augmenterait donc le complexe actif p21-GTP. Ce dernier semblerait être directement impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Finalement, il a été montré qu'une sérine thréonine kinase, *raf*-1, est phosphorylée par le récepteur au PDGF et coprécipite avec lui (Bryckaert et al., 1991).

Parallèlement à ces voies d'activation, de nombreuses autres réponses intracellulaires s'observent lors d'une stimulation au PDGF. Ainsi on note des modifications au niveau du cytosquelette, du pH, ainsi qu'au niveau du transport ionique. Il se produit également une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et en AMPc, une augmentation du transport des acides aminés, une activation des proto-oncogènes c-*myc* et c-*fos* et une expression de nombreuses protéines de fonction encore inconnue (Williams, 1989; Hanninck et Donoghue, 1989).

2.3. Les actions du PDGF

Le PDGF intervient dans des mécanismes aussi divers que le développement, l'oncogenèse, la cicatrisation et l'athérogenèse . Par ses actions sur la prolifération, le chémotactisme et le dépôt de matrice extracellulaire, il contribue à la régulation de la croissance cellulaire et tient un rôle primordial dans les processus de réparation tissulaires (Daniel et Kumjian, 1992).

In vivo, le PDGF est synthétisé par les mégacaryocytes, stocké et transporté par les plaquettes. Ces cellules s'agrégeant au niveau de l'endothélium blessé, y libèrent leur contenu. On comprend ainsi que le PDGF soit relargué localement dans les tissus blessés, où il stimule la réparation tissulaire. Libéré par les plaquettes, il est initialement responsable du chémotactisme des fibroblastes et des cellules inflammatoires telles que les neutrophiles et les monocytes (Antoniades, 1991).

Classiquement, la réparation tissulaire est décrite en trois phases successives : la réponse inflammatoire aigüe, la réparation et le remodelage du collagène (Pierce et al., 1991). Dans un premier temps, Seppä et al (1982) ont montré que les fibroblastes migraient suivant un gradient de concentration en PDGF et qu'à

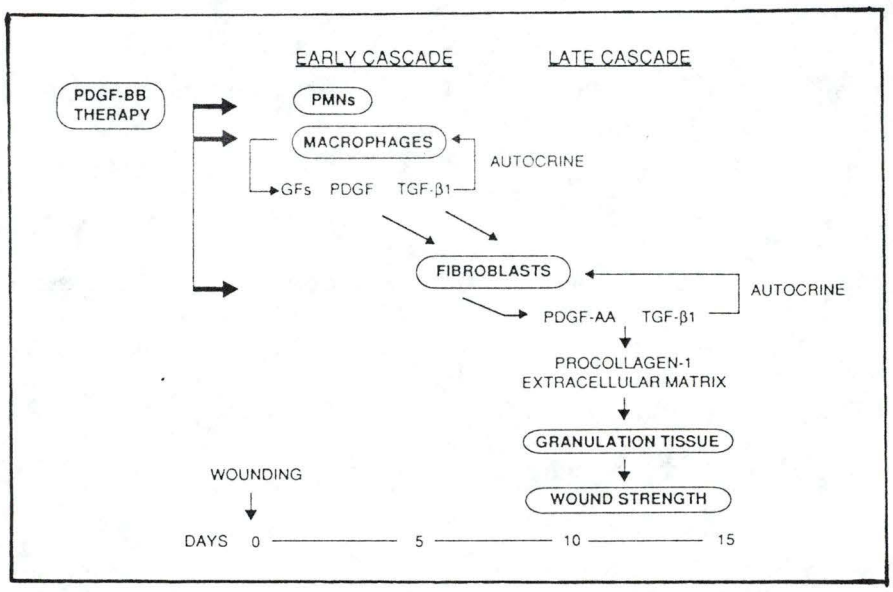


Fig. I.24. : Cascade d'événements induits par le PDGF lors d'une blessure (d'après Pierce *et al.*, 1991).

une concentration en PDGF supérieure à 1 unité/ml, l'action mitogénique se substituait au chémotactisme. Les macrophages et les fibroblastes synthétisant également du PDGF, on assiste à un effet de feed-back positif autocrine, renforçant ainsi l'action initiale du PDGF d'origine plaquettaire. Dans un second temps, le PDGF activant les macrophages et les fibroblastes, tout en stimulant toujours la prolifération fibroblastique, induit la synthèse de facteurs de croissance endogènes et de composants de la matrice extra-cellulaire dont le collagène de type I, l'acide hyaluronique et la fibronectine. Finalement le PDGF est responsable du remodelage tissulaire par la libération de collagènase suivie d'une induction de la synthèse de collagène de type V par les fibroblastes (Hanninck et Donoghue, 1989) (Fig. I.24.).

La capacité du PDGF à stimuler la prolifération cellulaire, le chémotactisme et la synthèse de collagène suggère qu'il devrait avoir un rôle important dans les fibroses. Depuis, un lien direct entre sa présence dans les lavages broncho-alvéolaires et la fibrose pulmonaire idiopathique a été montré (Antoniades, 1991). On assiste à une augmentation du nombre de cellules inflammatoires et à une altération progressive des unités alvéolaires par un processus de fibrose et d'accumulation de collagène.

Comme cité plus haut, le PDGF joue un rôle dans d'autres mécanismes biologiques tels que le développement embryonnaire du système vasculaire (Hanninck et Donoghue, 1989), mais aussi dans des situations pathologiques autres que les fibroses, telles l'athérosclérose et les transformations néoplasiques.

Dans le phénomène de l'athérosclérose, une prolifération anormale des cellules musculaires lisses, un dépôt excessif de tissu conjonctif et une augmentation anormale du nombre de macrophages, lymphocytes et de cellules spongieuses a lieu, suite à une synthèse de PDGF par les cellules endothéliales et les macrophages. De plus, augmentant l'expression de récepteurs aux LDL ("low density lipoproteins"), il favorise l'entrée de cholestérol dans la cellule.

Quant au lien entre PDGF et transformation maligne, il se base sur deux observations : la première que l'oncogène v-*sis* (du simian sarcoma virus : SSV) code

pour la chaîne B du PDGF, la seconde que des cellules de mammifères transformées par ce type de virus sont capables de processer la chaîne B du PDGF sous sa forme homodimérique, biologiquement active (Antoniades, 1991). L'homologue cellulaire du gène v-*sis* est le proto-oncogène c-*sis* . Dès lors, une dérégulation de l'expression génique, sous l'action de promoteurs transcriptionnels puissants, entraîne une surproduction de ce facteur de croissance (Ponzetto, 1990).

Cytokine clé dans la réparation tissulaire, son expression incontrôlée et inappropriée peut conduire à la fibrose.

3. MODELE IN VITRO

Comme nous venons de le voir, lors de fibroses pulmonaires, il se produit une prolifération excessive de fibroblastes. Cette prolifération serait due entre autres à la présence anormale de facteurs de croissance comme le PDGF (Vignaud et al., 1991).

Pour aborder ce problème, nous avons choisi de travailler sur un modèle de fibroblastes humains en culture, en utilisant le PDGF comme agent pro-proliératif.

L'avantage des modèles in vitro est qu'ils permettent de tester divers médiateurs, seuls ou en combinaison avec d'autres, permettant ainsi de décortiquer l'action individuelle de chacun sur la prolifération induite ou non par une molécule stimulante comme le PDGF.

Mais le PDGF affecte d'autres réponses cellulaires que la réponse proliférative : métabolisme de l'acide arachidonique, production de collagène,... C'est au métabolisme de l'acide arachidonique que nous nous sommes également consacrés en priorité dans ce travail, et ce pour diverses raisons : d'abord plusieurs dérivés de l'acide arachidonique sont reconnus pour leurs effets pro- ou anti-proliératifs sur différents types cellulaires; deuxièmment, l'IL-1 induit également le métabolisme de l'acide arachidonique dans ces cellules, mais en n'ayant que peu d'effets sur la prolifération cellulaire (Raes et al., 1993). Ce travail nous permettra donc également de mieux comprendre le comportement d'un type cellulaire - les fibroblastes de poumon - lorsqu'ils sont confrontés à des cytokines ou des facteurs de croissance différents.

Toutefois, l'utilisation de cultures cellulaires in vitro présente des limites puisqu'elle ne rend pas compte de toutes les interactions cellulaires et du réseau cytokinique complet qui existe entre les différentes cellules.

4. OBJECTIFS

L'ojectif du mémoire est de tenter de mettre en évidence l'existence de voies de régulation de la prolifération cellulaire suite à une stimulation au PDGF.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet du PDGF sur la prolifération cellulaire ainsi que sur la production des dérivés de l'acide arachidonique.

Ensuite, afin de découvrir si les dérivés de l'acide arachidonique pouvaient médier ou moduler la prolifération induite par le PDGF, nous avons testé la PGE_2, le LTB_4, le LTC_4 et les 5- et 12-HETEs sur la prolifération cellulaire. Seuls, ces métabolites n'affectent guère la prolifération cellulaire; mais en présence de PDGF, la PGE_2 contrecarre clairement les effets pro-proliératifs de ce facteur de croissance.

suspectant l'intervention de l'AMPc dans l'effet inhibiteur exercé par la PGE2, nous avons utilisé divers inhibiteurs ou activateurs de la voie de l'AMPc dont l'aminophylline, la forskoline, le didéoxyadénosine monophosphate (DDAO) et le H_8.

Nous avons également prospecté une autre voie de régulation possible : celle de la protéine kinase C (PKC). En vue de déterminer l'importance de cette voie dans l'activation par le PDGF, nous avons utilisé le PMA, activateur de la PKC et le H_7, inhibiteur de la PKC. L'inhibition de la voie de la PKC contrecare également en partie l'activation par le PDGF.

Finalement, nous avons voulu voir si la régulation négative exercée par la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF, était également applicable à d'autres réponses cellulaires induites par ce médiateur, telles que la libération d'interleukine-6 (IL-6).

A plus long terme, ce travail devrait nous permettre de donner des éléments de réponse quant aux mécanismes de régulation intracellulaires de la croissance cellulaire.

MATERIELS ET METHODES

1. CULTURES DES FIBROBLASTES DE POUMON

1.1. Matériels

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

-T : Trypsine : solution stérile de trypsine à 0.25 % dans un tampon TRIS (Gibco, Grande-Bretagne).

-OPT : milieu OPTI-MEM (Gibco, Grande-Bretagne) : milieu de culture composé du milieu minimum essentiel de Eagle (MEM), tamponné avec de l'HEPES (25 mM) et du bicarbonate de sodium (2.4 g/l), additionné d'hypoxanthine, de thymidine, de facteurs de croissance et fraîchement enrichi de pyruvate 1 mM, de L-glutamine 2 mM et de mercaptoéthanol 50 µM. L'addition de pyruvate de sodium et de mercaptoéthanol à ce milieu est justifié par leurs propriétés anti-oxydantes.

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

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

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

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

-OPT+SB 40 % : milieu OPTI-MEM contenant 40 % de sérum de veau foetal.

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

1.2. Repiquage des fibroblastes pulmonaires.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (Cell Cult Sterilin, Grande-Bretagne). Les cellules confluentes, représentant une densité moyenne de 80000 cellules par cm^2 sont repiquées en deux ou en quatre. Après les avoir resuspendues dans de l'OPT+SB 10 %, nous les répartissons de manière à obtenir 40000 cellules par cm^2 pour un repiquage en deux et 20000 cellules par cm^2 pour un repiquage en quatre.

Pour le repiquage, les cellules sont rincées avec 10 ml de solution de rinçage ce qui permet d'éliminer les traces de sérum, celui-ci contenant des inhibiteurs de protéases.

Ensuite les cellules sont trypsinisées pendant 2 minutes avec 2 ml de trypsine. Une fois la trypsine décantée, la boîte est placée à 37°C afin d'accélérer le détachement de cellules de la boîte de culture.

On ajoute alors du BME+SB 10 % (le sérum permettant l'inhibition de la trypsine) et on resuspend les cellules à l'aide d'une pipette Pasteur afin de rompre les agrégats et de détacher les cellules de leur support.

La suspension cellulaire est recueillie dans 10 ml de milieu de culture. A ce stade on peut effectuer un comptage à l'aide d'une chambre de Neubauer.

Le milieu contenant les cellules est centrifugé à 1000 RPM pendant 20 minutes (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, R.F.A.).

Le culot obtenu est resuspendu dans de l'OPT+SB 10 %. Les cellules sont alors transférées dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (Cell Cult Sterilin, Grande-Bretagne) ou dans des plaques multipuits (Bibby, Corning, U.S.A.).

Pour finir, on ajuste le pH du milieu en ajoutant du CO_2.

Après quelques jours, il est utile de réapprovisionner les cellules en éléments nutritifs en changeant le milieu de culture.

1.3. Congélation et décongélation des cellules

1.3.1. Congélation

Les cellules sont rinçées avec du milieu M, trypsinisées et recueillies dans 10 ml de BME+SB 10 % suivant la méthode décrite au point 1.2. des Matériels et Méthodes.

Après centifugation, le culot est resuspendu dans 0.4 ml d'OPT+SB 40 %. Cette suspension est transférée dans une ampoule (Nunc, Danemark) à laquelle on aura ajouté 0.4 ml d'OPT+DMSO 10 % au préalable.

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

1.3.2. Décongélation

L'ampoule gelée est plongée dans un bain à 40°C, les cellules décongelées sont centrifugées pendant 20 minutes à 1000 RPM (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, R.F.A.). Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans de l'OPT+SB 10 % et transférées dans une boîte de culture.

2. TEST DE LIBERATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE RADIOACTIF PREALABLEMENT INCORPORE PAR LES CELLULES

Le test de libération de l'acide arachidonique préalablement incorporé permet une analyse quantitative indirecte de l'activation de la phospholipase A_2 (PLA_2) par une molécule activatrice. Ce test peut être complété par une analyse à la fois quantitative et qualitative des dérivés de l'acide arachidonique radioactif formés, par chromatographie sur couche mince ou TLC, décrite au point 3.

2.1. Matériels

-OPT : milieu d'incubation OPTI-MEM (Gibco, Grande-Bretagne) : milieu de culture composé de milieu minimum de Eagle (MEM), tamponné avec de l'HEPES (25 mM) et du bicarbonate de sodium (2.4 g/l), additionné d'hypoxanthine, de thymidine, de facteurs de croissance et fraîchement enrichi de pyruvate 1 mM, de L-glutamine 2 mM et de mercaptoéthanol 50 µM.

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

-OPT+HLA 0.2 % : milieu OPTI-MEM additionné de 0.2 % d'hydrolysat de lactalbumine (Gibco, Grande-Bretagne).

-[^{3}H]-AA : acide arachidonique tritié (NET-2982, activité spécifique : 180 Ci/mmol, NEN Research Products, Boston, U.S.A.), l'[^{3}H]-AA est dissous dans 2.5 ml d'éthanol, ce qui correspond à 0.25 mCi/ml.

-IL-1ß : interleukine-1ß recombinante humaine (Janssen Biochimica, Turnhout, Belgique) diluée dans de l'OPT+HLA à raison de 1 unité/µl, filtrée et stockée à -70°C.

-PDGF A/B : platelet derived growth factor A/B humain, recombinant et stérile (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne) dilué dans de l'OPT+HLA 0.2 % à raison de 1 ng/µl, fractionné et stocké à -70°C.

-NaOH 0.5 N : (Merck, Darmstadt, Allemagne).

-HCl 0.5 N : (Merck, Darmstadt, Allemagne).

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

2.2. Méthodes

La méthode utilisée est celle de Godfrey et al (1987), modifiée selon Knott (1992).

Les cellules sont repiquées dans de l'OPT+HLA 0.2 %, selon la méthode décrite au point 1.2. des Matériels et Méthodes, dans une plaque 24 puits (Cell Cult Sterilin, Grande-Bretagne) à raison de 100000 cellules par puits. On ajoute par puits 1 ml de cette suspension cellulaire contenant 2.5 µl/ml de [^{3}H]-AA (soit 0.25 µCi/ml de suspension).

On laisse les cellules incorporer l'acide arachidonique radioactif pendant 18 heures à 37°C, puis un comptage est réalisé pour estimer la quantité d'[^{3}H]-AA non incorporé avant de laver deux fois chaque cupule avec 1 ml d'OPT+HLA 0.2 %.

Pour estimer la quantité d'acide arachidonique radioactif incorporé par les cellules au temps zéro, c'est à dire après 18 heures d'incorporation de l'[^{3}H]-AA, on fixe les cellules de deux cupules prévues à cet usage dans 500 µl de NaOH 0.5 N, auquels on ajoutera après 30 minutes 500 µl d'HCl 0.5 N pour neutraliser le NaOH. Un comptage de radioactivité est ensuité réalisé sur cette solution en y ajoutant 4 ml d'Aqua-Luma.

On ajoute alors aux autres cupules 1 ml de solution contenant les médiateurs à savoir l'IL-1ß à 20 u/ml et le PDGF A/B à 10 ng/ml.

Après 6 et 24 heures, on prélève le surnageant dans lequel ont éte relargués l'[^{3}H]-AA et ses dérivés.

De ce volume on prélève 100 µl qui seront mis à compter avec 5 ml d'Aqua-Luma. Ce comptage permet une analyse quantitative du release suite à une activation de la PLA_2. Le pourcentage de relarguage est estimé grâce aux formules suivantes :

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

On peut également rapporter le pourcentage de radioactivité relarguée par rapport au contrôle :

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

Les 900 µl restants sont congelés à -20°C en attendant un traitement pour l'analyse qualitative par TLC.

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

3.1. Matériels

-Minicolonnes d'extraction (C2, Amersham, Belgique).

-Plaques de silice : Silica gel 60 de 0.25 mm d'épaisseur, 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Allemagne).

-PGE_2 : prostaglandine E_2 (P-5640, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) : solution stock de 1 mg/ml d'éthanol, conservée à -20°C.

-6-kéto-$PGF_{1\alpha}$: prostaglandine $F_{1\alpha}$ (Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) : solution stock de 0.5 mg/ml d'éthanol, conservée à -20°C.

-5 HETE tritié : acide 5-hydroxyéïcosatétraénoïque tritié (TRK 829, activité spécifique de 124.4 Ci/mmol., Amersham, Belgique), conservé à -20°C.

-15 HETE tritié : acide 15-hydroxyéïcosatétraénoïque tritié (TRK 833, activité spécifique de 206 Ci/mmol., Amersham, Belgique), conservé à -20°C.

-12 HETE tritié : acide 12-hydroxyéïcosatétraénoïque tritié (NET-712, activité spécifique de 150-240 Ci/mmol., NEN Products, Boston, U.S.A.), conservé à -20°C.

-LTB_4 : leucotriène B_4 (L-0517, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) dilué dans de l'éthanol absolu (solution stock de 100 µg/ml) et conservé à -20°C.

-AA : solution stock d'acide arachidonique 33 mM dans du chloroforme (Janssen Chimica, Beerse, Belgium), et conservé à -20°C.

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

-Solution chloroforme/méthanol (3/1, V/V). Les deux produits proviennent de chez Janssen Chimica, Beerse, Belgique).

-Isooctane, Méthylformiate, Ethanol, HCl 1 N : (Merck, Darmstadt, Allemagne).

-Acide acétique, Méthanol, Hexane : (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).

-Acétate d'éthyle : (Aldrich Chemical Company, Milwauker, U.S.A.).

3.2. Extraction des dérivés de l'[^{3}H]-AA sur colonne

Les dérivés de l'[^{3}H]-AA sont extraits sur des minicolonnes C2 à partir des 900 µl de surnageant obtenus au point 2.2. des Matériels et Méthodes. Les colonnes C2 sont de type hydrophobe. Celles-ci sont reliées à un appareil 10 SPE System (Baker Chemical Company, Phillipsburg, U.S.A.), relié à une pompe à vide permettant une aspiration rapide des différents composés déposés et l'extraction est réalisée selon les recommandations de Amersham.

On commence par conditionner les colonnes en faisant passer 2 ml de méthanol et 2 ml d'H_2O désionisée. Ensuite on dépose les échantillons, préalablement

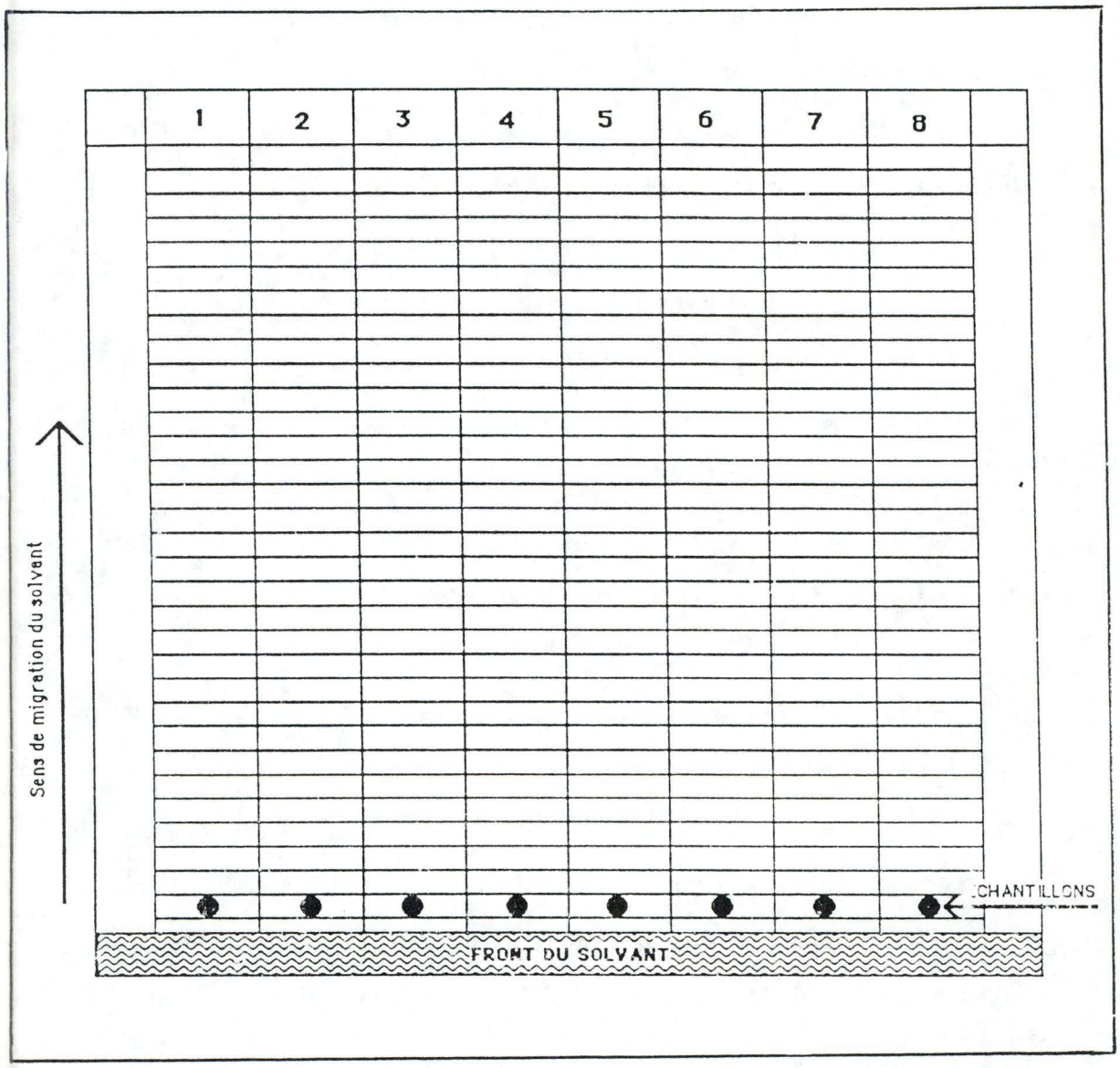


Fig. II.1. : Représentation d'une plaque de silice où sont représentés l'emplacement des échantillons et le sens de migration du solvant . Chaque échantillon migrera suivant son hydrophobicité.

traités avec 0.25 ml d'HCl 1 N par ml de surnageant, et on laisse les dérivés de l'[^{3}H]-AA se fixer lentement sur la colonne.

Cette étape réalisée, on fait passer successivement 5 ml d'H_2O, 5 ml d'éthanol 10 % et 5 ml d'hexane afin d'éluer les composés non fixés sur la colonne.

Finalement on élue les dérivés de l'[^{3}H]-AA avec 5 ml de méthyl formiate. A ce stade les échantillons peuvent être congelés à -70°C. Les échantillons sont alors évaporés sous azote et resuspendus dans 100 µl de chloroforme/méthanol (3/1, V/V).

3.3. Chromatographie sur couche mince

Ce type de chromatographie est basé sur l'hydrophobicité des différentes molécules présentes dans l'échantillon. On utilise une plaque de silice hydrophile sur laquelle un solvant de migration hydrophobe entraîne les composés plus ou moins loin suivant leur degré d'hydrophobicité. Ce solvant de migration est composé d'acétate d'éthyle, d'isooctane, d'acide acétique et d'eau (11/5/2/10, V/V), selon la procédure décrite par Mayer et al (1984). La plaque est divisée en 8 colonnes de 2 cm de large, et 14 cm de haut . Chacune d'elles est encore subdivisée en 28 fractions de 0.5 cm de haut.

Les échantillons sont déposés à la base de chaque colonne et la plaque est ensuite placée verticalement dans la cuve contenant le solvant (Fig. II.1.).

Au terme de la migration, on laisse évaporer la plaque sous hotte. Puis chaque fraction de silice est grattée et récoltée dans une fiole à laquelle on ajoute 5 ml d'Aqua-Luma. La radioactivité présente dans les fioles est lue grâce à un compteur à scintillation ß (Beckmann, U.S.A.). Le résultat de ce comptage permet d'obtenir le profil de radioactivité en fonction de la migration.

Afin de déterminer la nature de chaque pic, on aura pris soin de faire migrer les standards suivants :

-10 µl de PGE_2

-10 µl de $PGF_{2\alpha}$

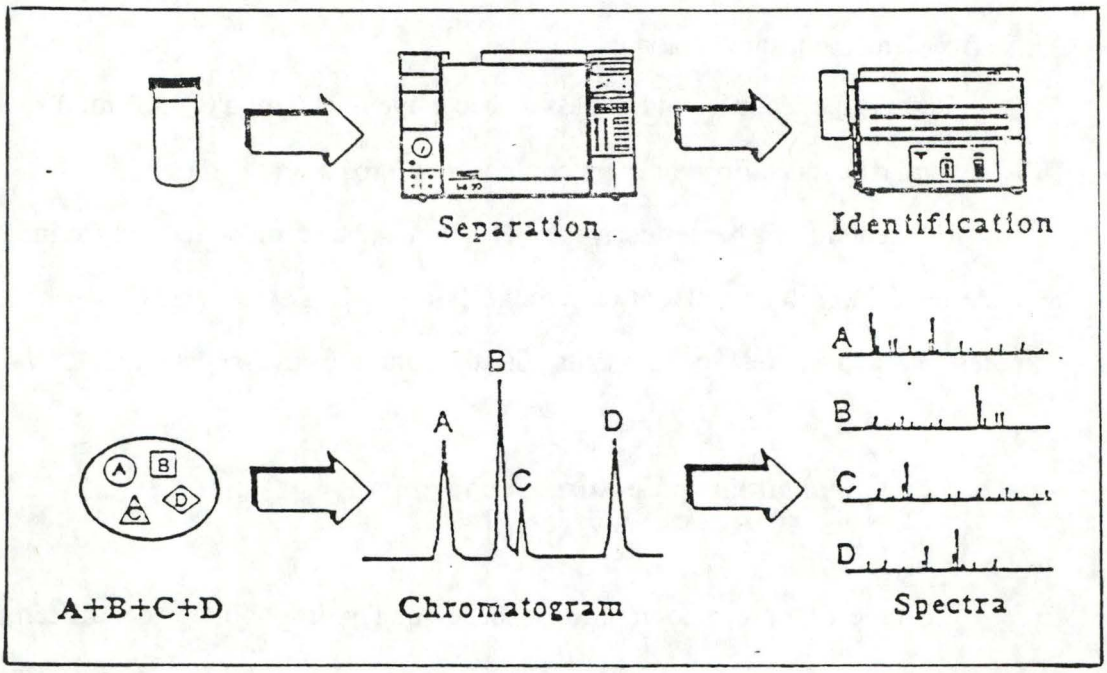


Fig. II.2. : Représentation des étapes lors du GC-MS.

-10 µl de 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$

-4 µl d'AA

-50 µl de LTB_4

-5 µl de 5-HETE tritié

-20 µl de 15-HETE tritié

-2 µl de 12-HETE tritié

Après leur migration, les standards non radioactifs sont révélés par une coloration à l'iode. Ce dernier en se sublimant se fixe aux composés lipidiques formant une tache brune. Quant aux standards tritiés, ils sont traités de la même manière que les échantillons, en grattant les fractions de silice mises ensuite à compter avec 5 ml d'Aqua-Luma grâce à un compteur à scintillation ß.

