



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise en évidence de stress oxydants dans la transduction du signal liée à l'IL-1 et au TNF dans une lignée de fibroblastes humains en culture

Adam, Johanne

Award date:
1998

[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.

SECRETARIAT BIOLOGIE

F. U. N. D. P.

Rue de Bruxelles, 61
B - 5000 NAMUR

12 JUIN 1998

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**MISE EN ÉVIDENCE DE STRESS OXYDANTS DANS LA
TRANSDUCTION DU SIGNAL LIÉE À L'IL-1 ET AU TNF DANS UNE
LIGNÉE DE FIBROBLASTES HUMAINS EN CULTURE**

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

Johanne ADAM

Juin 1998

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72. 44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Mise en évidence de stress oxydants dans la transduction du signal liée à l'IL-1 et au TNF dans une lignée de fibroblastes humains en culture

ADAM Johanne

Résumé

Le facteur NF- κ B est activé par les cytokines IL-1 et TNF- α , après phosphorylation et dégradation de la sous-unité inhibitrice I κ B. IL est généralement admis que cette activation requiert un processus oxydatif, dans la nature reste toutefois mal connu, surtout dans le cas de l'IL-1. Dans ce travail, nous avons suivi l'oxydation du glutathion, au cours d'une stimulation à l'IL-1 ou au TNF- α de fibroblastes humains. Les deux cytokines induisent un pic transitoire de glutathion oxydé (GSSG). Ce pic disparaît en présence de la molécule antioxydante PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate). Nous avons également dosé le H₂O₂ intracellulaire et la concentration augmente également dans les cellules stimulées.

Nous nous sommes aussi intéressés à la tunicamycine, provoquant une surcharge du réticulum endoplasmique et induisant l'activation de NF- κ B, par une voie récepteur-indépendante.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1998

Promoteur: M. Raes

Je tiens à remercier en premier lieu M. Remacle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et ce malgré le nombre important de personnes y travaillant.

Merci à Mme Raes pour avoir su trouver un sujet de mémoire à la dernière minute et pour avoir toujours trouvé le temps de me conseiller et de m'aider malgré un emploi du temps très chargé.

Merci à mes parents pour m'avoir permis de faire ces études et pour m'avoir soutenue durant ces quatre années.

Merci à Martine et Edouard qui ont grandement contribué à ce mémoire et qui ont toujours bien voulu répondre aux quantités de questions que je leur ai posées.

Merci à toutes les personnes qui m'ont appris à me servir des ordinateurs, photocopieuses, centrifugeuses, balances...

Merci à Andrée qui m'a appris les bases de la culture cellulaire.

Merci à François grâce à qui mes cellules n'ont jamais manqué de rien.

Merci aux mémorants pour tous les moments (et bonbons) partagés.

Un merci particulier à Laura, Delphine, Catherine, Martine, Armand et Cindy qui m'ont remonté le moral quand "ça avait encore raté".

Un grand MERCI à Rita, Mallory, Sophie, Manu, Sylvie, Caroline, Fanny et les autres pour les moments "décompression".

Je remercie également Vincianne et Armand pour les parties de Shanghai et Isabelle Gilles pour son aide tant de fois proposée. Merci aussi à Nathalie pour s'être inquiétée de notre santé.

Enfin, merci à toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce mémoire.

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS	1
1. LES RADICAUX LIBRES ET ESPECES REACTIONNELLES DERIVANT DE L'O₂.	2
1.1. DEFINITION.	2
1.2. RADICAUX DERIVES DE L'O ₂	2
1.3. PRODUCTION DE ROIS.....	3
1.3.1. <i>Auto-oxydation de molécules chimiques.</i>	3
1.3.2. <i>Ions métalliques.</i>	4
1.3.3. <i>Production enzymatique.</i>	4
1.3.4. <i>Production par irradiation</i>	5
1.4. DEFENSES ANTIOXYDANTES.....	6
1.4.1. <i>Principales enzymes antioxydantes</i>	6
1.4.1.1. Superoxyde dismutases (SOD).....	6
1.4.1.2. Catalase	7
1.4.1.3. Les glutathion peroxydases (GPx)	7
1.4.2. <i>Contrôle des radicaux secondaires</i>	8
1.4.2.1. Vitamine C (acide ascorbique)	8
1.4.2.2. Vitamine E (α-tocophérol)	8
1.4.2.3. Les caroténoïdes.....	9
1.4.2.4. Le glutathion	9
1.4.3. <i>Elimination des peroxydes lipidiques</i>	9
1.5. FONCTIONS BIOLOGIQUES DES ROIS	10
1.5.1. <i>Les ROIs dans la réponse inflammatoire</i>	10
1.5.2. <i>Les ROIs comme messagers secondaires.</i>	10
1.5.2.1. NO et la vasodilatation.....	11
1.5.2.2. Peroxydes et la fibrose	11
1.5.2.3. ROI et transcription de gènes: cas du facteur transcriptionnel NF-κB ..	11
2. LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES IL-1 ET TNF-α.	12
2.1. DEFINITION.	12
2.2. CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.	12
2.3. LE TNF-α.	12
2.3.1. <i>Introduction.</i>	12
2.3.1.1. Induction.....	13
2.3.1.2. Régulation.....	13
2.3.2. <i>Effets biologiques.</i>	13
2.3.2.1. cytotoxicité	13
2.3.2.2. Inflammation.....	14
2.3.2.3. La cachexie.....	15
2.3.2.4. Choc endotoxique	15

2.3.2.5. Remodelage tissulaire.....	15
2.3.2.6. Infection et immunité.....	15
2.3.3. Récepteurs.....	16
2.3.4. Transduction du signal.....	16
2.3.4.1. Médiateurs lipidiques.....	17
2.3.4.2. PLA ₂	17
2.3.4.3. Kinases.....	17
2.3.4.5. Protéines recrutées.....	18
2.3.4.6. Apoptose.....	18
2.4. L'IL-1 β	19
2.4.1. Introduction.....	19
2.4.1.1. Induction.....	19
2.4.1.2. Régulation.....	19
2.4.2. Rôles biologiques.....	19
2.4.2.1. Effets neuro-endocriniens.....	20
2.4.2.2. Effets sur la production de cytokines.....	20
2.4.2.3. Effets sur les vaisseaux sanguins.....	20
2.4.2.4. Effets sur les cellules immunocompétantes.....	21
2.4.2.5. Effets dans l'inflammation.....	21
2.4.3. Récepteurs.....	22
2.4.4. Transduction du signal.....	22
2.4.4.1. Protéines G.....	22
2.4.4.2. AMPc.....	23
2.4.4.3. Médiateurs lipidiques.....	23
2.4.4.4. Oxyde nitrique (NO).....	24
2.4.4.5. Kinases et phosphatases.....	24
2.4.4.6. NF- κ B.....	24
3. NF- κ B.....	26
3.1. LA FAMILLE REL/NF- κ B.....	26
3.2. LA FAMILLE I κ B.....	27
3.3. ROLE BIOLOGIQUE.....	27
3.3.1. Stimuli activateurs.....	27
3.3.2. Mécanismes d'activation.....	28
3.3.3. Gènes-cibles.....	28
4. ACTIVATION DE NF- κ B ET ROIS.....	30
4.1. L'ACTIVATION DE NF- κ B EST SENSIBLE AUX ANTIOXYDANTS.....	30
4.2. NF- κ B PEUT ETRE ACTIVE PAR DES CONDITIONS PRO-OXYDANTES.....	31
4.3. STIMULI ACTIVATEURS DE NF- κ B ET CONDITIONS PRO-OXYDANTES.....	32

5. OBJECTIFS.....	33
-------------------	----

MATERIELS ET METHODES

1. CULTURE CELLULAIRE.....	34
1.1. CELLULES.....	34
1.2. MATERIELS.....	34
1.3. METHODE.....	35
1.3.1. <i>Repiquage</i>	35
1.3.2. <i>Congélation et décongélation des cellules</i>	35
2. DOSAGE DU GLUTATHION.....	36
2.1. MATERIELS.....	37
2.2. METHODE.....	37
2.2.1. <i>Préparation des extraits cellulaires</i>	37
2.2.2. <i>Quantification</i>	37
3. DOSAGE DE PROTEINES.....	39
3.1. MATERIELS.....	39
3.2. METHODE.....	39
4. WESTERN BLOTS.....	40
4.1. MATERIELS.....	40
4.1.1. <i>Extraction des protéines</i>	40
4.1.2. <i>Electrophorèse</i>	40
4.1.3. <i>Transfert sur une membrane</i>	41
4.1.4. <i>Traitement de la membrane et révélation</i>	41
4.2. METHODE.....	42
4.2.1. <i>Stimulation et préparation des extraits cytosoliques</i>	42
4.2.2. <i>Electrophorèse</i>	42
4.2.3. <i>Transfert des protéines sur une membrane</i>	43
4.2.4. <i>Traitement de la membrane et révélation</i>	43
5.1. MATERIELS.....	45
6. TEST DE CYTOTOXICITE.....	46
6.1. MATERIELS.....	46
6.2. METHODE.....	46
7.1. MATERIELS.....	47
7.1.1. <i>Extraction protéique</i>	47
7.1.2. <i>Marquage de la sonde</i>	48
7.1.3. <i>Liaison sonde-protéine</i>	48

7.1.4. Electrophorèse et autoradiographie	49
7.2. METHODE	49
7.2.1. Culture de cellules	49
7.2.2. Extraction des protéines	50
7.2.3. Marquage de la sonde	50
7.2.4. Liaison sonde-protéines	50
7.2.5. Electrophorèse et autoradiographie	51
7.2.6. Quantification	51

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. ACTIVATION DE NF- κ B PAR L'IL-1 ET LE TNF- α	52
1.1. EXPERIENCES DE RETARD SUR GEL	52
1.2. INDUCTION DES GENES SOUS LE CONTROLE DE NF- κ B	53
2. MISE EN EVIDENCE D'UN STRESS OXYDATIF INDUIT PAR L'IL-1 β ET LE TNF- α	54
2.1. MODIFICATION DE LA BALANCE GSSG/GSH	54
2.1.1. Dosage du glutathion	54
2.1.2. Effets des cytokines sur la balance GSSG/GSH	55
2.1.3. Discussion	55
2.2. PRODUCTION D'H ₂ O ₂ INTRACELLULAIRE	56
2.2.1. Effet d'H ₂ O ₂ exogène	56
2.2.2. Effet des cytokines	56
2.3. DISCUSSION	57
3. LA SURCHARGE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET ACTIVATION DE NF- κ B DANS LES CELLULES WI-38 VA13	58
3.1. EFFETS SUR L'ACTIVATION DE NF- κ B	58
3.2. DISCUSSION	58

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. INDUCTION DE ROIS PAR L'IL-1 β ET LE TNF- α	59
2. EFFET DE LA TUNICAMYCINE	60
3. PERSPECTIVES	60

ANNEXE

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Avant-propos

L'IL-1 et le TNF sont les deux principaux activateurs du facteur de transcription NF- κ B. Ce facteur est un acteur important de la réponse cellulaire en cas d'inflammation, il se trouve à l'état inactif dans le cytoplasme de nombreuses cellules. Lorsqu'il est activé, il entre dans le noyau afin d'activer la transcription de gènes de réponse inflammatoire.

Les voies de transduction de l'IL-1 et du TNF aboutissant à l'activation de NF- κ B sont de mieux en mieux connues. On sait que des espèces oxydantes font partie intégrante des ces voies, mais leur nature, l'endroit où elles interviennent et leurs modes d'action ne sont pas toujours connus. C'est ces questions que nous aborderons en partie dans le cadre de ce mémoire, sur un modèle de fibroblastes humains immortalisés, stimulés avec l'IL-1 ou le TNF.

Nous commencerons donc cette introduction par un chapitre consacré aux espèces oxydantes, et en particulier aux dérivés actifs de l'oxygène, mais aussi aux mécanismes de défense mis en place pour limiter les dégâts que pourraient occasionner ces molécules.

Nous consacrerons une partie de ce chapitre à l'action des dérivés actifs de l'oxygène dans le cas de l'inflammation. Enfin, nous aborderons l'hypothèse prônant le rôle de messagers secondaires pour ces molécules.

Ensuite, dans un deuxième chapitre nous passerons en revue les deux cytokines pro-inflammatoires que sont le TNF- α et l'IL-1 β . Nous décrirons leurs effets et leurs voies de transduction du signal en insistant sur les voies aboutissant à l'activation de NF- κ B.

Enfin, nous présenterons le facteur transcriptionnel NF- κ B et le rôle des espèces réactives dérivées de l'oxygène dans son activation.

1. LES RADICAUX LIBRES ET ESPECES REACTIONNELLES DERIVANT DE L'O₂.

1.1. DEFINITION.

Les radicaux libres sont des espèces moléculaires contenant un nombre impair d'électrons, ils peuvent être neutres, chargés négativement ou positivement. La présence d'un électron non apparié est à la source de leur grande réactivité qui varie selon la température et l'espèce chimique (Pryor, 1976). Comme ils sont très réactifs, leur concentration in vivo est très basse (10^{-4} à 10^{-9} M). La plupart des radicaux libres subissent une dimérisation ou une réaction où l'électron célibataire s'apparie à un autre électron. Cependant certains sont relativement stables comme par exemple le radical nitroxyde (R_2NO) (Rice-Evans et al., 1991).

Dans ce travail, nous nous focaliserons sur les radicaux dérivés de l'oxygène.

1.2. RADICAUX DERIVES DE L'O₂

L'O₂ est nécessaire à la vie, mais il est aussi toxique en excès, par exemple dans l'ischémie-reperfusion. A l'état fondamental, l'O₂ triplet possède 2 électrons non appariés de spin parallèle logés dans des orbitales π antiliantes π_x , π_y . L'O₂ triplet réagit comme un diradical plus ou moins stable. Il peut convertir les radicaux (R°) en radicaux hydroperoxydes ($R-OO^\circ$). L'O₂ triplet ne peut oxyder spontanément une molécule chimique car il devrait réagir avec une espèce possédant une paire d'électrons de spin parallèle ou subir une inversion du spin d'un de ses électrons, ce qui est très improbable. En fait, l'ajout des électrons sur l'O₂ se fait un par un; on parle de réduction monovalente de l'O₂.

Il existe différentes formes réactionnelles d'O₂ (Rice Evans et al., 1991):

- La forme où les deux électrons sont appariés dans une des orbitales π , l'autre étant vide; cette forme, appelée oxygène singulet peut exister dans les solutions aqueuses.
- L'ion superoxyde qui possède un électron non apparié dans une orbitale π . Il s'agit d'une base faible. Il réagit comme un oxydant faible ou comme arracheur d'hydrogène avec la plupart des molécules organiques. Avec le peroxyde d'hydrogène, l'ion superoxyde est un médiateur des dommages cellulaires via l'oxydation des membranes ou l'altération de systèmes enzymatiques importants. Un

excès d'ions superoxyde peut interagir avec des protons dans les membranes, à faible concentration, générant HO_2° qui peut initier des peroxydations lipidiques. L'ion superoxyde et H_2O_2 peuvent cependant stimuler la croissance dans divers types cellulaires.

- Le radical hydroxyle (OH°): il est formé par perte d'électron à partir d' H_2O_2 , par capture d'électron ou homolyse (UV). OH° est tellement réactionnel qu'il a tendance à réagir avec la première molécule qu'il rencontre, en lui arrachant un hydrogène ou en s'additionnant aux doubles liaisons. Il cause entre autres des dommages à l'ADN en créant des dimères de thymine.
- Hydroperoxydes et radicaux peroxydes: Les radicaux RO_2° sont plus réactifs que $\text{O}_2^{\circ-}$ et peuvent former H_2O_2 . La production de radical hydroxyle par la réaction de Fenton est en partie responsable de la toxicité d' H_2O_2 . Les hydroperoxydes organiques sont capables de se décomposer en radicaux libres qui stimulent l'auto-oxydation de molécules organiques portant des hydrogènes labiles.

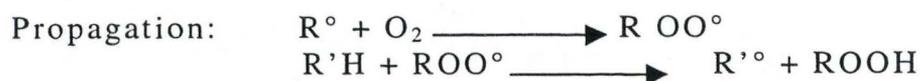
Dans la suite, nous parlerons de ROI (espèces réactionnelles dérivant de l' O_2) plutôt que de radicaux car les ROIs comprennent les radicaux et d'autres molécules hautement réactionnelles comme l' H_2O_2 et l' O_2 singulet, qui ne répondent pas à la définition de radical libre, mais qui sont physiologiquement également très importants.

1.3. PRODUCTION DE ROIs.

Les ROIs peuvent être produits de diverses manières, que ce soit naturellement ou non. Voici les voies les plus courantes.

1.3.1. Auto-oxydation de molécules chimiques.

Des molécules comme les quinones peuvent produire des ROIs car elles subissent un cycle redox où il y a transfert d'un électron. L'auto-oxydation comprend 3 étapes: l'initiation, la propagation et la terminaison (Pryor, 1976).



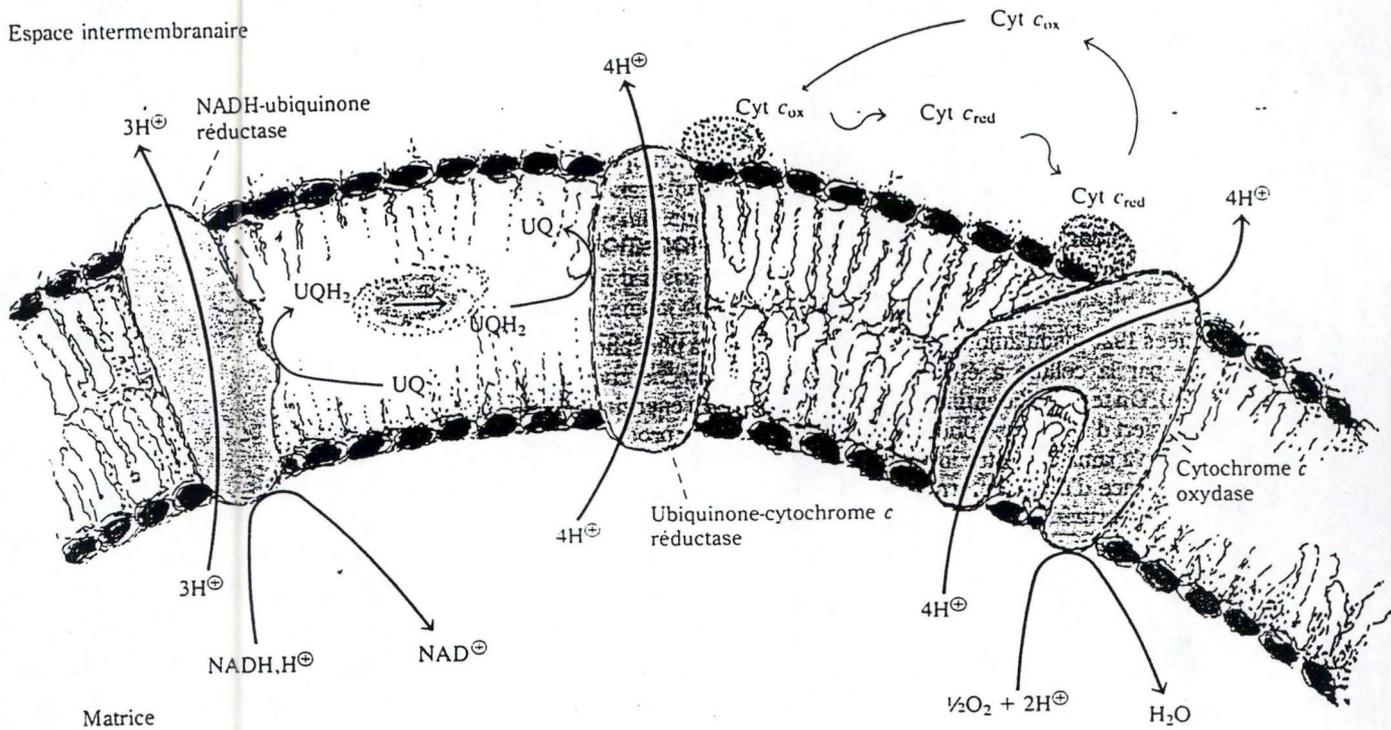
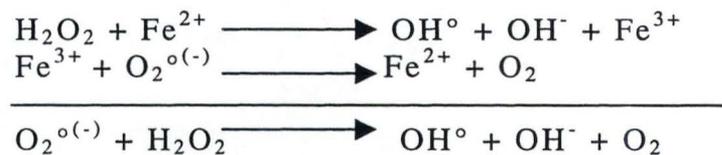


Fig. I. 1.: Chaîne mitochondriale de transport des électrons.
D'après Rawn, 1990 .

Les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires subissent ces réactions. Le taux d'auto-oxydation augmente avec le degré d'insaturation.

1.3.2. Ions métalliques.

Les réactions d'oxydoréduction entre un ion métallique de transition et un peroxyde jouent un rôle important dans la production de radicaux in vivo. Dans la réaction d'Haber-Weiss le fer catalyse la décomposition du peroxyde d'oxygène (Pryor, 1976):

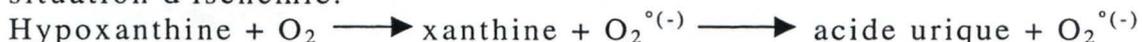


Cette réaction générant le radical hydroxyle (OH°), intervient dans la réduction monovalente de l'oxygène.

De nombreuses molécules biologiques utiles telles les thiols, l'hémoglobine, les flavines, quinones et cathécols subissent une auto-oxydation par l'oxygène moléculaire, générant ainsi $\text{O}_2^{\circ(-)}$. Ces auto-oxydations sont également souvent catalysées par des cations métalliques de transition comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} (Winyard et al., 1994)

1.3.3. Production enzymatique.

Les ROIs peuvent être des produits secondaires de réactions enzymatiques par exemple: la xanthine oxydase produit $\text{O}_2^{\circ(-)}$ en catalysant la production de xanthine à partir d'hypoxanthine en situation d'ischémie.



Les radicaux proviennent aussi de pertes lorsque les électrons sont transférés dans des systèmes tels le cytochrome P450 ou la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries. La plupart de l' O_2 des cellules de mammifères est converti en eau via le système de transport d'électrons des mitochondries. Les électrons viennent du NADH puis réduisent des flavoprotéines, le coenzyme Q (ubiquinone), des cytochromes et en final l'oxygène moléculaire. La cytochrome oxydase donne quatre électrons à l' O_2 par un transfert séquentiel d'un électron (Fig. I. 1). Environ 5 % des électrons transitant dans la chaîne s'en trouvent découplés à différents points, surtout au niveau de l'ubiquinone; ils s'échappent sur l' O_2 pour former $\text{O}_2^{\circ(-)}$.

Le système de transport d'électrons du réticulum endoplasmique (RE), la NADPH-cytochrome P-450 réductase génère aussi $\text{O}_2^{\circ(-)}$. Ce système

est responsable du métabolisme des substances étrangères. Il est présent en majorité dans les hépatocytes. Un premier électron passe d'une flavine réduite à un complexe substrat-cytochrome P-450. Un deuxième électron est transféré par ce complexe sur l'O₂. Il peut arriver qu'il y ait production d'O₂^{°(-)} en cas d'auto-oxydation du cofacteur partiellement réduit de la flavine ou par découplage d'électrons du complexe enzyme substrat sur l'O₂ (Winyard et al., 1994).

Les ROIs prennent part aux défenses antimicrobiennes dans les phagocytes, entre autres via la NADPH oxydase (Rice-Evans, 1994). Les phagocytes activés par des molécules étrangères subissent une explosion respiratoire. Dans le phagosome, il existe une NADPH-oxydase associée à la membrane plasmique. Les électrons relargués par le NADPH réduisent l'oxygène en radical superoxyde. Les particules étrangères sont donc exposées à un flux de radicaux superoxyde. Le peroxyde d'hydrogène formé par dismutation de radicaux superoxydes via la superoxyde dismutase, peut ensuite tuer certaines souches de bactéries.



Les granules neutrophiles relâchent également la myéloperoxydase qui utilise l'H₂O₂ comme substrat et oxyde le chlore en acide hypochlorique.



L'acide hypochlorique oxyde nombre de molécules biologiques, surtout les résidus méthionine et les groupements thiols. Le radical superoxyde (O₂^{°(-)}) forme aussi le radical hydroxyle OH[°] toxique pour les bactéries via la réaction d'Haber-Weiss. Dans les environnements acides comme les vacuoles d'endocytose, O₂^{°(-)} peut être protoné en radical perhydrol:

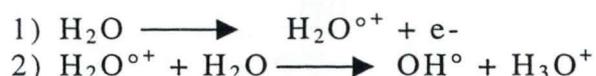


1.3.4. Production par irradiation

La photolyse de certains composés par de la lumière UV entre 240 et 400 nm peut créer des radicaux.

Les rayons X ou γ participent à des réactions comprenant l'éjection d'un électron et générant également des radicaux.

Après ionisation primaire, l'eau perd rapidement des protons et produit un radical hydroxyle:



D'après Rice-Evans et al., 1991.

1.4. DEFENSES ANTIOXYDANTES.

Définition.

Un antioxydant se définit comme toute substance pouvant retarder ou prévenir l'oxydation d'un substrat lorsqu'il est présent en faible quantité par rapport au substrat (Diplock, 1994).

Défenses in vivo.

Le premier niveau de défense consiste à diminuer la concentration locale en O₂. Il implique des enzymes qui contrôlent la formation des espèces radicalaires primaires.

Le second niveau de défense consiste à capturer les espèces radicalaires secondaires et implique les vitamines C et E ainsi que les caroténoïdes.

Le troisième niveau de défense empêche la formation de radicaux secondaires à partir d'hydroperoxydes lipidiques (Diplock, 1994).

1.4.1. Principales enzymes antioxydantes

1.4.1.1. Superoxyde dismutases (SOD)

Il en existe 3 sortes, la SOD-Fe présente chez les procaryotes, la SOD-Mn présente dans les mitochondries des cellules eucaryotes et la SOD-CuZn présente dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Les deux dernières sont également présentes chez les procaryotes. Ces enzymes catalysent la dismutation de l'ion superoxyde.



La dismutation spontanée de O₂^{°-} est très dépendante du pH alors qu'en présence de SOD la réaction est indépendante du pH et fortement accélérée.

Les SODs Cu-Zn contiennent deux sous-unités contenant chacune un atome de Cu ou de Zn au site catalytique. C'est le Cu qui joue le rôle catalytique. Il est probable que le Cu réagit en subissant alternativement une oxydation et une réduction. Le Zn quant à lui sert à stabiliser l'enzyme.

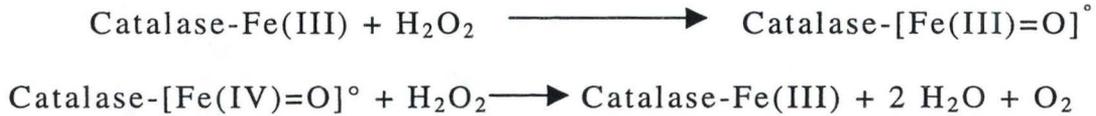
Mécanisme réactionnel:



1.4.1.2. Catalase

Dans la plupart des cellules, la catalase est présente dans les peroxysomes. Elle comprend 4 sous-unités contenant chacune un groupement hème dans le site actif (Fe(III) -protoporphyrine).

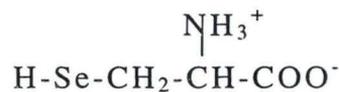
Mécanisme réactionnel :



1.4.1.3. Les glutathion peroxydases (GPx)

La GPx prédominante est une séléno-enzyme dont les fonctions catalytiques dépendent de la présence du sélénium dans l'enzyme. Elle est formée de quatre sous-unités identiques d'un poids moléculaire de 18 000 à 24 000 daltons comprenant chacune un atome de sélénium dans un résidu sélénocystéine. Chaque site actif est formé de parties de deux sous-unités. La formation de la sélénocystéine dépend d'un codon UGA codant spécifiquement pour ce résidu. Ici le codon UGA ne correspond donc pas à un stop traductionnel, probablement à cause d'une structure secondaire en épingle à cheveux de l'ARNm (Low et Berry, 1996). L'ARN de transfert complémentaire est lié à une Ser à laquelle vient s'ajouter un sélényl pour former la sélénocystéine. Cette enzyme est localisée dans les mitochondries et le cytoplasme de la plupart des cellules de mammifères.

Structure de la sélénocystéine:



Pour réduire un peroxyde, la glutathion peroxydase (GPx) utilise deux molécules de glutathion réduit (GSH) qui vont s'oxyder pour former une molécule de glutathion oxydé (GSSG). Le glutathion oxydé est ensuite réduit en deux molécules de glutathion réduits par la glutathion réductase, via l'oxydation du NADPH. Pour réduire les hydroperoxydes lipidiques, la GPx requiert toutefois l'action préalable de phospholipase A₂.

La GPx peut également réduire le H₂O₂ comme la catalase, mais elle intervient surtout à faible concentration en H₂O₂, car elle a une affinité plus grande que la catalase pour ce substrat. Son rôle

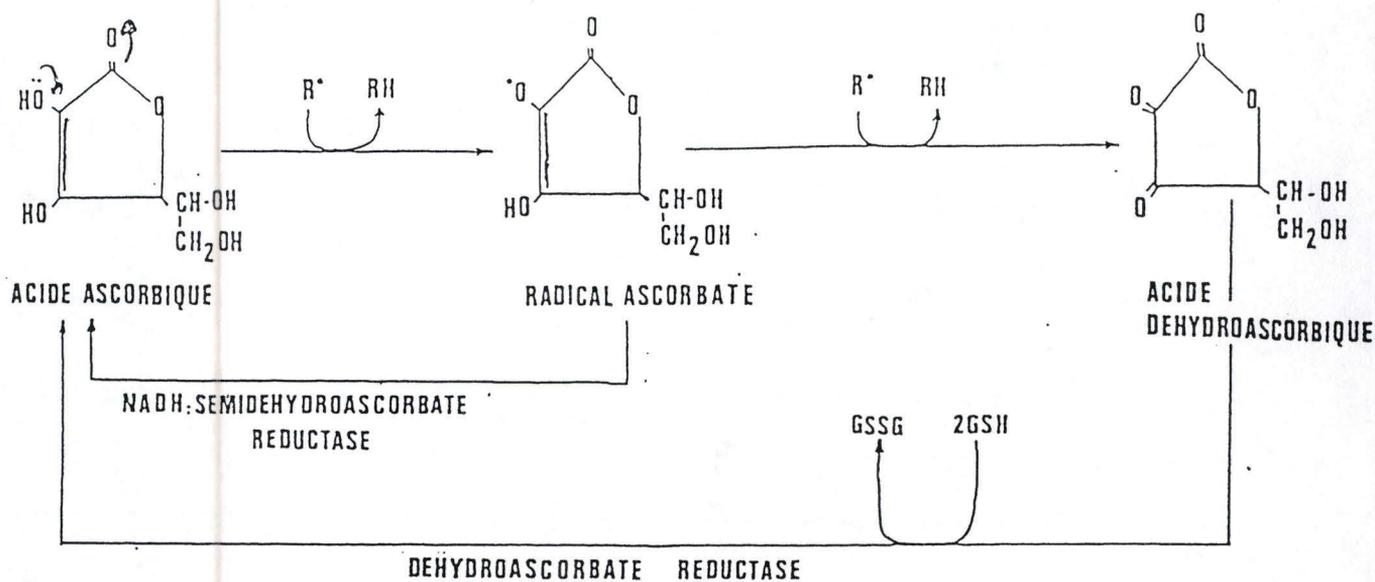


Fig. I. 2.: Oxydation et recyclage enzymatique de l'acide ascorbique (Vitamine C) (Fessenden et Verma, 1978).

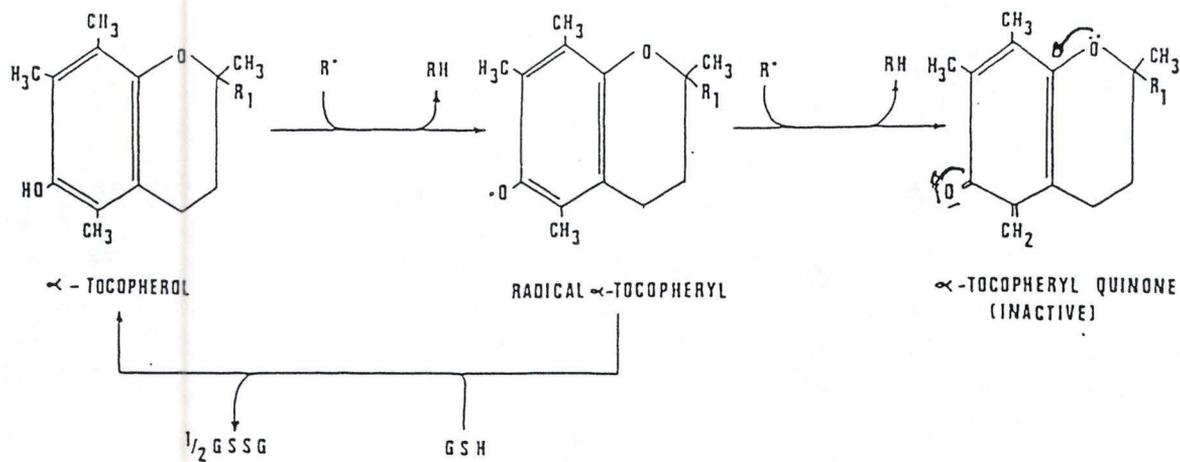


Fig. I. 3.: Oxydation de l' α -tocophérol (Vitamine E) et recyclage du radical α -tocophéryl (Fessenden et Verma, 1978).

primordial est la réduction d' H_2O_2 dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale.

Mécanisme réactionnel:

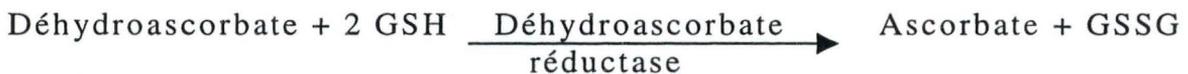


1.4.2. Contrôle des radicaux secondaires

1.4.2.1. Vitamine C (acide ascorbique)

Un petit groupe d'espèces animales incluant l'homme, les primates, les cobayes et les chauves-souris ne peut synthétiser la vitamine C car le gène correspondant à l'enzyme de synthèse est absent. La vitamine doit donc venir d'une source extérieure. L'ascorbate réagit avec un premier radical en lui donnant un électron et devient le radical ascorbate, qui réagit avec un deuxième radical pour devenir le déhydroascorbate. La régénération de l'ascorbate est prise en charge par la déhydroascorbate réductase, enzyme dépendante du glutathion (fig. I. 2).

Mécanisme réactionnel:



1.4.2.2. Vitamine E (α -tocophérol)

L'activité antioxydante de la vitamine E dans un aliment est la somme des activités de 8 tocophérols chimiquement similaires. L'absorption varie d'une forme à l'autre. Le tocophérol le plus important comme produisant l'activité de vitamine E est l' α -tocophérol (fig. I. 3).

Mécanisme réactionnel:

L' α -tocophérol s'oxyde en radical α -tocophéryl lorsqu'il rencontre un radical peroxy lipidique. Cette réaction est réversible: l' α -tocophéryl peut accepter un hydrogène du GSH et redonner l' α -tocophérol. Si une deuxième oxydation a lieu, elle donne naissance à l' α -tocophéryl quinone; cette réaction est irréversible. Cependant la quantité d' α -tocophéryl quinone in vivo est faible, car la régénération de l' α -tocophérol à partir de son radical est très efficace; elle fait probablement intervenir la vitamine C et les caroténoïdes comme donneurs d'hydrogène.

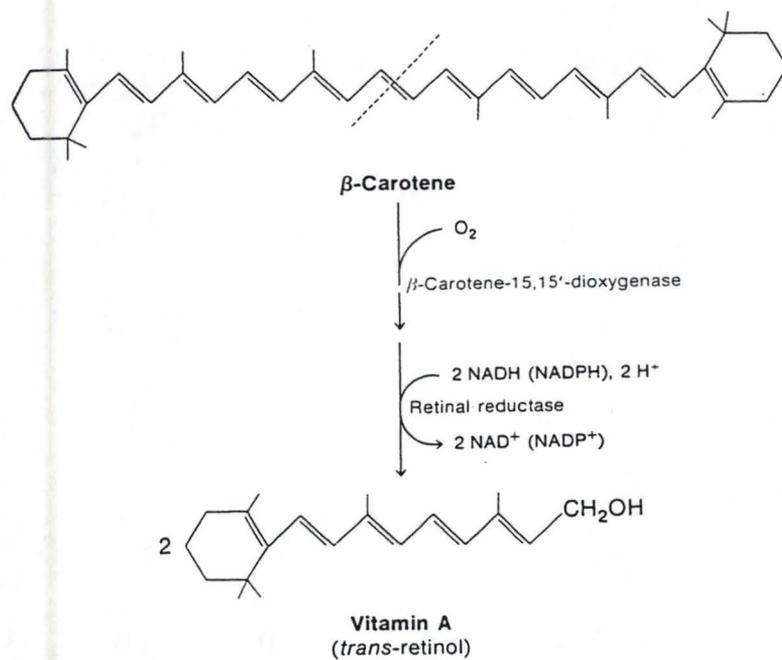


Fig. I. 4.: Biosynthèse de la Vitamine A à partir du β -carotène (Zubay, 1983).

1.4.2.3. Les caroténoïdes

Une des fonctions bien connue des caroténoïdes chez les animaux est de servir de précurseur à la vitamine A (Fig. I. 4). Plus récemment il a été montré qu'ils pourraient prévenir certaines formes de cancers et protéger des maladies athéromateuses (Diplock, 1994).

Dans les chloroplastes végétaux les caroténoïdes sont des scavengers de l'oxygène singulet généré par l'état excité de la chlorophylle, lui-même diminué par les caroténoïdes.

Leur rôle dans les cellules animales a été clarifié: le β -carotène agit en synergie avec l' α -tocophérol pour empêcher la peroxydation lipidique (Diplock, 1994).

1.4.2.4. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide composé d'une glutamine, d'une cystéine et d'une glycine. Il joue un rôle important dans la défense contre les ROIs car il procure des équivalents réducteurs à de nombreuses enzymes antioxydantes (Diplock, 1994). Le GSH est aussi un scavenger de radicaux hydroxyles et de l'oxygène singulet. Mécanisme d'action dans le cas du radical hydroxyle:



1.4.3. Elimination des peroxydes lipidiques

Le mécanisme de la peroxydation lipidique est expliqué au point 1.3.1. L'étape de terminaison produit des formes non radicalaires. Cependant, il peut y avoir reformation de radicaux peroxy lipidiques catalysée par des cations métalliques divalents de transition:



Il est donc utile de supprimer les hydroperoxydes, source potentielle de radicaux. La glutathion peroxydase est inefficace pour la réduction des hydroperoxydes lipidiques in situ et requiert l'action préalable de phospholipase A₂. Par contre, il existe également une phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase, qui, elle, est capable de catalyser cette réduction dans les structures membranaires (Diplock, 1994).

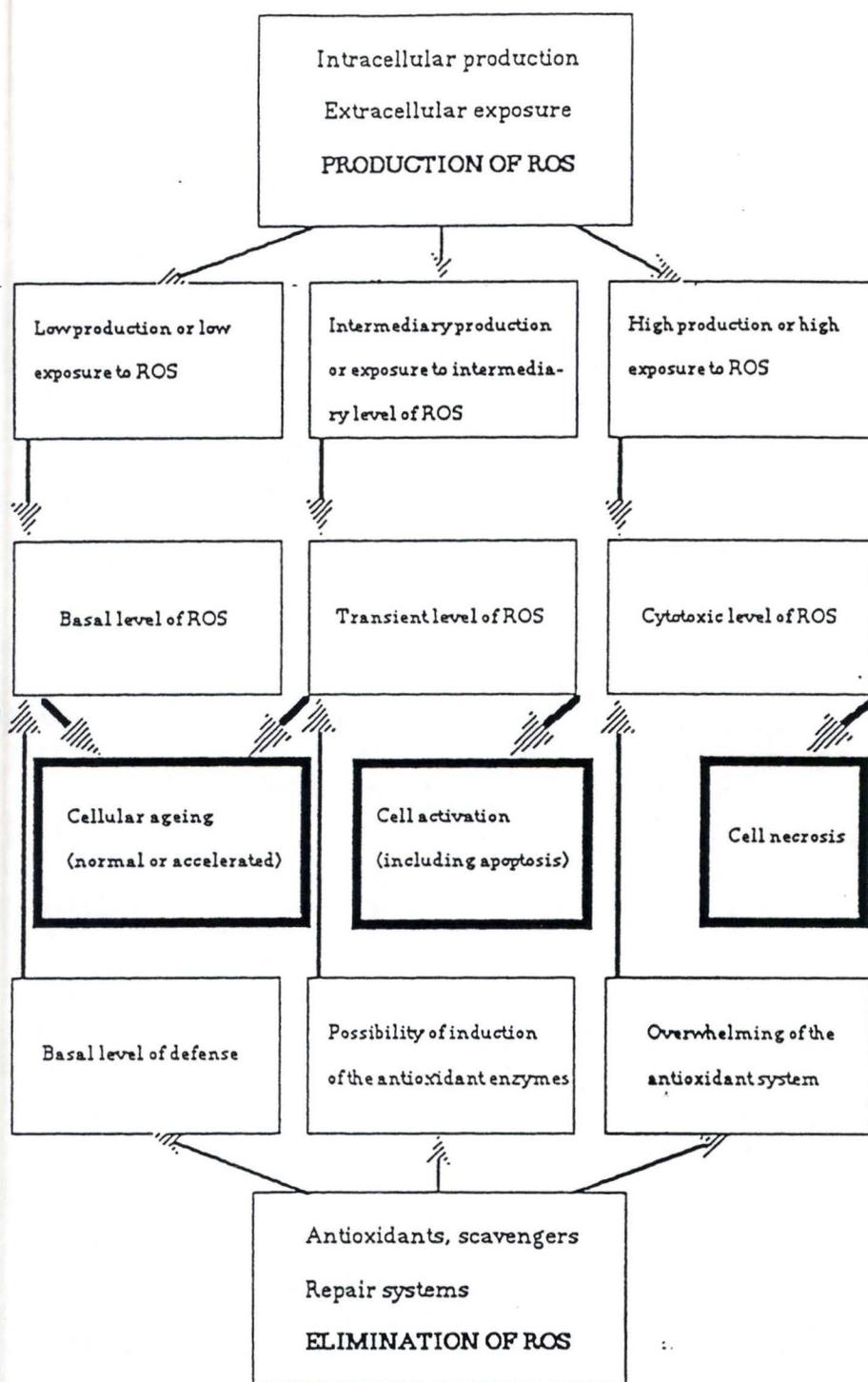


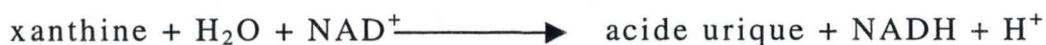
Fig. 1. 5.: Effet des ROIs, selon la cinétique et/ou l'intensité de leur production. Des fortes productions sont cytotoxiques. Des faibles productions transitoires joueraient un rôle dans l'activation des cellules. (Remacle et al., 1995).

1.5. FONCTIONS BIOLOGIQUES DES ROIs

1.5.1. Les ROIs dans la réponse inflammatoire

Les ROIs sont impliqués dans de nombreuses maladies possédant une composante inflammatoire comme l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le cancer... Dans ce contexte ils contribuent à la destruction tissulaire et cellulaire sur laquelle nous ne nous étendrons pas (Fig. I. 5). Signalons cependant que dans ce cas, les ROIs sont générés par une série de systèmes enzymatiques, parmi lesquels:

- la NADPH oxydase et myéloperoxydase des polymorphonucléaires, qui produisent localement des concentrations élevées en ROIs, lors de l'explosion respiratoire.
- la xanthine oxydase, dérivée de la xanthine déshydrogénase. Cette enzyme catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et acide urique. Chez l'homme elle est localisée principalement dans le foie, l'intestin grêle et l'endothélium capillaire. Dans les tissus sains elle est sous forme de déshydrogénase transférant des électrons au NAD^+ :



Seulement 10 % de l'enzyme est sous forme oxydase transférant des électrons à l'oxygène moléculaire pour former $\text{O}_2^{\circ-}$:



La production d' $\text{O}_2^{\circ-}$ dans les tissus ischémiques impliquerait un trouble dans le métabolisme des purines. Durant une ischémie, les phosphorylations oxydatives dans les mitochondries ne peuvent plus produire un taux normal d'ATP. Cela conduit à une augmentation de la concentration en adénosine et de ses produits de décomposition: la xanthine et l'hypoxanthine. Les gradients ioniques sont perturbés et le taux de Ca^{2+} cytosolique augmente, ce qui active une protéase catalysant la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase. La reperfusion apporte à la xanthine oxydase son substrat (O_2) et produit $\text{O}_2^{\circ-}$ (Winyard et al., 1994).

1.5.2. Les ROIs comme messagers secondaires.

Plus récemment, on a attribué aux ROIs, non seulement un rôle toxique, mais aussi, quand ils sont produits en faible quantité et de manière transitoire, un rôle de messenger secondaire (Fig. I. 5). Nous nous limiterons ici à trois exemples.

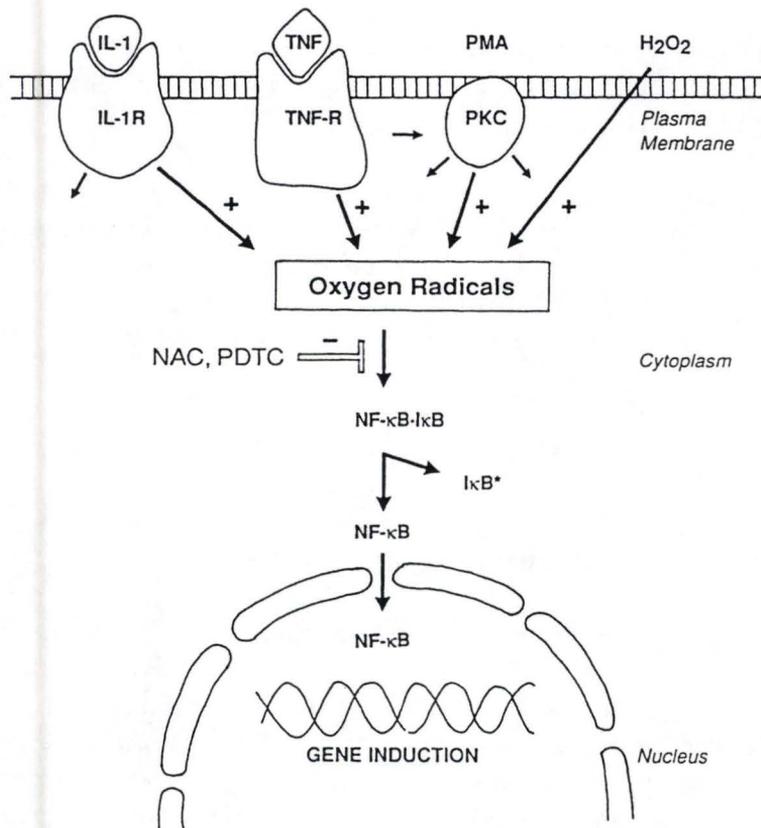


Fig. I. 6.: Modèle proposant les ROIs comme messagers secondaires pour l'IL-1, le TNF et le PMA (Schreck et Baeuerle, 1991).

1.5.2.1. NO et la vasodilatation

Le radical oxyde nitrique (NO°) joue un rôle important dans la vasodilatation. Il existe des NO-synthases constitutives dans de nombreuses cellules, mais il existe également des NO-synthases inductibles, calcium dépendantes, entre autres dans les neutrophiles, macrophages et lymphocytes, générant l'oxyde nitrique à partir de l'arginine.

1.5.2.2. Peroxydes et la fibrose

Une réponse inflammatoire avec infiltration de neutrophiles, monocytes et macrophages dans des tissus précède souvent la fibrose. Les ROIs libérés par ces cellules inflammatoires sont des facteurs vitaux pour le processus de fibrose. De faibles concentrations en ROIs, particulièrement en H_2O_2 peuvent augmenter le taux de réplication des fibroblastes in vitro. Si cela se produit in vivo, le pool de cellules produisant du collagène s'en trouve augmenté. Une preuve du rôle important des ROIs dans la fibrose est l'exemple de la drogue antitumorale, la bléomycine qui se complexe avec le fer et l' O_2 pour donner OH° .