4. DOSAGE DES PROSTAGLANDINES

La TLC (Thin Layer Chromatography) étant une technique peu sensible, afin de déterminer de façon plus précise les différentes prostaglandines synthétisées lors d'une stimulation, nous avons utilisé une autre méthode de détection. Il s'agit de la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. La chromatographie gazeuse permet d'obtenir une bonne séparation des composés, tandis que le spectomètre de masse permet l'identification et la quantification des différentes prostaglandines synthétisées (Fig. II.2.).

4.1. Matériels

-OPT : milieu d'incubation OPTI-MEM (voir le point 1.1. des Matériels et Méthodes).

-HLA, OPT+HLA 0.2 %, IL-1β, PDGF A/B : voir le point 2.1 des Matériels et Méthodes.

-PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0.9 %, pH 7.2.

-HCl, Ethanol, Méthylformiate, Pyridine sèche : (Merck, Darmstadt, Allemagne).

-Méthanol, Hexane, Acétonitrile, Méthoxylamine-HCl, BSTFA (bis (triméthylsilyl) tri fluoro acétamide), Dodécane : (Janssen Chimica, Beerse, Belgique).

-Prostaglandines deutérées : d-PGE_2, d-$PGF_{2\alpha}$ et d-6-kéto-$PGF_{1\alpha}$ (Cayman Chemical Company, U.S.A.), conservées à -70°C à raison de 10 ng/ml dans de l'éthanol absolu.

-Bromure de PFB (où le PFB = 2,3,4,5,6-Pentafluor-Benzyl), N-éthyldiisopropylamine : (Aldrich Chemie, Allemagne).

4.2. Méthode

4.2.1. Stimulation des cellules

Les cellules sont repiquées comme décrit au point 1.2. des Matériels et Méthodes, dans des cupules de 2 cm^2 à raison de 50000 cellules par cm^2. Elles sont cultivées dans de l'OPT+HLA 0.2 % (1 ml par cupule).

Après 24 heures, les cellules sont stimulées à l'IL-1ß (20 U/ml), au PDGF A/B (10 ng/ml) ainsi qu'aux deux médiateurs simultanément.

Suite à une période d'incubation de 6 ou 24 heures, on recueille les surnageants auxquels on ajoutera une quantité connue de prostaglandines deutérées. Ce standard interne permettra une analyse quantitative des prostaglandines. Les échantillons peuvent alors être congelés en attendant les étapes suivantes (Knott et al., soumis).

Les cellules quant à elles sont rinçées deux fois avec du PBS puis fixées avec 1 ml de NaOH 0.5 N pendant 30 minutes. Les protéines seront dosées suivant la méthode de Lowry et al. (1951).

4.2.2 Extraction des prostaglandines

On procède à l'extraction des prostaglandines le jour qui suit le prélèvement des surnageants. L'extraction est réalisée comme décrit au point 3.2. des Matériels et Méthodes, les prostaglandines sont recoltées dans 5 ml de méthylformiate et mises à congeler à -70°C.

4.2.3. Dérivatisation des prostaglandines

La méthode de dérivatisation s'inspire de celle de Leis et al. (1987), modifiée selon Knott (1992) et Knott et al. (1992) (soumis).

La dérivatisation a pour but :

-de masquer les groupements polaires, ceci améliorant la séparation des prostaglandines réalisée en chromatogrphie gazeuse.

-d'alourdir les molécules, permettant une détection plus spécifique. En effet, le chromatogramme présentera moins de contaminants en analysant des masses plus élevées.

-de permettre la détection des prostaglandines suivant une ionisation chimique négative.

Après avoir évaporé le méthylformiate sous azote, on ajoute à chaque tube 50 µl de bromure de PFB dissous dans de l'acétonitrile (7 %, W/W) ainsi que 10 µl de N-éthyldiisopropylamine. Les tubes sont vortexés et mis à incuber pendant 10 minutes à température ambiante.

Les tubes sont évaporés sous azote, puis on ajoute à chacun 50 µl de méthoxylamine-HCl dissous dans de la pyridine sèche à 2 % (W/W). On vortexe et on laisse incuber les échantillons à 60°C pendant 90 minutes.

Après évaporation sous azote, on ajoute 50 µl de BSTFA dissous dans de la pyridine sèche (2/1, V/V). On vortexe et une dernière incubation de 20 minutes à 60°C est réalisée.

Finalement les tubes sont à nouveau évaporés sous azote et les prostaglandines sont resuspendues dans 50 µl de dodécane. Après centrifugation à 3000 RPM pendant 10 minutes, les surnageants sont récupérés dans des petits tubes.

4.2.4. Détection par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) et quantification des prostaglandines.

L'appareil GC-MS (Hewlett-Packard, U.S.A.) est équipé d'une colonne capillaire de 5 % de phényl méthyl silicone, d'un diamètre interne de 0.32 mm et d'une longueur de 25 m. L'épaisseur du film de la phase stationnaire est de 0.17 µm.

L'échantillon injecté est entraîné dans la colonne par un gaz porteur inerte : l'hélium.

Un gradient de température du four du GC-MS est réalisé comme suit : 180°C pendant 1 minute, permettant un bon regroupement des prostaglandines, le dodécane ne s'évaporant pas encore à cette température. Ensuite, la température monte de 25°C par minute et ce jusqu'à atteindre 270°C. Cette méthode permet de séparer des molécules de même poids moléculaire tout en jouant sur la polarité et sur la température de vaporisation.

La température de l'injecteur est de 270°C, celle de la ligne de transfert (interface reliant le chromatogramme au spectromètre) est de 280°C, tandis que celle de la source d'ions est de 150°C.

Les différentes prostaglandines sont éluées entre 7 et 9 minutes.

Le principe du spectromètre de masse est basé sur la détection de l'abondance des ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/Z). La caractérisation des prostaglandines se fait suivant une ionisation chimique négative en présence de méthane en tant que gaz réactionnel. Les molécules ainsi ionisées seront détectées par fragmentométrie ou "selected ion monitoring" (SIM).

On détecte un pic intense dont le rapport m/Z correspond à l'ion M-pentafluorobenzyl. Les ions détectés dont le rapport m/Z est égal à 524, 569, et 614 correspondent respectivement à la PGD_2 et à la PGE_2, la $PGF_{2\alpha}$ et la 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$. Cette dernière étant la forme stable de la PGI_2. Les rapports m/Z de 528, 573 et 618 correspondent à la PGE_2-d4, $PGF_{2\alpha}$-d4 et à la 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$-d4.

Pour chaque injection, six chromatogrammes sont donc simultanément enregistrés. Ils sont intégrés par l'opérateur lorsque toutes les analyses sont terminées.

La quantité de prostaglandines ($Q^{té}$ PGs) de chaque échantillon est calculée à partir de la surface des pics de prostaglandines (S. PGs) de l'échantillon, corrigée suivant la surface du standard interne correspondant (S. PGs-d).

$$Q^{té}\ PGs = \frac{S.\ PGs}{S.\ PGs\text{-}d} \times Q^{té}\ PGs\text{-}d$$

Un facteur de correction doit être soustrait à cette formule : il correspond à la quantité de prostaglandines non deutérées (PGs-non d) se trouvant dans la solution de prostaglandines deutérées ajoutée à chaque échantillon. En effet cette solution de prostaglandines deutérées n'est pas totalement pure.

Nous exprimons dès lors les résultats par la formule suivante :

$$Q^{té}\ PGs = [\frac{S.\ PGs}{S.\ PGs\text{-}d} \times Q^{té}\ PGs\text{-}d] - Q^{té}\ PGs\text{-non d}$$

La quantité de prostaglandines obtenues pour chaque échantillon est ensuite rapportée à la quantité de protéines provenant de la cupule correspondant à chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en ng de prostaglandines par mg de protéines.

5. TEST DE PROLIFERATION CELLULAIRE

5.1. Méthode à l'hexosaminidase

La méthode utilisée est celle décrite par Givens et al. (1990) et par Landegren (1984).

La N-acétyl-ß-D-hexosaminidase est une enzyme lysosomale ayant pour rôle de dégrader les constituants cellulaires glycosylés. Le dosage de cette enzyme permet une quantification indirecte de la prolifération cellulaire. Le para-nitrophénol est utilisé comme substrat et le produit enzymatique apparaît jaune à pH basique.

5.1.1. Matériels

-OPT : milieu d'incubation OPTI-MEM : voir le point 1.2. des Matériels et Méthodes.

-HLA, OPT+HLA 0.2 %, IL-1β, PDGF A/B : voir le point 2.1 des Matériels et Méthodes.

-PGE_2 : Prostaglandine E_2 (P-5640, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) diluée dans de l'éthanol absolu (solution stock de 1mg/ml) et conservée à -20°C.

-LTB_4 : Leukotriène B_4 (L-0517, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) dilué dans de l'éthanol absolu (solution stock de 100 µg/ml) et conservé à -20°C.

-LTC_4 : Leucotriène C_4 (L-4886, Sigma Chemical Company, Saint-Louis,U.S.A.) dilué dans de l'éthanol absolu (solution stock de 50 µg/ml) et conservé à -20°C.

-5-HETE : Acide 5-hydroxyéïcosatétraénoïque (n° 34210, Cayman Chemical Company, Am Arbot, U.S.A.) dilué dans de l'éthanol absolu (solution stock de 100 µg/ml) et conservé à -20°C.

-12-HETE : Acide 12-hydroxyéïcosatétraénoïque (n° 34550, Cayman Chemical Company, Am Arbot, U.S.A.) dilué dans de l'éthanol absolu (solution stock de 100 µg/ml) et conservé à -20°C.

-INDO : Indométhacine (I-7378, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.). On réalise une solution stock de 10^{-2} M dans de l'éthanol absolu.

-Dibutyryl-AMPc : solution saline de Na N^6 2'-O-dibutyryl adénosine-3' : 5'-monophosphate cyclique (D-0627, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) diluée dans de l'OPT+HLA (solution stock 10^{-2} M) et conservée à 4°C.

-PMA : phorbol-12-myristate-13-acétate (P-8139, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) dilué dans de l'éthanol absolu (solution stock de 1 mg/ml) et conservé à - 70°C.

-H_7 : 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-méthyl pipérazine) (I-0260, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) diluée dans de l'éthanol absolu (solution stock de 10^{-2} M) et conservée à 4°C.

-DDAO : 2'-5' didéoxyadénosine : (27-2410, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suède) diluée dans de l'eau (solution stock de $2x10^{-3}$ M) et conservée à 4°C.

-H_8 : N-(2-méthylamino-éthyl-5-isoquinoline sulfonamide) (M-9656, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) dilué dans de l'éthanol absolu (solution stock de $2x10^{-3}$ M) et conservé à 4°C.

-Aminophylline : conservée à 4°C (A-1755, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) et diluée directement dans le milieu de culture aux concentrations voulues.

-Forskoline : conservée à 4°C (F-6886, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.). Solution stock de 10^{-2} M dans du DMSO.

-Tampon citrate 100 mM : acide citrique (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué dans de l'eau distillée et tamponné à pH 5 avec du NaOH.

-P-nitrophénol : p-nitrophénol-N-acétyl-ß-D-glucosamide 7.5 mM (N-9378, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) dilué dans du tampon citrate 100 mM et tamponné à pH 5.

-Triton 0.5 % : triton X 100 (Merck, Darmstadt, Allemagne) dilué dans de l'eau distillée.

-Solution C : mélange (1/1, V/V) de paranitrophénol et de triton X 100, 0.5 %, aliquoté en fractions de 6 ml et congelé à -20°C.

-Tampon glycine : Tampon glycine 150 mM (Janssen Biochimica, Turnhout, Belgique), EDTA 5 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne), tamponné à pH 10.4.

5.1.2.Méthode

Les cellules sont repiquées dans des plaques à 96 puits (Bibby, Corning, U.S.A.) comme décrit au point 1.2. des Matériels et Méthodes à raison de 3000 cellules par puits. Dans chaque puits on ajoute 100 µl de la suspension cellulaire; on prévoit 6 cupules par test et chaque expérience est réalisée pour trois temps d'incubation différents : 24, 48 et 72 heures. On repique également quelques puits afin d'estimer la quantité de cellules présentes au moment de l'ajout des médiateurs. Vingt quatre heures après le repiquage, on ajoute les médiateurs à tester, deux fois concentrés à raison de 100 µl par cupule.

Les molécules testées sur la prolifération cellulaire par cette méthode sont les suivantes :

-PDGF A/B : à 2.5, 5, et 10 ng/ml.

-IL-1ß : à 5 et 10 unités par ml.

-PMA : à 2.5, 5, 25 et 50 ng/ml en présence ou non de PGDF.

-H_7 : à 10, 20 et 40 µM, en présence ou non de PDGF.

-PGE_2 : à 10^{-6} M en présence ou non de PDGF, DDAO, H_7, aminophylline et forskoline.

-DDAO : à 10^{-4} et 10^{-5} M seule ou en combinaison avec le PDGF, la PGE_2 et l'AMPc.

-H_8 : à 20 µM seul ou en combinaison avec le PDGF, la PGE_2 et l'AMPc.

-L'aminophylline : à $5x10^{-4}$ et $5x10^{-5}$ M seule ou combinée au PDGF et à la PGE_2.

-Forskoline : à 10^{-5} et 10^{-6} M seule ou combinée au PDGF et à la PGE_2.

-Les 5 et 12-HETEs : à 10^{-8} et 10^{-7} M en présence ou non de PDGF.

-Les LTB_4 et LTC_4 : à 10^{-8} et 10^{-7} M en présence ou non de PDGF.

Après 24, 48 ou 72 heures d'incubation en présence des médiateurs, les cupules sont décantées et à chacune d'elles on ajoute 50 µl de solution C. On incube alors les plaques pendant 2 heures à 37°C. Suite à cela, on ajoute à chaque puits 100 µl de tampon glycine afin d'arrêter la réaction. La lecture de l'absorbance se fait à 405 nm grâce au lecteur de microplaques (modèle 3.550, BIO-RAD, Richmond, U.S.A.).

5.2. Méthode à l'iodure de propidium

La méthode utilisée est celle décrite par Vollenweider (1992) et adaptée au dosage de cellules en suspension. L'iodure de propidium se lie a l'ADN double brin formant ainsi un complexe fluorescent.

5.2.1. Matériels

-OPTI-MEM, BME+SB, HLA, OPT+HLA : voir le point 2.1. des Matériels et Méthodes.

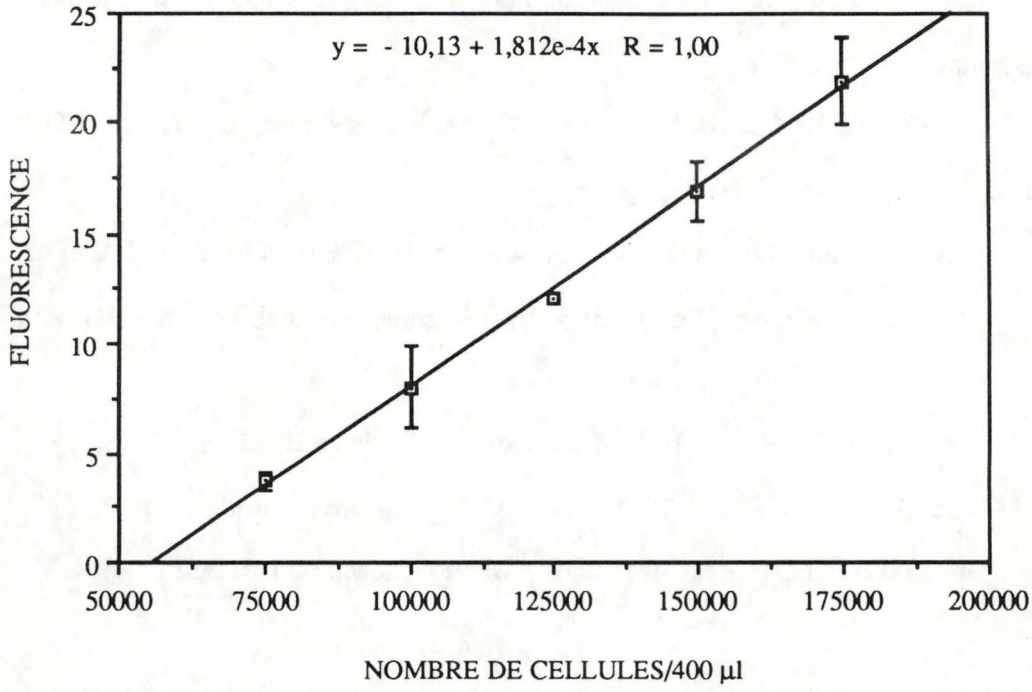


Fig. II.3. : Droite d'étalonnage de la fluorescence émise en fonction de la densité cellulaire par la méthode à l'iodure de propidium. Chaque point représente la moyenne de 3 valeurs ± un écart type.

-PDGF A/B : platelet derived growth factor A/B humain, recombinant et stérile (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne) dilué dans de l'OPT+HLA 0.2 % à raison de 1 ng/ml, fractionné et stocké à -70°C.

-PGE2 : prostaglandine E_2 (P-5640, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) diluée dans de l'éthanol absolu (solution stock de 1 mg/ml) et conservée à -20°C.

-dibutyryl AMPc : solution saline de Na N^6 2'-O-dibutyryl adénosine-3' : 5'-monophosphate cyclique (D-0627, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) diluée dans de l'OPT+HLA 0.2 % (solution stock de 10^{-2} M) et conservée à -4°C.

-T : trypsine : solution stérile de trypsine à 0.25 % dans un tampon TRIS (Gibco, Grande-Bretagne).

-PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0.9 %, pH 7.2.

-Ethanol : (Merck, Darmstadt, Allemagne), dilué à 70 %.

-Iodure de propidium : (P-4170, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.). Solution stock diluée à raison de 5 mg/ml de PBS et conservée à 4°C.

-Tampon citrate de sodium 1.12 %.

5.2.2. Méthode

Avant de tester les différents médiateurs sur la prolifération cellulaire par cette méthode, nous avons réalisé une droite d'étalonnage de la densité optique en fonction de la densité cellulaire (Fig. II.3.). Les cellules d'une T75 ont été trypsinisées et resuspendues dans du PBS. Des dilutions ont été réalisées, afin d'obtenir une gamme de concentration en cellules allant de 75000 à 175000 cellules/400 µl.

Les cellules sont repiquées comme décrit au point 1.2 des Matériels et Méthodes dans une plaque 24 puits (2 cm^2) (Corning, U.S.A.) à raison de 100000 cellules par cupule. On ajoute 0.5 ml de la suspension cellulaire par puits.

Vingt-quatre heures après le repiquage, on ajoute les médiateurs deux fois concentrés à raison de 0.5 ml par puits, à savoir : le PDGF (à 10 ng/ml), la PGE_2 (à

10^{-6} M) en présence ou non de PDGF et d'AMPc (à 10^{-3} M) en présence ou non de PDGF.

Après 72 heures de stimulation en présence des médiateurs, le milieu est décanté et les cellules trypsinisées à raison de 100 µl de trypsine par cupule. Une fois détachées de leur substrat, les cellules sont récupérées dans 1 ml de BME+SB (le sérum contenant des facteurs inhibiteurs de la trypsine).

La suspension cellulaire est alors centrifugée pendant 20 minutes (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, R.F.A.) puis les cellules sont resuspendues dans 1 ml de PBS. Une seconde centrifugation est réalisée, le PBS décanté et les cellules sont fixées avec 1 ml d'éthanol 70 % pendant 30 minutes à 4°C. Une dernière centrifugation est réalisée avant de resuspendre les cellules dans 400 µl d'iodure de propidium dilué à raison de 5 µl par ml de tampon citrate de sodium 1.12 %.

Après 30 minutes, la fluorescence est lue, pour une longueur d'onde d'excitation de 540 nm et une longueur d'onde d'émission de 620 nm, grâce à un fluorimètre (Kontron, SMF-25).

6. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE-6

Le dosage de l'interleukine-6 (IL-6) est réalisé grace à un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sandwich Assay). Les puits du KIT ELISA sont "coatés" avec des anticorps monoclonaux anti-IL-6. On incube les surnageants cellulaires dans ces puits, permettant à l'IL-6 présente dans les milieux de se fixer aux anticorps. Dans une seconde étape, on ajoute des anticorps monoclonaux anti-IL-6 conjugués à la biotine, qui se fixeront à l'IL-6, elle même liée aux anticorps fixés sur la plaque. On détecte ensuite la quantité d'anticorps biotinylés présents sur la plaque par l'addition de streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (horse radish peroxidase ou HRP). La streptavidine reconnaît la biotine avec une grande affinité. Les puits sont alors incubés

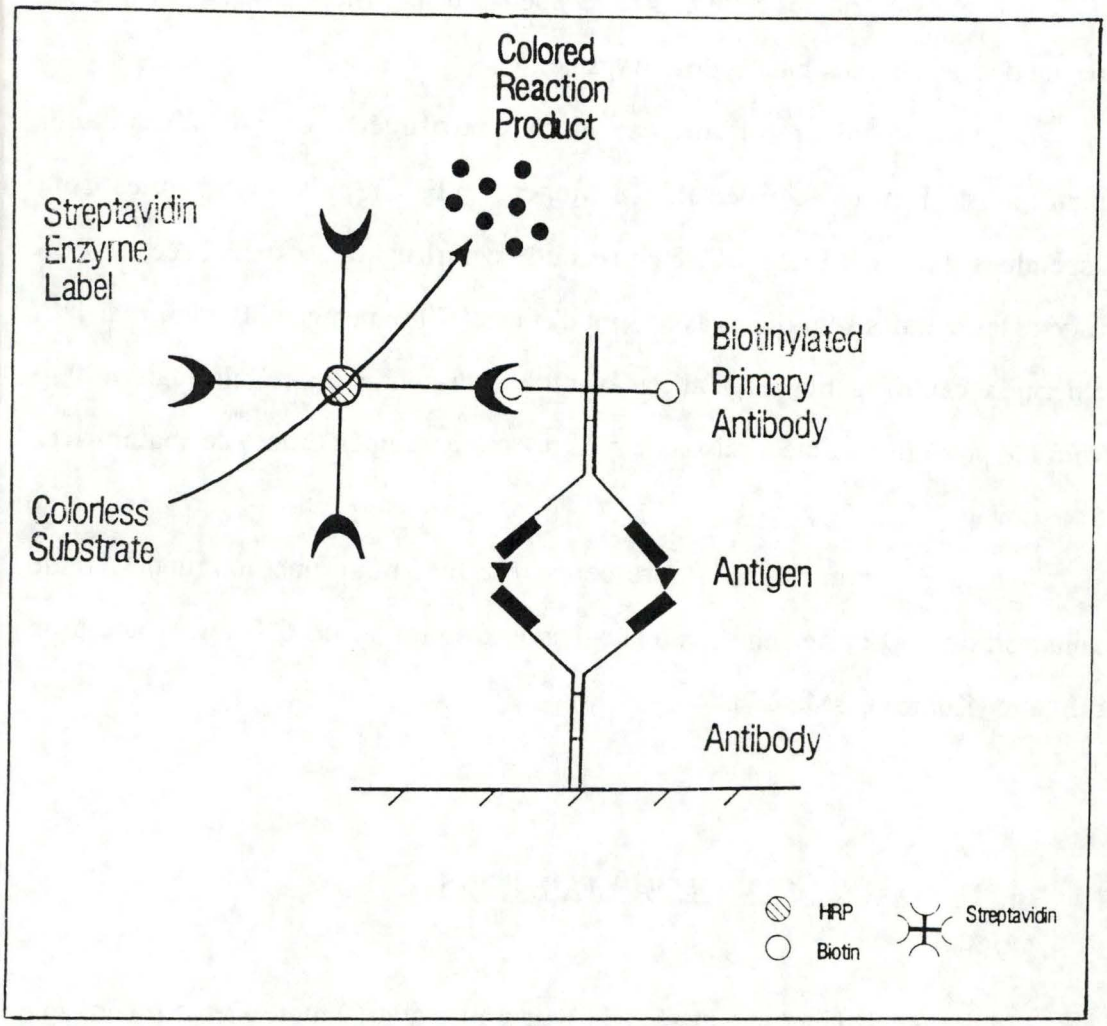


Fig. II.4. : Principe du test ELISA direct utilisé pour le dosage de l'IL-6 (d'après Immuno Stain Handbook).

avec une solution contenant de l'H_2O_2, substrat de la peroxydase, ainsi qu'avec une solution de tetraméthylbenzidine. Une coloration bleue apparaît lorsque l'IL-6 est présente et les cupules apparaîtront d'autant plus bleues qu'elles contiennent beaucoup d'IL-6. La réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de H_2SO_4 2 N (Fig. II.4.).

6.1. Matériels

-OPT, HLA, OPT+HLA 0.2 %, PDGF A/B : voir le point 2.1 des Matériels et Méthodes.

-PGE_2 : prostaglandine E_2 (P-5640, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) diluée dans de l'éthanol absolu (solution stock de 1 mg/ml) et conservée à -20°C.

Le dosage de l'interleukine 6 est réalisé grâce à un KIT ELISA provenant de chez Eurogenetics. Ce KIT contient :

-une plaque multipuits coatée avec des anticorps monoclonaux anti IL-6.

-des solutions standards en IL-6 de : 0, 10, 25, 50, 200 et 500 pg/ml, contenant 0.1 % de NaN_3, nécessaire pour leur conservation.

-une solution de rinçage à diluer 10 fois : tampon phosphate 10 fois concentré.

-des anticorps monoclonaux anti-IL-6 conjugués à la biotine, prête à l'emploi.

-une solution de streptavidine couplée à la HRP, prête à l'emploi.

-une solution A : substrat de la HRP, c'est à dire l'H_2O_2 dans du tampon citrate phosphate prêt à l'emploi.

-une solution B : solution de tétraméthylbenzidine chromogène, prête à l'emploi.

-une solution STOP : H_2SO_4 2 N.

La solution de rinçage, les anticorps conjugués anti-IL-6-streptavidine ainsi que la solution streptavidine-HRP contiennent des agents anti-microbiens afin d'assurer une meilleure conservation.

6.2. Méthodes

Les cellules sont repiquées dans une plaque 96 puits (Bibby, Corning, U.S.A.), comme décrit au point 1.2. des Matériels et Méthodes, à raison de 3200 cellules par puits. On ajoute à chaque puits 100 µl de la suspension cellulaire. Après 24 heures, les cellules sont stimulées au PDGF et/ou à la PGE_2. On ajoute par puits 100 µl de la solution contenant les médiateurs deux fois concentrés. Chaque test est réalisé en triple. Enfin, 24, 48 ou 72 heures après l'addition des médiateurs, on récupère les surnageants qui peuvent éventuellement être congelés à -20°C en attendant le dosage de l'IL-6.

Après décongélation des échantillons, on prélève 100 µl de chaque, que l'on incube à 37°C pendant 20 minutes, dans les puits "coatés" avec des anticorps anti-IL-6. Suite à cela, chaque puits est rinçé 5 fois avec du tampon de rinçage afin d'éliminer le matériel non fixé.

On met ensuite les anticorps monoclonaux anti-IL-6 biotinylés, à raison de 100 µl par puits, qu'on laisse incuber pendant 20 minutes à 37°C. Une seconde série de 5 rinçages est réalisée pour enlever les anticorps excédentaires.

Est ensuite ajoutée la streptavidine couplée à la HRP à raison de 100 µl par puits et la plaque est incubée pendant 20 minutes à 37°C. A nouveau 5 rinçages permettent d'éliminer la streptavidine-HRP en excès.

On ajoute alors 100 µl de solution A ainsi que 100 µl de solution B par puits. Une coloration bleue à cette étape est indicative de la présence d'IL-6 dans le milieu.

La réaction est arrêtée après 20 minutes d'incubation à température ambiante par l'addition de 50 µl de solution stop (la coloration bleue vire alors au jaune).

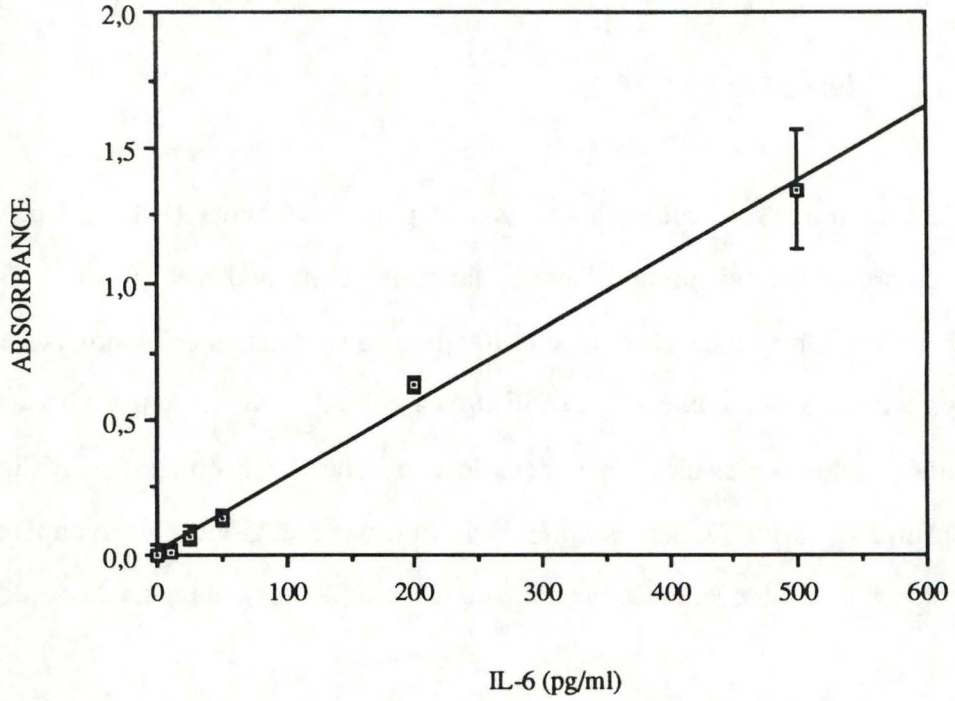


Fig. II.5. : Droite d'étalonnage exprimant la densité optique obtenue en fonction de la quantité d'IL-6 en pg/ml. Chaque point correspond à la moyenne de 3 déterminatons ± un écart type.