1.5.2.3. ROI et transcription de gènes: cas du facteur transcriptionnel NF- κ B

C'est en 1991, que Schreck et Baeuerle proposent que les ROIs agissent comme messagers secondaires pour les cytokines telles que l'IL-1 ou le TNF- α et pour les esters de phorbol tels que le PMA. L'argument majeur à la base de cette hypothèse était que plusieurs antioxydants tels que la N-acétyl-cystéine (NAC) et le pyrrolidine dithiocarbamate (PDTTC), étaient capables d'inhiber l'activation du facteur NF- κ B induite par ces cytokines et le PMA (Fig. I. 6). Ils ont également montré qu'un stress oxydatif induisait l'expression et la réplication de HIV-1, le virus-1 de l'immunodéficience humaine, dans une lignée de cellules T. Cet effet est médié par le facteur de transcription NF- κ B qui est rapidement activé par H_2O_2 .

Dans les chapitres suivants, nous passerons d'abord en revue les cytokines IL-1 et TNF- α , puis le facteur transcriptionnel NF- κ B, qui joue un rôle-clé dans les réponses induites par ces deux cytokines. Enfin, nous essayerons de préciser les liens existant entre ROI et l'activation du facteur NF- κ B.

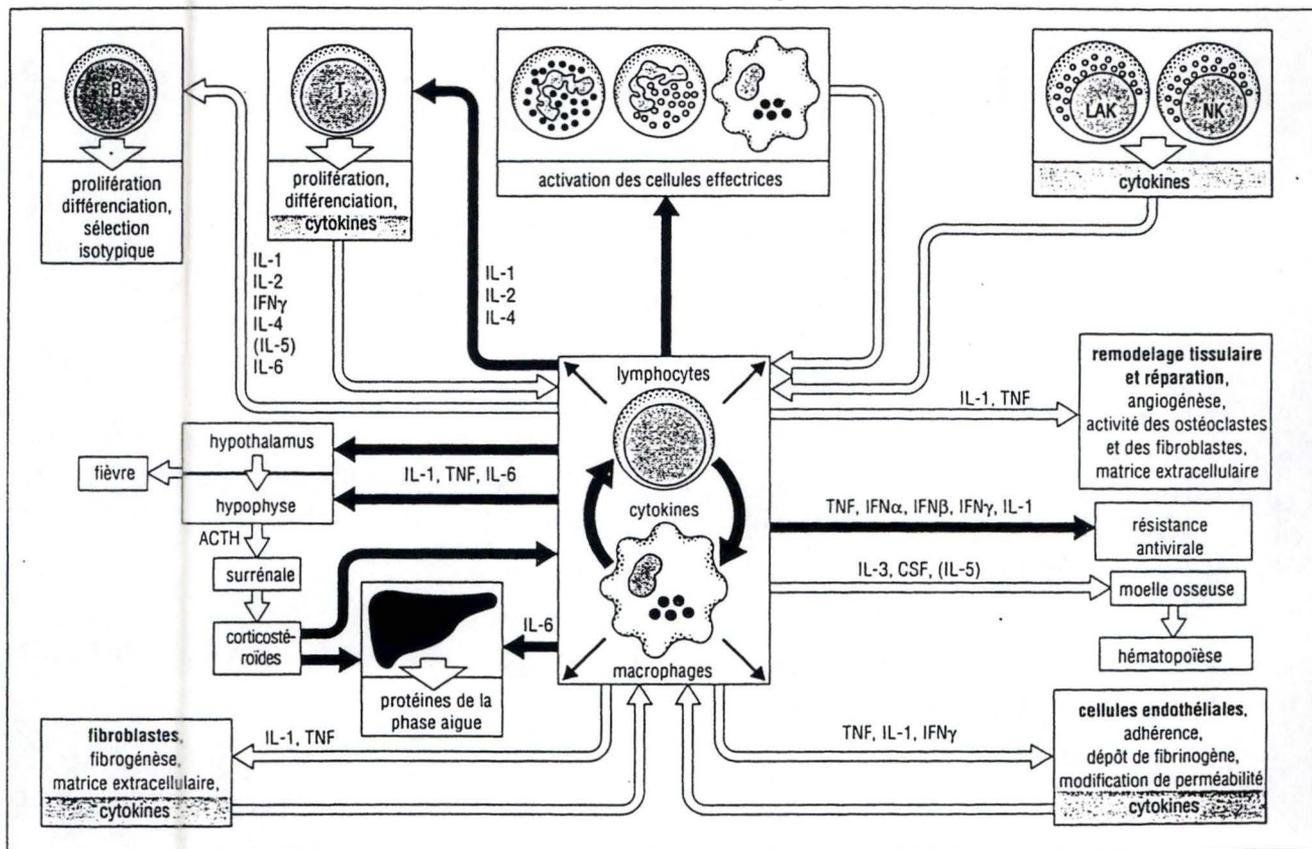


Fig. I. 7.: Schéma illustrant le réseau des cytokines agissant comme médiateurs intercellulaires (Rook, 1994).

2. LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES IL-1 ET TNF- α .

2.1. DEFINITION.

Le terme cytokine désigne un ensemble de molécules fonctionnant en réseau et impliquées dans la signalisation intercellulaire durant la réponse immunitaire. Elles permettent également au système nerveux de communiquer avec le système immunitaire. Ce sont des polypeptides glycosylés ou non (Roitt et Male, 1994) (Fig. I. 7). Les cytokines comprennent les facteurs de croissance, les facteurs hématopoïétiques, les interférons et les interleukines (Dinarello, 1994).

2.2. CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES.

Trois événements font partie de la réaction inflammatoire: l'augmentation du flux sanguin, l'augmentation de la perméabilité capillaire et la diapédèse ou transmigration des cellules inflammatoires à travers l'endothélium.

Au stade initial, l'IL-1, le TNF- α ou l'IL-6 peuvent être produites. Lorsque les lymphocytes et cellules mononucléées ont gagné le foyer inflammatoire, ils peuvent sécréter leurs propres cytokines (IL-1, TNF, IL-4, IFN- γ ,...) agissant sur les cellules endothéliales et augmentant encore la migration cellulaire. D'autres cytokines comme l'IL-8 ont des effets chimiotactiques (Male, 1994). Dans ce travail, nous nous focaliserons sur deux cytokines pro-inflammatoires majeures, le TNF- α et l'IL-1.

2.3. LE TNF- α .

2.3.1. Introduction.

Le TNF- α est une cytokine produite principalement par les monocytes et macrophages, mais également par les lymphocytes, cellules NK, astrocytes, cellules microgliales et cellules de Kupffer.

Le TNF- α est un trimère, chaque sous-unité faisant 17 kDa. Il peut être mitogène, cytotoxique ou cytostatique (Van Lint et al., 1992). Le TNF- α partage 30 % d'homologie avec la lymphotoxine (TNF- β) qui est produite principalement par les lymphocytes T.

Le TNF- α a été découvert presque simultanément dans deux laboratoires, dont l'un étudiait la perte de poids dans l'infection chronique (cachexie). Cette cytokine a donc été appelée "cachectine".

Le TNF- α est synthétisé *de novo* suite à une activation cellulaire (Camussi et al. , 1991) et n'existe donc pas sous une forme de stockage.

2.3.1.1. Induction

La néosynthèse du TNF- α est surtout induite par l'endotoxine et les lipopolysaccharides (LPS), mais elle peut également l'être via des virus, des champignons, des antigènes de parasites, des entérotoxines, le facteur C5a du complément, les complexes immuns, l'IL-1 et par lui-même d'une manière autocrine.

2.3.1.2. Régulation

La biosynthèse du TNF- α est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Les macrophages contiennent un pool d'ARNm de TNF- α non traduit en protéine. Après stimulation par du LPS, les cellules augmentent leur contenu en ARNm du TNF- α et la transcription du gène est accélérée trois fois. Les glucocorticoïdes inhibent à la fois la transcription et la traduction. L'INF- γ quant à lui exerce un effet positif sur la traduction de l'ARNm. La régulation de la transcription du TNF- α dans les macrophages implique quatre motifs κ B-like et le facteur de transcription NF- κ B (Camussi et al., 1991), dont il sera question plus loin dans cette introduction.

2.3.2. Effets biologiques

Le TNF- α a des effets pléiotropiques dans de nombreux types cellulaires. Ses deux rôles les plus importants sont la destruction des cellules tumorales et le déclenchement des processus inflammatoires (pour une revue voir Camussi et al., 1991).

2.3.2.1. cytotoxicité

Le TNF- α peut médier la nécrose et l'apoptose des cellules. Le processus de cytotoxicité impliquerait des ROIs, spécialement le radical superoxyde, car la SOD confère une protection au TNF- α dans certains types cellulaires (Wong et al., 1989). Des antioxydants comme l'hydroxytoluène et l'hydroxyanisole protègent également les cellules de l'activité cytotoxique du TNF- α . D'autre part, l'inhibition de la SOD ou la diminution du GSH conduisent à une cytotoxicité accrue du TNF- α .

Les radicaux libres produits par la chaîne de transport des électrons mitochondriale apparaissent souvent impliqués dans la cytotoxicité du TNF- α . Les complexes I et II sont sources d'espèces réactives dérivées

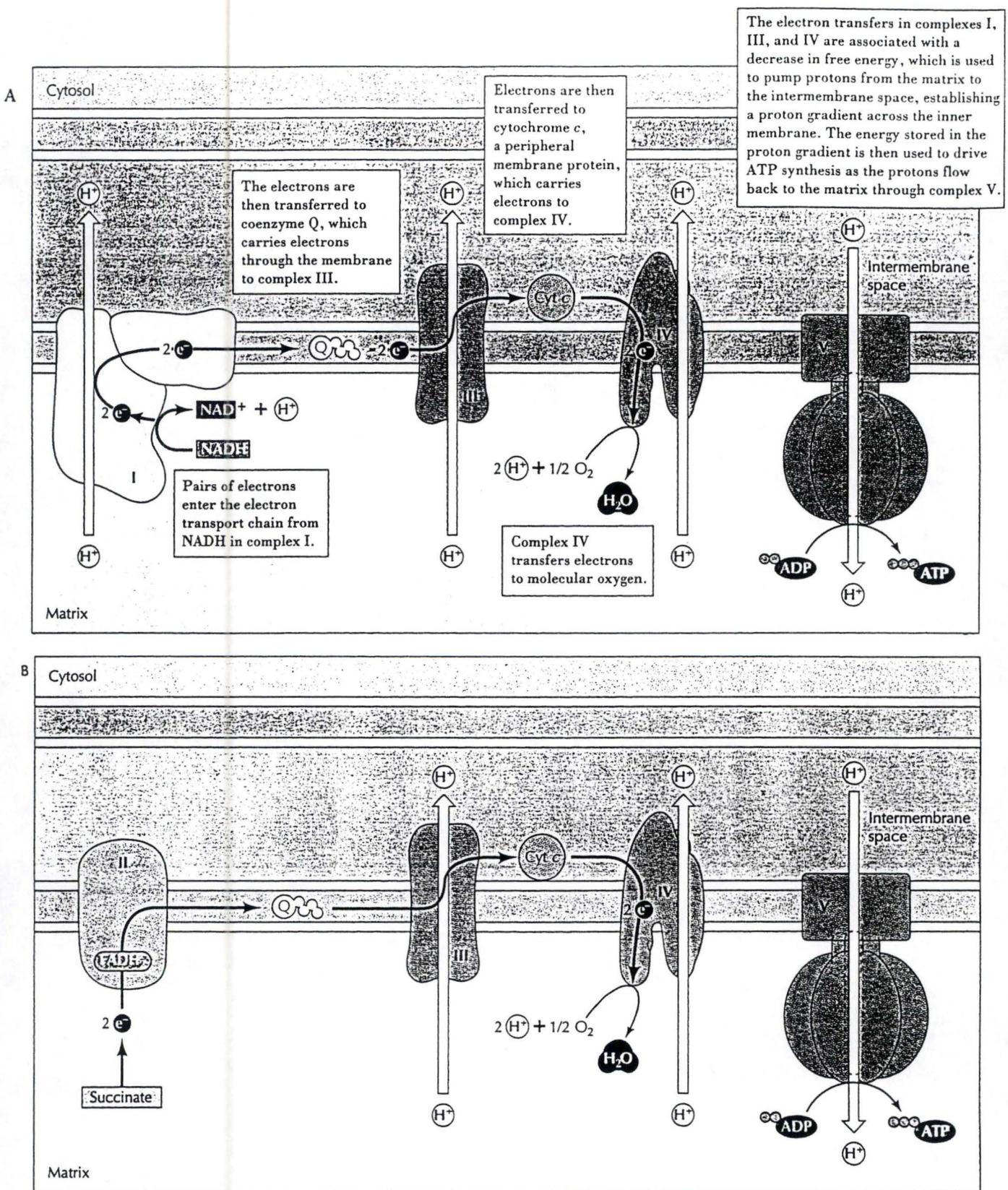


Fig. I. 8.: Transport des électrons dans la mitochondrie à partir du NADH (A) et à partir du FADH_2 (B) (Cooper, 1997). Les sites majeurs de fuites d'électrons sont les complexes III et IV.

de l'O₂ par auto-oxydation (Fig. I. 8). Les effets immédiats du TNF- α sur les mitochondries sont des altérations structurales et des dommages à certains complexes faisant parties de la chaîne de transport des électrons (Schulze-Osthoff et al., 1992). Lorsque le complexe III est inhibé par l'antimycine A, l'effet cytotoxique du TNF- α est exacerbé. Si les complexes I et II sont inhibés respectivement par la roténone ou l'amytal et par le TTFA (thénoyltrifluoracétone), on assiste à un effet protecteur vis-à-vis des effets toxiques du TNF- α . Ces observations font apparaître le rôle central des complexes transporteurs d'électrons dans les effets toxiques du TNF- α (pour une revue voir Schulze-Osthoff et al., 1992; 1993; Goossens et al., 1995).

La production d'O₂^{•-} dans les mitochondries induite par le TNF- α conduit également à l'inactivation de l'activité de la succinate déshydrogénase, ce qui a comme conséquence la chute du taux d'ATP cellulaire et la mort des cellules (Hennet et al., 1993).

Les changements structuraux des mitochondries exposées au TNF- α apparaissent, après 2 heures, sous forme de vésicules multilamellaires. Des vésicularisations similaires ont été observées après perfusion de cœur de rats par un système générant des radicaux libres.

D'autres modes de cytotoxicité ont été suggérés comme l'induction de nucléases endogènes ou la diminution des réserves ATP/NADH (Hennet et al., 1993).

2.3.2.2. Inflammation

Le TNF- α est impliqué dans les réactions inflammatoires, il est chémoattractif pour les monocytes et les PMN, il stimule la phagocytose et l'adhérence des globules blancs à l'endothélium. Il induit également la coagulation et stimule la production de thrombine et fibrinogène. Avec l'IL-1, il participe à la constriction des vaisseaux sanguins en réorganisant la couche de cellules endothéliales. Le TNF- α stimule la synthèse de prostacycline (PGI₂) et de PAF ce qui l'implique aussi dans le contrôle de la vasodilatation. Afin d'augmenter l'adhérence de cellules inflammatoires à l'endothélium, le TNF- α augmente l'expression de molécules d'adhérence comme les ICAMs et ELAM-1 qui lient les PMN et monocytes. Il augmente également l'expression de VCAM-1 dans la phase tardive de l'inflammation.

Le TNF- α induit la synthèse et la sécrétion d'IL-8 qui stimule le mouvement des PMN, leur dégranulation et l'explosion respiratoire. Il stimule la production de MCP-1 (monocyte chemotactic protein) par les cellules endothéliales, ce qui permet l'accumulation des monocytes dans les tissus. Son taux élevé dans le sérum suggère son rôle dans des maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde ou les maladies auto-immunes (pour revue; Camussi et al., 1991).

Outre la destruction cellulaire et le rôle pro-inflammatoire, le TNF exerce d'autres actions biologiques (pour une revue, voir Camussi et al., 1991):

2.3.2.3. La cachexie

Une trop grande production de TNF- α peut provoquer la cachexie (perte de poids intervenant dans les infections chroniques), en effet cette cytokine régule la synthèse de plusieurs enzymes métaboliques. Dans les adipocytes et cellules musculaires, le TNF- α stimule la glycolyse (Lee et al., 1987) et inhibe les lipoprotéines lipases (Larrick et Kunkel, 1988). Dans les hépatocytes il accélère la néoglucogénèse médiée par le glucagon (Warren et al., 1987).

2.3.2.4. Choc endotoxique

Les effets néfastes d'une injection d'endotoxine peuvent être annulés par l'administration d'anticorps monoclonaux anti-TNF- α . D'autre part, la production de TNF- α est corrélée dans le temps avec l'apparition de fièvres, nausées, maux de tête apparaissant après injection d'endotoxine.

2.3.2.5. Remodelage tissulaire

Le TNF- α stimule la résorption des os et des cartilages. Il inhibe la synthèse des protéoglycans ce qui conduit à une perte de fonction du cartilage. Il peut agir également comme facteur de croissance, stimulant la prolifération des fibroblastes et des cellules mésenchymateuse ou induisant la production d'autres cytokines stimulant la prolifération cellulaire et matricielle. Il renforce l'action de l'EGF (epidermal growth factor) en augmentant l'expression de ses récepteurs.

2.3.2.6. Infection et immunité

Le TNF- α participe aux défenses contre les pathogènes en activant la phagocytose et le recrutement des leucocytes. Les PMN voient leur dégranulation et leur production d'anion superoxyde augmenter lorsqu'ils sont stimulés par le TNF- α . Le TNF- α module la réponse immunitaire en déclenchant la production de nombreuses autres cytokines comme l'IL-1, l'IL-6, l'IFN, le TGF, le GM-CSF, le PDGF...

Type I Type II

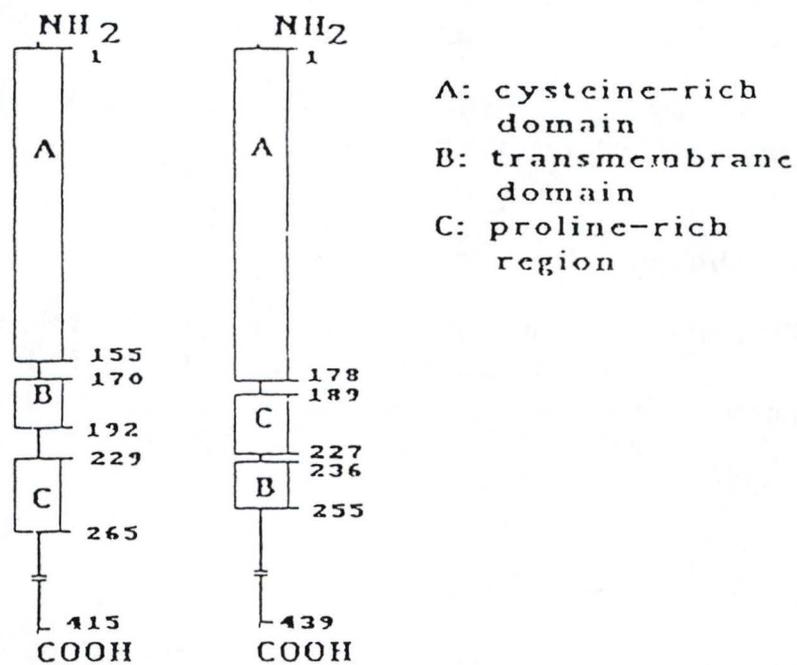


Fig. I. 9.: Structure des deux types de récepteurs au TNF- α (Kohno et al., 1990).

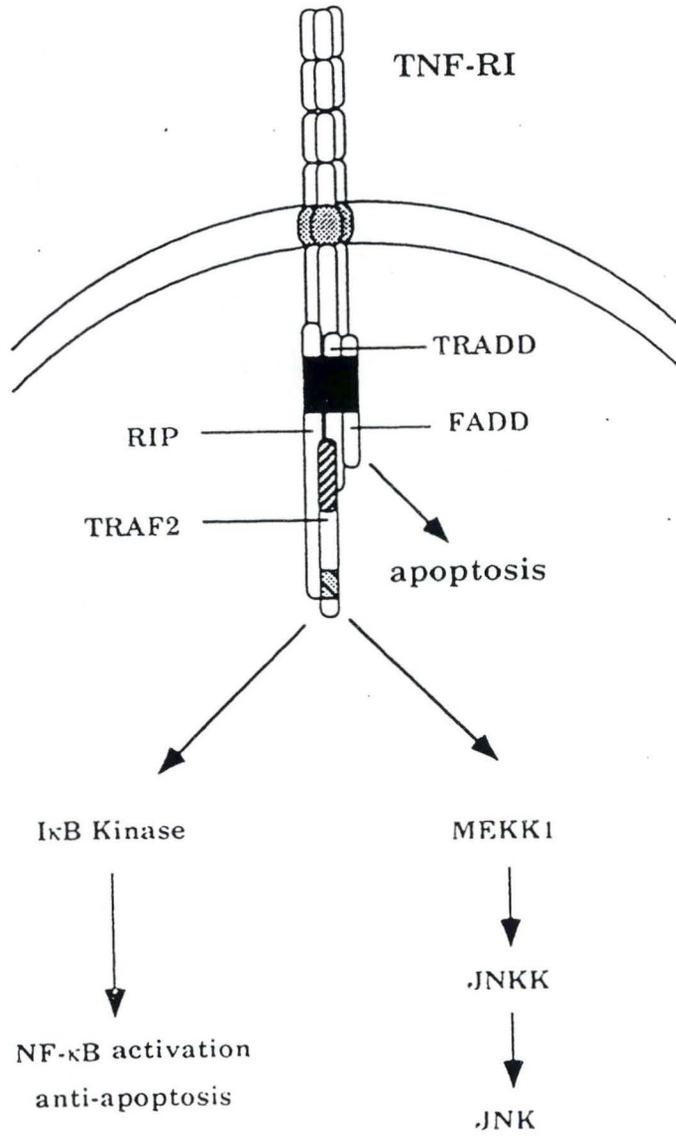


Fig. I. 10.: Mécanisme de transduction du signal lié au TNF-R55 (Liu et al., 1996).

2.3.3. Récepteurs.

Les récepteurs au TNF- α sont présents dans la plupart des cellules. Il en existe deux types, un récepteur de 55-kDa (TNF-R55 ou TNF-RI) et un récepteur de 75 kDa (TNF-R75 ou TNF-RII) (Fig. I. 9). Leur structure n'est similaire que dans les domaines extracellulaires. Ces récepteurs font partie de la même famille que la protéine Fas intervenant dans l'apoptose.

L'expression du gène codant pour le TNF-R55 est faiblement induite par le TNF- α , l'IL-1 et les diesters de phorbols dans les cellules sanguines, épithéliales, les fibroblastes et lymphocytes T. La variabilité du nombre de TNF-R75 d'un type cellulaire à l'autre (100 à 10 000 copies) semble largement due à une régulation par des facteurs externes au TNF-R75.

L'interaction du TNF- α avec son récepteur nécessite l'intégrité de 3 feuilletts β . Le haut de la pyramide que forme le trimère de TNF est dirigé vers la surface cellulaire, cette orientation permet à la partie N-terminale d'interagir avec ses récepteurs sur des cellules opposées. Le trimère TNF- α provoque une trimérisation des TNF-Rs qui seront alors activés. Lorsque le TNF- α se lie au TNF-R55, le complexe ligand-récepteur est rapidement internalisé par des vésicules tapissées de clatherine et dégradé par les lysosomes. Le TNF-R75, quant à lui, ne contient pas de tyrosines dans son domaine intracellulaire; il lui manque donc une séquence consensus pour une internalisation rapide par vésicules recouvertes.

Les réponses au TNF telles que l'activité cytotoxique ou l'expression de molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales, sont déclenchées uniquement par le TNF-R55 représenté à la figure I. 10. Cependant c'est le TNF-R75 qui a la plus forte affinité pour le TNF- α (Kd = 100 pM). En fait c'est ce dernier récepteur que lie préférentiellement le TNF à de faibles concentrations, ensuite le ligand passe sur le TNF-R55 voisin (pour une revue, voir Vandenameele et al., 1995).

S'il est généralement admis que la réponse au TNF- α passe par sa fixation à ses récepteurs, il pourrait également induire une cytotoxicité par formation de pores dans les membranes, via un mécanisme indépendant des récepteurs (Kagan et al., 1992).