La lecture se fait à 450 nm grâce à un lecteur de plaques (Bio RAD, U.S.A.).

Les valeurs d'absorbance données par les standards nous permettent d'établir une droite d'étalonnage, exprimant la densité optique en fonction du nombre de pg/ml d'IL-6. Les valeurs d'absorbances obtenues pour les différents tests peuvent alors être transformées en pg/ml grâce à cette droite d'étalonnage (Fig.II.5.).

7 TEST DE CYTOTOXICITE AU M.T.T.

La méthode utilisée est celle décrite par Mosman (1983) et améliorée par Hansen et al. (1989).

La méthode est basée sur l'activité des déshydrogénases mitochondriales. Le M.T.T. [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium] (jaune), ajouté aux cellules, est incorporé et transformé par la succinate déshydrogénase, active uniquement dans les cellules vivantes, en cristaux de formazan de coloration bleue et insoluble en milieu aqueux. En présence d'une molécule toxique, le nombre de cellules vivantes capables de métaboliser le M.T.T. diminue et une relation peut être établie entre le nombre de cellules vivantes et la quantité de M.T.T. réduit.

7.1. Matériels

-OPT : milieu d'incubation OPTI-MEM (voir le point 1.1. des Matériels et Méthodes).

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

-H_7 : 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-méthyl pipérazine) (I.0260, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) diluée dans de l'éthanol absolu (solution stock de 10^{-2} M) et stockée à 4°C.

-Aminophylline : conservée à 4°C (A-1755, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) et diluée directement dans de l'OPT+HLA 0.2 % aux concentrations voulues.

-Forskoline : conservée à 4°C (F-6886, Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.). Solution stock de 10^{-2} M dans du DMSO, stockée à 4°C.

-PDGF A/B : platelet derived growth factor recombinant humain et stérile (Boehringer Mannheim, GmbH, Allemagne) dilué dans de l'OPT+HLA 0.2 % à raison de 1 ng/µl, fractionné et stocké à -70°C.

-PGE_2 : prostaglandine E_2 (Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.) diluée dans de l'éthanol absolu (solution stock de 1 mg/ml) et conservée à -20°C.

-PBS : tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0.9 %, pH 7.2.

-M.T.T. : [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium] dilué à raison de 2.5 mg/ml de PBS. Conservé à 4°C.

-Solution de lyse : On prépare une solution 30 % (w/v) de SDS (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans de l'eau bidistillée. Cette solution est chauffée à 37°C ainsi que du N,N-diméthyl formamide (DMF) (Merck, Darmstadt, Allemgne). On ajoute ensuite 1 volume de DMF pour 2 volumes de SDS-H_2O. Après dissolution complète, on met la solution à pH 4.7 en ajoutant de l'acide acétique 80 % (à 2.5 % final) et de l'HCl 1 N (à 0.25 % final). Cette solution est conservée à 37°C pour éviter qu'elle ne précipite.

7.2. Méthode

Les cellules sont repiquées dans des plaques 96 puits (Bibby, Corning, U.S.A.), comme décrit au point 1.2. des Matériels et Méthode, à raison de 30000 cellules par puits. La suspension cellulaire est répartie à raison de 100 µl par puits. On prévoit des cupules contrôle où les cellules sont cultivées dans de l'OPT+HLA 0.2 % seul ainsi que des blancs auquels on n'ajoute que de l'OPT+HLA 0.2 %. Pour chaque test on prévoit 6 cupules.

Vingt quatre heures après, on ajoute les médiateurs à tester deux fois concentrés à raison de 100 µl par puits. Les molécules testées sont les suivantes :

-H_7 : à 40, 20, et 10 µM en présence ou non de PDGF 10 ng/ml.

-Aminophylline : à $5x10^{-4}$ et $5x10^{-5}$ M en présence ou non de PDGF 10 ng/ml et/ou de PGE_2 (10^{-6} M).

-Forskoline : à 10^{-5} et 10^{-6} M en présence ou non de PDGF 10 ng/ml et ou de PGE_2 (10^{-6} M).

Les cellules sont alors incubées pendant 72 heures. Passé ce délai, on ajoute à chaque puits 50 µl de solution MTT et on réincube les cellules pendant 2 heures à 37°C. Le milieu est ensuite décanté afin d'éliminer le MTT non réduit et on ajoute 100 µl de réactif de lyse permettant la resolubilisation des cristaux de formazan. Pour assurer une dissolution complète, les plaques sont incubées à 37°C pendant une nuit. L'absorbance peut alors être lue à 595 nm grâce à un lecteur de multiplaques (Bio-Rad, U.S.A.) et le pourcentage de survie est calculé de la manière suivante :

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

8 ANALYSE STATISTIQUE

Nous avons appliqué le test t de Student à certains de nos résultats, afin de déterminer s'ils présentaient une différence significative entre eux. Ce test permet la comparaison de deux moyennes.

Nous avons utilisé la formule suivante :

$$t = \frac{(X_1 - X_2)}{S^2_g \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}$$

où $S^2_g = \frac{(n_1 - 1)\, s^2_1 + (n_2 - 1)\, s^2_2}{n_1 + n_2 - 2}$

et X_1 et X_2 : représentent les moyennes des échantillons comparés

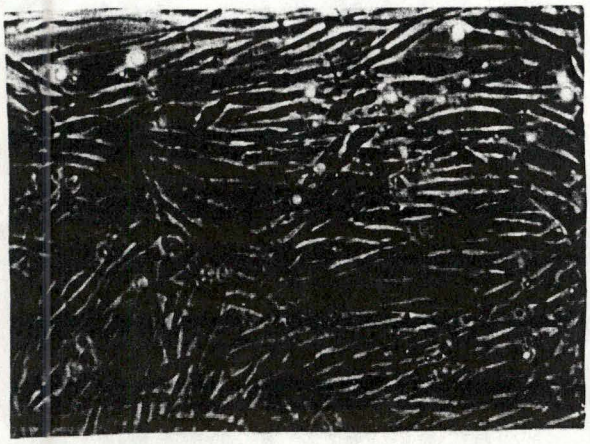
n_1 et n_2 : représentent le nombre de réplicats par test

S^2_1 et S^2_2 : la variance des échantillons comparés

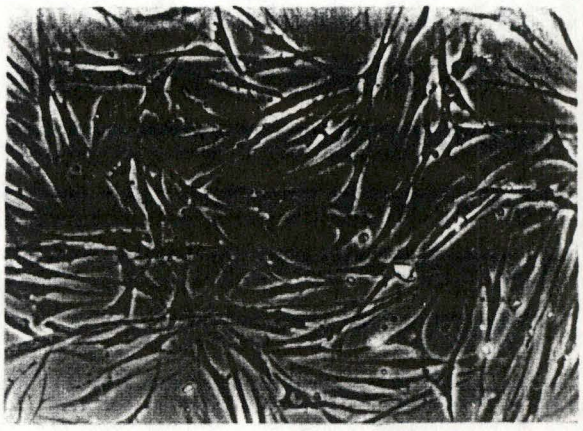
d.l. : le degré de liberté (= $(n_1 + n_2 - 2)$)

RESULTATS ET DISCUSSION

A.



B.



C.

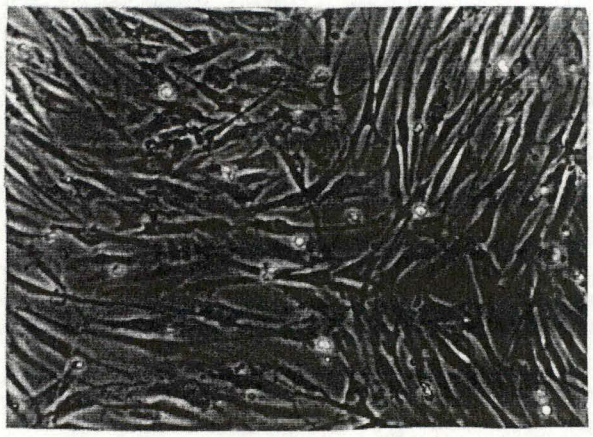


Fig. III.1. : Fibroblastes de poumon en culture cultivés en présence de PDGF (10 ng/ml) (A), d'IL-1 (20 U/ml) (B) ou dans du milieu OPT+HLA 0.2 % seul (C) après 24 heures d'incubation.

1.MODELE D'ACTIVATION PAR LE PDGF ET/OU L'IL-1 DU METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE

L'activation du métabolisme de l'acide arachidonique par l'IL-1 sur les cellules mésenchymateuses telles que les cellules synoviales, les chondrocytes et les fibroblastes pulmonaires a déjà été largement étudiée dans ce laboratoire (Knott, 1992; Burton, 1992). Comme confirmé par d'autres auteurs (Gilman et al., 1988), l'IL-1 active bien la PLA_2, libérant ainsi l'acide arachidonique (AA) qui pourra à son tour être métabolisé via les cyclooxygénase en prostaglandines (PGs) ou bien via les lipoxygénases en acides hydroxyéïcosatétraénoïques (HETEs) et en leucotriènes (LTs). De plus il a été montré que l'IL-1 induisait la synthèse de novo de PLA_2 et de cyclooxygénase sur les cellules synoviales (O'Neill et al., 1987; Knott, 1992). Nous avons donc développé un modèle comparatif d'activation des fibroblastes de poumon par l'IL-1 et la PDGF. La figure III.1. représente les fibroblastes stimulés ou non avec l'IL-1 ou le PDGF, pendant 24 heures.

Dans un premier temps, nous avons donc voulu voir si le PDGF pouvait également exercer un effet stimulateur sur le métabolisme de l'acide arachidonique. Trois types d'expériences peuvent être réalisées après stimulation des cellules :

-La première consiste, après une incorporation préalable d'AA tritié par les cellules, en une mesure quantitative de la radioactivité libérée.

-La seconde est une analyse qualitative des dérivés de l'AA tritié libérés dans le milieu de culture. Elle se réalise grâce à une chromatographie sur couche mince (TLC) permettant la séparation de l'AA et de ses dérivés.

-Finalement, la troisième analyse se réalise grâce à une chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Cette technique permet de qualifier et de quantifier de manière précise les différents composants libérés.

1.1. Analyse quantitative

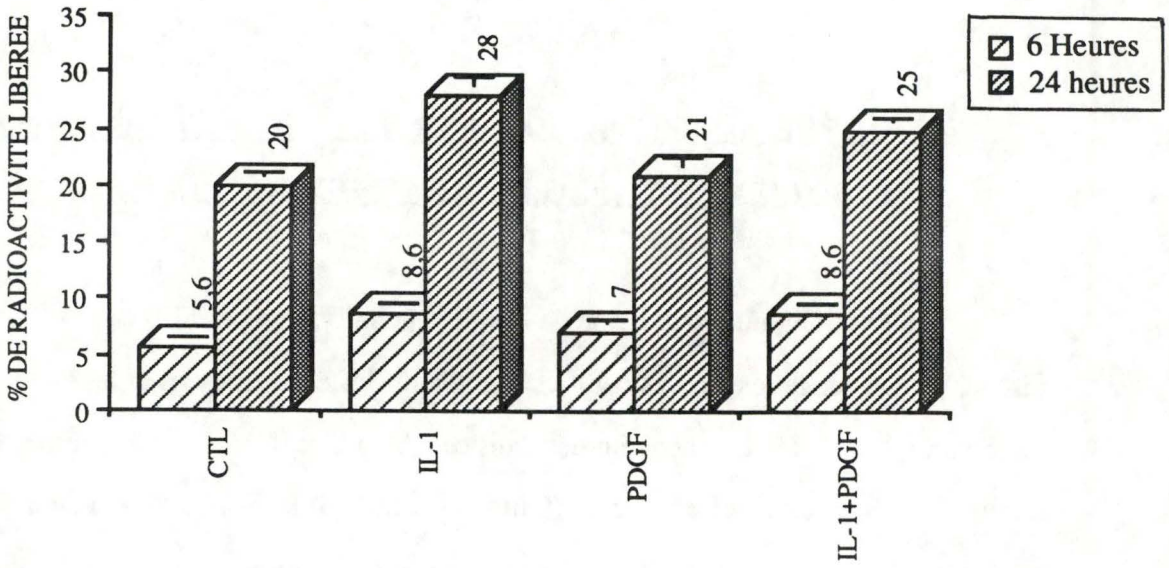


Fig. III.2. : Effet du PDGF AB (10 ng/ml) en présence ou non d'IL-1ß (20 U/ml) sur la libération d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les fibroblastes pulmonaires en dix-neuvième génération . Les cellules sont cultivées en présence d'OPT + HLA 0.2 % seul (CTL), ou additionné d'IL-1 ß, ou du PDGF seul, ou combinés l'un à l'autre pendant 6 et 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'AA* libéré par rapport à la radioactivité incorporée par les cellules. Chaque point correspond à la moyenne de trois cupules ± un écart-type.

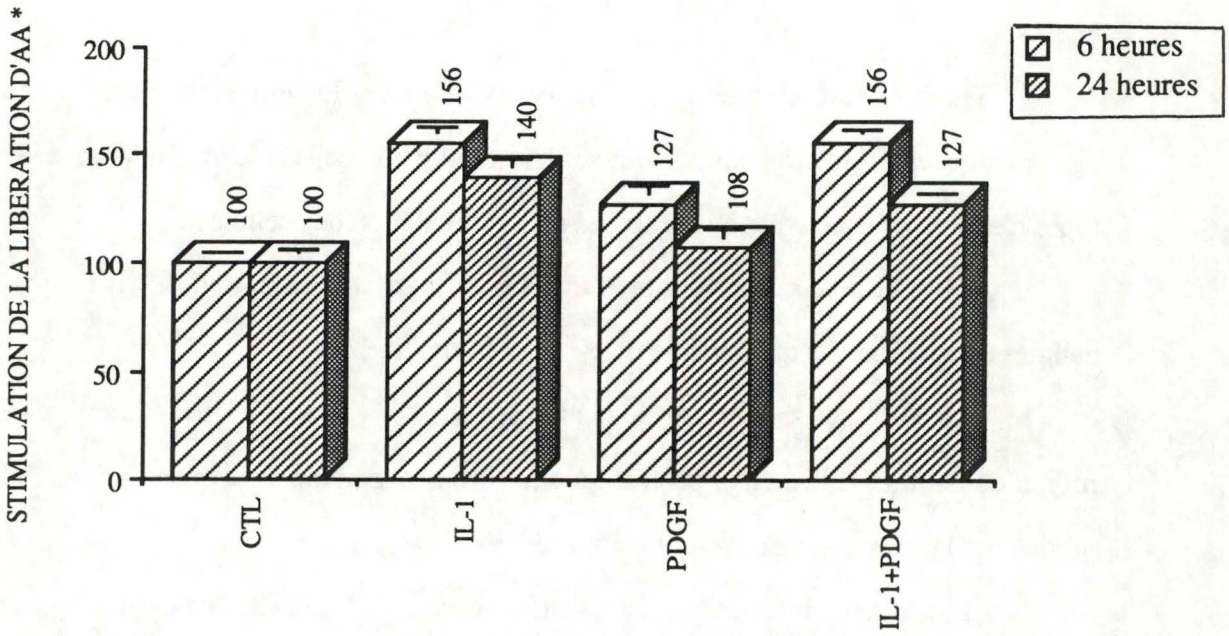


Fig. III.3. : Effet du PDGF AB (10 ng/ml) en présence ou non d'IL-1ß (20 U/ml) sur la libération d'acide arachidonique radioactif préalablement incorporé par les fibroblastes pulmonaires en dix-neuvième génération . Les cellules sont cultivées en présence d'OPT + HLA 0.2 % seul (CTL), ou additionné d'IL-1 ß, ou du PDGF seul, ou combinés l'un à l'autre pendant 6 et 24 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité libérée par rapport au contrôle posé comme égal à 100 %. Chaque colonne correspond à la moyenne de trois cupules ± 1 écart-type.

Les fibroblastes de poumon ont été préincubés pendant 18 heures en présence d'AA tritié puis stimulés à l'IL-1 (20 U/ml) et/ou au PDGF (10 ng/ml). On détermine ensuite après des temps de stimulation croissants (6 et 24 heures) la libération de la radioactivité dans le milieu de culture.

Les résultats de la figure III.2. ont été exprimés en % par rapport à la radioactivité incorporée au temps zéro. Ils montrent un effet stimulateur de l'IL-1β sur le métabolisme de l'AA après 24 heures de stimulation. Le PDGF quant à lui ne semble pas stimuler la libération d'AA et de ses dérivés puisque nous obtenons une valeur située au même niveau que le contrôle (20 % pour le contrôle et 21 % pour le PDGF). L'action combinée de l'IL-1 et du PDGF semble montrer un léger effet inhibiteur du PDGF (25 %) sur la stimulation induite par l'IL-1 (28 %).

Une autre manière d'exprimer les résultats, est d'exprimer le pourcentage de radioactivité libérée par rapport au contrôle, porté arbitrairement à 100 %. Ces résultats sont donnés à la figure III.3. De la même manière, on observe l'effet stimulateur de l'IL-1β, plus marqué à 6 heures (156 %) qu'à 24 heures (140 %). Le PDGF quant à lui, ne stimule que très faiblement après 6 heures d'incubation et n'a plus d'effet à 24 heures. L'action combinée des deux médiateurs à 24 heures, se révèle légèrement inférieure à la stimulation due à l'IL-1β seule.

La mesure de la radioactivité libérée dans le milieu nous permet d'avoir un apperçu global de l'activation de la PLA_2 mais ne nous renseigne en rien sur la nature des divers dérivés synthétisés suite à la libération d'AA. C'est pourquoi, nous avons complété l'expérience par une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (TLC).

1.2. Analyse quantitative par chromatographie sur couche mince ou thin layer chromatography (TLC)

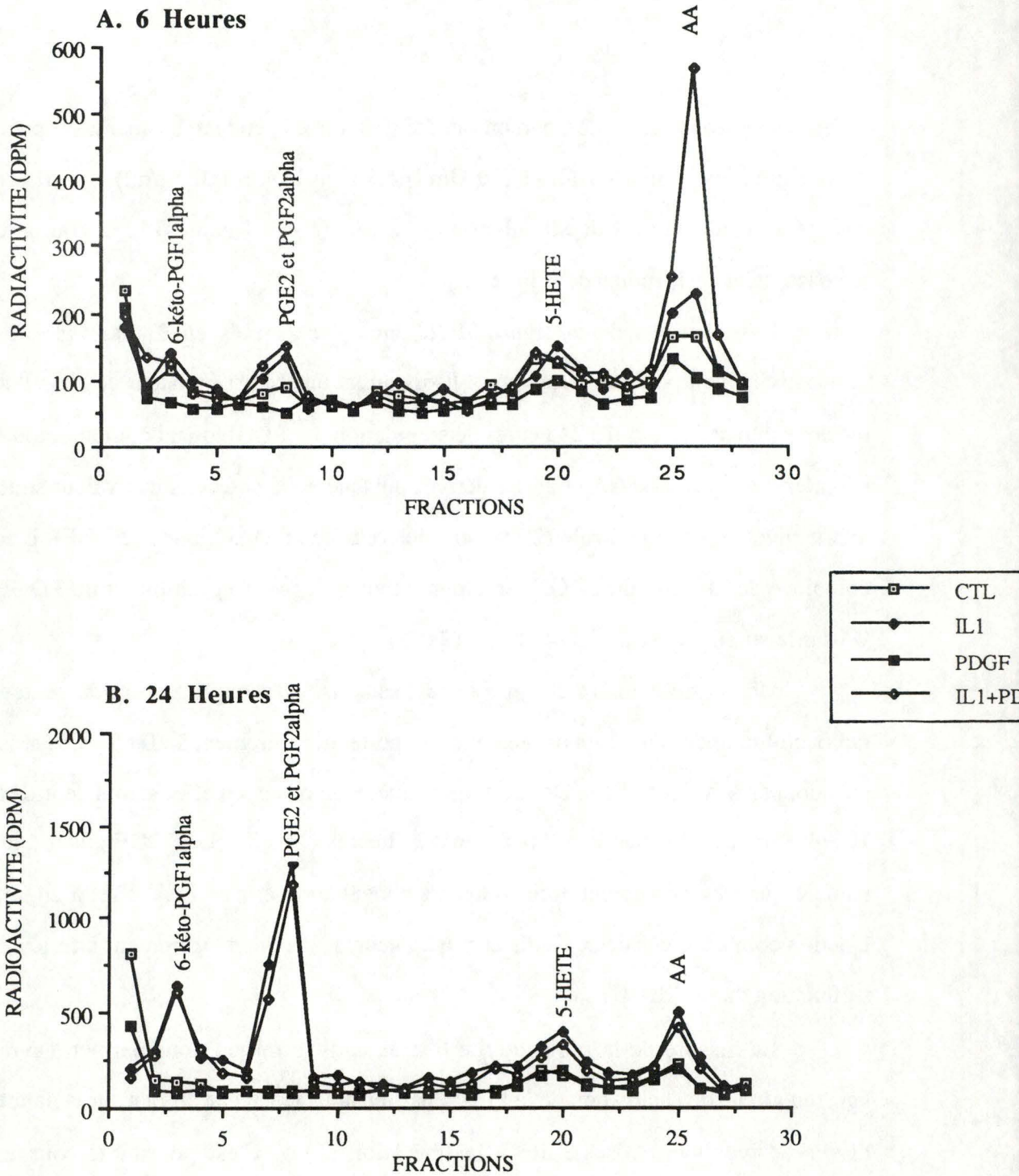


Fig. III.4. : Profil de migration après chromatographie sur couche mince d'échantillons obtenus à partir de fibroblastes pulmonaires en dix-neuvième génération. Les cellules ont été cultivées en présence d'OPT + HLA 0.2 % additionné d'IL-1ß (20 U/ml) ou de PDGF AB (10 ng/ml) ou en présence de ces deux cytokines combinées l'une à l'autre pendant 6 (A) et 24 (B) heures. Les quatre profils ont été superposés. Les résultats montrent la radioactivité (dpm) en fonction de la fraction. L'endroit de la migration des standards est indiqué sur la figure et chaque point représente la moyenne de deux échantillons.

Les cellules sont repiquées et préincubées pendant 18 heures avec de l'AA tritié et ensuite stimulées à l'IL-1 (20 U/ml) et/ou au PDGF A/B (10 ng/ml). Après 6 et 24 heures de stimulation, les surnageants sont recupérés, extraits et chromatographiés comme décrit au point 3 des Matériels et Méthodes.

Les résultats obtenus (Fig. III.4A.) révèlent qu'après 6 heures de stimulation à l'IL-1, on observe 4 pics correspondant à l'AA, au 5-HETE , à la 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$ et aux PGE_2 et $PGF_{2\alpha}$ confondues. Une stimulation au PDGF montre un profil semblable au contrôle avec une faible libération d'AA et de 5-HETE. La présence simultanée des deux médiateurs donne un profil se superposant à l'IL-1, avec cependant une diminution du pic en AA.

A 24 heures de stimulation à l'IL-1 (Fig. III.4B.), le profil de migration montre un pic important de $PGE_{2\alpha}$ et de $PGF_{2\alpha}$ confondues, de même que des petits pics de 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$, de 5-HETE et d'AA. Le PDGF ne semble toujours pas stimuler par rapport au contrôle et le profil obtenu pour les deux médiateurs (IL-1 et PDGF) simultanément se superpose à celui de l'IL-1 seule.

1.3. Analyse quantitative et qualitative par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

La TLC, de par sa faible sensibilité, ne nous permettant pas de mettre en évidence une synthèse éventuelle de prostaglandines par les fibroblastes lors d'une stimilation au PDGF, nous avons dosé les prostaglandines par une technique nettement plus sensible, celle de la chromatographie gazeuse couplée à un spectomètre de masse ou GC-MS.

La figure III.5. nous montre le dosage des prostaglandines réalisé en GC-MS suite à une incubation de 24 heures en présence de PDGF. On observe une stimulation de la synthèse de prostaglandine E_2 (PGE_2) ainsi que de 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$. Par contre, la synthèse de $PGF_{2\alpha}$ est identique au contrôle. Il est à noter que ces concentrations en

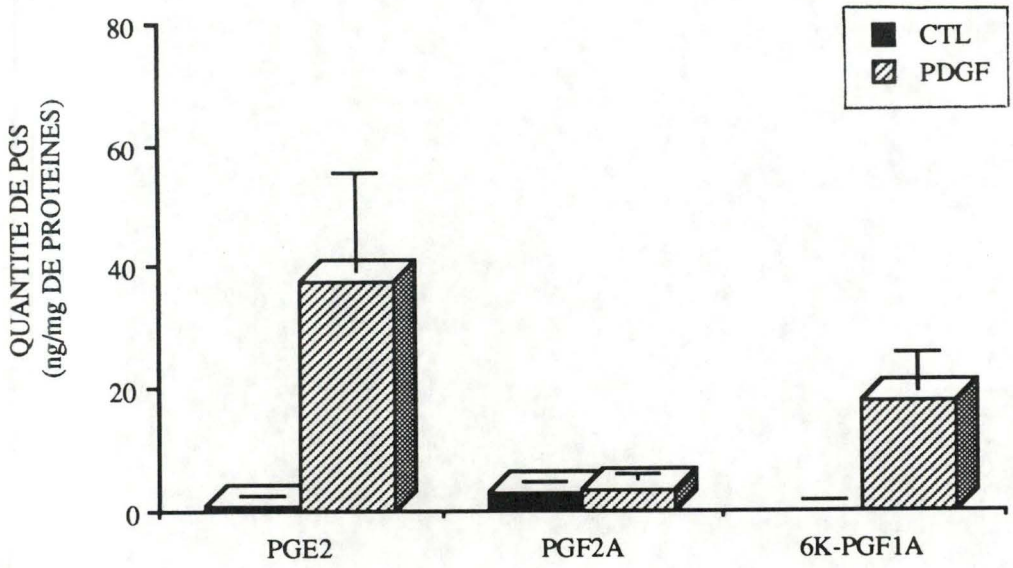


Fig. III.5. : Effet du PDGF (10 ng/ml) sur la synthèse de PGE_2, de $PGF_{2\alpha}$ et de 6-kéto-$PGF1\alpha$ par les fibroblastes de poumon en dix-neuvième génération. Les résultats sont exprimés en ng de prostaglandines par mg de protéines cellulaires. Chaque point représente la moyenne de 3 cupules ± un écart type.

prostaglandines restent néanmoins très faibles en comparaison aux résultats obtenus sur les cellules synoviales ou les chondrocytes humains stimulés à l'IL-1β (Knott, 1992).

1.4. Discussion

Les données de la littérature ainsi que les résultats obtenus sur les fibroblastes de poumon humains au laboratoire par Burton (1992) nous révèlent que l'IL-1 stimule surtout la libération de PGE_2 par les fibroblastes pulmonaires. Mais, outre cette prostaglandine, d'autres dérivés de l'acide arachidonique peuvent être également synthétisés. Parmi ceux-ci, on retrouve la 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$, la $PGF_{1\alpha}$, le LTB_4 et les 5- et 12-HETEs. En fait, lorsqu'on examine dans la littérature, les profils des dérivés de l'acide arachidonique produits par les cellules mésenchymateuses, on constate une grande diversité, mis à part la PGE_2 qui est toujours prépondérante. Les profils varient en fonction du type de cellules mésenchymateuses, de l'espèce dont elles proviennent, voire de la souche utilisée, et bien entendu en fonction de l'agent stimulant utilisé. Ainsi, Elliott et Van De Meent (1991) ont montré que des fibroblastes de peau stimulés à l'IL-1 produisaient de la PGE_2, de la PGI_2 et du 15- HETE de façon dose dépendante. D'autre part, Butler et al. (1989) et Lin et al. (1989) ont montré qu'une stimulation au PDGF respectivement sur des fibroblastes synoviaux ou des 3T3 murins, augmentait la synthèse de PGE_2 et ce par une synthèse de novo de prostaglandine H synthétase. Il semblerait également que le PDGF soit impliqué dans la régulation de la PLA_2, et qu'il stimule la libération de 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$, de TXA_2 et de $PGF_{2\alpha}$ (Habenicht et al., 1985). De plus, Chiou et al. (1990) ont montré que l'IL-1 induisait la synthèse de PGE_2 de façon dose dépendante uniquement en présence de PDGF sur les fibroblates BALB/c3T3.