2.3.4. Transduction du signal

Toutes les fonctions biologiques attribuées au TNF-R75 le sont également au TNF-R55. Cependant une densité plus faible de ce dernier est requise. Au contraire du TNF-R55, la transduction du signal par le TNF-R75 semble être dépendante de la densité de récepteurs. Le TNF-R55 semble monopoliser la fonction de transduction du TNF, tandis que le TNF-R75 jouerait un rôle accessoire

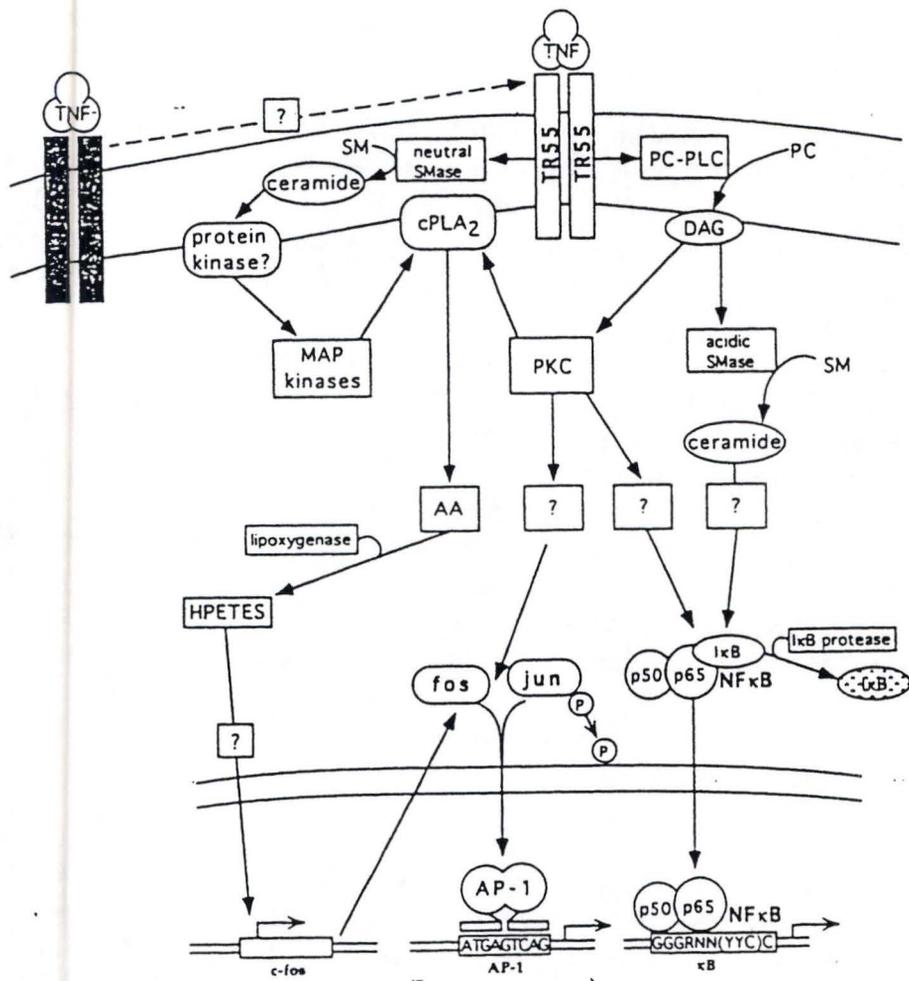


Fig. I. 11.: Modèle des voies de transduction du signal liées au TNF, aboutissant à l'activation des facteurs transcriptionnels AP-1 et NF-κB. (Heller et Krönke, 1994).

en augmentant les effets du TNF-R55. Nous ne considérerons donc que le TNF-R55. En outre, la transduction du signal liée au TNF- α est extrêmement complexe et nous nous limiterons ici à souligner les acteurs moléculaires majeurs impliqués (pour une revue, voir Vandenabeele et al., 1995; Camussi et al., 1991; Heller et Krönke, 1994; Martin et Falk, 1997).

2.3.4.1. Médiateurs lipidiques

Des phospholipases C et sphingomyélinases ont été identifiées dans l'induction par le TNF- α des gènes *c-fos*, *c-jun* et du facteur de transcription NF- κ B. Les molécules servant de messagers secondaires sont respectivement le DAG et les céramides (Fig. I. 11). Le DAG internalisé avec le complexe TNF/TNF-R dans un compartiment acide (endosome ou lysosome) active une sphingomyélinase acide qui hydrolyse la sphingomyéline en phosphorylcholine et céramides médiant de nombreuses réponses cellulaires. Une sphingomyélinase (SMase) neutre intervient également dans la transduction du signal du TNF- α . Elle hydrolyse la sphingomyéline membranaire en céramides (Fig. I. 11). Ces céramides activent une kinase liée à la membrane: la ceramide-activated protein kinase (CAPK) (Mathias et al., 1991) qui phosphoryle des substrats contenant le motif X-Ser/Thr-Pro-X, séquence consensus pour l'action de la MAPK (mitogen-activated protein kinase). Le TNF- α active également les p42 et p44 MAPK. Vu leur hydrophobicité, les céramides ne sont pas distribués uniformément dans la cellule. La réponse qu'ils induisent reste donc confinée à leur site de production dans la membrane.

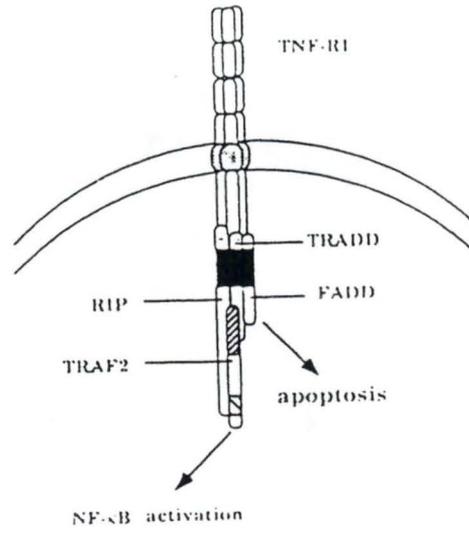
2.3.4.2. PLA₂

Le TNF- α augmente la synthèse de sPLA₂ (phospholipase A₂ sécrétée) et de cPLA₂ (PLA₂ cytotoxique) (Fig. I. 11). Le TNF- α conduit à la phosphorylation de la cPLA₂ sur des Ser par la p42 MAPK. La PLA₂ libère l'AA (acide arachidonique) des phospholipides qui sera métabolisé en prostaglandines par la cyclooxygénase ou en leucotriènes via la lipoxygénase.

2.3.4.3. Kinases

A part la ceramide-activated kinase, d'autres kinases sont rapidement activées par le TNF- α , il s'agit de l'I κ B kinase, d'une sérine/thréonine kinase associée au TNFR-55, des Jun N-terminal kinases (JNKs) (Minden et al., 1994) et de la p38/Mpk2. Le TNF- α stimule la phosphorylation de nombreuses protéines dans de nombreux types cellulaires, parmi lesquels la hsp27 (protéine de choc thermique de 27 kDa) dans les fibroblastes humains. Ces phosphorylations sont la

A



B

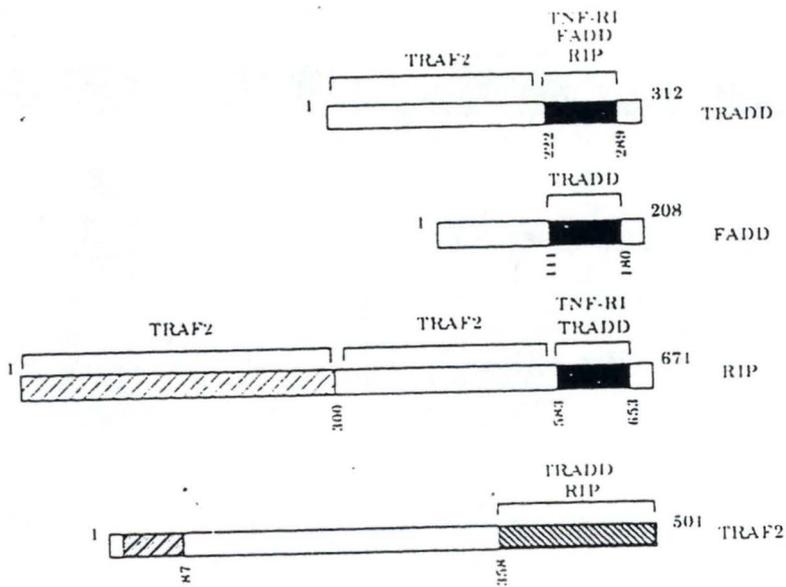


Fig. I. 12.: (A) Protéines recrutées par le TNF-R55. (B) Zones d'interaction entre ces protéines (Liu et al., 1994).

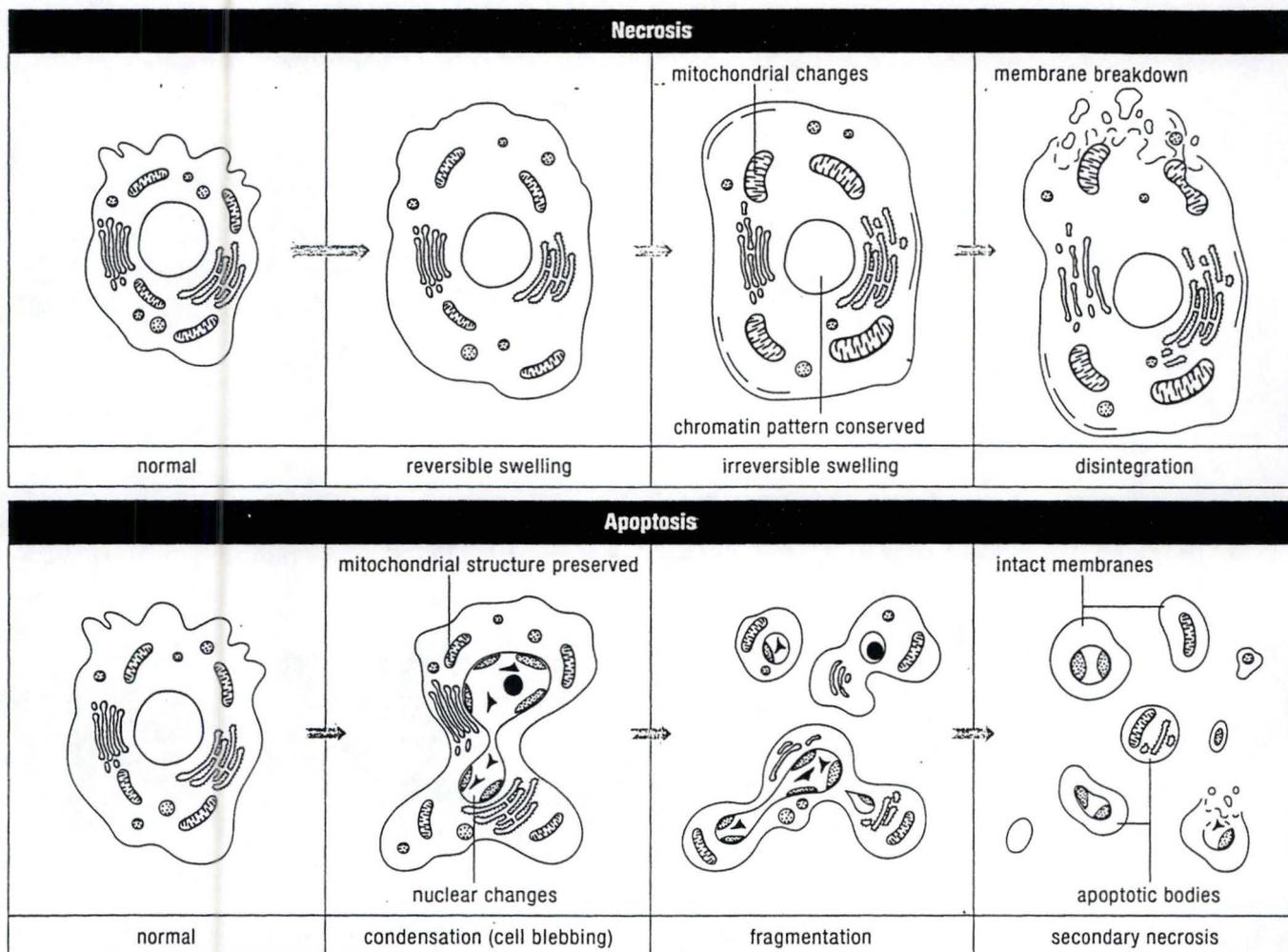


Fig. I. 13.: Schéma comparatif des processus de nécrose et d'apoptose (Trauth et Keesey, 1997).

conséquence de l'action de multiples Ser/Thr kinases (Van Lint et al., 1992) (pour revue; Heller et Krönke, 1994).

2.3.4.5. Protéines recrutées

L'activation du TNF-R55 conduit aussi au recrutement de protéines TRADD (TNF receptor-associated death domain) qui interagissent avec deux autres protéines, TRAF2 (TNF-R associated factor 2) et FADD (fas-associated protein death domain) (Hsu et al., 1995) aussi appelée MORT1 (Fig. I. 12). Le DD (death domain) de la sérine/thréonine kinase RIP (receptor interacting protein) s'associe au DD de TRADD, RIP participant avec TRAF2 à l'activation de NF- κ B dont nous parlerons au point 4 (Hsu et al., 1996; Song et al., 1997). TRAF2 et RIP interagissent ensemble, stabilisant le complexe (Baeuerle, 1998) (Fig. I. 12). TRAF2 se lie à NIK (NF- κ B inducing kinase), une sérine/thréonine kinase intervenant également dans la transduction du signal de l'IL-1 et activant le facteur de transcription NF- κ B. La séquence en acides aminés de NIK contient un motif sérine/thréonine protéine kinase indiquant qu'il s'agit d'une MAPKKK. Lorsqu'elle est phosphorylée, elle phosphoryle à son tour et active d'autres kinases (Malinin et al., 1997). Nous reparlerons de NIK, dans son rôle d'activation de NF- κ B au point 2.4.4.6.

Signalons que l'activation du TNF-R75 conduit au recrutement de TRAF1 et de TRAF2 (Rothe et al., 1994; 1995). Les protéines TRAF ont en commun une séquence à l'extrémité C-terminale de liaison au récepteur (le domaine TRAF). Elles n'ont pas d'activité enzymatique.

2.3.4.6. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée se distingue de la nécrose par l'absence d'inflammation. Les caractéristiques de l'apoptose sont la formation de "blebs" dans la membrane, des cassures du cytosquelette, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Au stade final, le cytoplasme et le noyau forment des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules environnantes (Fig. I. 13). L'induction de l'apoptose par le TNF- α fait intervenir TRADD, RIP, FADD et les caspases 8 et 10 qui sont capables d'interagir avec FADD/MORT1 (Duan et Dixit, 1997). Les caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinase) sont des protéases faisant partie intégrante du processus d'apoptose. L'induction de l'apoptose par le TNF- α peut être bloquée par l'activation de NF- κ B (Liu et al., 1996) (pour revue, voir Wallach et al., 1997).

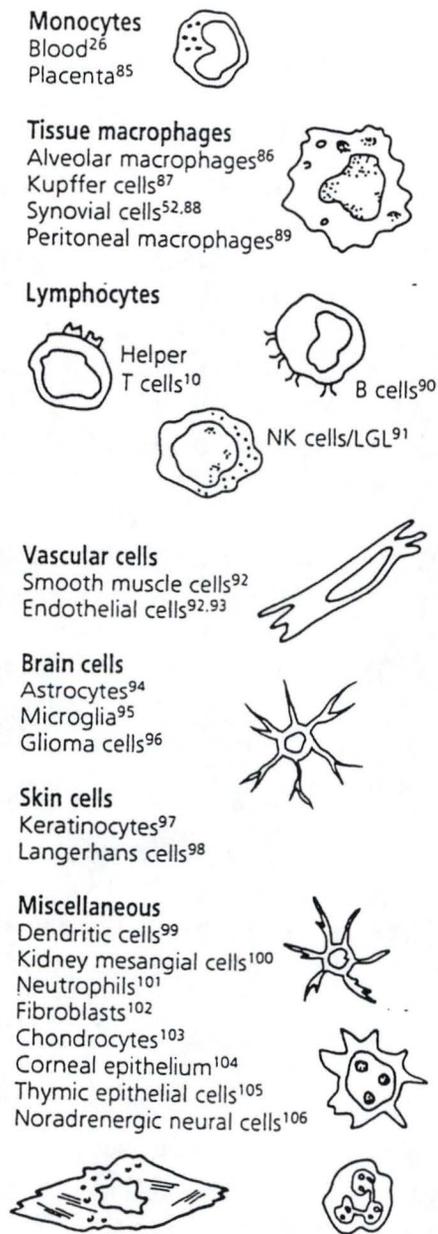


Fig. I. 14.: Sources cellulaires de production de l'IL-1 (di Giovine et Duff, 1990).

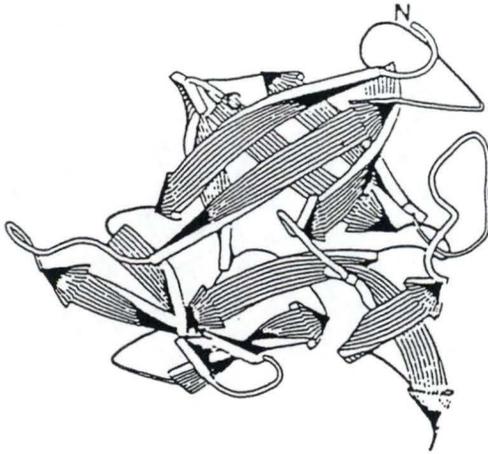


Fig. I. 15.: Structure tridimensionnelle de l'IL-1 β . Les flèches représentent des feuilletts β (Priestle et al., 1990).

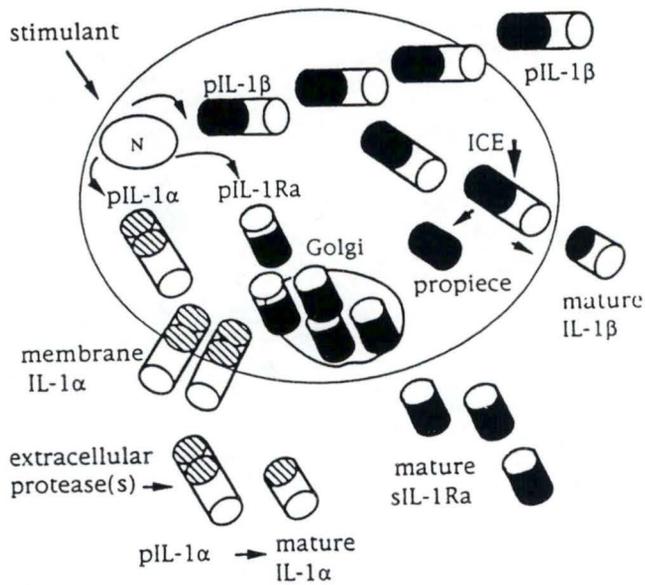


Fig. I. 16.: Schéma illustrant la biosynthèse cellulaire et la maturation pour l'IL-1 α et β (Dinarello, 1994).

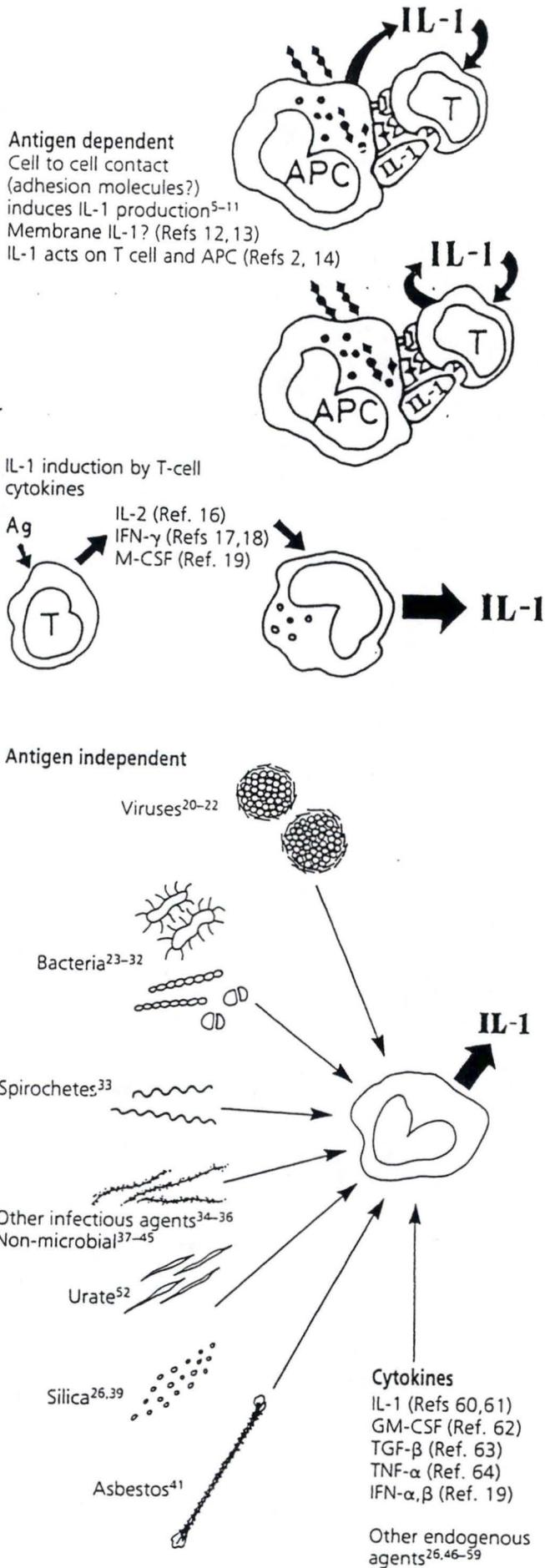


Fig. I. 17.: Illustration des différentes formes d'induction de la production d'IL-1 par les monocytes/macrophages. (di Giovine et Duff, 1990).

2.4. L'IL-1 β

2.4.1. Introduction

L'IL-1 est un polypeptide produit entre autres après une infection, une blessure. Il est produit majoritairement par les macrophages, mais également par la plupart des cellules dont les cellules de l'épiderme, les cellules épithéliales, lymphoïdes, les astrocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, fibroblastes... (Fig. I. 14). C'est un médiateur clef de la réponse à l'inflammation (Dinarello, 1998).

Il existe deux sortes d'IL-1 partageant 26 % d'homologie dans leur séquence en acides aminés; l'IL-1 α et l'IL-1 β (Auron et al., 1984). L'IL-1 α est la forme acide de l'IL-1 tandis que l'IL-1 β est la forme neutre dont la structure tridimensionnelle est donnée à la Fig. I. 15; cette dernière est prédominante dans les fluides corporels. Les deux gènes sont localisés sur le chromosome 2 et contiennent chacun 7 exons. Pour les 2 formes, les précurseurs font 31 000 Da et les protéines matures font 17 500 Da. La protéolyse de l'IL-1 β se fait grâce à une ICE (IL-1 converting enzyme) ou caspase 4 (Dinarello, 1994), tandis que pour l'IL-1 α , c'est une protéase extracellulaire qui agit (Fig. I. 16).

2.4.1.1. Induction

L'IL-1 est produite lors de l'activation des phagocytes. Sa transcription est augmentée par l'INF γ , les CSFs, l'endotoxine, les esters de phorbol, des virus, mais aussi par les fragments C3a et C5a du complément ainsi que par la substance P (un neurotransmetteur) et le LPS. (Larrick et Kunkel, 1988). L'IL-1 induit également sa propre production dans les phagocytes et dans la plupart des cellules capables de la produire (Fig. I. 17).

2.4.1.2. Régulation

Les corticostéroïdes bloquent la transcription des gènes codant pour l'IL-1 et réduisent sa production (Lee et al., 1998). Le taux d'IL-1 dans la circulation est élevé lors de nombreuses maladies, mais aussi pendant l'ovulation ou une exposition aux UV par exemple (Dinarello, 1988).