Nous avons donc testé l'action de ces deux médiateurs sur le métabolisme de l'acide arachidonique, encore peu caractérisé dans la souche de fibroblastes que nous avons utilisée. Ces résultats nous montrent en effet que l'IL-1 stimule la synthèse de PGE_2 après 24 heures de stimulation. Par contre, les résultats en TLC ne nous montrent pas de synthèse de PGE_2 pour la stimulation au PDGF. Seul un dosage plus sensible par CG-MS nous a permis de détecter une faible quantité de PGE_2 par comparaison à ce qui est libéré lors d'une stimulation à l'IL-1 sur des cellules synoviales où on peut atteindre jusqu'à 1000 ng de PGE_2 /mg de protéines. De plus, l'effet de l'IL-1 et du PDGF

simultanément ne change en rien le profil obtenu pour l'IL-1 seule. Signalons également, le petit pic de HETE, induit après 24 heures de stimulation en présence d'IL-1 (Fig. III.4B.), ce qui suggère la présence de lipoxygénase(s) dans les fibroblastes de poumon. Cette observation devrait toutefois être confirmée par la technique de GC-MS, actuellement au point au laboratoire pour le dosage des 5-, 12- et 15- HETEs.

Après avoir recherché quels étaient les dérivés de l'acide arachidonique libérés nous avons voulu voir dans quelle mesure ceux-ci pouvaient médier ou moduler la prolifération induite par un facteur de croissance tel que le PDGF.

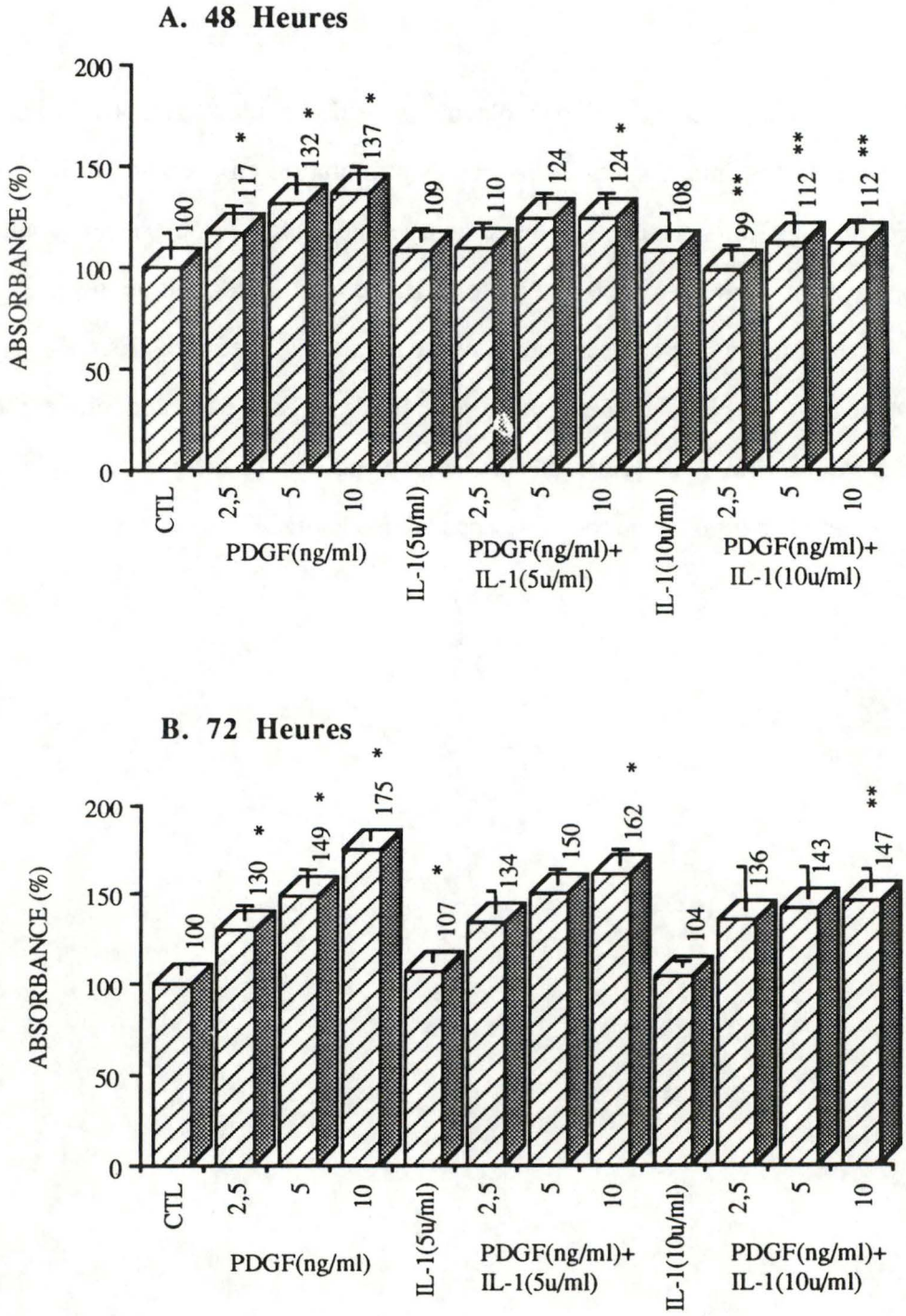


Fig. III.6. : Effet du PDGF AB (2.5, 5 et 10 ng/ml) en présence ou non de l'IL-1 ß (5 et 10 U/ml) sur la prolifération des fibroblastes de poumon en 22ème génération par la méthode à l'hexosaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 48 (A) et 72 heures (B). Les résultats sont exprimés en % par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type. Une analyse statistique a été réalisée par un test t de Student. Les valeurs du PDGF et de l'IL-1 seuls ont été comparées par rapport au contrôle, les valeurs des stimulations en présence des deux médiateurs simultanéments ont été comparés par rapport au PDGF seul. (* = significatif, ** = hautement significatif).

2. MODELE D'ACTIVATION PAR LE PDGF A/B DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE

2.1. Effet du PDGF A/B et/ou de l'IL-1β sur la prolifération cellulaire

2.1.1. Résultats

Avant de tester les divers médiateurs de l'inflammation sur la prolifération cellulaire, nous avons voulu vérifier l'effet pro-prolifératif du PDGF sur la prolifération de fibroblastes pulmonaires. De plus, l'effet stimulateur sur la prolifération de l'IL-1 sur les cellules synoviales ayant déjà été montré par les travaux de Burton (1991), nous avons voulu vérifier si cet effet pouvait être reproduit sur les fibroblastes de poumon humain en culture et si une synergie éventuelle pouvait être mise en évidence en présence de PDGF et d'IL-1.

Les concentrations utilisées en PDGF sont de 2.5, 5 et 10 ng/ml, celles en IL-1 sont de 5 et 10 U/ml. Les cellules ont été incubées pendant 48 et 72 heures en présence des médiateurs. La figure III.6. nous montre un effet nettement pro-prolifératif du PDGF déjà visible à 48 heures pour de faibles concentrations en PDGF (2.5 et 5 ng/ml) : il est de 117 % par rapport au contrôle pour une concentration en PDGF de 2.5 ng/ml. De plus l'action du PDGF est dose-dépendante puisqu'après 72 heures de stimulation en présence de PDGF, on obtient des valeurs de 130, 149 et 175 % par rapport au contrôle pour des concentrations en PDGF respectivement de 2.5, 5 et 10 ng/ml. Ces observations rejoignent bien ce qui avait été décrit dans la littérature à ce sujet. Par contre, nous n'avons pas obtenu d'effet stimulateur de l'IL-1β à 48 heures et seulement un très léger effet stimulateur à 72 heures pour une concentration en IL-1β de 5 U/ml. De plus, l'IL-1 combinée au PDGF, semble contrecarrer les effets de ce dernier. Ainsi, à 48 heures, à 5 U/ml en IL-1β et 10 ng/ml en PDGF et à 10 U/ml en IL-1β et à 2.5, 5 et 10 ng/ml en PDGF, on observe une inhibition significative par rapport au PDGF seul. De même, à 72

Table III-1 : Estimation de l'effet inhibiteur exercé par l'IL-1 sur la prolifération induite par le PDGF

	PDGF 2.5 ng/ml	**PDGF 5 ng/ml**	**PDGF 10 ng/ml**
48 heures	**% inhibition par l'IL-1**		
IL-1 (5 U/ml)	42.1	25	35.1
IL-1 (10 U/ml)	100	62.5	67.6
72 heures			
IL-1 (5 U/ml)	0	0	17.3
IL-1 (10 U/ml)	0	12.2	37.3

*Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule

$$100 - \left(\frac{ABS(\%)\{PDGF+IL\} - ABS(\%)CTL}{ABS\ (\%)PDGF - ABS(\%)CTL}\right) \times 100$$

heures d'incubation et pour des concentrations en PDGF de 10 ng/ml et de 5 et 10 U/ml en IL-1β, l'inhibition est également significative par rapport au PDGF seul. Les effets inhibiteurs de l'IL-1 sur la prolifération induite par le PDGF ont été estimés comme indiqués dans la Table III-1.

2.1.2. Discussion

L'effet stimulant de l'IL-1 sur la prolifération cellulaire ayant été bien décrit sur les cellules synoviales (Burton, 1991) ainsi que sur d'autres types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses vasculaires humaines (Libby et al., 1988), nous avons voulu tester l'effet de cette cytokine sur la prolifération des fibroblastes de poumon. Nous nous sommes également tournés vers le PDGF, agent mitogène puissant des fibroblastes (Demel et al., 1988; Pierce et al., 1991; Antoniades, 1991). De nombreux articles de la littérature nous rapportent que l'IL-1 seule est souvent peu mitogénique, tandis qu'en présence de PDGF, l'effet sur la prolifération est augmenté de façon synergique. De telles observations ont été obtenues sur les chondrocytes articulaires de lapin (Smith et al., 1991), les BALB/c 3T3 (Singh et al, 1988) et les cellules musculaires lisses vasculaires de lapin (Bonin et al., 1989). Mais contrairement à ce l'on aurait pu s'attendre, l'IL-1 n'a n'exerce pas d'effet pro-prolifératif sur les fibroblastes de poumon humains. De plus, aucun effet synergique avec le PDGF n'a pu être mis en évidence. Par contre, comme décrit dans la littérature, le PDGF est bien stimulateur de la prolifération. Son rôle est d'ailleurs important dans le cas de fibroses pulmonaires puisque sa concentration se trouve nettement augmentée dans les lavages broncho-alvéolaires, suite à l'arrivée des macrophages (Vignaud et al.,1991).

L'IL-1 ne montrant pas d'effet sur la prolifération cellulaire des fibroblastes de poumon, nous avons décidé de ne plus nous focaliser que sur le PDGF dans la suite de ce travail.

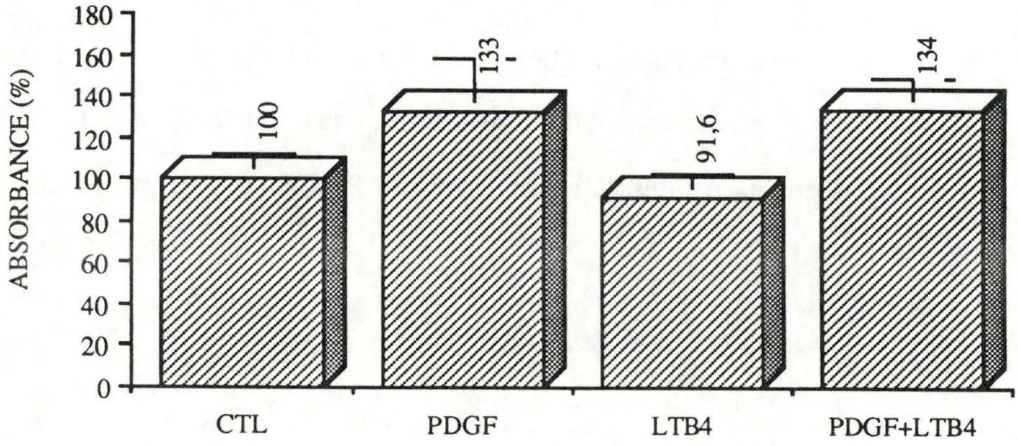


Fig. III.7. : Effet du PDGF (10 ng/ml) en présence ou non du LTB4 (10^{-7}M) sur la prolifération des fibroblastes de poumon en vingt-deuxième génération par la méthode à l'hexosaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type.

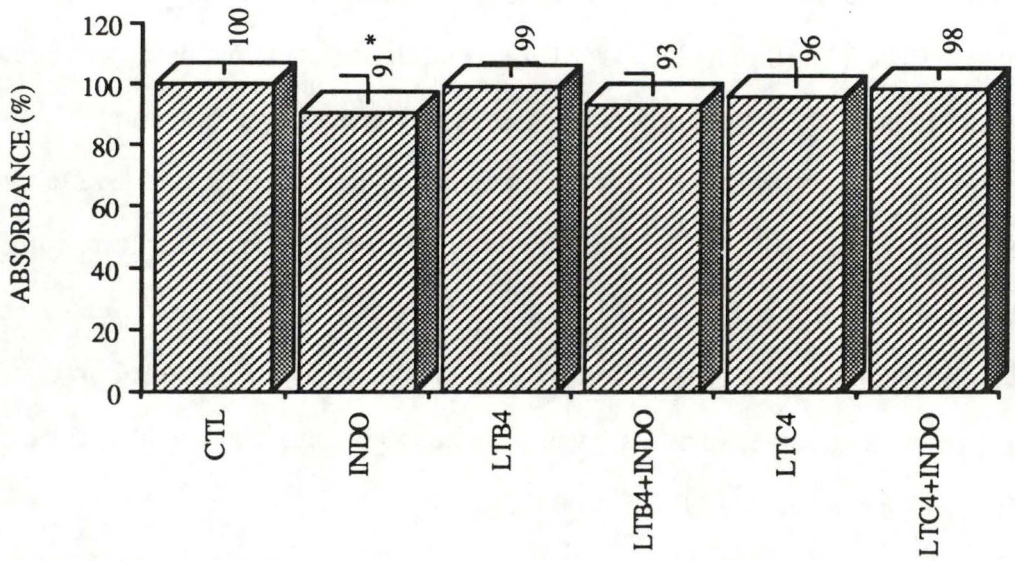


Fig. III.8. : Effet du LTB4 (10^{-7} M) et du LTC4 (10^{-7} M) en présence ou non d'indométhacine ($5x10^{-6}$ M) sur la prolifération de fibroblastes de poumon en vingt deuxième génération par la méthode à l'hexosaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non des médiateurs pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (=CTL) porté arbitrairement à 100 %. Les points représentent la moyenne de 6 valeurs ± un écart type . Un test statistique t de Student a été réalisé où chaque valeur a été comparée par rapport au contrôle. (* = significatif, ** = hautement significatif).

2.2. Influence des dérivés de l'acide arachidonique sur la prolifération cellulaire induite ou non par le PDGF

2.2.1. Résultats

Nous venons de voir dans l'introduction qu'outre les facteurs de croissance et les cytokines, d'autres médiateurs de l'inflammation tels les dérivés de l'AA étaient présents dans les lavages broncho-alvéolaires. Ainsi, Bernard et al. (1991) ont dosé des leucotriènes dans les lavages broncho-alvéolaires de patients souffrant d'ARDS, tandis qu'Elias et al. (1990) décrivent la présence de diverses cytokines dont l'IL-1, le TNF et l'IFNγ chez ces mêmes patients.

Nous avons donc voulu tester certains dérivés de l'AA tels que les LTB_4, LTC_4, les 5- et 12-HETEs et la PGE_2 sur la prolifération cellulaire, induite ou non par le PDGF, en vue de découvrir si ces derniers pouvaient médier ou moduler la prolifération induite par le PDGF.

La figure III.7. nous montre que le LTB_4 n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire aussi bien seul (91.6 % par rapport au contrôle) qu'en présence de PDGF (134 % par rapport à 133 % pour le PDGF seul). La concentration en LTB_4 choisie (10^{-7} M), est celle utilisée dans la littérature (Herlin et al., 1990). Mais, Baud et al. (1987) suivant la prolifération de fibroblastes de peau humaine, ont montré que le LTB_4 et le LTC_4 n'avaient d'effet stimulateur qu'en présence d'indométhacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase. C'est pourquoi, nous avons testé ces médiateurs sur la prolifération cellulaire en présence d'indométhacine cette fois. Cependant comme nous le montre la figure III.8., nous n'avons obtenu aucun effet de stimulation du LTB_4 ou du LTC_4 même en présence d'indométhacine.

De même, aucun effet stimulant n'a pu être montré pour les 5- et 12-HETEs (résultats non montrés).

Dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules mésangiales de rat (Floege et al., 1991), les fibroblastes 3T3 (Hori et al., 1991), les lymphocytes B, les

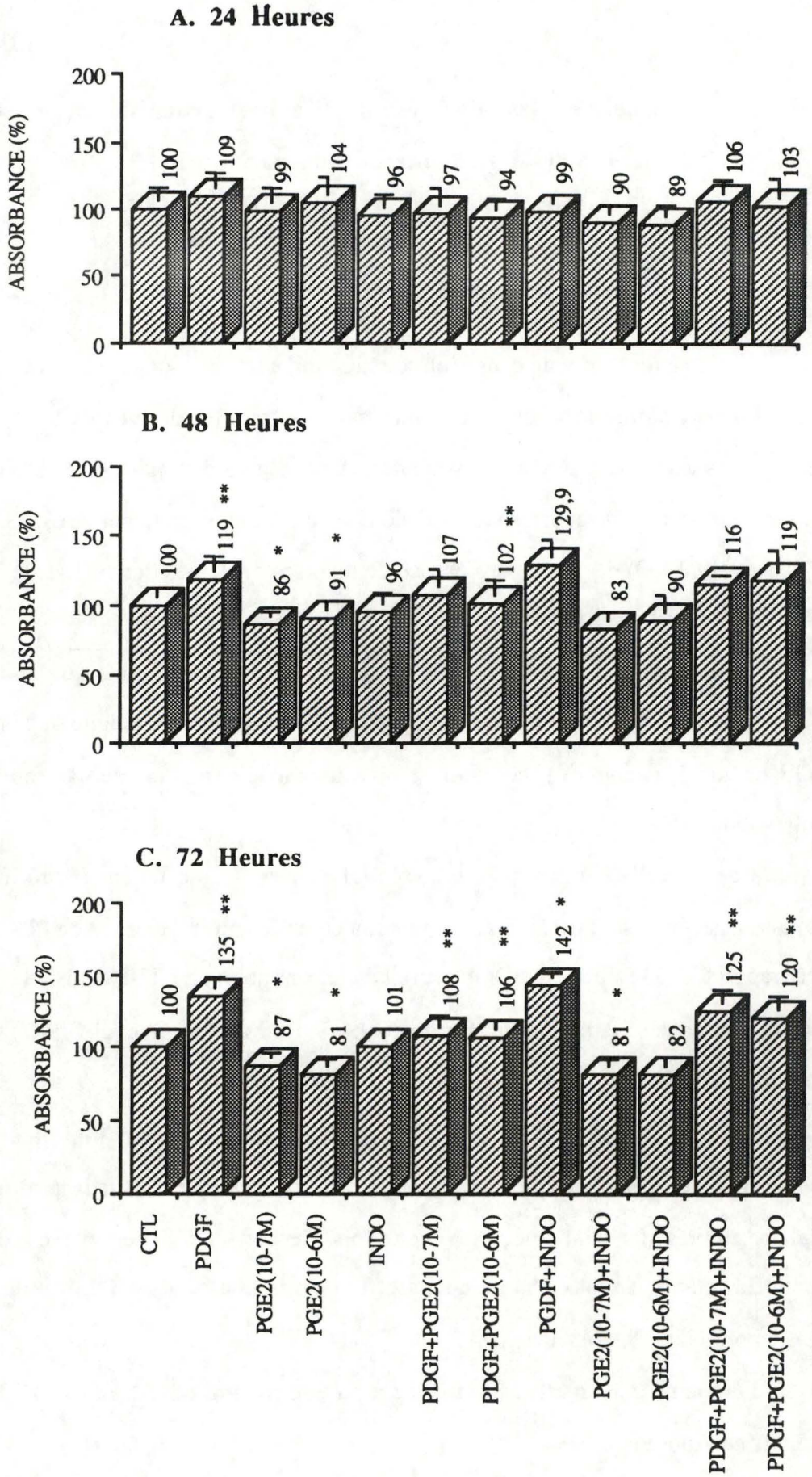

A. 24 Heures
ABSORBANCE (%)
200
150
100
50
0
100
109
99
104
96
97
94
99
90
89
106
103
B. 48 Heures
ABSORBANCE (%)
200
150
100
50
0
100
119 **
86 *
91 *
96
107
102 **
129,9
83
90
116
119
C. 72 Heures
ABSORBANCE (%)
200
150
100
50
0
100
135 **
87 *
81 *
101
108 **
106 **
142 *
81 *
82
125 **
120 **
CTL
PDGF
PGE2(10-7M)
PGE2(10-6M)
INDO
PDGF+PGE2(10-7M)
PDGF+PGE2(10-6M)
PGDF+INDO
PGE2(10-7M)+INDO
PGE2(10-6M)+INDO
PDGF+PGE2(10-7M)+INDO
PDGF+PGE2(10-6M)+INDO

Fig. III.9. : Effet du PDGF (10 ng/ml), de la PGE_2 (10^{-7} et 10^{-6} M) et de l'indométhacine combinés ou non les uns avec les autres sur la prolifération des fibroblastes de poumon en vingtième génération par la méthode à l'hexosaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non des médiateurs pendant 24 (A), 48 (B) et 72 (C) heures. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (=CTL) porté arbitrairement à 100 %. Les valeurs représentent la moyenne de 6 points ± un écart type. Un test statistique t de Student a été réalisé, comparant le PDGF, la PGE_2 et l'indométhacine par rapport au contrôle; le PDGF+PGE_2, le PDGF+INDO par rapport au PDGF seul; la PGE2+INDO par rapport à la PGE_2 seule et le PDGF+PGE_2+INDO par rapport au PDGF+PGE_2. (* = significatif, ** = hautement significatif).

lymphocytes T... (Goodwin, 1991), la PGE_2 est connue pour son action anti-proliférative et régulatrice de la croissance cellulaire. Nous avons donc testé son effet, seul ou en présence de PDGF sur la prolifération cellulaire. La PGE_2 a été testée pour des concentrations de 10^{-7} et 10^{-6} M, en présence ou non d'indométhacine à $5x10^{-6}$ M (inhibiteur de la cyclooxygénase et donc de la synthèse de prostaglandines endogènes) et/ou de PDGF (10 ng/ml). Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, porté arbitrairement à 100 %. Les cellules ont été incubées pour des temps de 24, 48 et 72 heures. La figure III.9. nous montre que dès 48 heures d'incubation, on observe un effet pro-prolifératif du PDGF (119 % par rapport au contrôle) tandis que la PGE_2 seule exerce un léger effet inhibiteur. L'indométhacine seule n'a aucun effet sur la prolifération et l'action combinée de PGE_2 et d'indométhacine en l'absence de PDGF, ne montre pas de différence par rapport à la PGE_2 seule. Ces résultats sont cohérents avec le fait que ces cellules ne synthétisent pas de prostaglandines en l'absence d'une stimulation extérieure (Fig. III.5). Par contre, la figure III.9. nous montre que la PGE_2 exerce un net effet inhibiteur sur la prolifération induite par le PDGF. On passe en effet de 135 % de stimulation pour le PDGF seul à 108 et 106 % de stimulation par rapport au contrôle pour des concentrations de 10^{-7} et 10^{-8} M en PGE_2 après 72 heures de stimulation. L'incubation de PDGF en présence d'indométhacine, induit une stimulation quelque peu supérieure à celle induite par le PDGF seul à 72 heures. On passe en effet de 135 à 142 % de stimulation par rapport au contrôle (résultats significatifs). Ces résultats suggèrent que le PDGF induit la synthèse de prostaglandines qui à leur tour exercent un effet de rétro-action négative sur la prolifération induite par ce PDGF, cet effet pouvant être renforcé par l'addition de PGE_2 exogène. Effectivement, en présence des trois médiateurs : PDGF (10 ng/ml), PGE_2 (10^{-7} et 10^{-8} M) et indométhacine ($5x10^{-6}$ M), les prostaglandines endogènes ne sont plus synthétisées, et la PGE_2 exogène seule contrecarre les effet du PDGF. L'inhibition est donc plus faible par rapport au test du PDGF en présence de PGE_2 seule (résultats hautement significatifs). On passe de 108 et 106 % à 125 et 120 % de stimulation par rapport au contrôle pour des concentrations de 10^{-7} et 10^{-8} M en PGE_2 après 72 heures de stimulation. A 48 heures, ces résultats ne sont pas significatifs.

2.2.2. Discussion

Parmi les dérivés de l'acide arachidonique, certains s'avèrent avoir un effet plutôt pro-prolifératif tandis que d'autres semblent inhiber la prolifération cellulaire.

Ainsi, dans la gamme des dérivés lipoxygénasiques, certains tels que le LTB_4, le LTC_4 et le LTD_4 stimulent la prolifération cellulaire de fibroblastes de peau, mais seulement si la synthèse de prostaglandines endogènes est bloquée par l'indométhacine (Baud et al., 1987). D'autres dérivés tels que le 15-HETE par contre, ont un effet inhibiteur sur la prolifération de cellules synoviales (Andreasen et al., 1990), et ce en inhibant la synthèse du LTB_4 par la 5-lipoxygénase.

Nous avons donc testé les LTB_4, LTC_4 et les 15- et 12-HETEs sur la prolifération des fibroblastes de poumon. Aucun effet, qu'il soit pro- ou anti-prolifératif n'a été montré pour ces médiateurs, même en présence d'indométhacine. Ils n'interfèrent pas non plus avec la prolifération induite par le PDGF.

Nous avons alors prospecté parmi les dérivés cyclooxygénasiques. La littérature nous montre que certaines prostaglandines telles que la PGE_2 semble être anti-proliférative sur les fibroblastes pulmonaires de rat (Tobey et al., 1990) et les cellules musculaires lisses (Brinckman et al., 1990), tandis que d'autres telles que la $PGF_{2\alpha}$ stimulent la prolifération de fibroblastes (Wickremasinghe, 1988). Mais, des effets pro-proliératifs ont également été décrits par d'autres auteurs. Ainsi, Durant et al., (1989) ont observé un effet pro-prolifératif de la PGE_2 sur les fibroblastes d'embryons de souris.

Nous avons donc testé l'effet de la PGE_2 sur la prolifération des fibroblastes pulmonaires. Contrairement aux autres dérivés de l'acide arachidonique, la PGE_2 provoque une inhibition bien marquée de la prolifération induite par le PDGF. Les résultats obtenus montrent également que la PGE_2 exogène et les prostaglandines endogènes contrecarrent les effets du PDGF. Nous avons essayé d'évaluer les effets inhibiteurs respectivement pour la PGE_2 exogène et les prostaglandines endogènes, dans la Table III.2., en considérant que la stimulation maximale obtenue pour les cellules

Table III-2 : Estimation du pourcentage d'inhibition obtenu pour les diverses combinaisons de médiateurs, après 72 heures.