2.4.2. Rôles biologiques

L'IL-1 induit la fièvre, la synthèse de protéines hépatiques, de PGE₂ (prostaglandine E₂), la résorption des os, la rupture des cartilages, l'augmentation du taux d'ACTH (adrenocorticotropie hormone), et de la réponse des lymphocytes T aux antigènes et mitogènes. Elle stimule

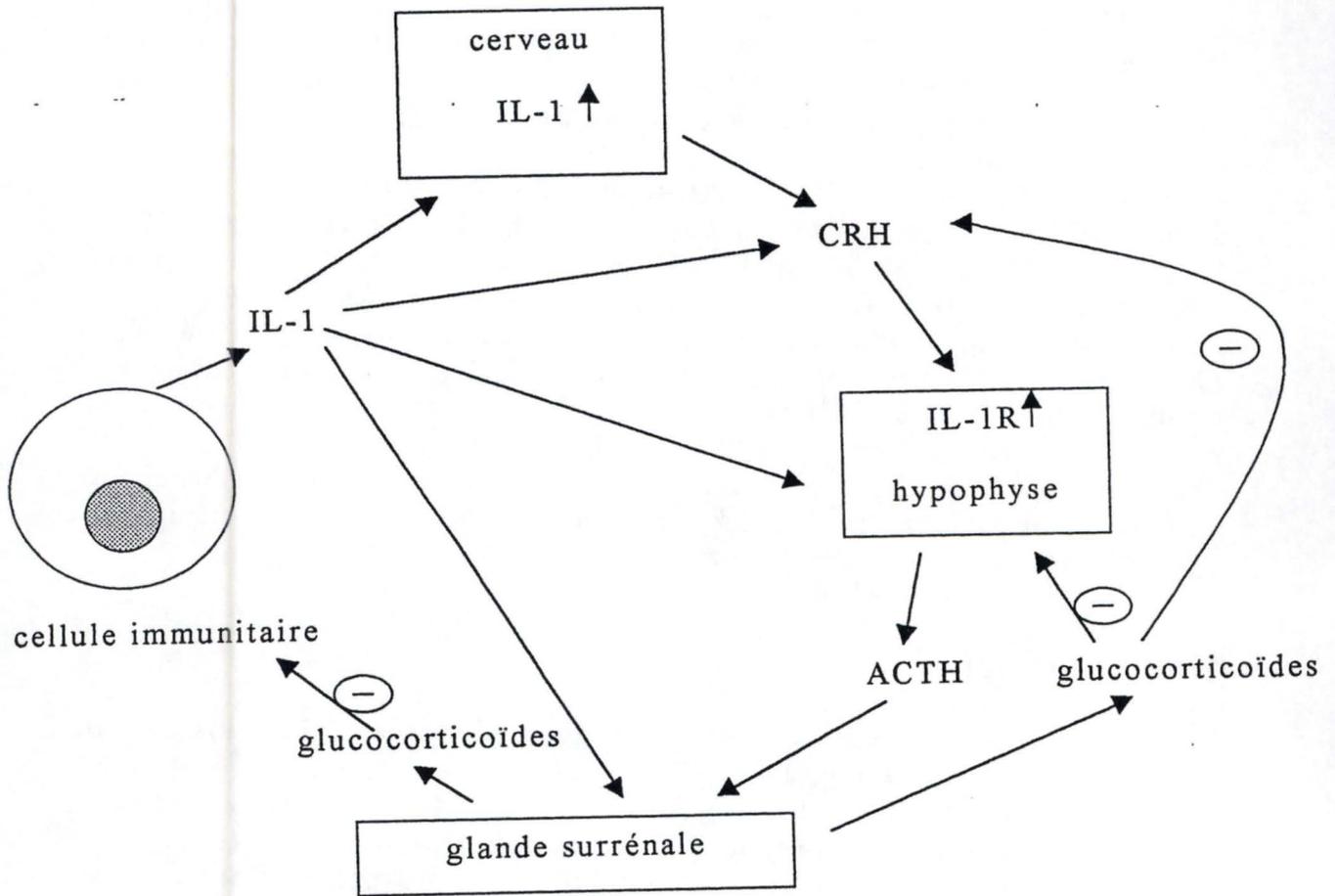


Fig. I. 18.: Sites d'action de l'IL-1 dans le système hypothalamus-hypophyse-glande surrénale.

également la prolifération des fibroblastes et lymphocytes T et la maturation des thymocytes. In vitro, la concentration en IL-1 induisant un effet va de 1 pM à 1 nM (Dinarello, 1988; 1994).

2.4.2.1. Effets neuro-endocriniens

Les effets neuroendocriniens de l'IL-1 sont illustrés à la figure I. 18. L'IL-1 agit sur le centre hypothalamique de la thermorégulation pour initier la fièvre. Elle déclenche la synthèse de PGE₂ par les vaisseaux hypothalamiques, ce qui augmente le taux d'AMPc pouvant agir comme neurotransmetteur. Quelques minutes après l'administration d'IL-1, on observe une tendance à l'endormissement. L'IL-1 induit la production de peptides hypophysaires comme les endorphines, le CRF (corticotropin-releasing factor) et la somatostatine. Les endorphines, de la famille des opioïdes ont des effets analgésiques. Le CRF stimule la production d'ACTH par l'adénohypophyse qui agit au niveau du cortex surrénalien, induisant la libération de corticoïdes. La somatostatine inhibe l'absorption des sucres, régule la température corporelle, facilite la mémoire. L'IL-1 induit également le relargage de LH (luteinizing hormone), TSH (Thyroïd-stimulating hormone) et GH (growth hormone). La LH stimule la maturation des gamètes, la TSH stimule la production de T3 et T4 par la thyroïde et la GH agit sur la croissance des tissus. L'IL-1 augmente le taux de corticostérone via la libération d'ACTH, mais agit aussi directement sur le cortex surrénal pour augmenter la synthèse de stéroïdes. La production d'insuline par les cellules β du pancréas peut également être induite par l'IL-1.

2.4.2.2. Effets sur la production de cytokines

L'IL-1 stimule la synthèse d'IL-2, IL-3, IL-6, de CSF (colony stimulating factor), facteur activant la croissance des cellules hématopoïétiques, (ce qui augmente la réponse immune) et agit également sur sa propre production. La synthèse de l'INF- γ stimulée par l'IL-1 contribue à un effet anti-inflammatoire.

2.4.2.3. Effets sur les vaisseaux sanguins

L'IL-1 induit la synthèse de PGE₂ et PGI₂ dans les cellules endothéliales et dans les cellules musculaires lisses. Ces molécules sont des vasodilatateurs potentiels. Leur administration in vivo conduit à l'hypotension. L'endothélium activé par l'IL-1 synthétise également le tPA (activateur tissulaire du plasminogène) ainsi que le PAF (platelet activating factor) qui stimule l'agrégation des plaquettes. L'IL-1 agit aussi comme facteur de croissance pour les cellules musculaire lisses.

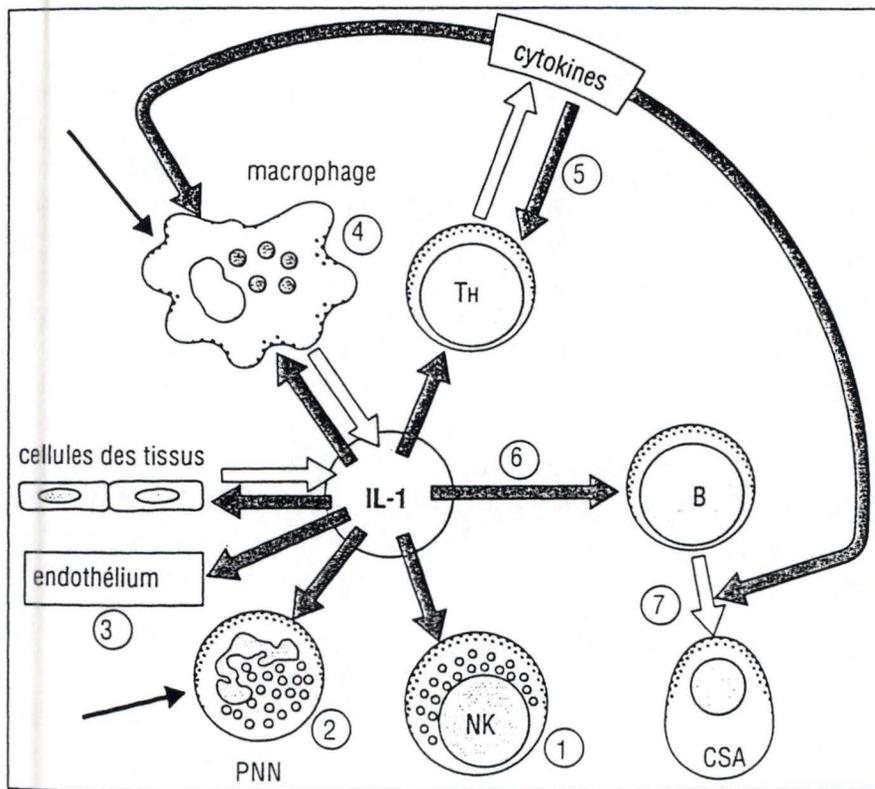


Fig. I. 19.: Action de l'IL-1 sur les cellules immunitaires (Feldmann, 1994).

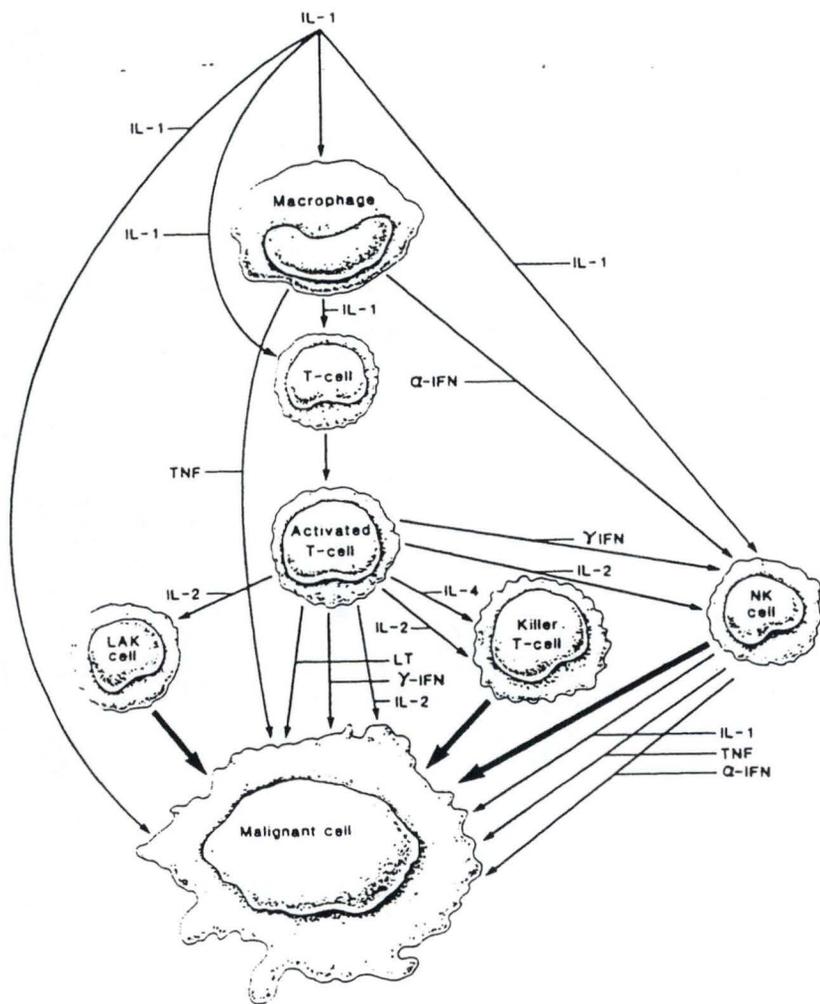


Fig. I. 20.: Effets antitumoraux de l'IL-1 (LT=lymphotoxine).
 D'après Platanias et Vogelzang, 1990.

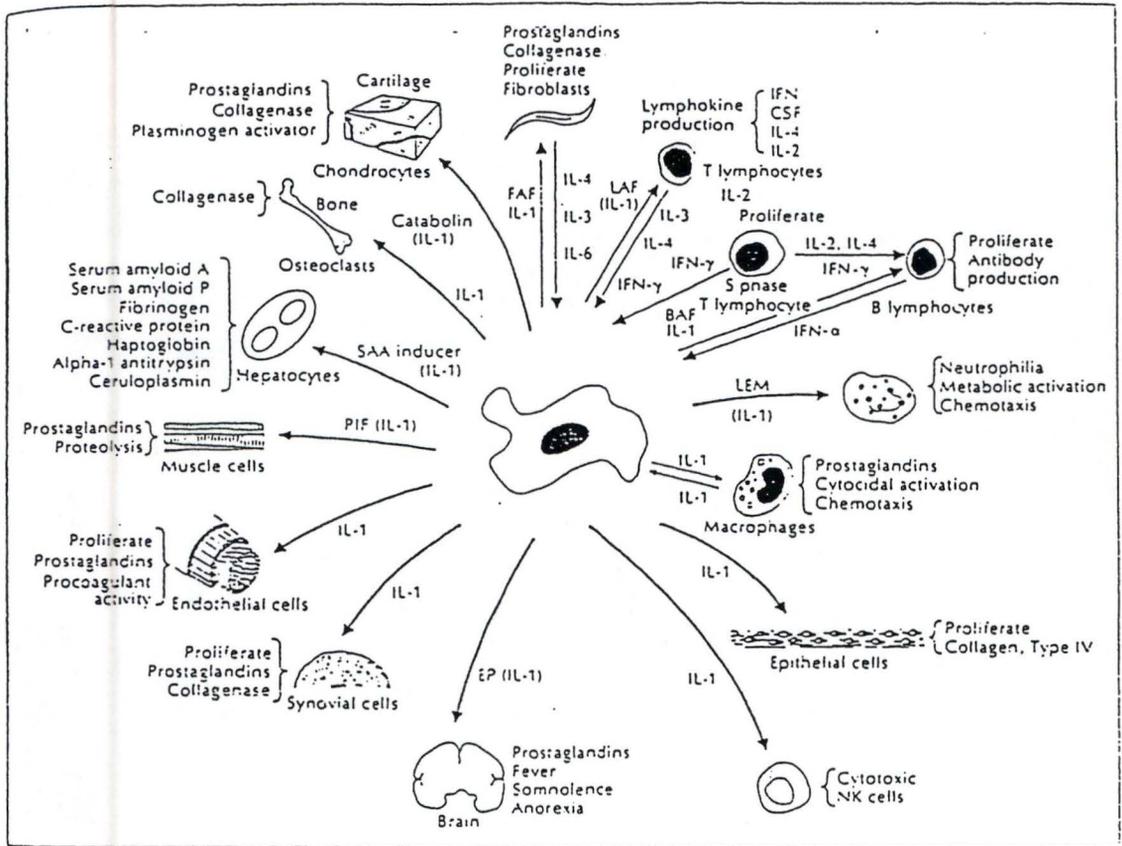


Fig. I. 21.: Effets de l'IL-1 sur différents types cellulaires (Klein, 1990).

L'IL-1 modifie l'expression des récepteurs à la surface des cellules endothéliales. ICAM-1 et ELAM-1 sont rapidement exprimés en réponse à l'IL-1. VCAM-1 est également rapidement induit et son induction est entretenue pendant 48 à 72 heures (Osborn et al., 1989).

Ces effets contribuent à contenir l'infection et à localiser les dommages.

2.4.2.4. Effets sur les cellules immunocompétantes

Ces effets sont illustrés à la figure I. 19. L'IL-1 active les lymphocytes et la synthèse de protéines qui activent les lymphocytes, elle augmente la production et la différenciation des lymphocytes et également l'adhérence des cellules NK à leur cible. L'IL-1 est un facteur chimiotactique pour les lymphocytes. En stimulant la synthèse d'IL-2, qui est un facteur de croissance pour les lymphocytes T, l'IL-1 participe à la réponse immunitaire médiée par les cellules et à l'élimination des cellules tumorales (Fig. I. 20).

(Pour revue sur les effets biologiques: Dinarello, 1987; 1988; Plataniias et Vogelzang, 1990).

2.4.2.5. Effets dans l'inflammation

Pour illustrer l'implication de l'IL-1 dans une maladie inflammatoire, nous donnerons comme exemple la polyarthrite rhumatoïde.

L'IL-1 est présente dans les fluides articulaires d'individus souffrant d'arthrite. Elle induit, comme le TNF, l'expression de ICAM-1 par les cellules endothéliales, l'accumulation de granulocytes aux sites inflammatoires via une augmentation d'expression des molécules d'adhérence CD11/CD18 sur les granulocytes et cellules endothéliales. L'IL-1 induit aussi la sécrétion des collagénases, des métalloprotéinases dégradant la gélatine, le collagène et les protéoglycans de la matrice extracellulaire. En agissant comme facteur de croissance pour les fibroblastes, l'IL-1 ainsi que le TNF peuvent contribuer à la formation de granulomes et à la fibrose dans les articulations après une inflammation chronique. Dans des conditions normales, ces deux cytokines participent à la réparation et au remodelage des os et cartilages (pour revue, Larrick et Kunkel, 1988).

L'IL-1 médie également la production de protéines de phase aiguë dans le foie. Les rôles biologiques de l'IL-1 sont donc divers et s'insèrent dans les réseaux de contrôle neuro-endocrinien et immunitaire, extrêmement complexes. La figure I. 21 illustre l'ubiquité de l'IL-1 et ses effets sur les principaux tissus ou types cellulaires présents dans l'organisme. Dans ce travail, nous nous limiterons aux fibroblastes.

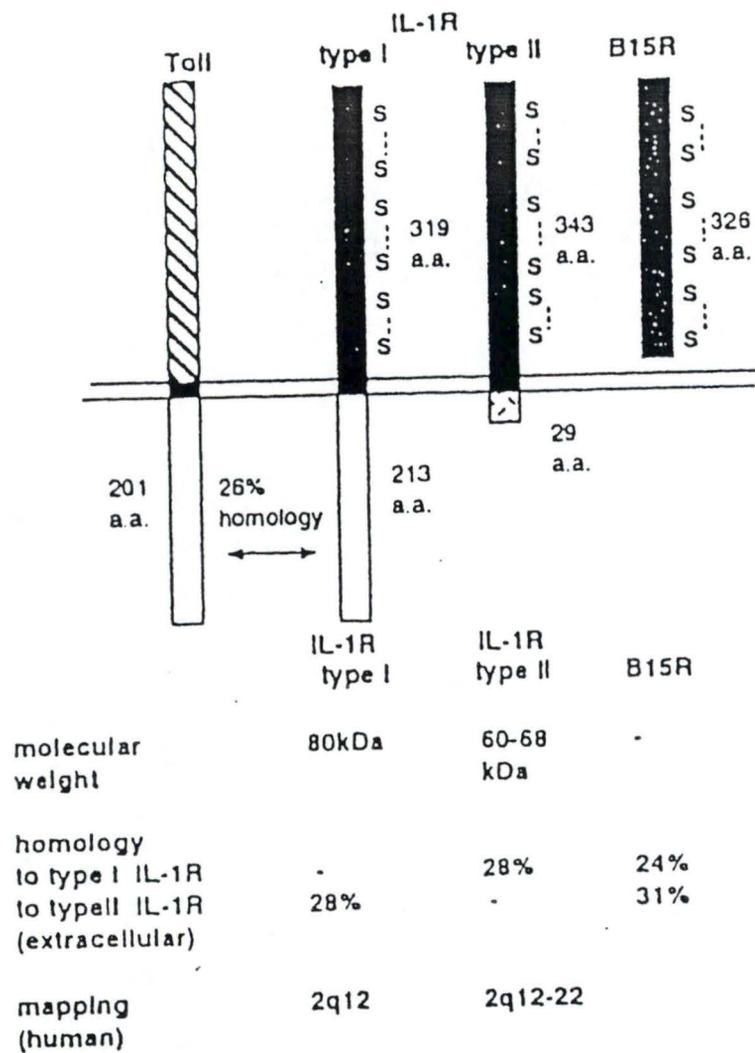


Fig. I. 22.: Schéma des récepteurs à l'IL-1 et des protéines apparentées (Kuno et Matsushima, 1994).

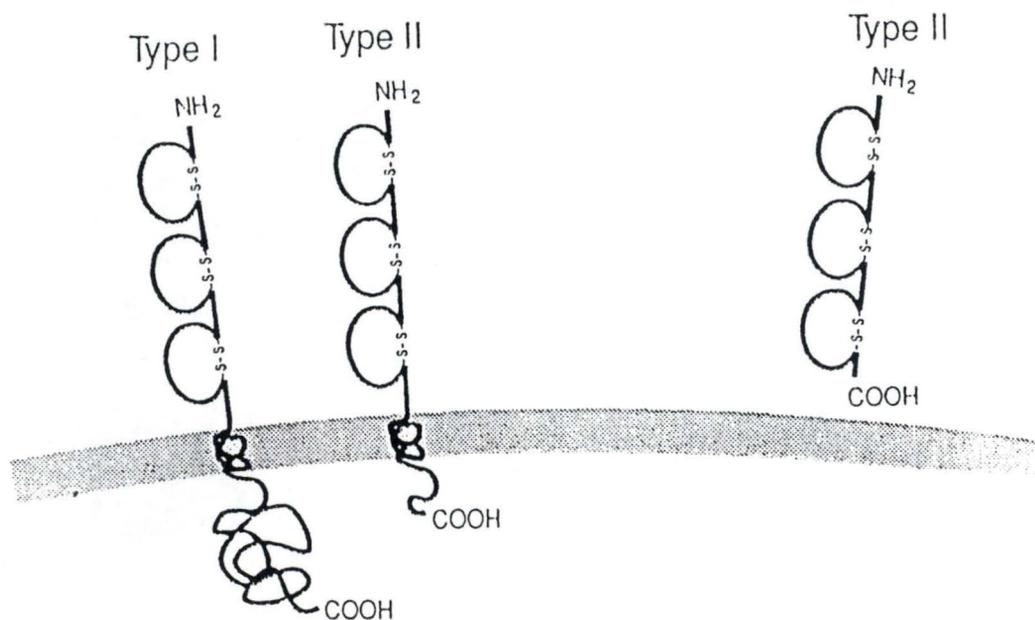


Fig. I. 23.: Schéma illustrant les boucles des immunoglobulines présentes au niveau des récepteurs à l'IL-1 (Nicola, 1997).

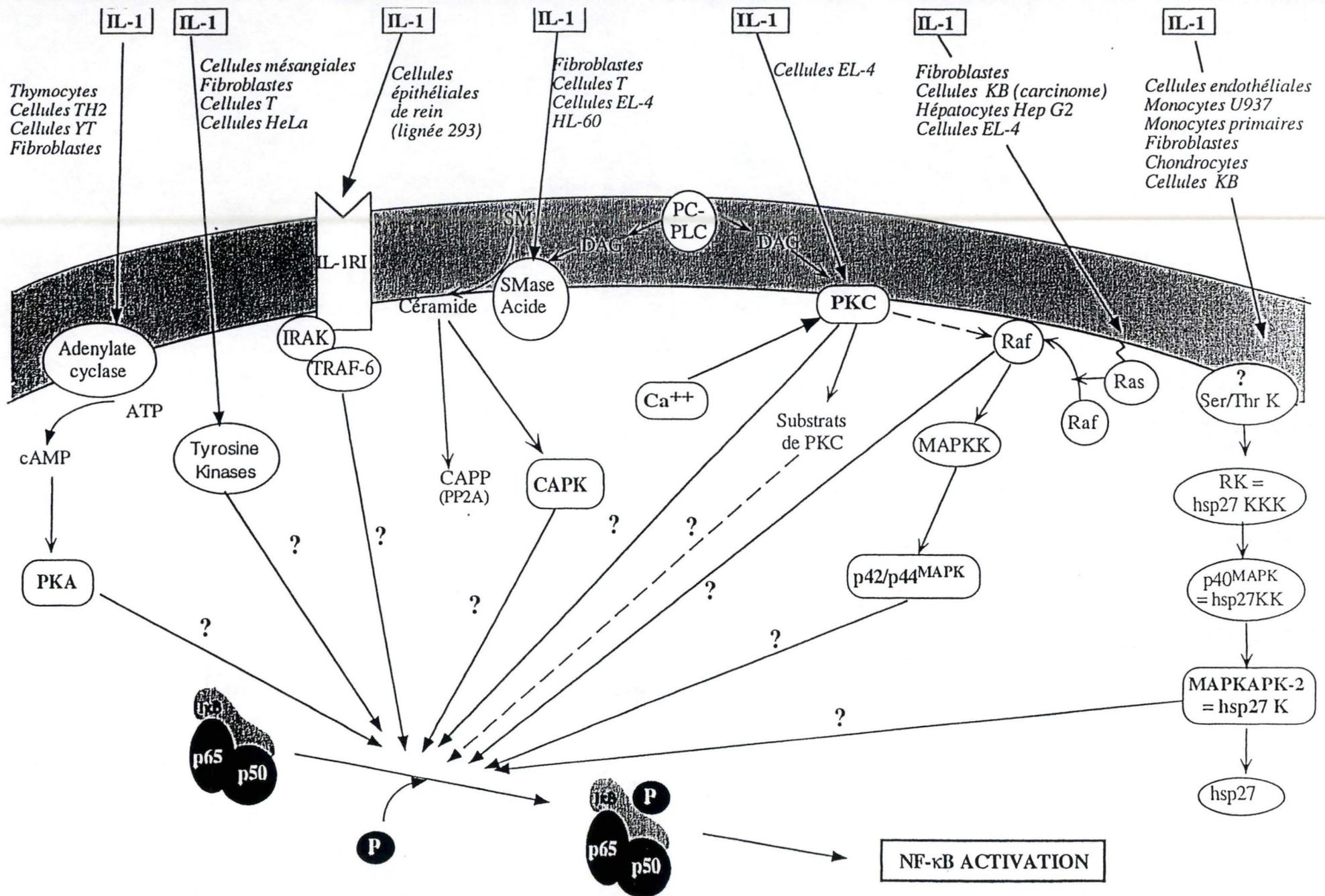


Fig. I. 24.: Schéma récapitulatif des différentes voies de transduction du signal liées à l'IL-1 dans différents types cellulaires. D'après Renard, FUNDP, thèse de doctorat, 1997.