Médiateurs	Stimulation (%)	Inhibition (%)
PDGF + INDO.	100	0
PDGF	83	17
PDGF+ PGE_2	14	86
PDGF + PGE_2 + INDO.	48	52

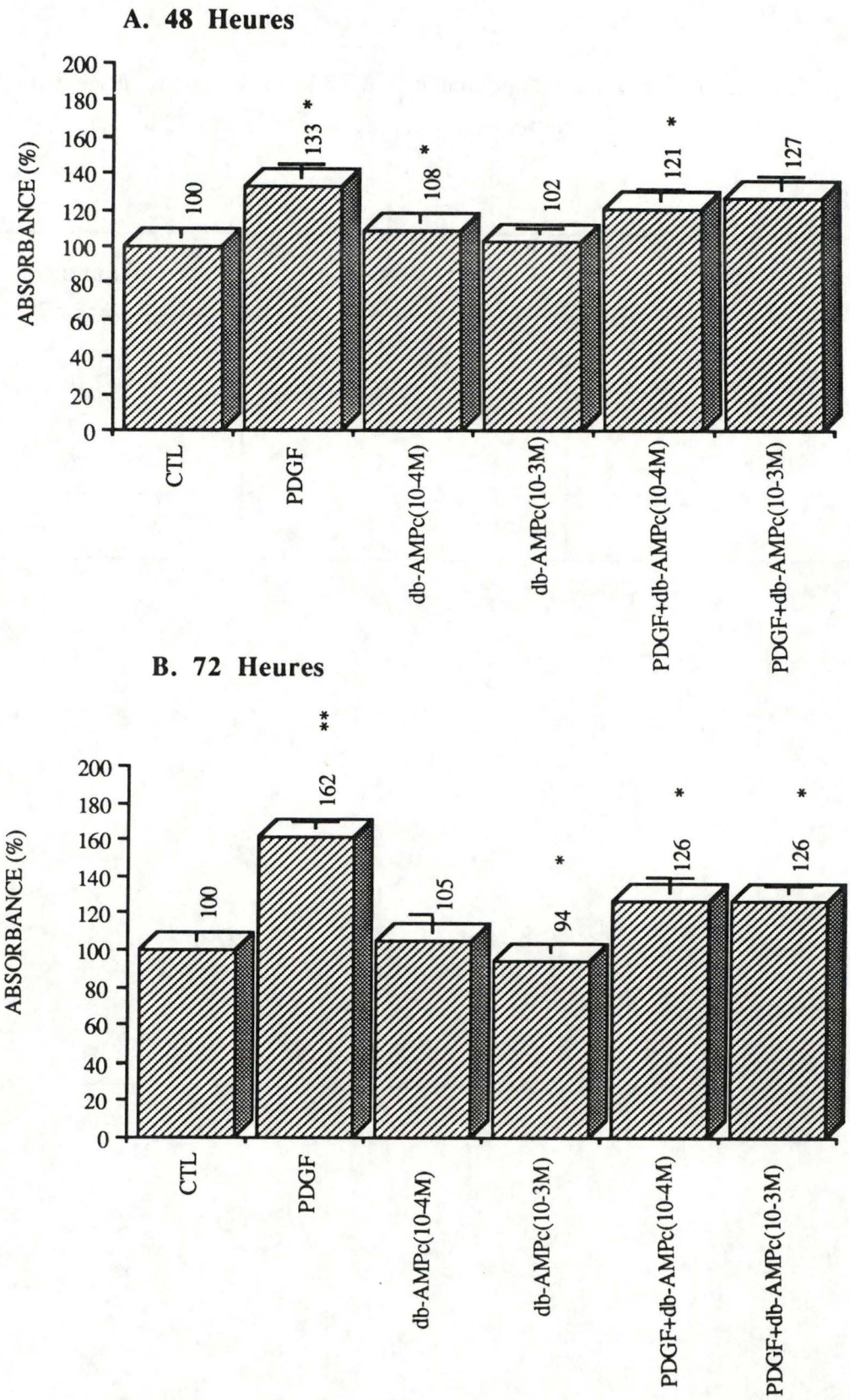


Fig. III.10. : Effet du PDGF (10 ng/ml) en présence ou non avec le db-AMPc (10^{-4} et 10^{-3} M) sur la prolifération des fibroblastes de poumon en vingt-cinquième génération par la méthode à l'hexosaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 48 (A) et 72 heures (B). Les résultats sont exprimés par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type. Un test statistique t de Student a été réalisé. Le PDGF et le db-AMPc seuls ont été comparés par rapport au contrôle; l'action combinée du PDGF et du db-AMPc a été comparée par rapport au PDGF. (* = significatif, ** = hautement significatif).

traitées avec le PDGF en présence d'indométhacine correspondait arbitrairement à 100 % de stimulation. On voit clairement que l'effet inhibiteur de la PGE_2 exogène (86 %) s'atténue quand on inhibe la synthèse endogène de prostaglandines (52 %).

Ceci montre bien que les voies de régulation sur la prolifération cellulaire ne sont pas simples et de surcroît, qu'elles peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre.

2.3. Rôle de l'AMPc dans la réponse proliférative au PDGF et à la PGE_2

L'AMPc est souvent responsable des effets exercés par la PGE_2, comme cela a été démontré dans plusieurs types cellulaires, dont les fibroblastes 3T3 (Burch et al., 1989), les fibroblastes du ligament périodontal humain (Saito et al., 1990) et les cellules de l'endomètre utérin de rat (Yee et Kennedy, 1991). Nous avons donc testé divers inhibiteurs ou activateurs de la voie de l'AMPc pour rechercher si une perturbation de la concentration intracellulaire en AMPc pouvait affecter l'action de la PGE_2. Mais avant cela, nous avons voulu vérifier l'effet de l'AMPc exogène sur la prolifération induite ou non par le PDGF.

2.3.1. Effet du db-AMPc

Les concentrations testées en dibutyryl-AMPc (db-AMPc) sont de 10^{-3} et 10^{-4} M (Burch et al, 1989). Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, porté arbitrairement à 100 %. Ainsi, la figure III.10. nous montre toujours l'effet pro-prolifératif du PDGF, aussi bien à 48 qu'à 72 heures. Cet effet est contrecarré par le db-AMPc. Ces résultats sont clairs après 72 heures de stimulation où l'effet du PDGF est de 162 % par rapport au contrôle tandis qu'en présence de db-AMPc à 10^{-3} et 10^{-4} M, il est ramenée à 126 % pour les deux concentrations en db-AMPc testées. Par contre, le db-AMPc seul n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire à 10^{-4} M à 72 heures, il semble pourtant inhiber légèrement la prolifération à 10^{-3} M. Les résultats obtenus reproduisent

Table III-3 : Estimation de l'inhibition exercée par le db-AMPc sur la prolifération induite par le PDGF et mésurée par la méthode à l'hexosaminidase

Médiateurs	Inhibition (%)	
	48 H	72 H
PDGF + db-AMPc (10^{-4}M)	36	58
PDGF + db-AMPc (10^{-3}M)	non significatif	58

Table III.4. Estimation de l'inhibition exercée par le db-AMPc et la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF après 72 heures et mesurée par la méthode à l'iodure de propidium.

Médiateurs	Inhibition (%)
PDGF+PGE_2	15
PDGF+db-AMPc	49
PDGF+PGE_2+db-AMPc	73

donc bien ceux qui avaient été obtenus pour la PGE_2. L'effet inhibiteur obtenu avec le db-AMPc a été estimé (Table III-3) : après 72 heures, il est de 58 % pour les deux concentrations en db-AMPc testées.

En vue de confirmer les résultats obtenus sur la prolifération cellulaire par la méthode à l'hexosaminidase, nous avons testé la prolifération cellulaire par une autre méthode : celle à l'iodure de propidium. Cette mesure nous donne toujours une indication indirecte de la prolifération cellulaire mais au lieu de doser une concentration en hexosaminidase (proportionnelle à la densité cellulaire), nous dosons l'ADN. Cette technique requiert beaucoup plus de cellules, est nettement moins sensible et plus fastidieuse à réaliser; nous avons donc choisi de ne tester que les médiateurs dont l'effet sur la prolifération des fibroblastes était évident. Ainsi, nous avons incubé les cellules pendant 72 heures en présence de PDGF (10 ng/ml), de db-AMPc (10^{-3} M) et de PGE2 (10^{-6} M), seuls ou combinés entre eux. La figure III.11. nous montre les résultats obtenus. L'effet pro-prolifératif du PDGF est toujours bien marqué et est de 159 % par rapport au contrôle. De même, ces résultats confirment bien l'effet inhibiteur de la PGE_2 (150 % par rapport à 159 % pour le PDGF), du db-AMPc (130 % par rapport à 159 % pour le PDGF) ainsi que celui de l'action combinée du db-AMPc et de la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF (116 % par rapport à 159 % pour le PDGF). L'effet inhibiteur dû au db-AMPc et à la PGE_2 combinés sur la prolifération induite par le PDGF, peut être estimé à 73 % (Table III-4). De façon étonnante, l'action combinée de la PGE_2 et du db-AMPc semble stimuler légèrement la prolifération cellulaire. Cette observation mériterait d'être vérifiée, mais nous avons préféré nous concentrer sur l'objectif principal de ce travail, comprendre comment la voie de la PGE_2/AMPc contrecarre les effets pro-prolifératifs du PDGF.

72 Heures

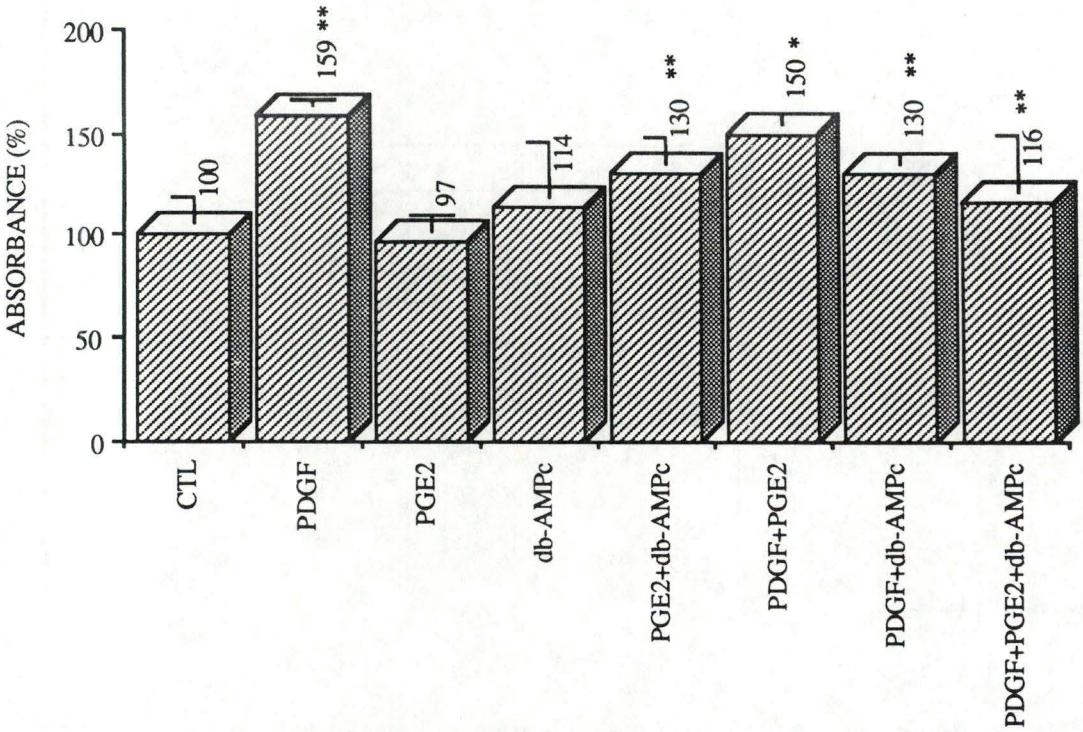


Fig. III.11. : Effet de la PGE2 (10^{-6} M) et du db-AMPc (10^{-3} M) en présence ou non de PDGF (10 ng/ml) sur la prolifération de fibroblastes de poumon en vingt et unième génération par la méthode à l'iodure de propidium. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA en présence ou non des médiateurs pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type. Un test statistique t de Student a été réalisé où le PDGF, la PGE_2 et le db-AMPc et la PGE_2+db-AMPc ont été comparés par rapport au contrôle; le PDGF+db-AMPc, PDGF+PGE_2 et PDGF+db-AMPc+PGE_2 par rapport au PDGF. (* = significatif, ** = hautement significatif).

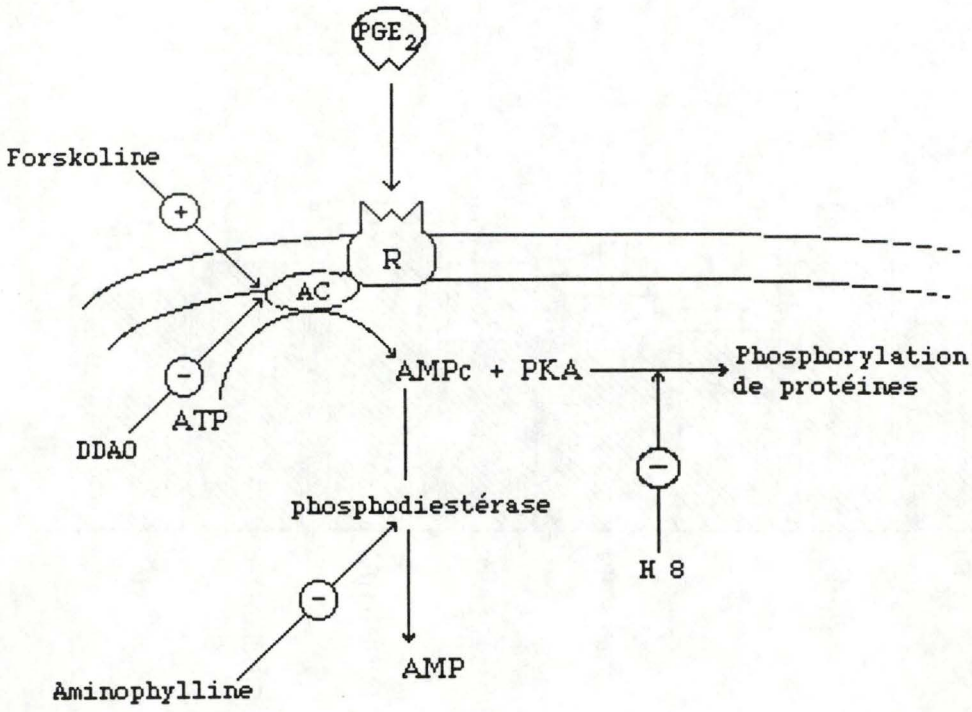


Fig. III.12. : Représentation schématique de la voie de l'AMP cyclique et des différentes molécules qui perturbent cette voie (DDAO = didéoxyadénosine monophosphate). La PGE2 se fixe sur son récepteur (R) qui est couplé à l'adénylate cyclase (AC). Celle-ci transforme l'ATP en AMPc qui à son tour active une protéine kinase A (PKA). Cette protéine peut alors phosphoryler d'autres protéines qui sont responsables d'une réponse cellulaire donnée.

2.3.2. Effet de certains inhibiteurs ou activateurs de la voie de l'AMPc : l'aminophylline, la forskoline, la didéoxyadénosine monophosphate et le H8

Afin de tenter de mettre en évidence le rôle joué par l'AMPc dans l'inhibition exercée par la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF, nous avons utilisé diverses molécules affectant d'une manière ou d'une autre la voie de l'AMPc. La figure III.12. illustre cette voie avec les différents activateurs ou inhibiteurs que nous avons utilisés et leurs sites d'action.

Suite à la liaison d'une molécule signal à son récepteur, l'adénylate cyclase est activée et catalyse la transformation d'ATP en AMPc. Ce dernier peut alors à son tour activer des protéines AMPc dépendantes telles que la protéine kinase A (PKA) qui peut alors phosphoryler d'autres protéines, responsables d'une réponse cellulaire donnée. La réaction se termine par l'inactivation de l'AMPc suite à son hydrolyse en AMP par la phosphodiestérase (PDE). L'aminophylline agit à ce niveau, en inhibant la PDE : l'AMPc n'étant plus hydrolysé, la concentration intracellulaire en AMPc sera maintenue élevée et la cellule restera activée. Une seconde molécule modulant positivement la concentration intracellulaire en AMPc, est la forskoline (diterpène de *Coleus forskohlie)*. Celle-ci active directement l'adénylate cyclase, provoquant une élévation du taux intracellulaire en AMPc. La didéoxyadénosine monophosphate (DDAO) quant à elle, agit directement sur l'adénylate cyclase en inhibant son activité et par delà même la formation intracellulaire en AMPc. Finalement, la dernière molécule utilisée est le H8 qui par son action inhibitrice sur la PKA, empêche la phosphorylation des protéines responsables de la réponse cellulaire.

Ces différentes molécules ont été utilisées aux différentes concentrations recommandées dans la littérature. Nous avons donc d'abord évalué leur cytotoxicité par la méthode au MTT (Fig. III.13.). Par exemple, l'aminophylline s'avère légèrement cytotoxique à $5x10^{-4}$ M, nous avons donc rejeté cette concentration pour la suite des expériences. La forskoline n'affecte pas la viabilité aux concentrations testées.

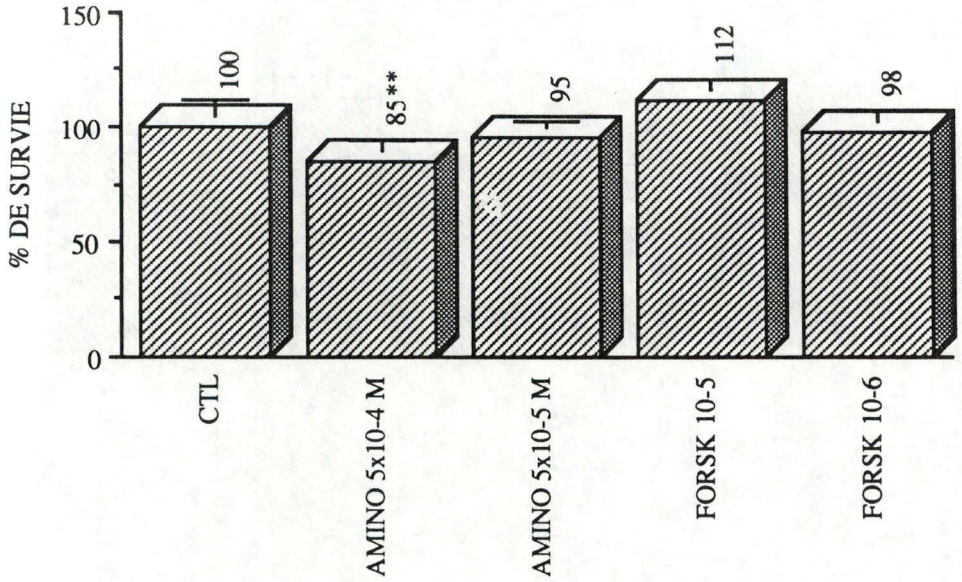


Fig. III.13. : Effet de l'aminophylline ($5x10^{-4}$ et $5x10^{-5}$ M) et de la forskoline (10^{-5} et 10^{-6} M) sur la survie des fibroblastes de poumon en vingt-cinqième génération par la méthode au MTT. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 72 heures. Les résultats expriment le pourcentage de survie. Le contrôle (=CTL) est fixé arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type. Un test statistique t de Student a été réalisé où chaque point a été comparé au contrôle (* = significatif, ** = hautement significatif).

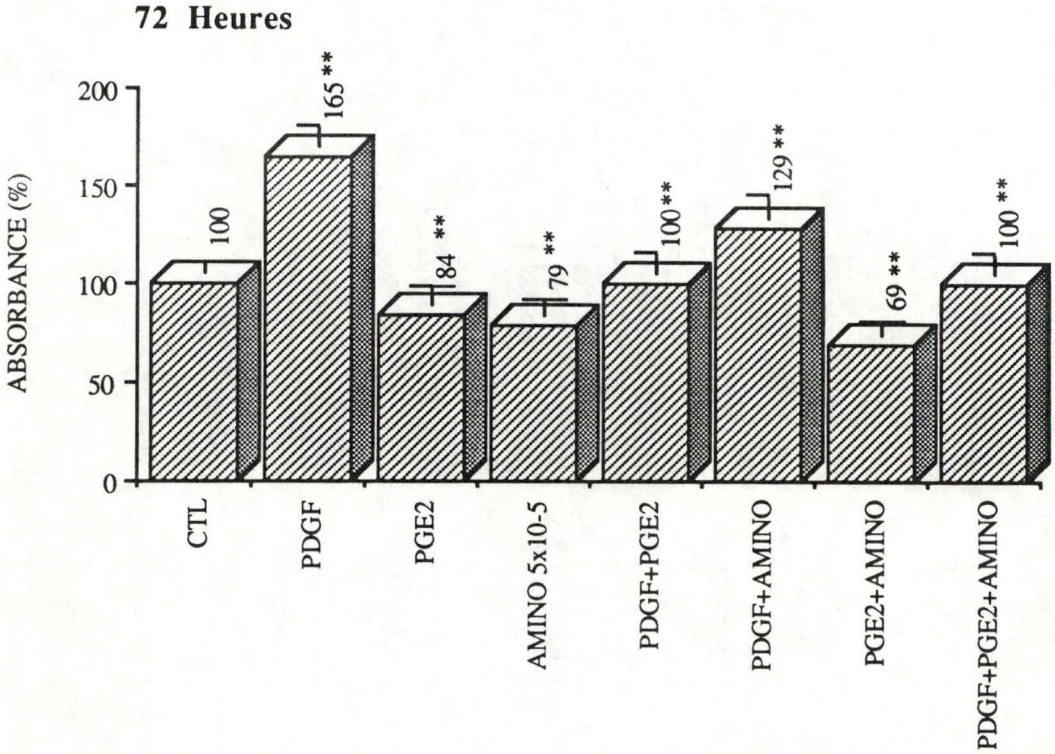


Fig. III.14. : Effet de l'aminophylline ($5x10^{-5}$ M) et de la PGE_2 (10^{-6} M) en présence ou non de PDGF (10 ng/ml) sur la prolifération de fibroblastes de poumon en seizième génération par la méthode à l'hexoaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA en présence ou non des médiateurs pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type. Un test statistique t de Student a été réalisé où le PDGF, la PGE_2 et l'aminophylline seuls et la PGE_2+aminophylline ont été comparés par rapport au contrôle; les tests PDGF+PGE_2, PDGF+AMINO et PDGF+PGE_2+AMINO par rapport au PDGF. (* = significatif, ** = hautement significatif).

2.3.2.1. L'aminophylline

Comme décrit plus haut, l'aminophylline maintient un taux intracellulaire en AMPc élevé, en empêchant son hydrolyse par la phosphodiestérase en AMP. Dans la littérature, l'aminophylline est utilisée à $5x10^{-4}$ et $5x10^{-5}$ M (Shirakawa et al., 1988). Les résultats obtenus sont les suivants : la figure III.14. nous révèle toujours l'effet pro-prolifératif du PDGF qui est de 165 % par rapport au contrôle, toujours rapporté à 100 %. La PGE_2 seule, semble exercer un léger effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (on passe de 100 % pour le contrôle à 84 % pour la PGE_2). On observe également un effet inhibiteur bien marqué de la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF (on passe de 165 % à 100 % de stimulation). Ces observations sont cohérentes avec les résultats obtenus avec le db-AMPc. La combinaison de la PGE_2 et de l'aminophylline (69 %) provoque une inhibition légèrement supérieure à la PGE_2 seule (84 %). Les cellules traitées avec le PDGF en présence d'aminophylline, proliferent moins (129 % par rapport aux cellules contrôles) par rapport à celles traitées avec le PDGF seul (165 % par rapport au contrôle). Quant à l'action des trois médiateurs simultanément, on n'observe pas d'inhibition plus forte qu'en présence de PGE_2 et de PDGF. Il semble qu'on arrive à un maximum d'inhibition.

2.3.2.2. La forskoline

Les cellules ont été incubées pendant 48 et 72 heures en présence des médiateurs. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle, porté arbitrairement à 100 %. Les concentrations utilisées en forskoline sont celles utilisées dans la littérature (10^{-5} et 10^{-6} M). Elles n'affectent pas la viabilité des fibroblastes pulmonaires (Fig. III.13). Nous n'avons représenté les résultats que pour le temps 72 heures. La figure III.15. nous montre l'effet pro-prolifératif du PDGF. La PGE_2 et la forskoline testées individuellement, inhibent légèrement la prolifération cellulaire. De même, la PGE_2

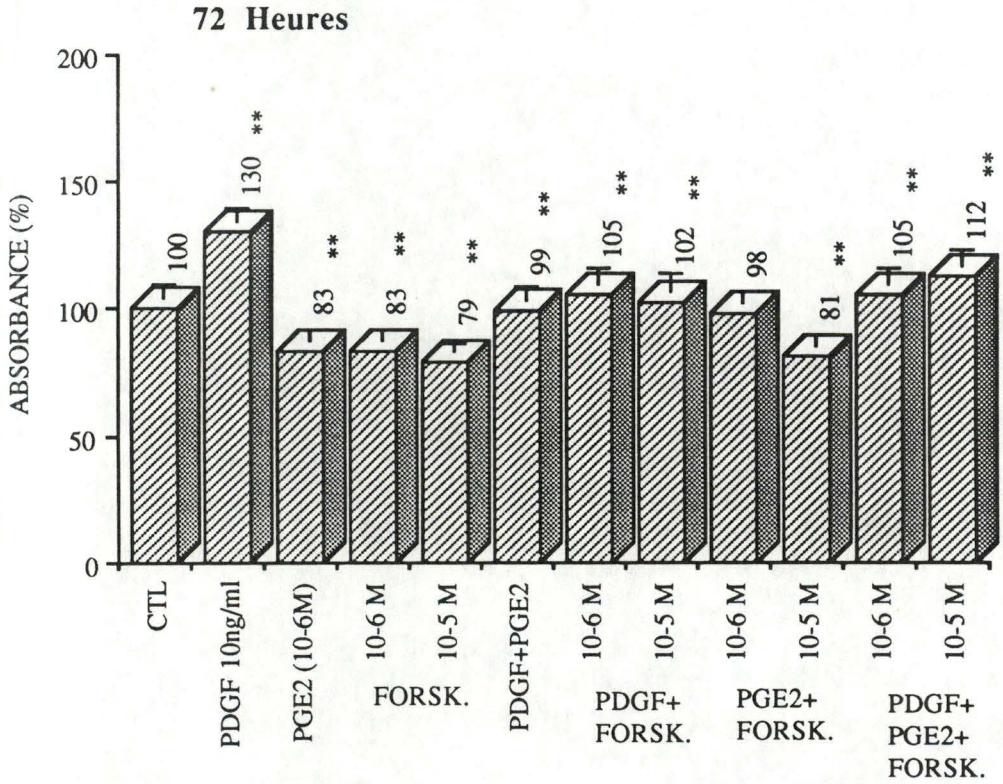


Fig. III. 15. : Effet de la forskoline (10^{-5} et 10^{-6} M) et de la PGE_2 (10^{-6} M) en présence ou non de PDGF (10 ng/ml) sur la prolifération de fibroblastes de poumon en vingt-deuxième génération par la méthode à l'hexosaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type. Un test statistique t de Student a été réalisé où le PDGF, la forskoline, la PGE_2 et PGE_2+forskoline ont été comparés au contrôle et le PDGF+PGE_2, PDGF+FORSK, PDGF+PGE_2+FORSK au PDGF. (* = significatif, ** = hautement significatif).

Table III-5 : Estimation de l'effet inhibiteur exercé par l'aminophylline, la forskoline et la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF après 72 heures.

Médiateurs	Inhibition (%)
PDGF+PGE_2	100
PDGF+AMINO $5x10^{-5}$ M	55
PDGF+PGE_2+AMINO $5x10^{-5}$ M	100
PDGF+PGE_2	103
PDGF+FORSK 10^{-6} M	83
PDGF+FORSK 10^{-5} M	93
PDGF+PGE_2+FORSK 10^{-5} M	60
PDGF+PGE_2+FORSK 10^{-6} M	83

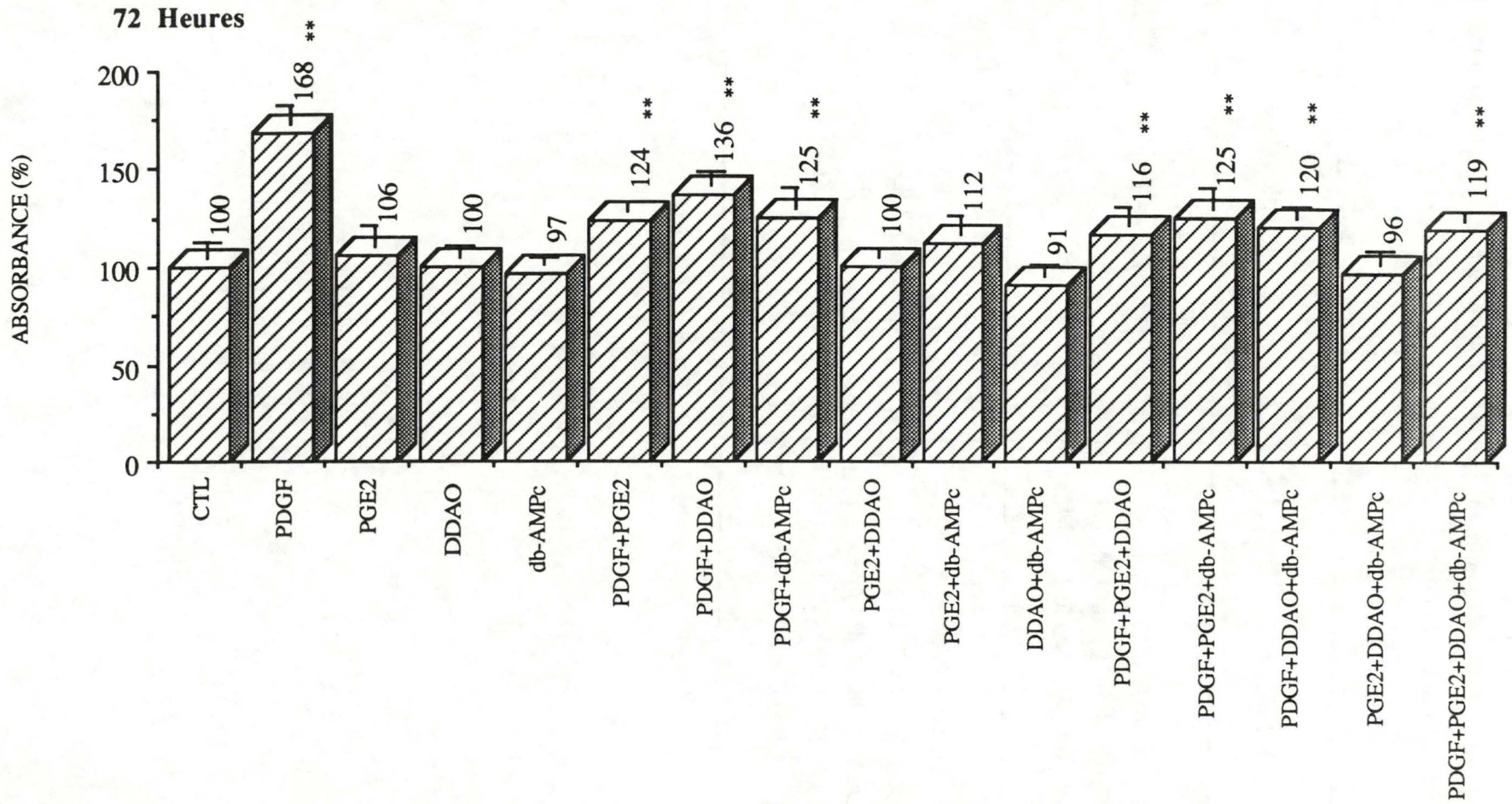


Fig. III.16 : Effet de la DDAO (didéoxyadénosine monophosphate) (10^{-4} M), du db-AMPc (10^{-3} M) et de la PGE_2 (10^{-6} M) en présence ou non de PDGF sur la prolifération des fibroblastes de poumon en vingt-cinquième génération par la méthode à l'hexosaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés par rapport au contrôle(=CTL) porté arbitrairement à 100 %. Les points représentent la moyenne de 6 points ± un écart type. Un test statistique t de Student a été réalisé où, le PDGF, PGE_2, DDAO et db-AMPc ont été comparés par rapport au contrôle et les autres combinaisons en présence de PDGF ont été comparées par rapport au PDGF seul.

inhibe toujours l'effet pro-prolifératif du PDGF : la stimulation de 130 % à 72 heures pour le PDGF est ramenée à 99 % en présence de PGE_2. La forskoline elle aussi, contrecarre l'effet du PDGF puisque nous passons de 130 % à 105 et 102 % pour des concentrations en forskoline de 10^{-6} et 10^{-5} M respectivement. On note également que l'action combinée de la PGE_2 et de la forskoline inhibe toujours le PDGF. Mais de manière comparable à la PGE_2 ou la forskoline seule. La Table III-5 reprend les % d'inhibition exercés par la forskoline, l'aminophylline et la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF.

2.3.2.3. La didéoxyadénosine monophosphate et le H8

Les cellules ont été incubées pendant 72 heures en présence ou non des médiateurs. La concentration en didéoxyadénosine monophosphate (DDAO) utilisée est de 10^{-4} M, cette concentration est celle utilisée par Brushfield et Johnson (1990). Les résultats, exprimés en % par rapport au contrôle, porté arbitrairement à 100 %, sont repris à la figure III.16. Seule, la DDAO n'affecte pas la prolifération par rapport aux cellules contrôles. Par contre, l'effet de la DDAO, qui rappelons-le, inhibe l'adénylate cyclase et la production d'AMPc, est inattendue en présence de PDGF. En effet, jusqu'à présent, nous avions toujours mis en évidence un effet inhibiteur de l'AMPc sur la prolifération induite par le PDGF. Or en bloquant cette synthèse par le DDAO nous observons également une inhibition de l'effet pro-prolifératif du PDGF. Ces observations suggèrent que l'AMPc pourrait être nécessaire, même en faibles quantités, pour que le PDGF exerce pleinement ses effets stimulants. Toutefois, les observations précédentes concernant le PDGF, la PGE_2 et le db-AMPc sont toujours vérifiées de même que l'action inhibitrice de la PGE_2 et du db-AMPc sur la prolifération induite par le PDGF (on passe de 168 % pour le PDGF à 124 % pour le PDGF+PGE_2 et à 125 % pour le PDGF+db-AMPc).

Pour toutes les combinaisons de médiateurs en présence de PDGF-db-AMPc et de DDAO (PDGF+db-AMPc+DDAO; PDGF+PGE2+db-AMPc+DDAO), l'effet du db-

Table III-6 : Estimation des effets exercés par le db-AMPc, la DDAO et la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF après 72 heures.

Médiateurs	Inhibition (%)
PDGF+PGE_2	65
PDGF+db-AMPc	63
PDGF+DDAO	47
PDGF+PGE_2+DDAO	76
PDGF+PGE_2+db-AMPc	63
PDGF+DDAO+db-AMPc	71
PDGF+PGE_2+DDAO+db-AMPc	72

Table III-7 : Estimation des effets exercés par le db-AMPc, le H8 et la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF après 72 heures.

Médiateurs	Inhibition (%)
PDGF+PGE_2	57
PDGF+db-AMPc	48
PDGF+H8	14
PDGF+PGE_2+H8	50
PDGF+PGE_2+db-AMPc	52
PDGF+H8+db-AMPc	64
PDGF+PGE_2+H8+db-AMPc	67

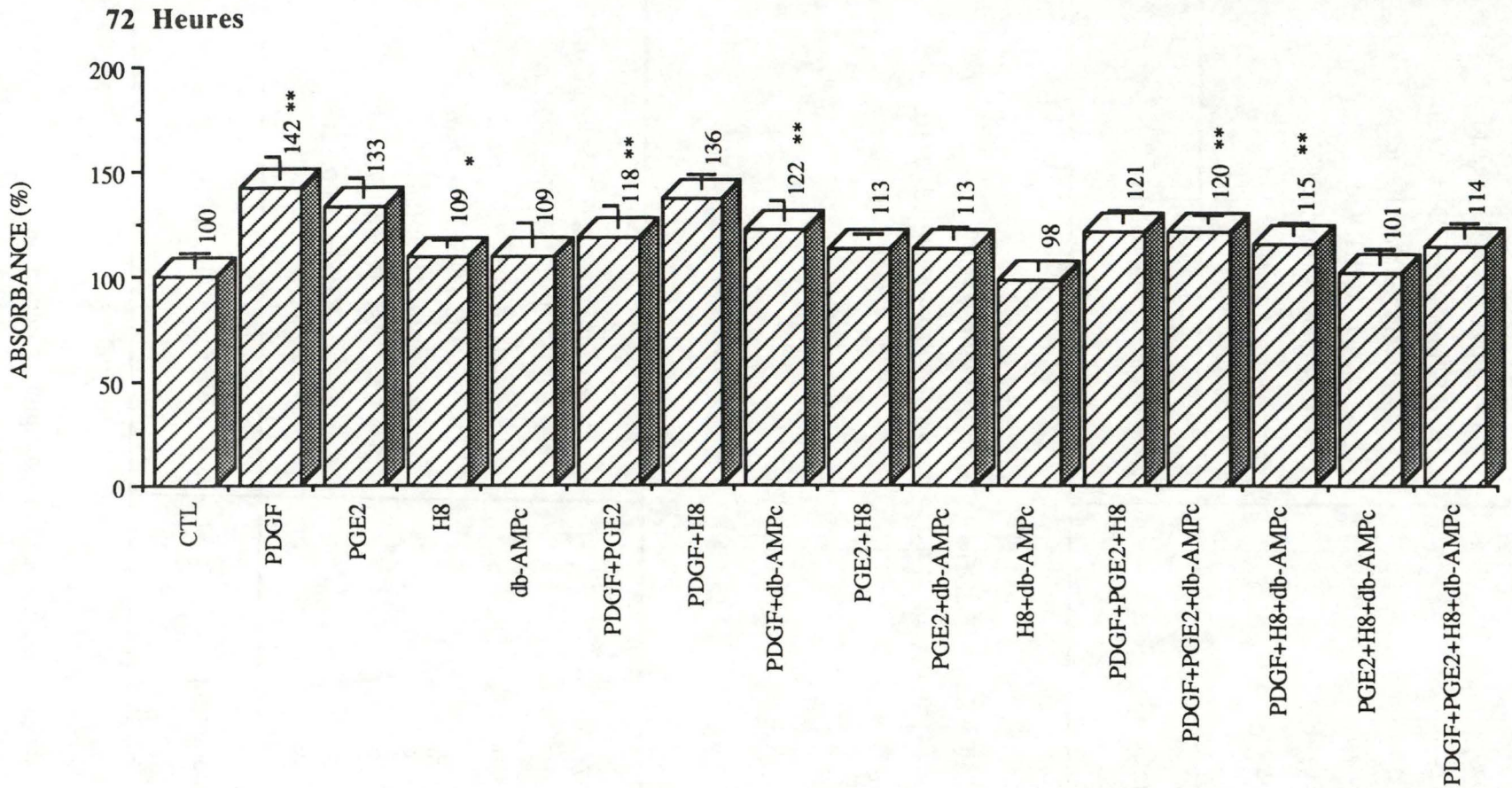


Fig. III.17. : Effet du H8 ($2x10^{-5}$ M) du db-AMPc (10^{-3} M) et de la PGE_2 (10^{-6} M) en présence ou non de PDGF sur la prolifération des fibroblastes de poumon en vingt-cinqième génération par la méthode à l'hexosaminidase. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés par rapport au contrôle(=CTL) porté arbitrairement à 100 %. Les points représentent la moyenne de 6 points ± un écart type. Un test statistique t de Student a été réalisé où, le PDGF, PGE_2, H8 et db-AMPc ont été comparés par rapport au contrôle et les autres combinaisons en présence de PDGF ont été comparées par rapport au PDGF seul. (* = significatif, ** = hautement significatif).

AMPc vient s'ajouter à l'effet de la DDAO sur le PDGF. La DDAO n'empêche pas le db-AMPc d'agir puisque ce dernier court-circuite l'adénylate cyclase. Les résultats obtenus pour les cellules traitées avec le PDGF, la DDAO et la PGE_2 sont inattendus, du fait que la PGE_2 agit normalement en amont de l'adénylate cyclase. Ils devraient donc être reconfirmés. (Fig. III.16). Les % d'inhibition dus à la DDAO, la PGE_2 et le db-AMPc sur la prolifération induite par le PDGF sont repris à la Table III-6.

Des résultats semblables ont été obtenus pour le H8, inhibiteur de la PKA (Fig. III.17.). Le H8 exerce également un effet inhibiteur sur l'effet pro-prolifératif du PDGF. Sur cette figure, l'inhibition du PDGF due au H8 n'est pas significative en raison du fait que le PDGF n'a que très peu stimulé mais d'autres expériences réalisées dans les mêmes conditions ont révélé un effet inhibiteur significatif du H8 sur le PDGF. D'autre part, tout comme pour la DDAO, l'addition de H8 ne relève pas l'inhibition entraînée par la PGE_2 ou le db-AMPc sur la prolifération induite par le PDGF. Mais, au contraire, l'inhibition semble plutôt s'accentuer (on passe de 122 % de stimulation pour le PDGF+db-AMPc à 115 % en présence de H8). La Table III-7 reprend les effets inhibiteurs exercés par le H8, le db-AMPc et la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF.

2.3.2.4. Effet de la concentration en db-AMPc sur la prolifération induite par le PDGF

Au vu des résultats précédents, nous nous sommes demandé si l'effet du db-AMPc ne serait pas dépendant de sa concentration intracellulaire : à forte concentrations, il inhibe bien les effets du PDGF sur la prolifération cellulaire; mais de faibles concentrations en AMPc seraient requises pour que le PDGF exerce ses effets stimulateurs. C'est pourquoi, nous avons testé le db-AMPc en présence ou non de PDGF sur une large gamme de concentrations (Fig.III.18.). Nous observons bien l'effet inhibiteur du db-AMPc de 10^{-7} à 10^{-13} M. Mais les faibles concentrations ne renforcent pas les effets du PDGF. Cette expérience ne nous permet donc pas de vérifier l'hypothèse

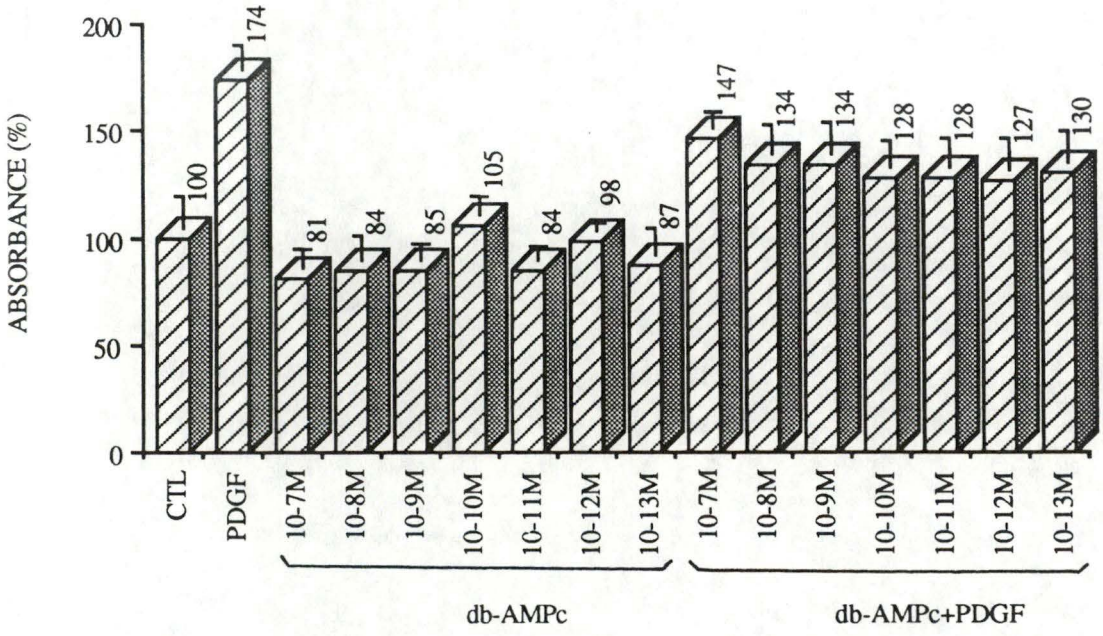


Fig. III.18. : Effet du db-AMPc (10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12} et 10^{-13} M) en présence ou non de PDGF (10 ng/ml) sur la prolifération de fibroblastes de poumon en dix-huitième génération. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2% en présence ou non des médiateurs pendant 72 heures. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (=CTL) porté arbitrairement à 100 %. Les points représentent la moyenne de 6 valeurs ± un écart type.

émise. Une étude plus approfondie par un dosage de l'AMPc intracellulaire devrait permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

2.3.3. Discussion

Tout comme on avait noté une grande complexité quant à l'action des divers dérivés de l'acide arachidonique sur la prolifération cellulaire, les résultats obtenus pour l'AMPc nous montrent qu'une fois de plus les voies de communication intracellulaires ne sont pas simples et qu'elles restent loin d'être bien comprises. De même, dans la littérature, les observations à ce sujet sont fort controversées. D'une part, certains auteurs semblent montrer un effet positif de l'AMPc sur la prolifération cellulaire. Ainsi, l'IL-1 induit la synthèse de PGE_2 dans les fibroblastes 3T3, PGE_2 qui à son tour provoque une augmentation du taux intracellulaire en AMPc et conduit à la prolifération (Burch et al., 1989). Des observations semblables ont été faites pour ce qui concerne le PDGF : Weinmaster et Lemke (1990) ont montré que l'AMPc potentialisait l'effet pro-proliératif du PDGF sur les cellules de Schwann de rat. Par contre, Boynton et Whitfield (1983) ont montré qu'une augmentation du taux en AMPc provoquait une inhibition de la prolifération.

Les résultats que nous avons observés vont d'une part dans le sens que la PGE_2 agirait via l'AMPc : c'est ainsi que lorsqu'on ajoute de l'aminophylline ou de la forskoline on favorise l'accumulation d'AMPc, renforçant encore l'inhibition due à la PGE_2. Par contre, les résultats obtenus pour la DDAO et le H8 semblent à priori contradictoires puisqu'en bloquant la voie de l'AMPc, nous ne relevons pas l'effet inhibiteur de la PGE_2. De plus, nous observons un effet négatif sur la prolifération induite par le PDGF en présence de ces deux molécules. Différentes hypothèses explicatives sont à envisager. Primo, la PGE_2 agirait via la voie de l'AMPc, comme nous l'avions supposé, mais il existerait une rupture du système AMPc/PKA, c'est-à-dire que l'AMPc n'agirait pas via la PKA. Par exemple, les travaux de Hurme et al. (1990) ont montré un effet stimulateur de l'AMPc sur la production d'IL1 induite par le PMA, alors que l'inhibition de la PKA n'a aucun effet sur cette production d'IL-1 par les cellules leucémiques myéloïdes humaines. Cette hypothèse expliquerait pourquoi le H8 ajouté au

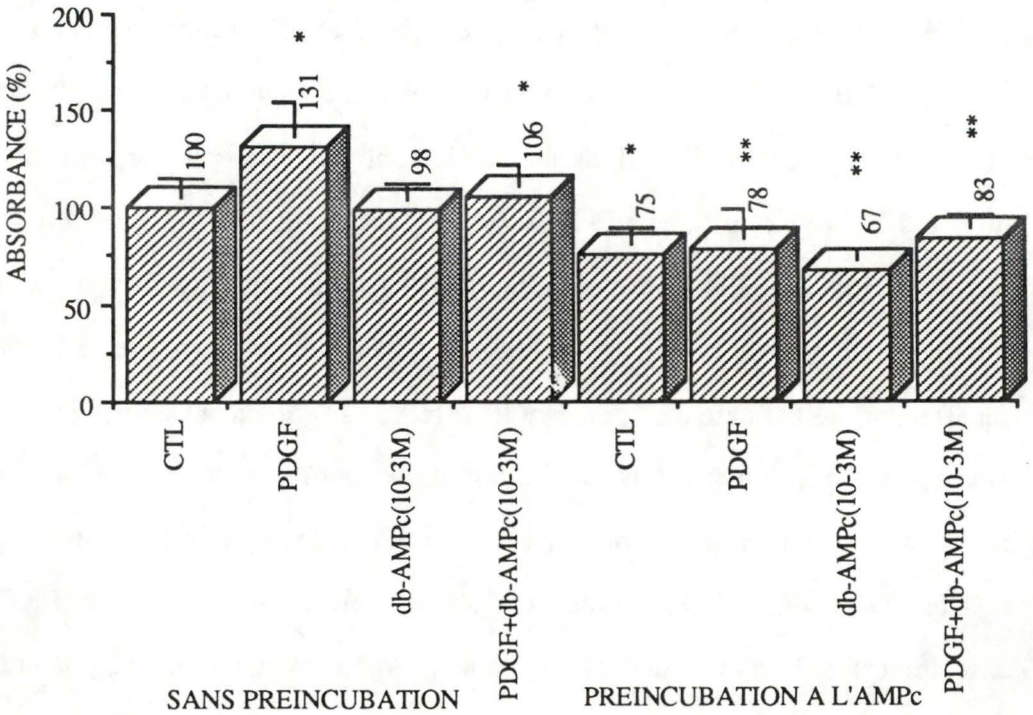
PDGF en présence du système AMPc/PGE_2, ne relève pas l'inhibition exercée par le système AMPc/PGE_2 sur le PDGF. Mais nous ne pouvons exclure un effet du H8 sur la PKC. Les inhibiteurs de protéine kinases actuellement sur le marché ne sont jamais spécifiques à 100 %. Cet effet sur la PKC expliquerait que le H8 seul diminue la prolifération induite par le PDGF. En effet, le PDGF, comme nous l'avons signalé dans l'introduction, active entre autres une phospholipase C, qui de manière indirecte active la PKC. Cet effet anti-PKC limiterait également les effets du PDGF en présence du système AMPc/PGE_2. Deuxièmement, nos résultats nous feraient penser que l'action pro-proliférative du PDGF s'exercerait donc en un premier temps en partie par la voie de l'AMPc. Ainsi, Rozengurt (1989) rapporte qu'il existerait un lien entre la PKC et l'AMPc. Il a en effet observé qu'une stimulation au PMA provoquait une augmentation de l'AMPc intracellulaire qui pourrait contribuer à l'action de facteurs agissant via la PKC. Cette hypothèse expliquerait les résultats obtenus avec le PDGF en présence de DDAO.

Une autre hypotèse quant à l'action de l'AMPc est que son effet sur la prolifération dépande de sa concentration intracellulaire. Pawelek (1979) a montré qu'une diminution en AMPc stimulait la prolifération tandis qu'à une concentration plus élevée, il exerçait un effet inhibiteur sur les cellules de mélanome de Cloudman S91. Encore une fois, seul un dosage de l'AMPc intracellulaire pourra nous donner la réponse puisqu'en testant une série de concentrations en AMPc sur la prolifération cellulaire induite par le PDGF, nous n'avons observé aucun effet dose dépendant du db-AMPc.

Bien qu'un certain nombre de questions restent en suspens et exigent des expériences supplémentaires, nous pouvons quand même tirer une conclusion importante : la voie de l'AMPc/PGE_2 est capable de contrecarrer les effets pro-prolifératifs du PDGF et pourrait donc constituer une voie physiologique de régulation négative de la prolifération cellulaire.

L'étape suivante consiste donc à essayer de voir par quels mécanismes le système AMPc/PGE_2 exerce ses effets inhibiteurs. Nous n'avons fait que dégrossir la question par une expérience relativement simple.

A. 48 Heures



B. 72 Heures

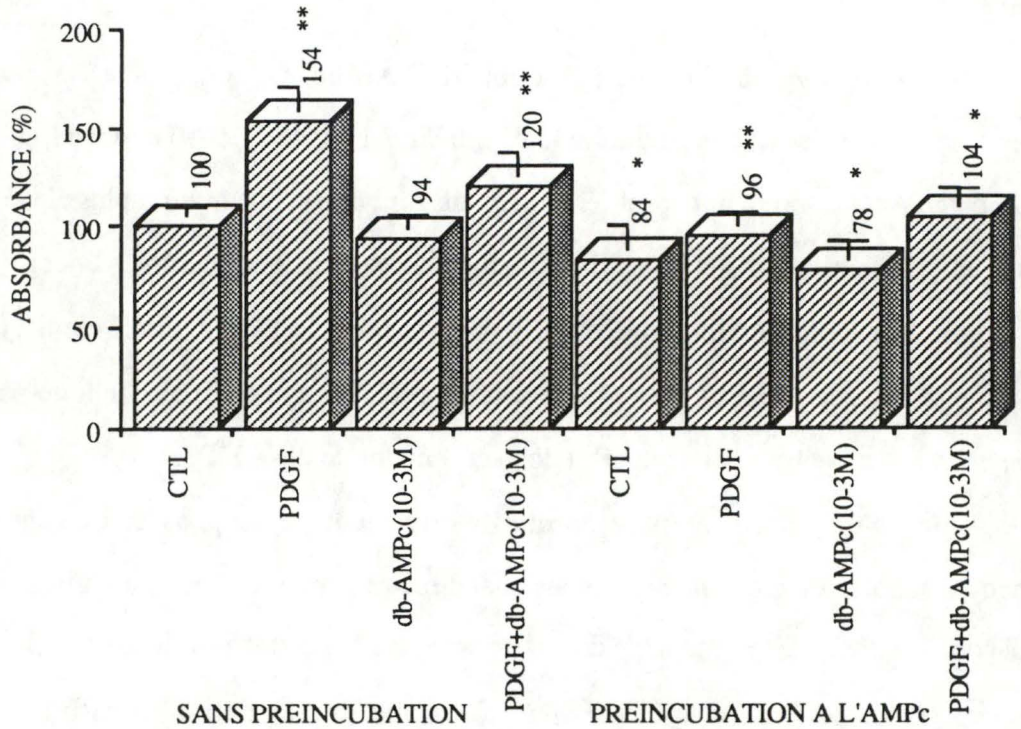


Fig. III.19. : Effet d'une préincubation de 24 heures au db-AMPc en présence ou non de PDGF sur la prolifération de fibroblastes de poumon en dix-neuvième génération. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 48(A) et (72) heures. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (=CTL) qui est fixé arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type. Un test statistique t de Student a été réalisé où chaque point ayant subi une préincubation, est comparé à son contrôle. (* = significatif; ** = hautement significatif).

2.3.4. Hypothèse quant au mécanisme d'action de l'AMPc sur la prolifération cellulaire induite par le PDGF

Après avoir observé l'effet inhibiteur du db-AMPc sur la prolifération induite par le PDGF, nous avons émis deux hypothèses concernant le mécanisme d'action de ce db-AMPc.

Selon la première hypothèse, l'inhibition due au db-AMPc serait le résultat d'une compétition entre le PDGF et la voie de l'AMPc pour une même voie de communication intracellulaire, la voie de l'AMPc étant favorisée par l'addition de PGE_2 sur le db-AMPc.

La seconde expliquerait l'action du db-AMPc par une action négative au niveau des récepteurs au PDGF.

Afin de vérifier laquelle de ces deux hypothèses s'avèrerait correcte, nous avons réalisé l'expérience suivante : les cellules ont été préincibées en présence ou non de db-AMPc (10-3 M). Suite à celà, elles ont été stimulées ou non par du PDGF (10 ng/ml), du db-AMPc (10-3 M) ou en présence des deux médiateurs simultanément. Dans la première hypothèse, une fois le db-AMPc retiré du milieu, il ne doit plus inhiber l'effet pro-prolifératif du PDGF. Par contre, dans le cas où la deuxième hypothèse est correcte, le db-AMPc agissant négativement au niveau du récepteur au PDGF il diminuerait les interactions entre le PDGF et son récepteur. C'est en effet bien ce que l'on observe comme montré par la figure III.19. : après préincubation avec le db-AMPc, le PDGF a perdu la capacité d'induire la prolifération cellulaire. Avec préincubation en présence de db-AMPc, la stimulation de la prolifération induite par le PDGF (par rapport aux contrôles correspondants) ne représentent que 22.22 % de celle induite par le PDGF sans incubation.

Cette expérience indique qu'il faudra vérifier les effets du système AMPc/PGE_2 sur les récepteurs au PDGF : le nombre de récepteurs diminue-t-il? L'affinité des récepteurs est-elle affectée?... Ces questions seront abordées mais dépassent le cadre de ce travail.

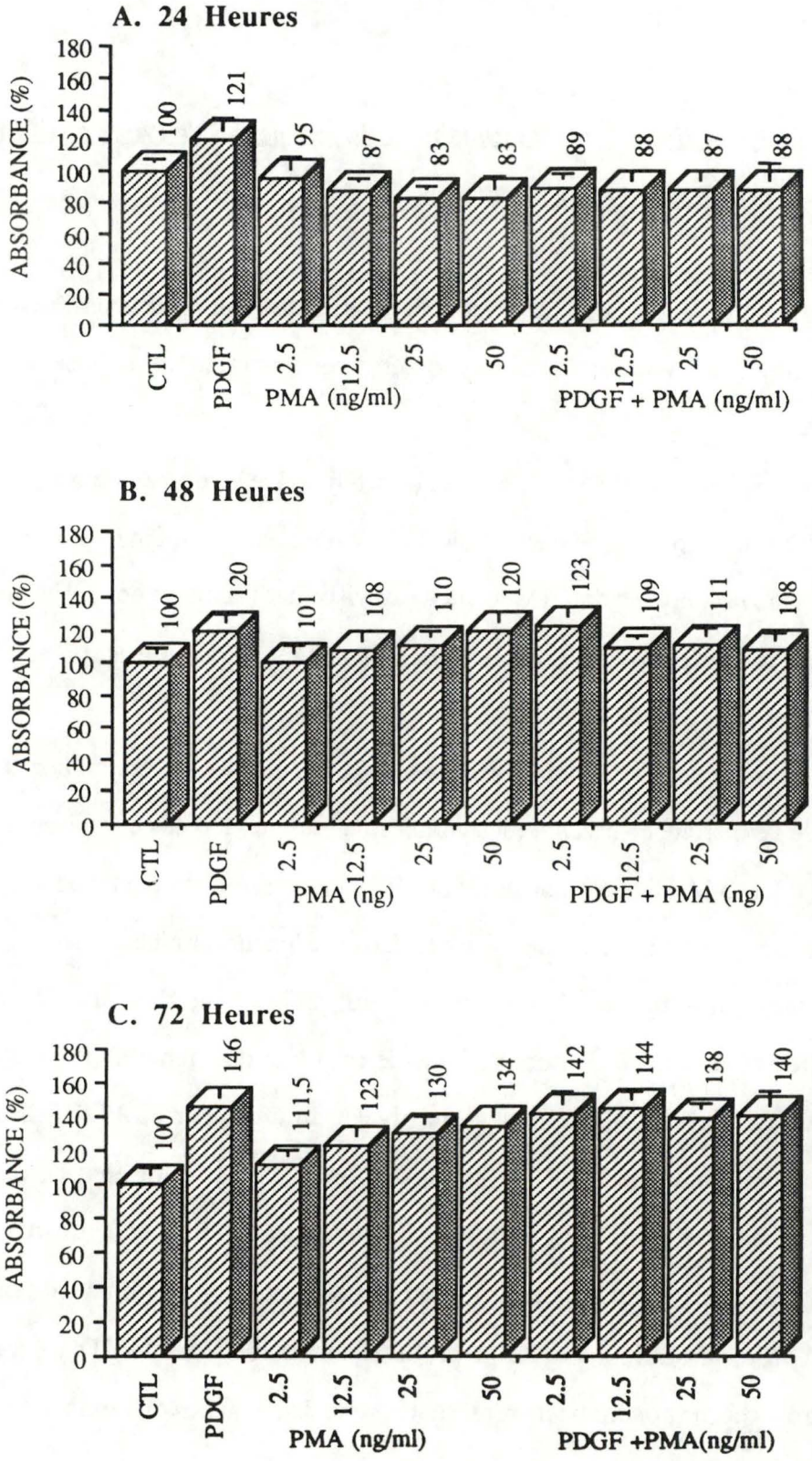


Fig. III.20. : Effet du PMA (2.5, 12.5, 25 et 50 ng/ml) en présence ou non de PDGF A/B (10ng/ml) sur la prolifération des fibroblastes de poumon en vingt-cinquième génération. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 24 (A), 48 (B) et 72 heures (C). Les résultats sont exprimés par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type.