2.4.3. Récepteurs

Il existe deux récepteurs à l'IL-1, l'IL-1RI (80 kDa) présent dans presque toutes les cellules en faible quantité et l'IL-1RII (68 kDa) présent principalement dans les neutrophiles, monocytes, et lymphocytes B (Fig. I. 22). Les parties extracellulaires des récepteurs contiennent 3 domaines Ig-like et partagent 26-28 % d'homologie (Fig. I. 23). Chez l'homme, les gènes de ces récepteurs sont localisés sur le chromosome 2.

L'IL-1RI est exprimé constitutivement à un niveau bas, mais le nombre de récepteurs peut augmenter suite à une stimulation par l'INF γ , IL-1, IL-2, IL-4, vitamine D₃, PGE₂ et PDGF. L'IL-1RI est monomérique et lie une seule molécule d'IL-1. Le domaine cytosolique de l'IL-1RI comprend 213 acides aminés, tandis que celui de l'IL-1RII n'en comprend que 29. Ce dernier ne peut donc pas participer à la transduction du signal (Stylianou et al., 1992; Sims et al., 1993). Il servirait d'appât: en se liant au récepteur de type II l'IL-1 ne pourra pas se lier au récepteur de type I (Sims et al., 1993) et la réponse à l'IL-1 sera moins forte. En situation inflammatoire, l'expression de l'IL-1RII est augmentée, elle peut l'être par les CSF, corticostéroïdes, l'IL-1, PGE₂ et IL-4.

On retrouve également dans la circulation sanguine, une forme soluble du RII, ne comportant que le domaine extracellulaire du récepteur RII (Fig. I 22-23). Comme elle lie préférentiellement l'IL-1 β , elle agit comme un antagoniste constitutif de l'IL-1 β , particulièrement efficace étant donné que les concentrations locales en récepteur soluble peuvent être de loin supérieures à celles enregistrées pour la forme membranaire.

Après la liaison à l'IL-1, l'IL-1RI est phosphorylé. Une réponse biologique a lieu quand seulement 2-3 % des IL-1RI sont occupés (pour revue; Dinarello, 1994).

2.4.4. Transduction du signal

Jusqu'en 1996, les mécanismes de transduction du signal liés à l'IL-1 étaient peu clairs et sujets à controverse. Selon les modèles cellulaires utilisés, plusieurs voies moléculaires différentes étaient décrites comme jouant un rôle possible (Fig. I. 24). Nous ne mentionnerons ici que les voies principales (pour une revue plus détaillée, voir par exemple Dinarello, 1994; Brooks et Mizel, 1994; Martin et Falk, 1997).

2.4.4.1. Protéines G

Les protéines G sont constituées de 3 sous-unités α , β , γ et sont associées préférentiellement à des récepteurs hormonaux. Au repos, la

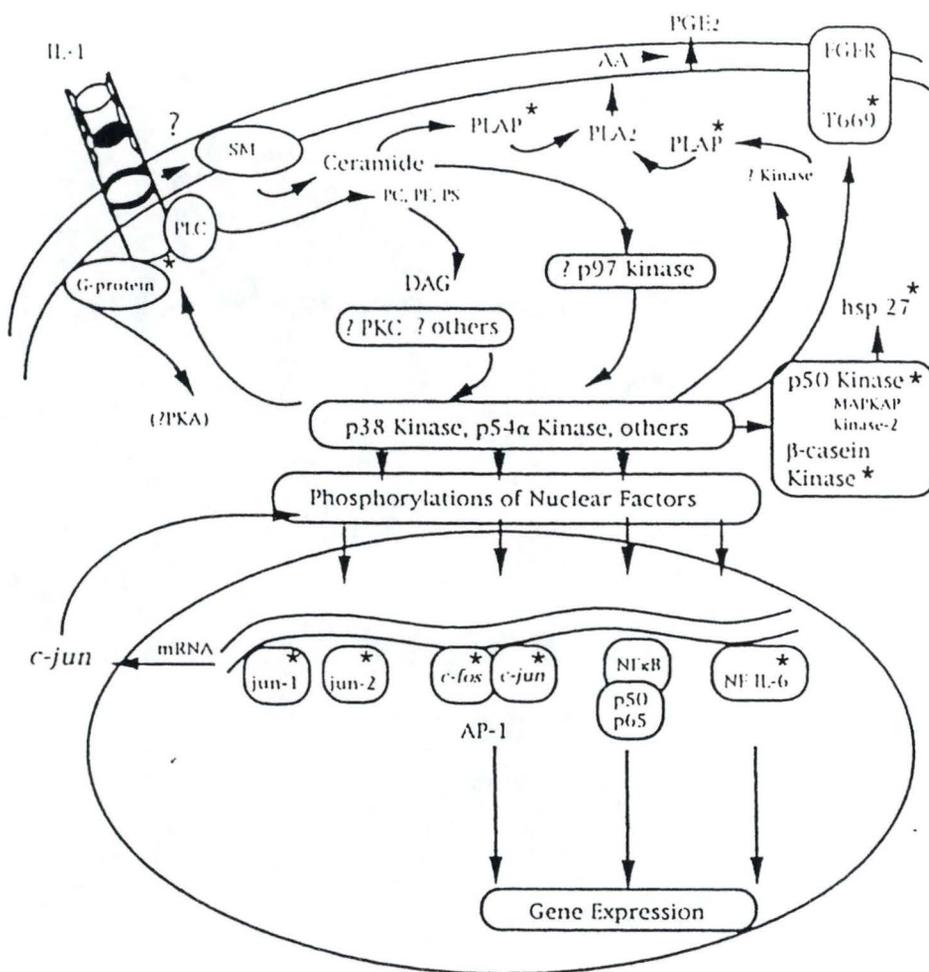


Fig. I. 25.: Schéma récapitulatif des différentes voies de transduction du signal décrites comme étant liées à l'IL-1 (Dinarello, 1994).

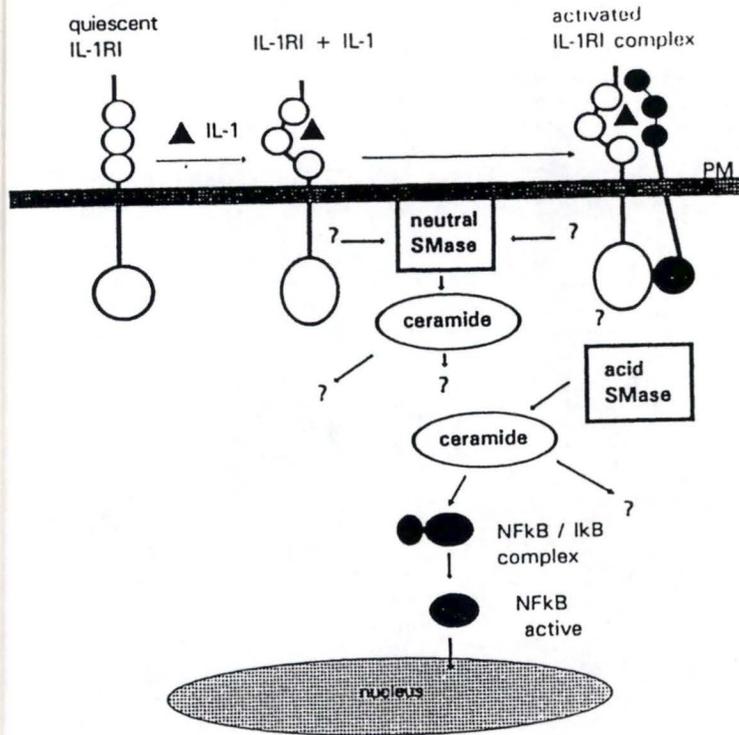


Fig. I. 26.: Intervention des sphingomyélinases dans la transduction du signal liée à l'IL-1 (Martin et Falk, 1997).

sous-unité α est liée à un GDP (guanosine diphosphate). Lorsque le récepteur est activé, il y a un changement de conformation de la protéine G, ce qui induit un échange de GDP par un GTP (guanosine triphosphate) sur α . La sous-unité α liée au GTP se dissocie de β et γ et se lie à une enzyme, telle que l'adénylate cyclase, qui se trouve activée. α a une activité GTPase qui permet au système de revenir au repos. Une activité GTPase et une sensibilité à la toxine pertussique (qui empêche la fixation du GTP) sur certaines protéines G, suggèrent une implication des protéines G dans la transduction du signal de l'IL-1 dans certaines cellules comme les fibroblastes et les lymphocytes T (Fig. I. 25). Toutefois, ces résultats n'ont pas toujours pu être confirmés.

2.4.4.2. AMPc

Lorsqu'une hormone se lie à son récepteur, l'adénylate cyclase est activée via une protéine G. L'enzyme catalyse la formation d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA) qui va phosphoryler d'autres protéines. Plusieurs auteurs ont montré une implication de l'AMPc dans la transduction du signal à l'IL-1 dans certains types cellulaires. Par exemple, il a été montré que l'IL-1 augmente l'AMPc intracellulaire dans des fibroblastes et cellules pré-B (Shirakawa et al., 1988) (Fig. I. 24). Cependant, des auteurs ont montré que la transduction du signal de l'IL-1 pouvait être indépendante de l'AMPc. Au contraire, des auteurs ont découvert que des agents élevant le taux d'AMPc intracellulaire bloquent, au moins partiellement, l'induction de la sécrétion d'IL-2 par l'IL-1.

2.4.4.3. Médiateurs lipidiques

L'IL-1 est capable de stimuler la production de PGE₂ et d'induire la synthèse de la cyclooxygénase inducible (COX-2) dans certaines cellules.

Elle induit également une augmentation en DAG (diacylglycérol). La source du DAG pourrait être la phosphatidylcholine ou la phosphatidyléthanolamine, le DAG pourrait aussi venir des céramides. Cette voie de transduction aboutirait à l'augmentation de PGE₂ et cyclooxygénase. Une autre voie implique la libération d'acide arachidonique (AA) par la PLA₂ cytosolique, activée par la PLAP (PLA₂ activating protein; Clark et al., 1991). La stimulation de l'IL-1RI par l'IL-1 active les sphingomyélinases (SMases) neutre et acide. Ceci conduit à la génération de céramides biologiquement actifs comme messagers secondaires. La SMase neutre peut être activée en absence de Acp (accessory membrane spanning protein) une protéine associée au récepteur de type I. Par contre, l'activation de la SMase acide requiert la présence de cette protéine accessoire dont nous reparlerons au point 2.4.4.6 (Fig. I. 26).

2.4.4.4. Oxyde nitrique (NO)

NO est un médiateur possible de l'action de l'IL-1. Il a été montré que l'IL-1 augmente le taux de mRNA pour la forme inducible de NOS (nitric oxyde synthase) et induit production de NO dans la lignée cellulaire RINm 5F (Cetkovic-Cvrjle et al., 1993). L'IL-1 pourrait donc réguler iNOS (forme inducible), voire même la cNOS (forme constitutive), par régulation de son état de phosphorylation. Des résultats montrant que cNOS est phosphorylée par des protéines kinases comme la PKA et PKC renforcent cette hypothèse.

2.4.4.5. Kinases et phosphatases

Des messagers secondaires induits par l'IL-1 peuvent conduire à l'activation de protéines kinases ou de protéines phosphatases. Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, l'IL-1 peut accroître le taux d'AMPc qui à son tour active la PKA. Les céramides peuvent également activer une protéine phosphatase 2A et la CAPK (ceramide activated protein kinase) (Mathias et al., 1991). Dans les fibroblastes, l'IL-1 active une MAP-kinase kinase ainsi que la MAPK kinase p40. La hsp 27 kinase induit la phosphorylation de la hsp 27 lorsque certaines cellules sont traitées à l'IL-1 (Fig. I. 24). La signification physiologique de cette phosphorylation reste cependant inconnue. L'IL-1 stimule également l'activité de tyrosine protéines kinases dans différents types cellulaires.

2.4.4.6. NF- κ B

Si les mécanismes moléculaires de transduction en aval du récepteur étaient peu compris, on savait depuis longtemps qu'une des cibles majeures des kinases activées par l'IL-1 était le facteur transcriptionnel NF- κ B, dont il sera question au chapitre suivant (Fig. I. 24). Mais depuis 1996, plusieurs équipes sont parvenues à décortiquer la machinerie moléculaire mise en branle par l'IL-1 et qui aboutit à la phosphorylation et à l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B. Les découvertes ont également permis d'établir certains liens avec la transduction du signal liée au TNF- α (pour une revue récente, voir Baeuerle, 1998).

En bref, lorsque l'IL-1-RI est occupé par l'IL-1, il va, via une protéine accessoire appelée Acp (accessory membrane spanning protein) recruter un complexe cytoplasmique formé d'une Ser/Thr kinase appelée IRAK (pour IL-1 receptor associated kinase) et d'une protéine TRAF6, apparentée à TRAF2, associée au récepteur-R55 du TNF- α (Cao et al., 1996a; Cao et al., 1996b). TRAF6 interagit avec NIK (ou NF- κ B inducing kinase (Song et al., 1997). NIK fait partie de la famille des MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) et interagit avec TRAF2 et TRAF6, mais aussi avec l'IKK (ou I κ B kinase) (Woronicz et al., 1997;

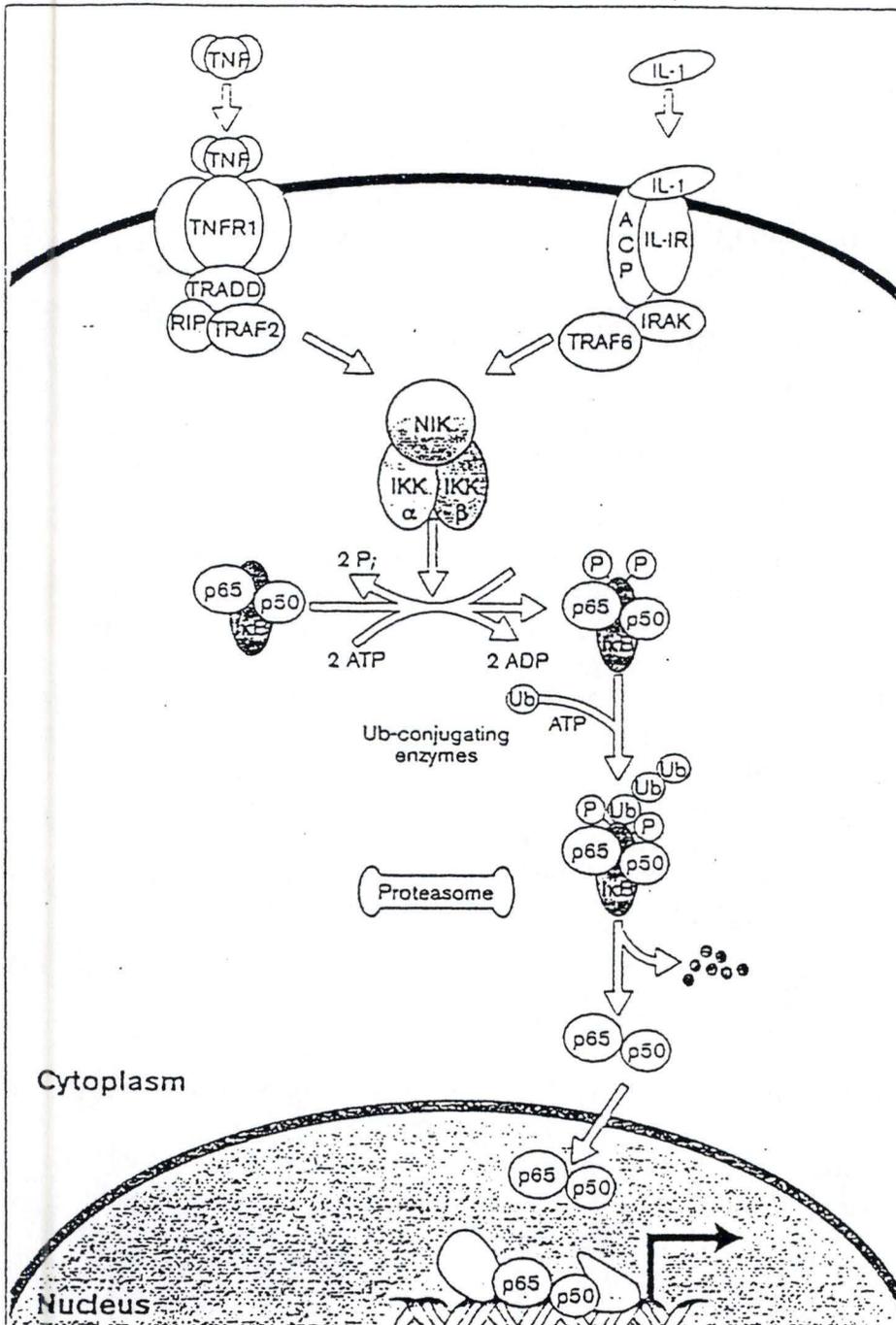


Fig. I. 27.: Transduction du signal de l'IL-1 et du TNF- α aboutissant à l'activation de NF- κ B (Baeuerle, 1998).

Stancovski et Baltimore, 1997), kinase hétérodimérique constituée d'IKK α (anciennement appelée CHUK) et d'IKK β . Cette dernière phosphorylerait directement ou indirectement le facteur NF- κ B. NIK, IKK- α et IKK- β forment ainsi un large complexe de 700 à 900 kDa, dont chacune des sous-unités est indispensable pour l'activité kinasique. NF- κ B joue donc un rôle clef et dans le cas de l'IL-1 et dans le cas du TNF (Fig. I. 27). Nous allons donc le passer en revue dans le chapitre suivant.

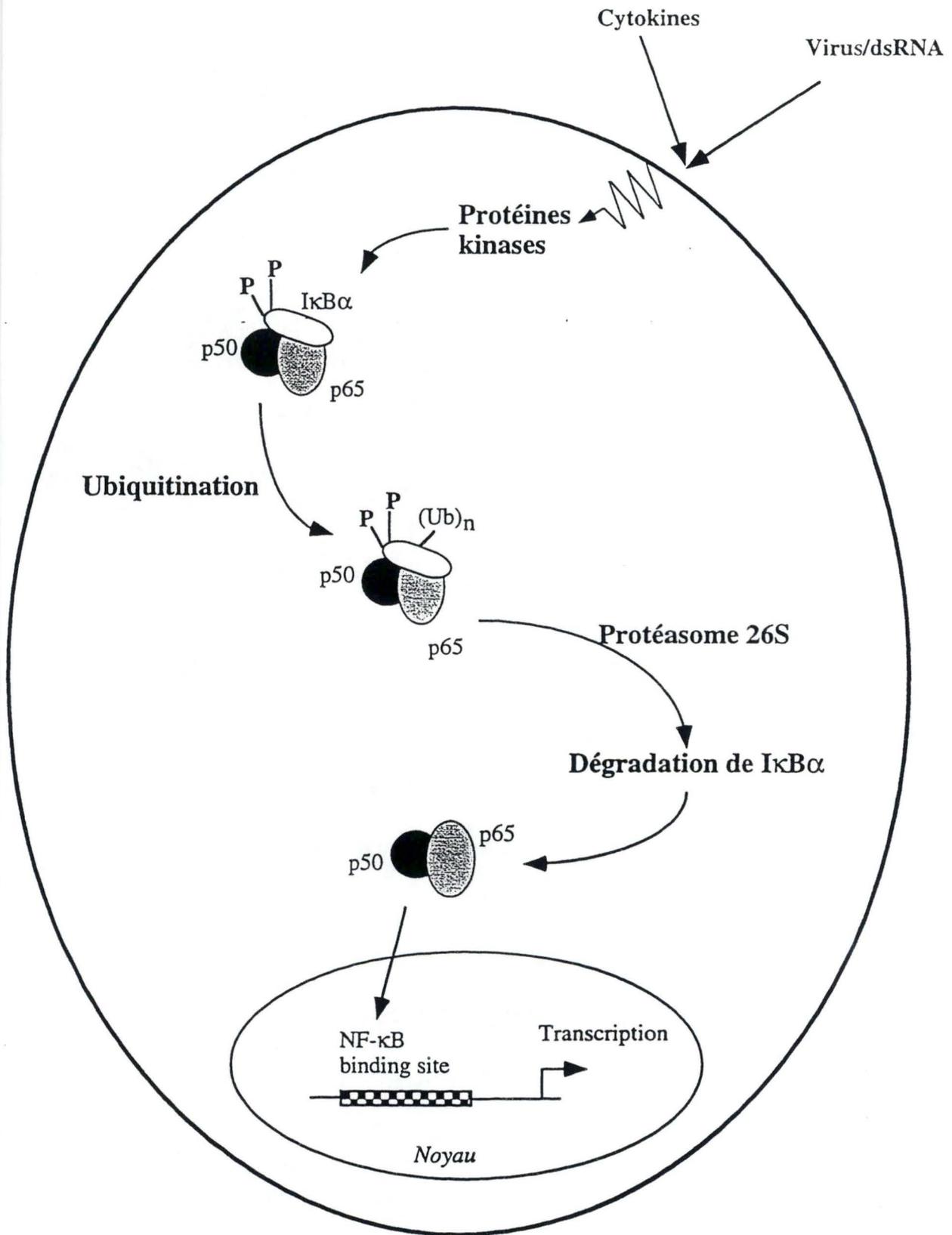


Fig. I. 28.: Schéma du mécanisme d'activation de NF-κB, après phosphorylation et protéolyse d'IκB (Renard, FUNDP, thèse de doctorat, 1997).

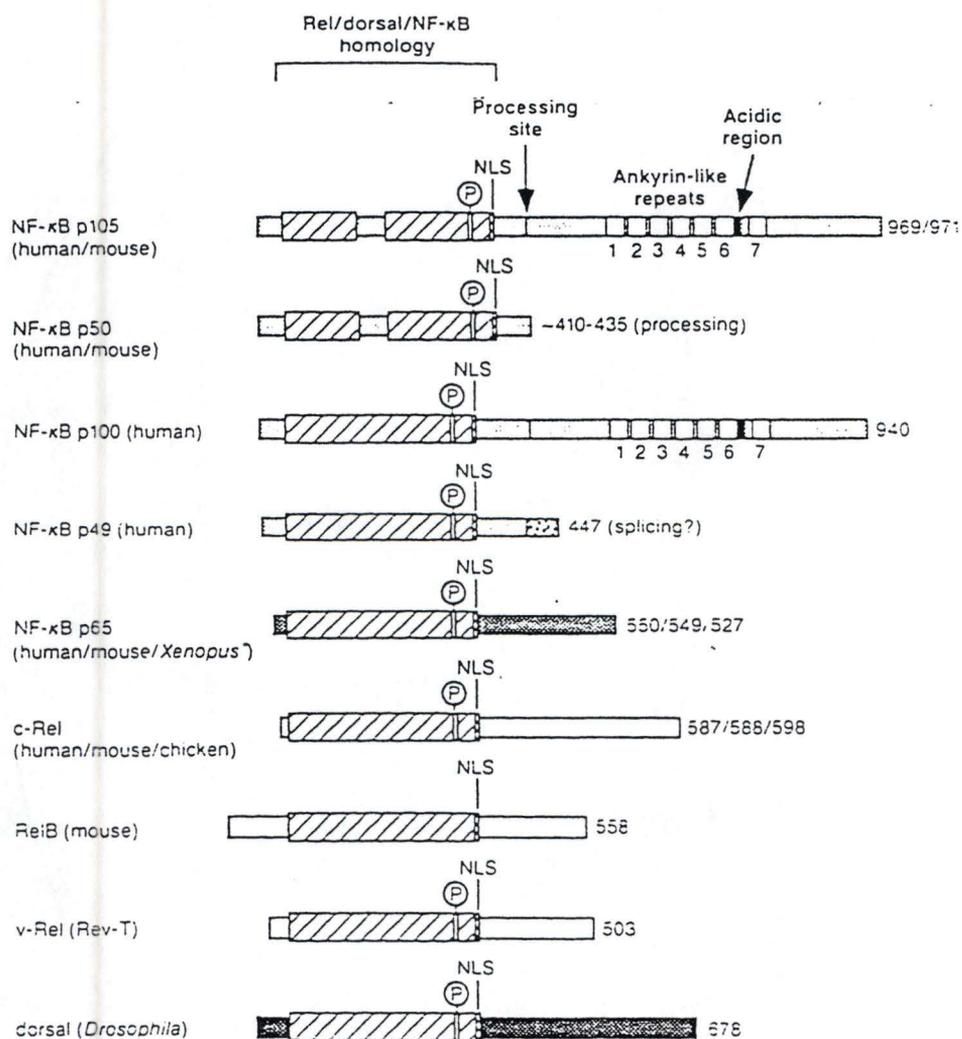


Fig. I. 29.: Membres de la famille Rel/NF- κ B (Blank et al., 1992).