2.4. Rôle de la PKC dans la prolifération induite par le PDGF

2.4.1. Résultats

L'action du PDGF via la phospholipase C (PLC) a déjà été décrite par de nombreux auteurs (Daniel et Kumjian, 1992; Rozengurt, 1992). Cette PLC entraîne alors l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 et en DAG qui provoqueront respectivement une libération du calcium intracellulaire et une activation de la PKC.

Nous avons voulu voir si la PKC était impliquée dans le cas de la transduction du signal lors d'une stimulation au PDGF.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un activateur de la PKC : le PMA, en vue de mettre en évidence une synergie éventuelle en présence de PDGF. La figure III.20. nous montre les résultats de cette expérience. Les cellules ont été incubées pendant 24, 48 et 72 heures en présence ou non de PDGF (10 ng/ml) et/ou de PMA (2.5, 12.5, 25 et 50 ng/ml). Seul, le PMA exerce un léger effet pro-prolifératif mais qui reste nettement inférieur à celui du PDGF. Les résultats obtenus ne nous permettent pas non plus de mettre en évidence une quelconque synergie, peut être parcequ'à la concentration de 10 ng/ml, le PDGF provoque une stimulation maximale de la prolifération. Nous avons alors testé des concentrations plus faibles en PDGF mais à nouveau, aucune synergie n'a pu être démontré (Fig. III.21.).

Nous avons alors choisi de nous tourner vers un inhibiteur de la PKC : le H7. Les concentrations utilisées sont celles décrites dans la littérature et sont de 10, 20 et 40 µM. Un test de cytotoxicité au MTT a d'abord été réalisé sur cette molécule. La figure III.22. nous montre que le H7 n'est pas cytotoxique même après 72 heures d'incubation.

La figure III.23. reprend les résultats obtenus avec le H7. Dans ce cas, nous constatons un effet négatif sur la prolifération induite par le PDGF. La Table III.8. reprend les % d'inhibition exercés par le H7 sur la prolifération induite par le PDGF.

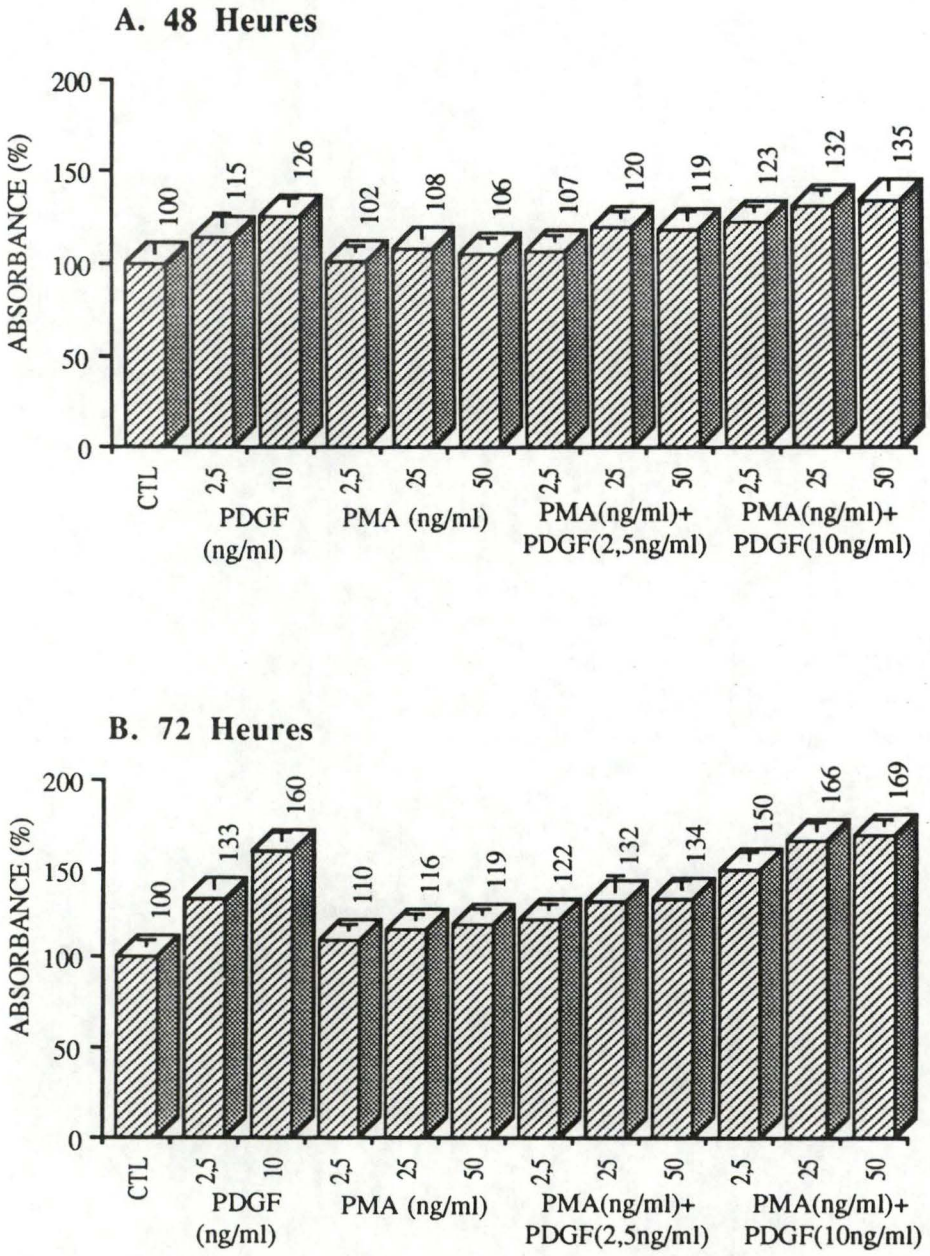


Fig. III.21. : Effet du PMA (2.5, 25 et 50 ng/ml) en présence ou non de PDGF AB (2.5 et 10ng/ml) sur la prolifération des fibroblastes de poumon en trentième génération. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 24 (A), 48 (B) et 72 heures (C). Les résultats sont exprimés par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type.

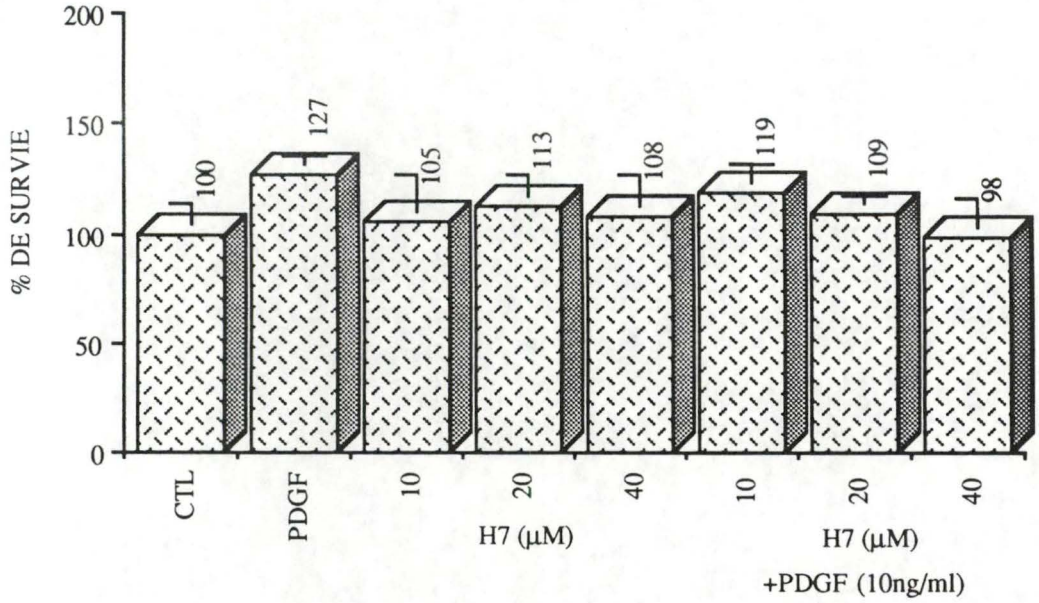


Fig. III.22. : Effet du H7 (10, 20 et 40 µM) en présence ou non de PDGF A/B (10ng/ml) sur la survie des fibroblastes de poumon en vingt-cinquième génération. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 72 heures. Les résultats expriment le pourcentage de survie. Le contrôle (=CTL) est fixé arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type.

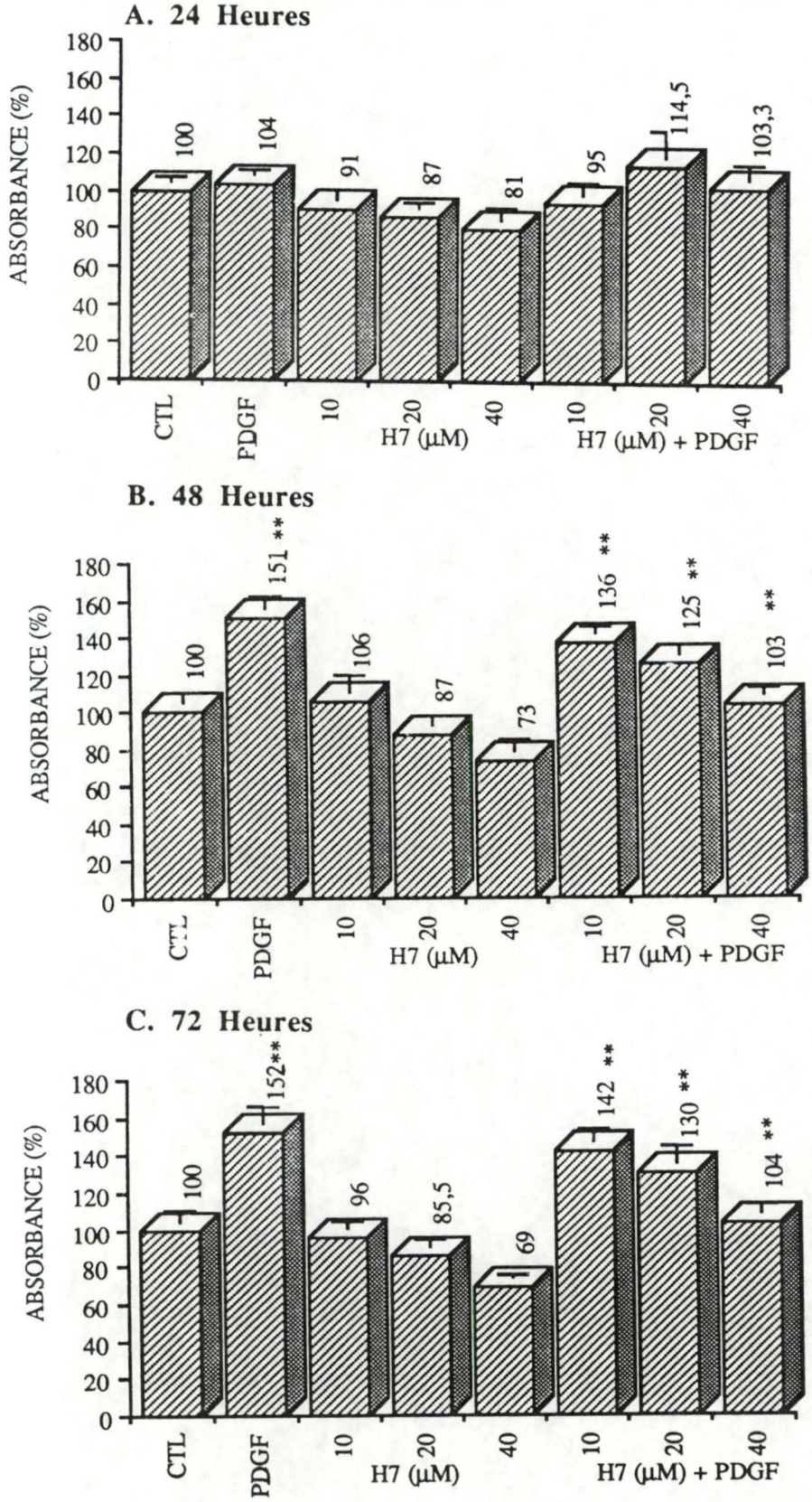


Fig. III.23. : Effet du H7 (10, 20 et 40 µM) en présence ou non de PDGF AB (10ng/ml) sur la prolifération des fibroblastes de poumon en vingt-cinquième génération. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % en présence ou non de ces médiateurs pendant 24 (A), 48 (B) et 72 heures (C). Les résultats sont exprimés par rapport aux contrôles (=CTL), portés arbitrairement à 100 %. Les points correspondent à la moyenne de 6 points ± 1 écart-type. Un test statistique t de Student a été réalisé, où le PDGF est comparé au contrôle tandis que le H7 en présence de PDGF est comparé au PDGF seul. (* = significatif; ** = hautement significatif).

Table III-8: Estimation de l'effet inhibiteur exercé par le H 7 sur la prolifération induite par le PDGF

Médiateurs	Inhibition (%)	
	48 H	72 H
H 7 10 µM	29	19
H 7 20 µM	51	42
H 7 40 µM	94	92

2.4.2. Discussion

La transduction du signal du PDGF via la PLC est un mécanisme bien connu et décrit par des auteurs tels que Daniel et Kumjian (1992). Cette PLC activée, hydrolyse alors le PIP_2 en IP_3 et en DAG. Une fois ces deux messagers secondaires libérés, ils provoqueront une libération du calcium intracellulaire. Le calcium et le DAG iront alors activer d'autres substrats, caractéristiques d'une réponse cellulaire donnée.

Nous avons voulu vérifier si cette voie était bien empruntée dans le cas des fibroblastes de poumon humain. Nous avons donc choisi de tester d'une part un activateur de la PKC et d'autre part un inhibiteur, le H7. En utilisant le PMA nous nous attendions à voir apparaître une synergie en présence de PDGF. Mais rien n'a pu être conclu à ce niveau. Nous nous sommes alors tournés vers le H7, qui quant à lui exerçait bien un effet inhibiteur sur la prolifération induite par le PDGF. Cette dernière experience nous permet donc de suspecter l'intervention de la PKC dans la voie d'activation de la prolifération par le PDGF. Une dernière expérience à réaliser pour confirmer ces résultats, serait de prétraiter les cellules au PMA, pour épuiser le système PKC (Rozengurt, 1989). Si une inhibition de l'effet pro-prolifératif du PDGF apparaît, cela confirmera l'intervention de cette voie d'activation lors d'une stimulation au PDGF.

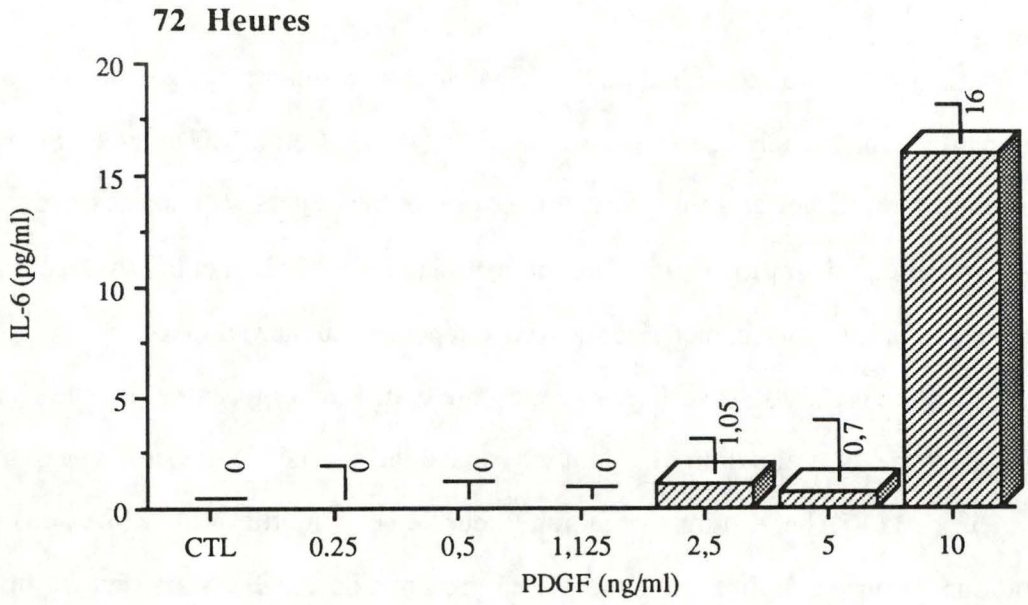


Fig. III.24. : Effet du PDGF (10 ng/ml) sur la synthèse d'IL-6 par les fibroblastes de poumon en vingt-quatrième génération. Les cellules ont été incubées dans de l'OPT+HLA 0.2 % pendant 72 heures en présence ou non de PDGF. Les résultats sont exprimés en % par rapport au contrôle (=CTL) porté arbitrairement à 100 %. Les points représentent la moyenne de 3 valeurs ± un écart type.

3.EFFET DU PDGF A/B SUR LA SYNTHESE EN IL-6

3.1. Résultats

Après avoir mis en évidence une voie de régulation négative via la PGE_2 sur la prolifération cellulaire induite par le PDGF, nous avons voulu vérifier si celle-ci pouvait s'appliquer à d'autres réponses cellulaires induites par le PDGF telles que la synthèse d'interleukine-6 (IL-6).

Tout d'abord, nous avons voulu vérifier que les fibroblastes de poumon stimulés au PDGF produisaient bien de l'IL-6. Les cellules ont été incubées en présence de PDGF (0, 2.5, 5 et 10 ng/ml) pendant 24, 48 et 72 heures. Ensuite, l'IL-6 a été dosée par un KIT ELISA. Aucune libération d'IL-6 n'a pu être détectée dans le milieu à 24 et 48 heures. Seul à 72 heures, une légère stimulation a été observée pour une concentration en PDGF de 10 ng/ml (Fig. III.24.).

Ensuite, nous avons testé le PDGF en présence ou non de PGE_2 et d'AMPc sur la synthèse d'IL-6 mais sans aucun effet significatif.

3.2. Discussion

L'IL-6, cytokine caractéristique des foyers inflammatoires, est trouvée en concentration nettement supérieure dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de fibrose pulmonaire (Jones et al., 1991). Cette cytokine est responsable de la production de protéines de la phase aiguë par le foie et est un facteur de croissance et de différenciation des lymphocytes T et B. Elle est élaborée surtout par les monocytes activés, les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les lymphocytes activés; elle agit sur les lymphocytes B et T, les fibroblastes, les cellules de la lignée myéloïde et les hépatocytes. Certaines cellules telles que les cellules synoviales en synthétisent de manière constitutive. Cette synthèse peut être potentialisée par la présence d'IL-1 ou le TNFα (Guerne et al., 1989). De même les fibroblastes de poumon peuvent

synthétiser de l'IL-6 qui peut être augmentée en présence de PDGF (Kelley, 1990). Dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, l'IL-6 potentialise la croissance de ces cellules via la synthèse endogène de PDGF (Ikeda et al., 1991).

Nous avons testé l'effet du PDGF sur cette synthèse d'IL-6. Après 72 heures d'incubation, une légère libération d'IL-6 a été observée. Cette synthèse est minime si on la compare à celle qui a lieu suite à une activation à l'IL-1 (20 U/ml) sur les mêmes cellules et dans les mêmes conditions où déjà après 24 heures on peut atteindre des concentrations en IL-6 de l'ordre de 10 ng/ml (Renard, 1992).

Nous avons ensuite tenté de voir si l'effet inhibiteur exercé par la PGE_2 sur la prolifération cellulaire pouvait se reproduire sur une autre réponse cellulaire au PDGF : celle de l'IL-6. Malheureusement, aucun résultat significatif n'a pu être obtenu.

Le PDGF étant également reconnu pour stimuler le chémotactisme des fibroblastes et la synthèse de collagène par ces cellules, il serait intéressant dans des expériences futures de vérifier si le système AMPc/PGE_2 est également capable de contrebalancer ces réponses induites par le PDGF.

4. CONCLUSION GENERALE

La prolifération cellulaire joue un rôle importatnt, aissi bien dans les processus de "turn-over" que de réparation tissulaire, mais également lors de pathologies au cours desquelles se développent des fibroses. Tel est le cas pour les fibrose pulmonaires ou la polyarthrite rhumatoïde. Alors que des cytokines telles que le PDGF ou l'IL-1 sont bien connues pour leurs actions régulatrices de la prolifération cellulaire, les dérivés de l'acide archidonique semblent également intervenir pour moduler celle-ci. C'est pourquoi, dans ce travail, nous avons tenté de voir comment les dérivés de l'acide arachidonique pouvaient moduler ou médier la prolifération induite par le PDGF.

Dans un premier temps, nous avons recherché quels étaient les dérivés de l'acide arachidonique qui étaient libérés suite à un activation par le PDGF ou l'IL-1. L'action de l'IL-1 sur la libération des dérivés de l'acide arachidonique a déjà été bien étudiée au laboratoire sur les fibroblastes de poumon (Burton, 1992), les cellules synoviales et les chondrocytes humains (Knott, 1992). C'est pourquoi nous avons utilisé l'IL-1 comme référence. Nous avons étudié les dérivés de l'acide arachidonique par trois approches distinctes : La première mesure la radioactivité relarguée suite à une préincubation à l'acide arachidonique tritié, la seconde est une approche à la fois qualitative et semi-quantitative, réalisée par une chromatographie sur couche mince (TLC) et la troisième est une approche qui est à la fois qualitative et quantitative par GC-MS. Les résultats obtenus nous montrent que l'IL-1 stimule la libération d'acide arachidonique comme déjà observé par Burton (1992). Ainsi, à 24 heures de stimulation en présence d'IL-1, on note la présence de PGE_2, de $PGF_{2\alpha}$, de 6-kéto-$PGF_{1\alpha}$, de 5-HETE et d'acide arachidonique. Le PDGF par contre, ne semble pas stimuler la libération de dérivés de l'acide arachidonique puisque le profil obtenu se superpose au contrôle. Nous nous sommes alors tournés vers une technique nettement plus sensible : celle du GC-MS. Cette technique nous a permis de noter la synthèse de PGE_2 par les fibroblastes suite à une stimulation au PDGF. Cette production de PGE_2 suite à une stimulation au PDGF a également été observée par Lin et al. (1989) sur des fibroblastes 3T3 murins. Cependant,

cette synthèse est plus faible que celle induite par l'IL-1 et elle est minime en comparaison à celle observée chez les cellules synoviales ou les chondrocytes humains suite à une stimulation de 24heures à l'IL-1 (Knott, 1992).

Dans un second temps, nous avons voulu tester l'effet de l'IL-1 ainsi que de différents dérivés de l'acide arachidonique sur la prolifération induite par le PDGF. Smith et al. (1991) avaient mis en évidence l'effet synergique sur la prolifération, due à une stimulation d'IL-1 en présence de PDGF. Mais, contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre, nous n'avons observé aucun effet de synergie. Par contre, nous avons pu vérifier l'effet stimulateur du PDGF seul, comme décrit par Antoniades (1991).

Ensuite, nous avons testé divers dérivés lipoxygénasiques ou cyclooxygénasiques sur la prolifération induite par le PDGF. Parmi les dérivés lipoxygénasiques, nous avons testé les LTB_4 et LTC_4, décrits comme pro-prolifératifs en présence d'indométhacine par Baud et al. (1987). Cependant, aucun effet sur la prolifération des fibroblastes pulmonaires en présence ou non de PDGF n'a pu être observé, même en présence d'indométhacine.

Nous nous sommes alors tournés vers les dérivés cyclooxygénasiques. De nombreux articles de la littérature nous montrent que la PGE_2 peut avoir un effet de régulation négative sur la prolifération. Cependant, alors que la régulation négative exercée par la PGE_2 endogène est relativement bien décrite (Libby et al., 1988), les résultats obtenus en présence de PGE_2 exogène sont fort controversés. La PGE_2 exogène peut avoir un effet inhibiteur sur la prolifération de fibroblastes de poumon humain (Tobey et al., 1990) tout comme elle peut stimuler la prolifération de fibroblastes d'embryons de souris (Durant et al., 1989). Les résultats que nous avons obtenus lors d'une stimulation à la PGE_2 en présence ou non d'indométhacine sur la prolifération des fibroblastes induite ou non par le PDGF, nous donnent les informations suivantes : tout d'abord, une incubation en présence d'indométhacine seule, n'a aucun effet sur la prolifération, ce qui revient à dire que les cellules étudiées ne synthétisent pas de prostaglandines en l'absence de toute stimulation, ce qui est conforme avec les données de la GC-MS. Ensuite, nous avons observé que l'indométhacine relevait l'effet pro-

prolifératif du PDGF. Ceci signifie que le PDGF induit la synthèse de PGE_2, qui à son tour pourrait exercer un effet de rétro-action négative sur cette prolifération. D'autre part, la PGE_2 exogène s'est avérée avoir un effet inhibiteur sur la prolifération induite par le PDGF alors que seule, elle restait sans effet. Les prostaglandines exogènes sont souvent testées seules sur la prolifération cellulaire mais plus rarement en présence d'autres médiateurs. Dans notre travail, nous avons testé l'effet de la PGE_2 exogène sur la prolifération induite par le PDGF et nous avons pu mettre en évidence un effet inhibiteur de cette PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF.

Comme dans de nombreux types cellulaires l'effet de la PGE_2 est médié par l'AMPc (Wickremasinghe, 1988), nous avons tenté d'explorer quelque peu cette voie, en vue de voir si l'effet de la PGE_2 exogène sur la prolifération induite par le PDGF était également médié par l'AMPc. Une première expérience fut de tester l'effet du db-AMPc sur la prolifération induite ou non par le PDGF. Les effets de ce db-AMPc reproduisaient bien ceux de la PGE_2, nous pouvions suspecter son intervention. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons utilisé divers activateurs ou inhibiteurs de la voie de l'AMPc. L'effet des deux activateurs utilisés (aminophylline et forskoline), semblait confirmer l'hypothèse suivant laquelle la PGE_2 agirait via l'AMPc. Cependant, l'utilisation des inhibiteurs (didéoxyadénosine monophosphate et H8) fut à priori surprenante pour deux raîsons : primo, le H8 n'atténue pas l'effet inhibiteur du système AMPc/PGE_2 exogène sur le PDGF; secundo, ces deux inhibiteurs semblaient également inhiber la prolifération due au PDGF, ce qui tend à faire penser que le PDGF agirait également en partie par la voie de l'AMPc. Nous avons alors suspecté un effet de l'AMPc qui serait dépendant de sa concentration intracellulaire. Nous n'avons pas pu confirmer ou infirmer cette hypothèse. Mais un dosage direct de l'AMPc devrait apporter la réponse.