3. NF- κ B

NF- κ B a été découvert comme le facteur se liant au motif κ B situé dans la séquence enhancer du gène de la chaîne légère κ des immunoglobulines. Depuis, il a été identifié dans de nombreux types cellulaires et il est reconnu pour pouvoir se lier à une série de promoteurs différents.

Le facteur NF- κ B est un dimère composé de deux protéines appartenant à la famille Rel/NF- κ B. Il est maintenu inactif et séquestré dans le cytoplasme, par son association à une sous-unité inhibitrice I κ B (Fig. I. 28).

3.1. LA FAMILLE REL/NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B est un dimère composé de combinaisons variables de membres de la famille de protéines Rel/NF- κ B.

Un domaine de 300 acides aminés (le Rel homology domain ou RHD) est présent chez tous les membres de cette famille avec 35 à 61 % d'identité entre eux (Fig. I. 29). Le RHD comprend un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation avec les autres membres de la famille. Il permet également l'interaction avec la famille de protéines I κ B dont nous parlerons plus tard. La figure I. 29 illustre le RHD (en hachuré) chez les protéines de la famille Rel/NF- κ B. Le domaine de liaison à l'ADN se lie (à l'exception des protéines dorsales de *Drosophile*) à une séquence consensus 5'-GGGANNYYCC-3' où N représente n'importe quel nucléotide et Y un nucléotide à base pyrimidique. Le domaine de dimérisation ne montre aucune homologie avec les motifs déjà connus (Blank et al., 1992).

La famille Rel/NF- κ B peut être divisée en deux groupes:

- le groupe des protéines p105 et p100, contenant des répétitions de type ankyrine, qui donnent après un clivage protéolytique, les protéines matures p50 et p52.
- Le groupe des protéines c-Rel, v-Rel, Rel A (p65), Rel B, les protéines dorsales de *Drosophile* et Dif (Dorsal related immunity factor) (Ip et al., 1993). La protéine Dorsal est impliquée dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale dans l'embryon de *Drosophile*.

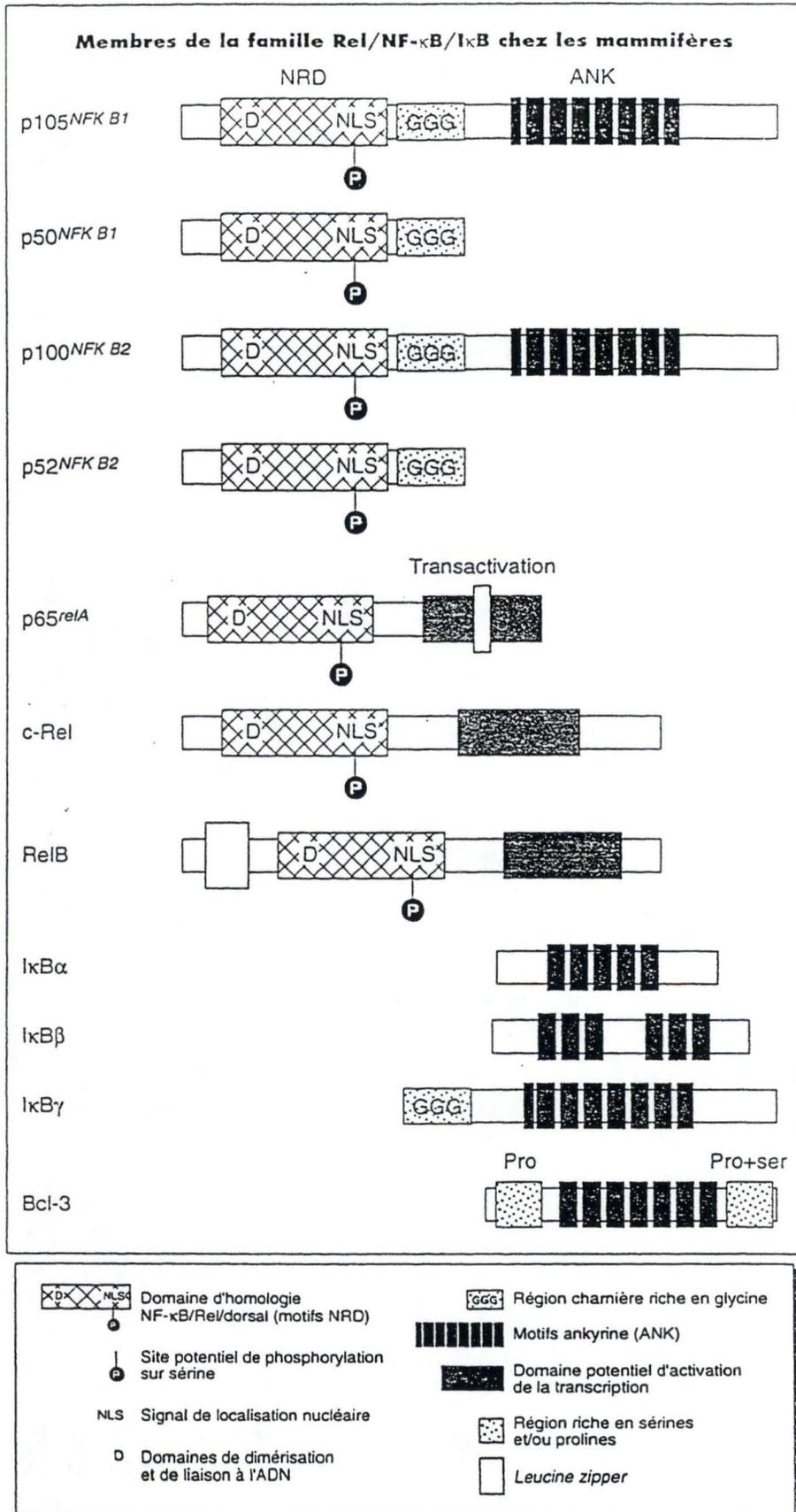


Fig. I. 30.: Membres des familles Rel/NF- κ B et I κ B chez les mammifères (Costello et al., 1995).

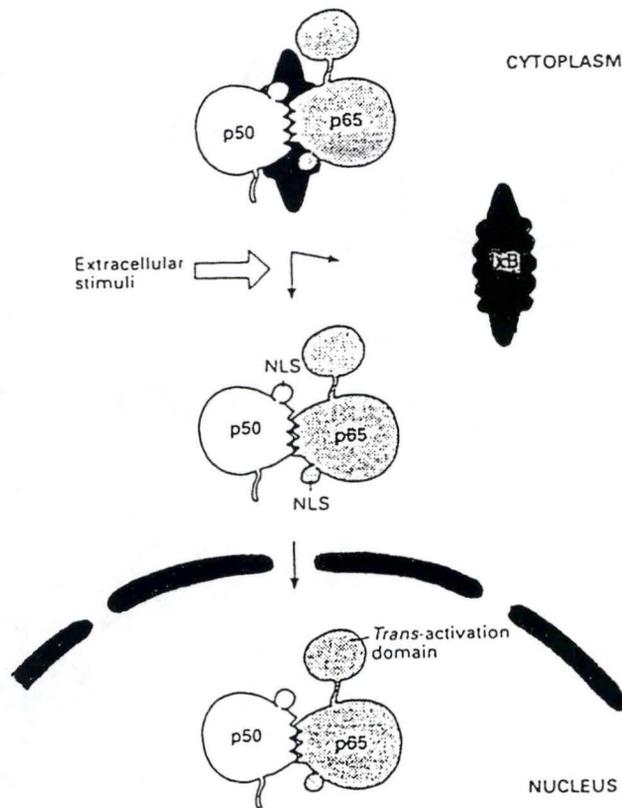


Fig. I. 31.: Schéma de l'activation de NF-κB en réponse à des stimuli externes. La dégradation de IκB expose le site de localisation nucléaire (NLS) et permet la translocation de NF-κB vers le noyau (Grimm et Baeuerle, 1993).

Les deux groupes diffèrent par leur habileté à activer la transcription; pour que le dimère NF- κ B puisse activer la transcription, il doit être constitué d'au moins un monomère du deuxième groupe. Les membres de ce groupe contiennent un domaine d'activation qui se trouve en dehors du RHD (pour revue; Siebenlist et al., 1994). Enfin, signalons que ces protéines portent un motif NLS (nuclear localization site), 4 ou 5 acides aminés basiques, qui permet leur translocation vers le noyau.

3.2. LA FAMILLE I κ B

Les protéines de la famille I κ B sont I κ B- β , Bcl-3 et la protéine cactus de *Drosophile*. Les membres de cette famille présentent un domaine partiellement conservé de 6 à 8 motifs ankyrine. Des répétitions de type ankyrine sont aussi retrouvées dans la partie carboxy-terminale des précurseurs p100 et p105 (Fig. I. 30). Ces derniers sont confinés dans le cytoplasme et incapables de se lier à l'ADN, leur partie carboxy-terminale en serait la cause. En effet, les répétitions de type ankyrine de cette partie masqueraient la séquence de localisation nucléaire et le site de processing de ces protéines (Fig. I. 31). Les membres de la famille I κ B, contenant également des motifs ankyrine, empêcheraient de la même façon l'accès au noyau des protéines auxquelles ils se lient. Les précurseurs p100 et p105 peuvent fonctionner comme des protéines I κ B, ils sont tous deux capables de s'associer avec des protéines Rel et d'inhiber leur translocation vers le noyau. (Blank et al., 1992; Siebenlist et al., 1994; Costello et al., 1995).

3.3. ROLE BIOLOGIQUE

NF- κ B est un facteur de transcription ubiquiste. Il intervient dans les réponses aux événements pathogéniques et stress divers, en activant la synthèse de gènes de réponse inflammatoire. Le dimère p50/p65, qui est le plus abondant, est présent dans presque toutes les cellules.

La survie des cellules dépend de leurs réponses à un changement environnemental. Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle central de régulateur en contribuant à l'induction des gènes de réponse rapide à un changement dans l'environnement de la cellule.

Signalons également que les fonctions de NF- κ B sont déviées par de nombreux virus afin de médier l'expression des gènes viraux (Siebenlist et al., 1994).

3.3.1. Stimuli activateurs

NF- κ B est activé par les cytokines comme l'IL-1 et le TNF- α , par les LPS, les esters de phorbol, les UV, les stress oxydatifs, une surcharge

<u>Cytokines</u>	Tumor necrosis factor- α (TNF- α) Lymphotoxin (LT) (TNF- β) Interleukin-1 α and β (IL-1 α and β) Interleukin-2 (IL-2) Leukemia inhibitory factor (LIF) (Interferon- γ) (Macrophage colony-stimulating factor) (M-CSF) (Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) (GM-CSF)	<u>Viruses and viral products</u>	Human T cell leukemia virus-1 (HTLV) Tax Hepatitis B virus (HBV) Hbx MHBs ¹ Epstein-Barr virus (EBV) EBNA-2 LMP Cytomegalovirus (CMV) (Human immunodeficiency virus-1) (HIV) Herpes simplex virus-1 (HSV-1) Human herpes virus-6 (HHV-6) Newcastle disease virus Sendai virus Adenovirus 5
<u>Mitogens</u>	Antigen Allogeneic stimulation Lectins (PHA, Con A) anti- $\alpha\beta$ T cell receptor anti-CD3 anti-CD2 anti-CD28 ¹ Phorbol esters (Diacylglycerol) (DAG) Calcium ionophores (ionomycin, A2837) ¹ anti-surface IgM (p39) (CD-40 ligand) Serum (Platelet-derived growth factor) (PDGF)	<u>Eukaryotic parasite</u>	ds RNA <i>Theileria parva</i>
<u>Other biological mediators</u>	Leukotriene B4 (Prostaglandin E2) (PGE2) (Insulin)	<u>Physical stress</u>	UV light Ionizing radiations (X and γ) (Photofrin plus red light) (Hypoxia) Partial hepatectomy
<u>Bacteria and bacterial products</u>	<i>Shigella flexneri</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Cell wall products: Lipopolysaccharide (LPS) Muramyl peptides (G(Anh)MTetra) Toxins: Staphylococcus enterotoxin A and B (SEA and SEB) Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) (Cholera toxin)	<u>Oxidative stress</u>	Hydrogen peroxide Butyl peroxide Oxidized lipids (Antimycin A) ¹
		<u>Chemical agents</u>	Calyculin A Okadaic acid (Pervanadate) (Ceramide) (Dibutyl c-AMP) (Forskolin) Protein synthesis inhibitors Cycloheximide Anisomycin Emetine

Table I. 1.: Agents activateurs de NF- κ B (Siebenslist et al., 1994).

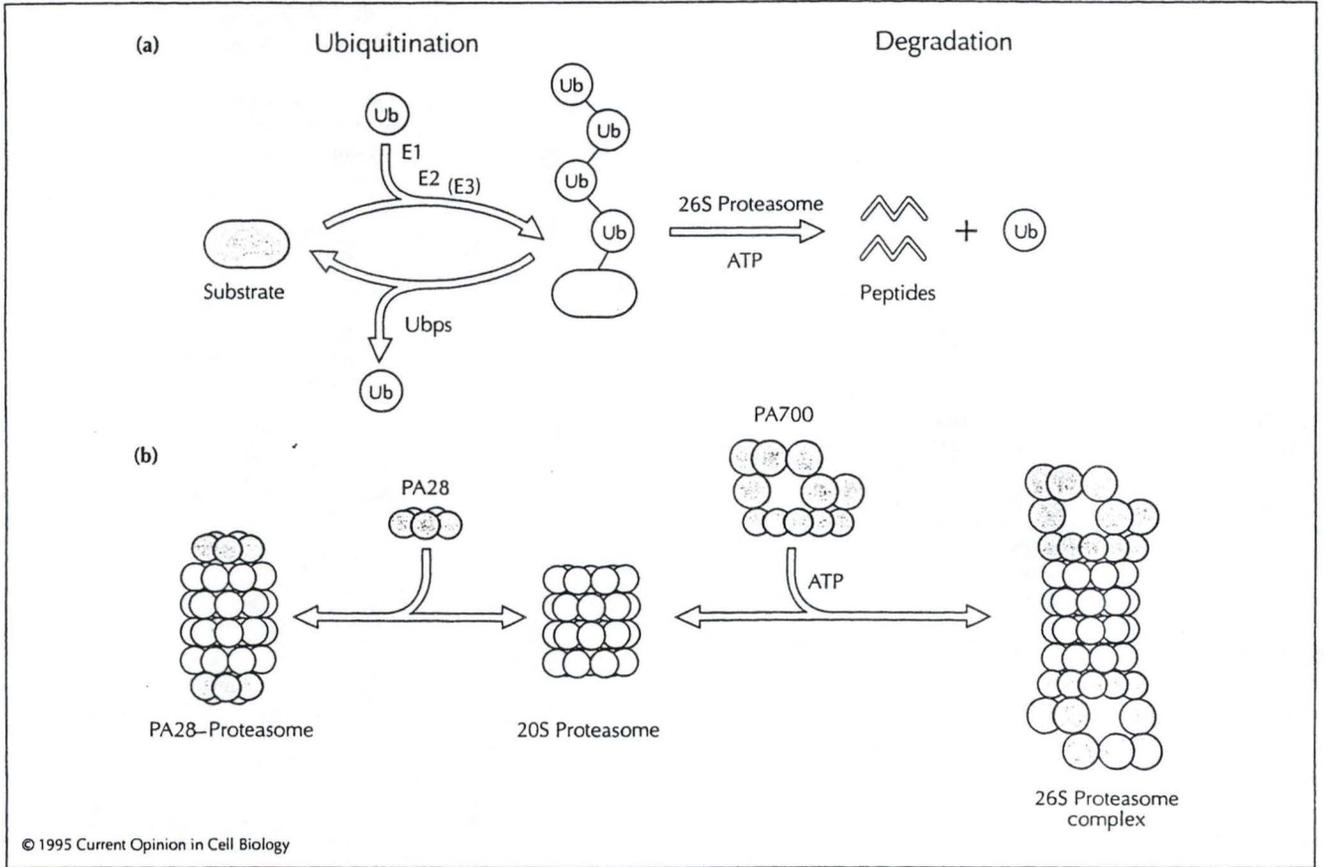


Fig. I. 32.: Schéma de l'ubiquitination et de la dégradation des protéines par le protéasome (a). La structure générale du protéasome 26S est également renseignée (b) (Hochstrasser, 1995).

<u>Cytokines and growth factors</u>	<p>Interleukin-1β Tumor necrosis factor α (TNF-α) Lymphotoxin (LT) (TNF-β)</p> <p>Interleukin-8 IP-10 Gro-α, -β and -γ (MIP-1α) (MCP-1/JE) (RANTES)</p> <p>Interleukin-2 Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Erythropoietin)</p> <p>Interferon-β (Interferon-γ) Interleukin-6 Proenkephalin (Transforming growth factor-β2) (TGF-β2)</p>	<u>Acute phase proteins</u>	<p>Angiotensinogen Serum amyloid A precursor Complement factor B Complement factor C4 (Urokinase-type plasminogen activator)</p>
		<u>Viruses</u>	<p>Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) (Human immunodeficiency virus 2) (HIV-2) Simian immunodeficiency virus (macaques) (SIV) Cytomegalovirus (CMV) Adenovirus Herpes simplex virus 1 (HSV-1) (Human neurotropic virus) (JCV) (Simian virus 40) (SV-40)</p>
		<u>Transcription factors and regulators</u>	<p>Rel p105 IκB-α</p> <p>Myc Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) (Interferon regulatory factor 2) (IRF-2) A-20</p>
<u>Immunoreceptors</u>	<p>Immunoglobulin κ light chain (Ig-κ-LC) T cell receptor β chain Major histocompatibility complex class I (MHC-I) (Major histocompatibility complex II) (MHC-II) β2-microglobulin MHC-II invariant chain Tissue factor-1 Interleukin-2 receptor α chain (CD7)</p>	<u>Others</u>	<p>NO-synthetase (Apolipoprotein CIII)</p> <p>(Perforin)</p> <p>Vimentin (Decorin)</p>
<u>Adhesion molecules</u>	<p>Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Intracellular cell adhesion molecule-1) (ICAM-1)</p>		

Table I. 2.: Gènes induits par NF- κ B activé (Siebenslist et al., 1994).

du reticulum endoplasmique, une infection virale, les ionophores de calcium. L'ensemble des stimuli activateurs de NF- κ B est repris dans la table I. 1 (Siebenlist et al., 1994).

3.3.2. Mécanismes d'activation

Dans la cellule au repos, NF- κ B se trouve dans le cytoplasme sous une forme inactive car il est lié à I κ B. La forme la plus fréquente de NF- κ B dans la cellule au repos est l'hétérodimère p50-p65-I κ B α . Le dimère est retenu dans le cytoplasme car la sous-unité inhibitrice I κ B masque le signal de localisation nucléaire (NLS) des sous-unités p50-p65 (Fig. I. 30).

Lors de l'activation cellulaire I κ B est phosphorylé et détruit et p50-p65 peut alors entrer dans le noyau, se fixer sur son élément régulateur sur l'ADN et activer les gènes-cibles comme illustré à la figure I. 28. Pour être dégradé I κ B doit être phosphorylé sur deux sérines: S32 et S36 pour I κ B- α et S19 et S23 pour I κ B- β . Comme vu précédemment au point 2.4.4 et à la figure 27 cette phosphorylation est assurée par le complexe NIK-IKK. Cette phosphorylation est le signal pour une ubiquitination. La chaîne d'ubiquitines portée par I κ B est reconnue par le protéasome 26S qui va alors détruire l'inhibiteur (Stancovski et Baltimore, 1997). La phosphorylation peut être inhibée par des antioxydants comme le PDTTC (Israël, 1995).

Le protéasome 26S est un large complexe protéique responsable de la dégradation par la voie de l'ubiquitine. La voie de dégradation est indépendante des lysosomes. Une première ubiquitine se lie au groupe amino-terminal d'une lysine portée par la protéine cible. L'ubiquitine est ensuite elle-même ubiquitinée. Cette réaction se répète jusqu'à la formation d'une longue chaîne reconnue par le protéasome 26S (Peters, 1994) (Fig. I. 32).

3.3.3. Gènes-cibles

NF- κ B, une fois actif et transloqué vers le noyau, induit des effecteurs de réponse inflammatoire, immune ou de phase aiguë: c'est le cas de nombreux gènes codant pour des cytokines, chémokines, facteurs de croissance ou molécules d'adhérence cellulaire (Table I. 2). NF- κ B induit l'IL-6 (régulateur de phase aiguë), l'IFN- β (antiviral), les chémokines IL-8, Gro et MCP-1. L'expression de l'IL-1 et du TNF- α est régulée positivement par l'activation de NF- κ B (Stancovski et Baltimore, 1991).

Les cellules immunitaires attirées par les chémokines sur le site de l'inflammation adhèrent ensuite aux cellules endothéliales pour finalement traverser l'endothélium afin d'atteindre les tissus touchés

par l'inflammation. L'adhérence à l'endothélium est facilitée par l'expression de molécules sur les cellules endothéliales induites par NF- κ B; E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1. Ces molécules d'adhérence interagissent avec des molécules se trouvant sur les cellules immunitaires pour faciliter le processus de diapédèse: par exemple VCAM-1 et ICAM-1 sont reconnues par des intégrines.

Des virus comme HIV-1 et le CMV utilisent aussi NF- κ B pour réguler leur propre expression (Siebenlist et al., 1994).

NF- κ B active également le gène codant pour la cyclooxygénase-2 (COX-2), forme inductible de la cyclooxygénase. Cette enzyme convertit l'acide arachidonique libéré par la PLA₂ en prostaglandines (Newton et al., 1997).

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

Table I. 3.: Effets de différents antioxydants sur l'activation de NF- κ B induite par le TNF- α dans la lignée lymphoïde Jurkat (sous-clone JR). L'activation de NF- κ B est estimée par retard sur gel: ++++ représente près de 100 % d'inhibition, +++ environ 75 % d'inhibition et ++ 50 % d'inhibition (Schreck et al., 1992).

NF- κ B inducing agent	Class	Inhibition by antioxidants	Induction of oxidative stress
Tumor necrosis factor α	Cytokine	yes	yes
Interleukin-1	Cytokine	yes	yes
Lipopolysaccharide	Bacterial lipid	yes	yes
Double-stranded RNA	Viral RNA intermediate	yes	n.d.
Phorbol esters	Protein kinase activator	yes	yes
A23187	Calcium ionophore	yes	n.d.
Lectins (plus phorbol ester)	T cell mitogen	yes	yes
Cycloheximide	Protein synthesis inhibitor	yes	n.d.
Ultraviolet light	Physical stress	n.d.	yes
Ionizing radiation	Physical stress	n.d.	yes
Hydrogen peroxide	Oxidative stress	yes	yes
Butylperoxide	Oxidative stress	n.d.	yes
Tax (HTLV-1)	Viral protein	yes	n.d.
HBx (HBV)	Viral protein	yes	n.d.
MHBs ¹ (HBV)	Viral protein	yes	n.d.
Anti-IgM	Anti surface antibody	n.d.	yes
Okadaic acid	Phosphatase inhibitor	n.d.	n.d.
Taxol	Microtubuli stabilizer	yes	n.d.

Table I. 4.: Effets des antioxydants sur l'activation de NF- κ B induite par des agents autres que des cytokines (Schreck et al., 1992).