Parallèlement à ces expériences, nous nous sommes demandé comment le db-AMPc pouvait agir pour inhiber la prolifération induite par le PDGF. Nous avions alors émis deux hypothèses : la première, que l'inhibition due au db-l'AMPc serait le résultat d'une compétition intracellulaire pour une même voie que le PDGF; la seconde que le db-AMPc agirait en exerçant une régulation négative au niveau des récepteurs au PDGF. Les

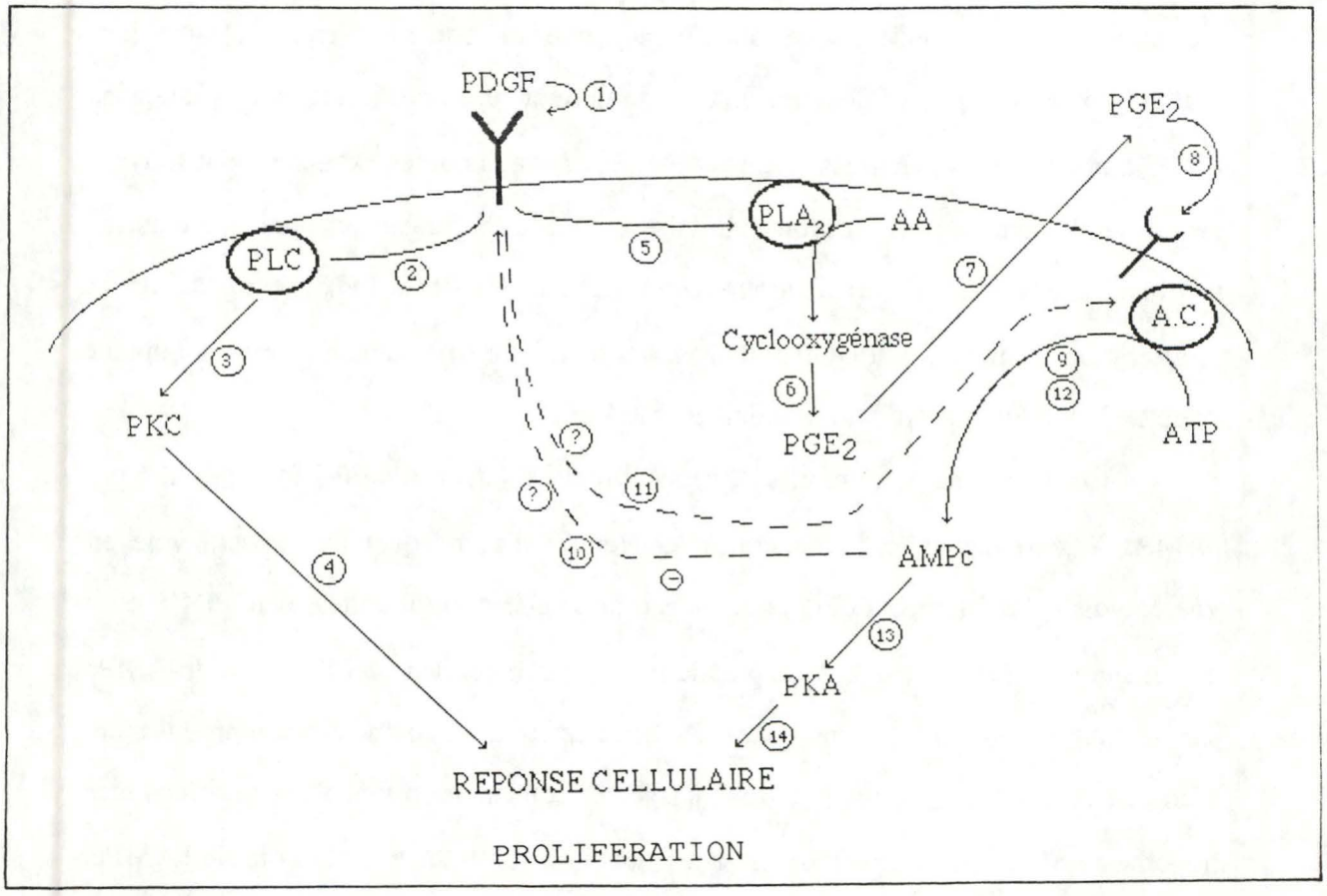


Fig. IV.1. : Modèle proposé de la régulation négative exercée par la PGE_2 sur la voie du PDGF.

1) Le PDGF se lie à son récepteur membranaire.

2) Activation de la PLC par l'activité tyrosine kinase du récepteur au PDGF.

3) Activation de la PKC par l'intermédiaire du DAG et de l'IP_3.

4) Phosphorylation de substrats par la PKC, responsables de la réponse cellulaire.

5) Activation de la PLA2 après liaison du PDGF à son récepteur.

6) Libération de l'acide arachidonique métabolisé entre autres en PGE_2 par la cyclooxygénase.

7) Exportation extracellulaire de la PGE_2.

8) La PGE_2 se lie à son récepteur membranaire.

9) Activation de l'adénylate cyclase suite à l'activation du récepteur au PDGF et transformation de l'ATP en AMPc.

10) Régulation négative exercée par l'AMPc sur les récepteurs au PDGF (hypothétique).

11) Activation de l'adénylate cyclase par les récepteurs au PDGF (hypothétique).

12) Transformation de l'ATP en AMPc.

13) L'AMPc active la PKA.

14) Phosphorylation de nombreux substrats par la PKA, responsables de la réponse cellulaire.

résultats obtenus lors d'une expérience préliminaire sont plutôt en faveur de la seconde hypothèse.

Ensuite, la transduction du signal du PDGF par la voie de la PLC ayant déjà été souvent décrite dans la littérature (Daniel et Kumjian, 1992), nous avons voulu vérifier l'existence de cette voie pour nos fibroblastes pulmonaires. Nous avons donc utilisé d'une part un activateur de la PKC (le PMA) et d'autre part, un inhibiteur de la PKC (le H7). Une stimulation au PMA en présence de PDGF n'eût aucun effet synergique. Par contre, le H7 s'est avéré inhiber l'effet pro-prolifératif du PDGF. Cette dernière observation est en accord avec l'implication de la voie de la PLC généralement admise dans la littérature. Cependant, ces résultats devraient être confirmés par une expérience où les cellules seraient stimulées à de fortes doses en PMA, pour épuiser le système PKC.

Pour expliquer l'ensemble des résultats obtenus en présence d'activateurs ou d'unhibiteurs de la voie de l'AMPc, nous proposons le modèle d'activation suivant (Fig. IV.1.) : tout d'abord, le PDGF se lie à son récepteur (1) activant d'une part la voie bien connue de la PLC (2). Cette PLC activée, libérant le DAG , agit alors sur la PKC (3) qui contribue à la réponse cellulaire. D'autre part, le PDGF active également la PLA_2 (5), provoquant ainsi la libération d'acide arachidonique (point 1.1. des résultats). Cet acide arachidonique sera alors métabolisé par la cyclooxygénase (6) en PGE_2 entre autres (point 1.3. des résultats). Cette PGE_2 libérée dans le milieu extracellulaire (7), se lierait à son récepteur (8). Ce récepteur d'après la littérature est couplé à l'adénylaye cyclase (AC) par le biais de protéines G. L'adénylate cyclase activée, catalyse alors la transformation de l'ATP en AMPc (9). Ce dernier pourrait alors réguler de manière négative les récepteurs au PDGF (10), comme nous le suggèrent les résultats obtenus au point 2.3.4. des résultats. D'autrepart, nous proposons que le PDGF puisse agir dans un premier temps en activant directement l'adénylate cyclase (11), provoquant la libération de faibles quantités d'AMPc qui seraient nécessaires pour qu'il agisse pleinement. L'AMPc ne deviendrait anti-prolifératif que dans un deuxième temps et à plus forte concentration.

Ainsi, nous pouvons expliquer :

1) L'effet de l'indométhacine sur la prolifération induite par le PDGF : l'indométhacine bloque la synthèse de PGE_2 par la cyclooxygénase, la PGE_2 endogène dès lors n'est plus synthétisée et n'exercera pas son effet de rétro-action négative. L'effet du PDGF sur la prolifération sera donc renforcé (point 2.2. des résultats).

2) L'effet de l'aminophylline sur la prolifération induite par le PDGF : le système PGE_2/AMPc endogène est induit par le PDGF, mais l'AMPc étant stabilisé par l'aminophylline, son effet de régulation négative sur le PDGF esr renforcé. On observe donc une prolifération plus faible qu'avec le PDGF seul (point 2.3.2.1. des résultats). une expérience complémentaire serait d'incuber les cellules en présence d'aminophylline, de PDGF et d'indométhacine simultanément. Si notre modèle est correct, l'indométhacine bloquant alors la synthèse de PGE_2, il n'y aura pas d'AMPc produit et l'aminophylline ne devrait plus contrebalancer le PDGF.

3) L'effet inhibiteur de la DDAO sur la prolifération induite par le PDGF : il s'explique si on admet que le PDGF agisse en activant l'adénylate cyclase, provoquant rapidement une libération d'AMPc qui serait nécessaire à son action. La DDAO en bloquant l'adénylate cyclase empêche la formation d'AMPc et affecte la réponse cellulaire au PDGF.

4) L'effet du H8 : il s'explique d'une part par son effet inhibiteur au niveau de la PKA (bloquant la réponse cellulaire du PDGF par cette voie) mais également du fait que cet inhibiteur ne soit pas spécifique de la PKA mais puisse aussi affecter le fonctionnement de la PKC.

5) L'effet du H7 quant à lui s'explique par son action inhibitrice sur la PKC, bloquant alors cette voie d'activation cellulaire bien connue du PDGF.

Finalement, afin de voir si la régulation négative exercée par la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF pouvait s'appliquer à d'autres réponses biologiques dues au PDGF, nous avons choisi de doser l'IL-6 synthétisée lors d'une stimulation au PDGF. Le PDGF (10 ng/ml) entraîne bien la libération d'IL-6 après 72 heures. Mais les

quantités produites sont beaucoup plus faibles que celles induites par l'IL-1 (Renard, 1992) et nous n'avons pas pu montrer un régulation négative par la PGE_2 à ce niveau.

En conclusion, ce travail nous a permis de mettre en évidence dans la souche de fibroblastes de poumon étudiée, une voie de régulation négative exercée par la PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF, tout en soulignant la complexité de la transmission intracellulaire du signal. Ainsi, la régulation de la prolifération cellulaire est un phénomène complexe, régulé par l'intervention de plusieurs molécules. Ce travail, bien que fondamental peut s'insérer dans un cadre de compréhension plus général de la croissance des fibroblastes lors des fibroses pulmonaires. A plus long terme, il faudra vérifier si la voie de régulation négative exercée par le système AMPc/PGE_2 sur la prolifération induite par le PDGF, fonctionne également sur d'autres réponses induites par le PDGF, telles que la synthèse de collagènes, le chémotactisme... également impliqués dans les phénomènes de réparation tissulaire et de fibrose.

BIBLIOGRAPHIE

Adelmann, B.C. & Cully, Z. (1990)
Signal perception of fibroblasts for directional migration to platelet-derived growth factor in Boyden-type chambers.
J. Cell. Physiol., 143, 172-177.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1989)
Cell signaling *In* : Molecular biology of the cell.
Garland publishing Inc., eds., New-York, pp 698-714

Arnento, E.P., Ehsani, N., Palmer, H. & Libby, P. (1991)
Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.
Arter. Thromb., 11, 1223-1230.

Andreas, Matthias G., Grulich J., Rothe D., Gronwald R., Loth U., Schettler G., Kommerell B. & Ross R. (1985)
Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid *de novo* synthesis of cyclooxygenase.
J. Clin. Invest., 75, 1381-1387.

Andreasen, A., Hansen, E.S., Fogh, K., Kragballe, K. & Herlin, T. (1990)
Proliferation of adherent synovial fluid cell cultures is modified by eicosanoids.
APMIS Suppl., 98, 605-608.

Antoniades, H.N. (1991)
PDGF a multifunctional growth factor.
Baillières Clin. Endocrin. Metab., 5, 595-613.

Arend, W.P. & Dayer, J.M. (1990)
Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis.
Arthr. Rheum., 33, 305-315.

Balkwill, F.R. & Burke, F. (1989)
The cytokine network.
Immunol. Today, 10, 299-303.

Baud L., Perez, J., Denis, M. & Ardaillon, R. (1987)
Modulation of fibroblast proliferation by sulfidopeptide leukotrienes : effect of indomethacin.
J. Immunol., 138, 1190-1195.

Bernard G.R., Korley, V., Chee, P., Swindell, B., Ford-Hutchinson, A.W. & Tagari P. (1991)
Persistent generation of peptido leukotrienes in patients with the adult respiratory distress syndrom.
Am. Rev. Respir. Dis., 144, 263-267.

Berridge, M. (1985)
Les molécules de la communication dans la cellule.
Pour la Science, 98, 134-138.

Bonin P.D., Fici G.J. & Singh J.P. (1989)
Interleukin-1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells in coordination with PDGF or a monocyte-derived growth factor.
Exp. Cell. Res., 181, 475-482.

Bowen-Pope, D.F., Hart, C.E. & Seifert, R.A. (1989)
Sera and conditioned media contain different isoforms of platelet-derived growth factor (PDGF) which bind to different classes of PDGF receptor.
J. Biol. Chem., 264, 2502-2508.

Bowen-Pope D.F., Van Koppen, A. & Schatteman, G. (1991)
Is PDGF really important, Testing the hypotheses.
Trends Genet., 7, 413-418

Boynton, A.L. & Whitfield, J.F. (1983)
The role of cyclic AMPc in cell proliferation : a critical assessment of the evidence.
Adv. Cyclic Nucl. Res., 5, 195-294

Brinkman, H.J., Van Buul-Wortelboer, M.F. & Mourik J.A. (1990)
Involvement of cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated conversion of arachidonic acid on controlling human vascular smooth muscle cell proliferation.
Thromb. and Haem., 63, 291-297.

Bryckaert, M.C., Fontenay, M. & Tobelem, G. (1991)
Le PDGF (platelet-derived growth factor) et ses implications en pathologie humaine.
Médecine/Sciences, 7, 478-484.

Burch, R.M., White, M.F. & Connor, J.R. (1989)
Interleukin-1, stimulates prostaglandin synthesis and cyclic AMP accumulation in Swiss 3T3 fibroblasts : interactions berween two second messengers systems.
J. Cell. Physiol., 139, 29-33.

Burton, M. (1990)
Regulation de la croissance des cellules synoviales humaines en culture. Etude des mécanismes d'action de l'IL-1.
Mémoire de licence, FUNDP.

Burton, M. (1991)
Rapport I.R.S.I.A., FUNDP

Burton, M. (1992)
Rapport I.R.S.I.A., FUNDP

Bushield, M. & Johnson,R.A. (1990)
Regulation of adenylate cyclase by adenosine : characterization of the P-site.
Arch. Biochem. Biophys., 278, 88-98.

Butler, D.M., Picolli, D.S., Hart, P.H. & Hamilton, J.A. (1988)
Stimulation of human synovial fibroblast DNA synthesis by recombinant cytokines.
J. Rheumatol., 15, 1463-1470.

Butler, D.M., Leizer, T. & Hamilton, J.A. (1989)
Stimulation of human synovial fibroblast DNA synthesis by platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor: differences to the activation by IL-1.
J. Immunol., 122, 3098-3103.

Crastes de Paulet, A. (1983)
Les grandes voies métabolique de l'acide arachidonique.
In : "Biochimie de l'inflammation", (Eds., Blotman, F., Crastes de Paulet, A., Simon, L.), Masson eds. PARIS, pp 1-43.

Chiou, W.J., Bonin, P.D., & Singh J.P. (1990)
Obligatory action of polypeptide growth factor for the IL-1 mediated prostaglandin E2 production in fibroblasts. Potential role of growth factors in modulation of tissue response to IL-1.
J. Immunol., 145, 2155-2160.

Daniel, T.O. & Kumjian, D.A. (1992)
Platelet-derived growth factor receptors and phospholipase C activation.
Kidney Int., 41, 575-580.

Demel, T.F., Silverman, N.J. & Kawahara, R.S. (1988)
Platelet-derived growth factor : a multifunctional regulator of normal and abnormal cell growth.
Biofactors, 1, 213-217.

Dodet, B. (1987)
Cancer et biotechnologies.
Biofutur, 58, 11-16.

Dodet, B. (1989)
Stratégies anti-inflammatoire : l'inflammation.
Biofutur, 82, 25-37.

Downes, C.P. & Carter, A.N. (1990)
Inositol lipids and phosphates.
Cur. Opinion Cell Biol., 2, 185-191.

Dunnill, M.S. (1990)
Pulmonary fibrosis.
Histopathology, 16, 321-329.

Durant, S., Duval, D. & Homo-Delarche, F. (1989)
Effects of exogenous prostaglandins and nonsteroidal anti-inflammatiory agents on prostaglandins secretion and proliferation of mouse embryo fibroblasts in culture.
Prost. Leuc. Ess. Fatty Acids, 38, 1-8.

Elias, J.A., Freundlich, B., Kern, J.A. & Rosenbloom, J. (1990)
Cytokines networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung.
Chest, 97, 1439-1445.

Elliott, G.R. & Van De Meert D. (1991)
Human recombinant interleukin 1-α enhances basal and arachidonic acid stimulated synthesis of cyclooxygenase and lipooxygenase metabolites by skin fibroblasts *in vitro*.
Int. J. Immunol. Pharmacol., 2, 67-74.

Eriksson, A., Siegbahn, A., Westermark, B., Heldin, C.H. & Claesson-Welsh, L. (1992)
PDGF α and ß-receptors activate unique and common signal transduction pathways.
EMBO J., 11, 543-550.

Floege, J., Topley, N. & Resch, K. (1991)
Regulation of mesangial cell proliferation.
Am. J. kid. Dis., 17, 673-676.

Gallin, J.I., Goldstein I.M. & Snyderman R. (1988)
Adult respiratory distress syndrome *In :* Inflammation : basic principles and clinical correlates.
Raven Press , pp 815-839.

Gilman, S.C., Chan, J., Zeigler, P.R., Uhl, J., Mochan, E. (1988)
Il-1 activates phospholipase A_2 in human synovial cells.
Arthr. Rheum., 31, 126-130.

Givens, K.T., Kitado, S., Chen, A.K., Rothschiller, J. & Lee, D.A. (1990)
Proliferation of human ocular fibroblasts : an assessement of *in vitro* colorimetric assays.
Invest. Ophtalmol. Visual. Sci., 31, 1856-1862.

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.

Goodwin, J.S. (1991)
Are prostaglandins proinflammatory, antiinflammatory, both or either?
J. Rheumatol., 18, 26-29.

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

Guerne P.A., Zuran B.L., Vaughan J.H., Carson D.A., Lotz M. (1989)
Synovium as a source of interleukin-6 *in vitro*.
Am. Soc. Clin. Invest., 83, 585-592.

Habernicht, A.J.R., Goerig, M., Grulich, J., Rothe, D., Gronwald, R., Loth, U. Schettler, G., Kommerell, B. & Ross, R. (1985)
Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and rapid *de novo* synthesis of cyclooxygenase.
J. Clin.Invest., 75, 1381-1387.

Hannink, M., Donoghue, D.J. (1989)
Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins.
Biochim. Biophys. Acta, 989, 1-10.

Hansen M.B., Nielsen, S.E. & Berg K. (1989)
Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.
J. Immunol. Meth., 119, 203-210.

Heldin, C.H. & Westermark, B. (1989)
Platelet-derivated growth factor : three isoforms and two receptor types.
Trends genet., 5, 108-111.

Herlin, T., Fogh, R., Hansen, E.S., Andreasen, A., Knudsen, V., Hendriksen, T.B, Burger, C. & Kragballe, K. (1990)
15-HETE inhibits leukotriene B4 formation and synovial cell proliferation in experimental arthritis.
Agents Actions, 29, 52-53.

Hopkins, S.J. (1990)
Cytokines and eicosanoids in rheumatic diseases.
Ann. Rheum. Dis., 49, 207-210.

Hori, T., Kashiyama, S., Hayakawa, M., Shibamoto, S., Tsujimoto, M., Oku, N. & Ito, F. (1989)
Possible role of prostaglandins as negative regulators in growth stimulation by tumor necrosis factor and epidermal necrosis factor in human fibroblasts.
J. Cell. Physiol., 141, 275-280.

Hori, T., Yamanaka, Y., Hayakawa, M., Shibamoto, S., Tsujimoto, M., Oku, N. & Ito, F. (1991)
Prostaglandins antagonize fibroblast proliferation stimulated by tumor necrosis factor.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 174, 758-766.

Hu, L.M., Kemp, S.F., Elders, M.J. & Smith, W.G. (1989)
Metabolic effects of Forskolin in chick chondrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 1013, 294-299.

Hurme, M. (1990)
Modulation of IL-1 β production by cyclic AMP in human monocytes.
FEBS lett., 263, 35-37.

Ikeda, U., Ikeda, M., Oohara, T., Oguchi, A., Kamitani, T., Tsuruya, Y. & Kand, S. (1991)
Interleukin-6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner.
Am. J. Physiol. Soc. , 260, 1713-1717.

Jackson, S.P. (1992)
Regulating transcription factor activity by phosphorylation.
Trends Cell Biol., 2, 104-108.

Jones, K.P, Reynolds, S.P., Copper, S.J., Kalirke, S., Edwards, J.H. & Davier, B.H.
Measurement of interleukin-6 in sarchoalveolar lavage fluid by radioimmunoassay : differences between patients with interstitial lung disease
Clin.Exp. Immunol, 83, pp 30-34.

Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (1987)
Appareil respiratoire
In : "Histologie", Piccin eds., Brezil, 383-400.

Kaiser, E., Chiba, P. & Zaky, K. (1990)
Phospholipases in biology and medecine.
Clin. Biochem., 23, 349-367.

Kelley, J. (1990)
Cytokines in the lung.
Am. Rev. Respir. Dis., 141, 765-788.

Kelly, J.D., Haldemans, B.A., Grant, F.J., Murrayt, M.J., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Cooper, J.A. & Kazlauskas, A. (1991)
Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit *trans*-phosphorylation.
J. Biol. Chem., 266, 8987-8992.

Knott, I. (1992)
Comparaison des cellules synoviales et des chondrocytes humains en culture : activation de la cascade de l'acide arachidonique par l'interleukine-1.
Thèse de doctorat, FUNDP, Namur.

Klein, J. (1990)
Immunology,
Cambridge : Blackwell Scientific Publications, Cambridge.

Kovacs, E.J. (1991)
Fibrogenic cytokines : the role of immune mediators in the development of scar tissues.
Immunol. Today, 12, 17-23.

Kuhn, C. (1991)
Patterns of lung repair, a morphologist's view.
Chest, 3, 11S-14S

Landegren, U. (1984)
Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase : Application to detection of lymphokines and cell surface antigens.
J. Immunol. Meth., 67, 379-388.

Leis, H.J., Hohenester, E., Gleipach, H., Malle, E. & Mayer, B. (1987)
Measurement of prostaglandins, thromboxanes and hydroxy fatty acids by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry.
Biomed. Mass Spectrom., 14, 617-621.

Lewis, R.A., Austen, K.F. & Soberman, R.J. (1990)
Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases.
New Engl. J. Med., 323, 645-655.

Libby, P., Warner, S.J.C. & Friedman, G.B. (1988)
IL-1 : a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth inhibitory prostanoids.
J. Clin. Invest., 81, 487-498.

Lin, A.H., Bienkowski, M.J. & Gorman, P.R (1989)
Regulation of prostaglandin H synthetase m-RNA levels and prostaglandin biosynthesis by platelet-derived growth factor.
J. Biol. Chem., 264, 17379-17383.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

Marinelli, W.A., Polunovsky, V.A., Harmon, K.R. & Bitterman, P.B. (1991)
Role of platelet-derived growth factor in pulmonary fibrosis.
Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol., 5, 503-504.

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

Olawash, N.E., Kusmik, W., Daniel, T.O. & Pledger, W.J. (1991)
Biochemical and fonctional discremination of platelet-derived growth factor α and ß receptors in BALB/c-3T3 cells.
J. Biol. Chem., 266, 10234-10240.

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.

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

Parkes, W.R. (1982)
Introductory Considerations
In : "Occupational lung disease", (Ed. Parkes, W.R.) Butterworths and Co., London, pp 1-10.

Pawelek, J.M. (1979)
Evidence suggesting that a cyclic AMP-dependent protein kinase is a positive regulator of proliferation in Cloudman S91 melanoma cells.
J. Cell. Physiol., 98, 619-625.

Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altrock, B.W., Demel, T.F. & Thomason, A. (1991)
Role of platelet-derived growth factor in wound healing.
J. Cell. Biochem., 45, 319-326.

Picquet-Pellorce, C. & Dy, M. (1991)
Prostaglandin E_2 potentiates granulocytes-macrophages-colony stimulating factor induced histamin synthesis in bone marrow cells : role of AMP_c.
Life Sci., 48, 2377-2382.

Ponzetto, C. (1991)
Growth factors and oncogenes.
Baillières clin. endocrin. metab., 5, 655-669.

Raes, M., Burton, M., Knott, I., Vanderbeck, S., Lecomte, V. & Remacle, J. (1993)
Activation by interleukin-1 of human synovial cell, human skin and lung fibroblast proliferation. Interaction with the arachidonic acid derived metabolites.
In: Eicosanoids and other bioactive lipids in cancer, inflammation and radiation injury, (Eds. S. Nigam, L.Y. Marnett, K.V. Hohn, & T.L.Walden), Kluver Academic, Publishers, Boston, pp 525-529.

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

Remy, E. (1990)
Importance du PAF et des leucotriènes dans la mediation et la régulation des fonctions cellulaires des polymorphonucléaires neutrophiles.
Thèse de doctorat, FUNDP, Namur.

Renard, P. (1992)
Importance des radicaux libres dans l'activation des fibroblastes de poumon par l'IL-1.
Mémoire de licence, FNDP, Namur.

Rozengurt, E. (1992)
Growth factors and cell proliferation.
Cur. Opin. Cell. Biol., 4, 161-165.

Rozengurt E. (1989)
Signal transduction pathway in mitogenesis.
Brit. Med.Bull., 45, 515-528.

Saito, S., Ngar, P., Saito, M., Kim, K., Lanse, R., Sharfeld, J. & Davidovitch, Z. (1990)
Effects of cytokines on prostaglandin E and cAMP levels in human peridontal ligament fibroblasts *in vitro*.
Arch. Biol., 35, 387-395.

Scott, J.D. (1991)
Cyclic nucleotide-dependent protein kinase.
Pharm. Ther., 50, 123-145.

Seppä, H., Grotendorst, G., Seppä, S., Schiffmann, E. & Martin, G.R. (1982)
Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts.
J. Cell. Biol., 92, 584-588.

Shirakawa, F., Yamashita, U., Chedid, M and Mizel, S.B. (1988)
Cyclic AMP, an intracellular second messenger for interleukin-1.
Proc. Natl. Acad. Sci, 85, 8201-8205.

Singh, J.P., Adams, L.D. & Bonin, P.D. (1988)
Mode of fibroblast growth enhancement by human interleukin-1.
J. Cell. Biol., 106, 813-819.

Smith, R.J, Justen, J.M., Sam, L.M., Rohloff, N.A., Ruppel, P.L., Brunden, M.N. & Chin, J.E. (1991)
Platelet-derived growth factor potentiates cellular responses of articular chondrocytes to interleukin-1.
Arthr. Rheum., 34, 697-706.

Snyder, L.S., Hertz, M.I., Peterson, M.S., Harmon, K.R., Marinelli, K.R., Henke, C.A., Greenheck, J.R., Chen, B. & Bitterman, P.B. (1991)
Acute lung injury : pathogenesis of intra-alveolar fibrosis.
J. Clin. Invest., 88, 663-673.

Spencer, H. (1982)
Pathology of interstitial fibrosis of the lungs
In : "Occupational lung disease", (Ed., Parkes, W.R.),
Butterworths and Co., London, pp 648-657.

Tobey, R.A., Voldez, J.G., Voldey, Y.E. & Lehnert, B.E. (1990)
Proliferation of rat and human lung fibroblasts following exposure to PGE_2.
Exp. Lung Res.., 16, 235-255.

Thornton, S.C., Por, S.B., Walsh, B.J., Perry, R. & Breit, S.N. (1990)
Interaction of immune and connective tissue cells : the effect of lymphokines and monokines on fibroblast growth.
J. Leuk. Biol., 47, 312-320.

Thurlbeck, W.M. and Miller, R.R. (1988)
The respiratory system
In : "Pathology", (Eds., Rubin, E. & Farber, J.L.), J.B. Lippincott Company ; Philadelphia. pp 577-581 & 598-605.

Turino, G.M., (1980)
The assessment of functional impairement *In* "Pulmonary fibrosis in Pulmonary diseasesand disorders".
Ed. Fishman, A.P., Mc Graw Hill Inc., Pensylvany, pp 725-732.

Vanderbeck, S. (1991)
Activation par l'IL-1 de cellules synoviales et de fibroblastes humains en culture. Effets sur la libération et la métabolisation de l'acide arachidonique.
Mémoire de licence, FUNDP, Namur.

Vignaud, J.M., Allan, M., Martinet, N., Pech, M., Plenat, F. & Martinet, Y. (1991)
Presence of platelet-derived growth factor in normal and fibrotic lung is specifically associated with interstitial macrophages, while both interstitial macrophages and alveolar epithelial cells express the c-sis proto-oncogene.
Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol., 5, 531-538.

Vollenweider, I & Groscurth, P. (1992)
Comparison of four DNA staining fluorescence dyes for measuring cell proliferation of lymphokine-activated killer (LAK) cells.
J. Immunol. Meth., 149, 133-135.

Wahl, S.M., (1985)
The role of lymphokines and monokines in fibrosis.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 460, 224-231.

Wahl, S.M., Wong, H. & Mc Cartney-Francis, N. (1989)
Role of growth factors in inflammation and repair.
J. Cell. Biochem., 40, 193-199.

Weinberger S.E., Crystal, R.G. (1982)
Reactions of the interstitial space to injury
In : "Occupational lung disease", (Ed., Parkes, W.R.), Butterworths and Co., London, pp 640-646.

Weinmaster, G. & Lemke, G. (1990)
Cell-specific cyclic AMP-mediated induction of the PDGF receptor.
EMBO J., 9, 915-920.

Williams, L.T., (1989
Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor.
Science, 243, 1564-1570.

Wickremasinghe, R. G. (1988)
The role of prostaglandins in the regulation of cell proliferation.
Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids, 31, 171-179.
Prost. Leuc. Fss. Fatty Acids.

Zhang, Y., Lin, J.X., Keung Yip, Y. & Viltek, J. (1988)
Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts : role in the induction of interleukin-6.
Proc. Nat. Acad. Sci., 85, 6802-6805.

Yee, G.M. & Kennedy, T.G. (1991)
Role of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate in mediating the effect of prostaglandin E_2 on decidualisation *in vitro*.
Biol. Reprod., 45, 163-171.