4. ACTIVATION DE NF- κ B ET ROIS

Avant même que la machinerie moléculaire aboutissant à l'activation de NF- κ B ne soit élucidée, il était généralement admis que les stress oxydatifs pouvaient jouer un rôle dans cette activation (Schreck et al., 1991) (fig. I. 6). Cette hypothèse reposait sur une série d'arguments:

- l'activation de NF- κ B est sensible aux antioxydants;
- des conditions pro-oxydantes peuvent dans certaines conditions activer NF- κ B;
- plusieurs stimuli induisant l'activation de NF- κ B, produisent également des ROIs dans la cellule.

4.1. L'ACTIVATION DE NF- κ B EST SENSIBLE AUX ANTIOXYDANTS

Plusieurs antioxydants se sont révélés actifs pour empêcher l'activation de NF- κ B. Le tableau I. 3 reprend la liste des différents antioxydants testés sur l'activation de NF- κ B induite par le TNF- α dans des cellules de la lignée lymphoïde Jurkat (sous-clone JR) (Schreck et al., 1992). Ce tableau révèle d'abord que tous les antioxydants ne sont pas actifs: c'est le cas des molécules connues pour neutraliser les ions OH $^{\circ}$. Par contre, une série de molécules reconnues pour interférer avec les fonctions thiols s'avèrent actives: N-acétyl-cystéine (NAC), cystéine, glutathion, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). Le PDTC a une activité de chélateur pour les métaux lourds et possède une activité antioxydante grâce à son groupe dithiocarboxy (Schreck et al., 1992). Il a été montré que le PDTC inhibe la transcription des gènes d'IL-6, IL-8 et GM-CSF (Munoz et al., 1996). La N-Acétyl-L-Cystéine (NAC) sert de scavenger pour les ROIs et de précurseur pour le glutathion. Les thiols intracellulaires jouent donc un rôle clef dans la régulation du facteur de transcription NF- κ B (Staal et al., 1990).

IL faut remarquer que cette sensibilité de l'activation de NF- κ B aux antioxydants se vérifie, non seulement dans le cas des cytokines, mais pour une série de stimuli autres, reconnus pour activer NF- κ B, de nature très diverse (Table I. 4).

A cet égard, soulignons la surcharge du réticulum endoplasmique (RER), qui active également NF- κ B, indépendamment de tout signal extracellulaire (Pahl et Baeuerle, 1995; 1997). Cette surcharge peut être artificiellement provoquée, par exemple dans les cellules 293 de diverses manières. Soit on transfecte ces cellules avec un plasmide d'expression pour la chaîne μ des immunoglobulines. Vu l'absence de chaînes légères, les chaînes s'accumulent dans le RER. Soit on traite

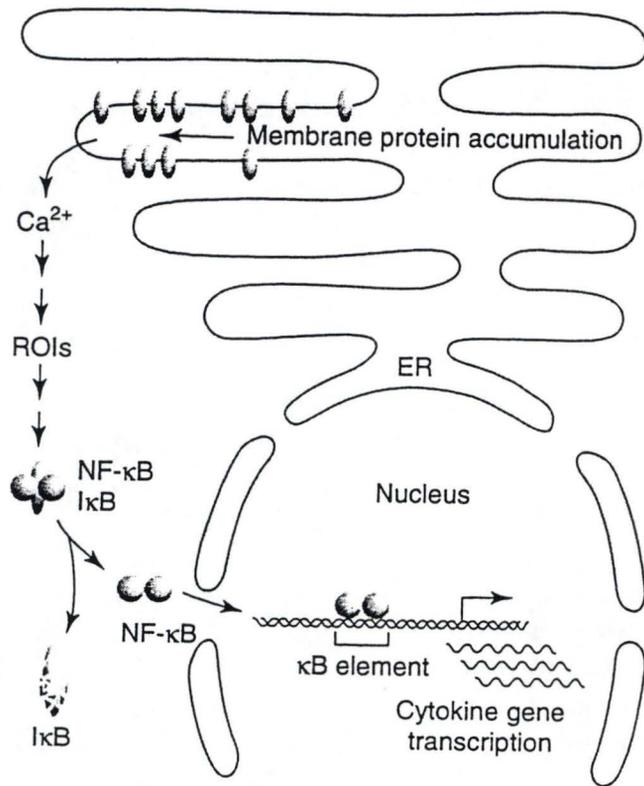


Fig. I. 33.: Effet d'une surcharge du réticulum endoplasmique sur l'activation de NF- κ B (Pahl et Baeuerle, 1997).

Condition	Class	Concentration range	Activating
<i>Hydrogen peroxide</i>	<i>Peroxide</i>	30-150 μM	<i>Yes</i>
<i>Butyl peroxide</i>	«	300 μM	<i>Yes</i>
Paraquat	O_2^- generating	0.1 μM -5 mM	No
Doxorubicin	«	10-50 μM	No
Mitomycin C	«	1-50 $\mu\text{g/ml}$	No
Menadion	«	1-100 μM	No
<i>L-Buthionine sulfoximine</i>	<i>Inhibitor of GSH synthesis</i>	0.5 mM	<i>Yes</i>
<i>N-ethylmaleimide</i>	<i>Alkylating agent</i>	1-10 mM	<i>Yes</i>
*			
(IN VITRO) ^o			
<i>Diamide*</i>	<i>Oxidizing reagent</i>	10 mM	<i>Yes</i>
(IN VITRO)			
3,3'-(1,4-naphtylidene) dipropionate	Singlet O_2 generating	0.1-0.8 mM	No
<i>Methylene Blue photosensitization</i>	«		<i>Yes</i>
4-Nitroquinolineoxide	DNA damaging	1-50 μM	No
1- β -D-arabinofuranosylcytosin (Ara-C)	«	0.1-100 μM	No
Na nitroprusside	NO-generating	1-250 μM	No
Clofibrate	peroxisome proliferator	1-1000 μM	No
CuSO_4	Chemical stress	50 μM	No
CdSO_4	«	50 μM	No
Sodium arsenite	«		No
42 °C	Heat shock		No

Table I. 5.: Effet de différentes conditions de stress oxydatif sur l'activation de NF- κ B (Schreck et al., 1992).

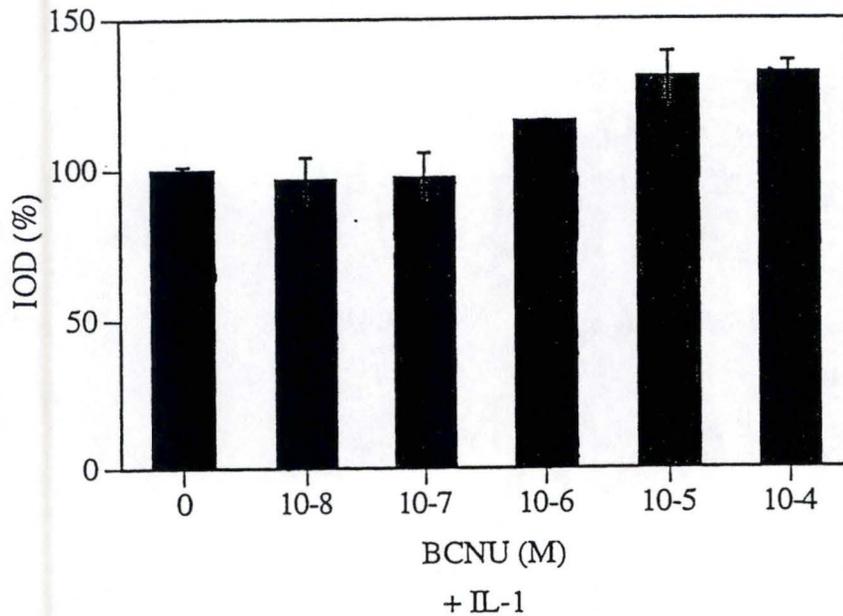


Fig. I. 34.: Effet du BCNU (Bischloronitrosourée) sur l'activation de NF- κ B. Les cellules sont préincubées 30 minutes en présence de BCNU puis stimulées avec 5 ng/ml d'IL-1 pendant 30 minutes toujours en présence de BCNU. L'activation de NF- κ B est estimée par retard sur gel. L'IOD (intégration de densité optique) correspondant aux cellules incubées en présence de BCNU est exprimée en pourcentage de l'IOD des cellules stimulées en présence d'IL-1 seule (Renard, FUNDP, thèse de doctorat, 1997).

les cellules avec la tunicamycine, inhibiteur de la N-glycosylation. Encore une fois, cette perturbation de la glycosylation, aboutit à l'accumulation des protéines non glycosylées dans le RER. Cette surcharge du RER entraîne une activation de NF- κ B, bien que la cinétique soit plus lente que celle observée en présence des cytokines IL-1 ou TNF- α (Fig. I. 33). Par contre, cette activation de NF- κ B induite par la surcharge du RER est également inhibée par le PDTC (Pahl et Baeuerle, 1995, 1997).

Enfin, des expériences de surexpression d'enzymes antioxydantes confirment les résultats obtenus avec des antioxydants exogènes. Ainsi, une surexpression de la catalase supprime l'activation de NF- κ B par le TNF. Cela montre que H₂O₂ est requis pour l'activation de NF- κ B par le TNF. H₂O₂ joue un rôle dans l'induction, mais également dans le maintien de l'activité de NF- κ B. De plus, une surexpression de la SOD Cu/Zn qui convertit les superoxydes en peroxyde d'hydrogène augmente l'activation de NF- κ B par le TNF (Schmidt et al., 1995). Renard et al. (1997) ont montré que des fibroblastes humains surexprimant la glutathion peroxydase, étaient moins sensibles à l'IL-1, en ce qui concerne l'activation de NF- κ B et la production d'IL-6.

4.2. NF- κ B PEUT ETRE ACTIVE PAR DES CONDITIONS PRO-OXYDANTES

Différentes conditions pro-oxydantes ont été testées sur l'activation de NF- κ B. Dans les cellules de la lignée lymphoïde Jurkat, certaines de ces conditions activent effectivement NF- κ B (Table I. 5). Il faut cependant signaler que des divergences existent entre lignées cellulaires et même entre sous-clones d'une lignée. En outre Piette et ses collaborateurs ont également montré que sur des cellules de carcinome ovarien humain, le H₂O₂ et les cytokines activent bien NF- κ B, mais via des cinétiques et des mécanismes moléculaires différents (Bonizzi et al., 1996).

La table I. 5 confirme cependant que la nature du stress pro-oxydant est importante. Par exemple, les ions superoxydes semblent peu actifs. H₂O₂ semble souvent impliqué. Enfin, la balance GSH/GSSG semble également jouer un rôle clef. Renard et al (1997) ont montré que la bischloronitrosourée (BCNU), inhibiteur de la GSH réductase, qui favorise donc le maintien d'un pool de GSSG ou glutathion oxydé, induisait une hyperactivation du facteur NF- κ B en présence d'IL-1 (Fig. I. 34).

4.3. STIMULI ACTIVATEURS DE NF- κ B ET CONDITIONS PRO-OXYDANTES

C'est probablement l'argument pour lequel il existe le moins d'évidences expérimentales. Dans le cas du TNF- α , il est clairement démontré qu'il y a production de ROIs. Goossens et al. (1995) ont montré par microscopie confocale, cytométrie de flux et une sonde fluorescente spécifique de ROI (dihydrorhodamine 123), que dans une lignée cellulaire de fibrosarcome murin (cellules L929) cette production serait le résultat d'interférences avec le flux normal d'électrons dans la mitochondrie. Cette formation de ROIs induite par le TNF- α est corrélée avec la cytotoxicité.

En ce qui concerne l'IL-1, Tiku et al. (1990) via des sondes fluorescentes et par cytométrie de flux, ont décrit une augmentation de H₂O₂ intracellulaire, dans des chondrocytes de lapin en culture. Meier et al. (1990) quant à eux, décrivent une production accrue de O₂[°] et de H₂O₂ par des fibroblastes humains stimulés par l'IL-1. En général, ni la nature du stress oxydatif, ni les mécanismes moléculaires impliqués ne sont clairement élucidés.

5. OBJECTIFS

Comme exposé dans l'introduction, les cytokines IL-1 et TNF- α activent le facteur transcriptionnel NF- κ B via des mécanismes de signalisation actuellement identifiés. Elles font également intervenir dans cette activation, des processus oxydatifs dont la nature reste controversée. Les données de la littérature suggèrent cependant que le glutathion puisse jouer un rôle à ce niveau.

L'objectif majeur de ce travail est de préciser la nature des stress oxydants induits par l'IL-1 et le TNF, aboutissant à l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B.

Mettant à profit une méthode récemment mise au point au laboratoire pour doser le glutathion oxydé (GSSG) et réduit (GSH), basée sur l'électrophorèse capillaire (Renard et al., soumis pour publication), nous suivrons ces deux formes de glutathion dans des cellules soumises à de l'H₂O₂ exogène et aux deux cytokines pro-inflammatoires que sont l'IL-1 et le TNF- α dans l'espoir de mettre en évidence une oxydation accrue du glutathion. Une sonde fluorescente relativement spécifique pour H₂O₂ sera également utilisée pour mettre en évidence une éventuelle augmentation de cette molécule dans les cellules stimulées à l'IL-1.

Enfin, nous nous intéresserons à la surcharge du réticulum endoplasmique, stress intracellulaire, capable d'activer NF- κ B dans les cellules HeLa (Pahl et Baeuerle, 1997). Dans des expériences préliminaires, nous vérifierons les effets de ce type de stress sur l'activation de NF- κ B dans le modèle de fibroblastes WI-38 VA13.

MATERIELS

ET METHODES

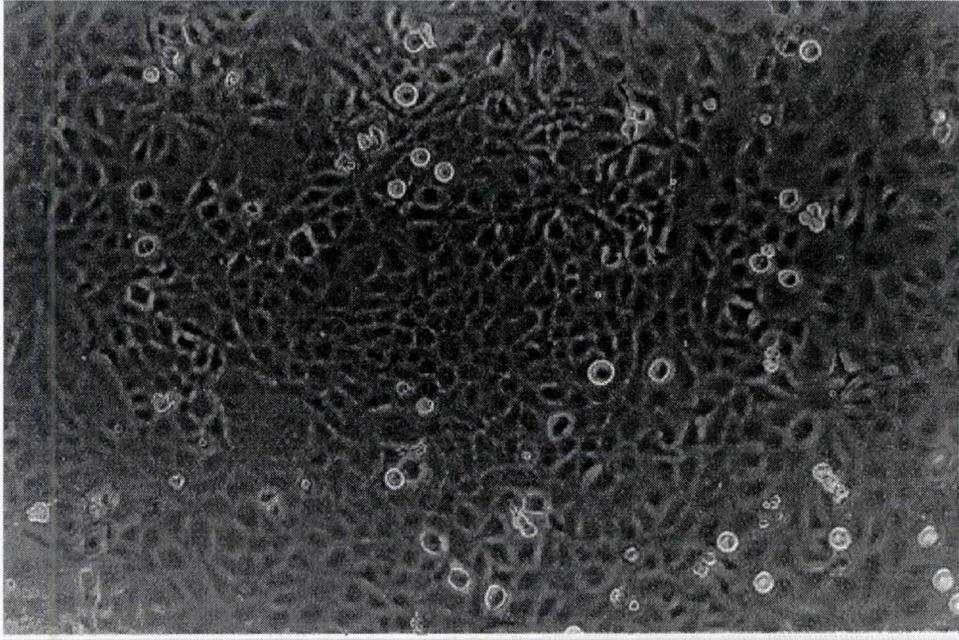


FIG. II. 1.: Photographie des cellules WI-38 VA13 confluentes. Cette photographie a été prise au microscope photonique à contraste de phase. Le grossissement est de 115 x.

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1. CELLULES

Les cellules utilisées dans ce travail sont les cellules WI-38 VA13, c'est à dire des fibroblastes de poumon humains transformés avec le virus SV40; elles sont fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC n°CCL75.1). Elles ont un potentiel prolifératif illimité, car le virus contient des oncogènes. La morphologie de ces cellules est illustrée à la figure II. 1.

1.2. MATERIELS

- Trypsine: solution stérile de trypsine à 0,25 % dans un tampon 0,4 g/l KCl; 2,2 g/l NaHCO₃; 6,8 g/l NaCl; 1 g/l glucose; 0,0005 g/l rouge de phénol (25050-014, Gibco, Grande-Bretagne).
- MEM (Dulbecco Minimum Essential Medium, 41200-056, Gibco, Grande-Bretagne):
Pour 5 l:
 - MEM en poudre.
 - 50 ml d'acides aminés non essentiels pour MEM (11140-035, Gibco, Grande-Bretagne).
 - 50 ml de vitamines pour MEM (11120-037, Gibco, Grande-Bretagne).
 - 100 ml d'acides aminés pour MEM (043-01135, Gibco, Grande-Bretagne).
 - 3,6 g de NaHCO₃.

Les bouteilles de 500 ml de milieu MEM sont additionnées de sélénite de sodium (Na₂SeO₃, S5261, Sigma, USA) à une concentration de 10⁻⁷M et de tampon HEPES 10 mM. L'ajout de sélénium est nécessaire pour ne pas limiter l'activité de la glutathion peroxydase (Pigeolet, 1990).

- MEM + SB: milieu enrichi de 10 % de sérum de veau fœtal (PAA Laboratoires, Autriche).
- Milieu de rinçage: MEM
- HLA: solution d'hydrolysate de lactalbumine 10 % (11640-018, Gibco, Grande-Bretagne).
- MEM + HLA: milieu MEM additionné de 0,2 % de lactalbumine.

1.3. METHODE

1.3.1. Repiquage

On préchauffe le milieu, le milieu + sérum et la trypsine à 37°C. L'ancien milieu est décanté. La boîte de culture (75 cm²) est rincée avec 10 ml de milieu de rinçage puis décantée et incubée dans 2 ml de trypsine pendant 1 à 2 minutes à température ambiante. Lorsque les cellules sont arrondies, la trypsine est décantée et la boîte de culture est incubée à 37°C durant 5 à 10 minutes pour détacher les cellules. On ajoute 10 ml de MEM + SB et on agite le milieu avec une pipette Pasteur pour rompre les agrégats de cellules; le sérum contient des inhibiteurs de protéases, qui inhibent donc la trypsine.

Le milieu contenant les cellules est le plus souvent transféré dans 4 boîtes de culture de 75 cm². La suspension cellulaire est donc diluée 4 fois (\pm 15 000 cellules/cm²). Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C. Les cellules sont à confluence 3 jours après le repiquage.

1.3.2. Congélation et décongélation des cellules

1.3.2.1. Congélation.

Les cellules sont rincées et trypsinisées. La suspension cellulaire est centrifugée 10 minutes à 150 g (centrifugeuse de table Hettich, Tuttlinger, Allemagne), et le culot est resuspendu dans 0,8 ml de MEM + SB (20 %) + DMSO (10 %). La suspension est transférée dans une ampoule à congélation (Nunc, Danemark). La congélation se fait grâce à un appareil programmable (l'Air Liquide, Belgique) qui diminue la température de 1°C par minute. L'ampoule contenant les cellules est stockée dans l'azote liquide à -196°C.

1.3.2.1. Décongélation.

L'ampoule contenant les cellules est retirée de l'azote liquide et immédiatement plongée dans un bain à 37°C. Lorsque les cellules sont décongelées, elles sont centrifugées 10 minutes à 150 g. Le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans du MEM + SB avant d'être transféré dans une boîte de culture.

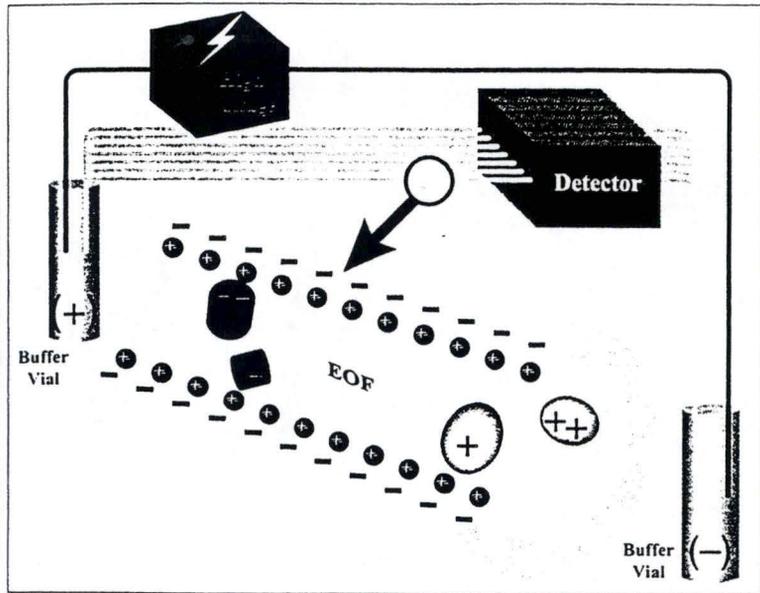
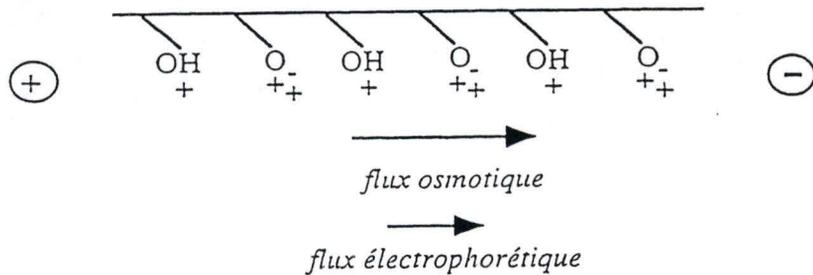


Fig. II. 2.: Principe de l'électrophorèse capillaire. Sur ce schéma 7 capillaires sont représentés, mais nous en utilisons un seul. (EOF: flux électroosmotique)

(a) *pH acide*



(b) *pH alcalin*

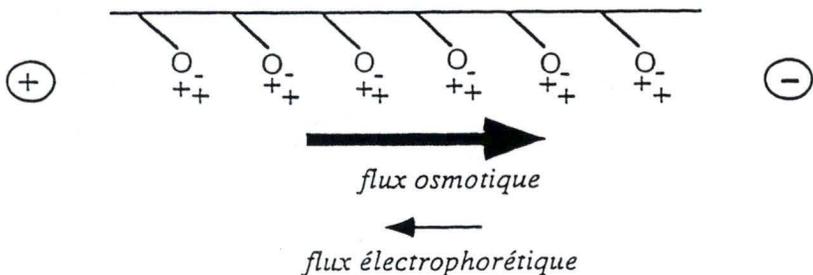


Fig. II. 3.: Effet du pH sur le flux osmotique et sur le flux électrophorétique. (a) pH acide; (b) pH basique.

2. DOSAGE DU GLUTATHION

Le dosage du glutathion a été réalisé grâce à l'électrophorèse capillaire, d'après la méthode décrite par Piccoli et al. (1994) sur des globules rouges. Cette méthode a été adaptée pour des cellules adhérentes (Renard et al; soumis pour publication).

Cette technique utilise des capillaires de calibre serré (20-200 μm), d'une longueur de 20 à 80 cm, permettant une séparation efficace des molécules, facilitée par l'utilisation de hauts voltages générant un flux électroosmotique et électrophorétique dans le capillaire. Les extrémités du capillaire en silice trempent dans des réservoirs de tampon. (Fig II. 2). A proximité d'une de ses extrémités, une portion dénudée est alignée avec un détecteur UV. Des électrodes connectées à une source de haut voltage sont également en contact avec les réservoirs de tampon.

Le capillaire est d'abord rincé avec du tampon, puis un volume précis d'échantillon est introduit par trempage de l'extrémité du capillaire dans l'échantillon et surpression pendant un temps déterminé.

L'échantillon subit alors deux forces principales, l'électroosmose et le champ électrique, qui permettent de séparer ses composants en fonction de la taille et de la charge. Puisque le capillaire est en silice il est donc chargé négativement. Les ions positifs du tampon sont attirés par les charges négatives de la silice, créant une double couche électrique. Lorsqu'un voltage est appliqué au capillaire, les ions positifs sont attirés vers la cathode. Ils entraînent avec eux les molécules d'eau, créant un flux de tampon vers l'électrode négative: c'est le phénomène d'électroosmose. Les molécules contenues dans l'échantillon subissent aussi le champ électrique et sont attirées vers les électrodes.

A pH alcalin ou neutre, le flux électroosmotique est suffisamment fort pour que tous les constituants migrent vers l'électrode négative (Fig. II. 3. A). En effet, la silice est fortement chargée négativement à pH élevé, et par conséquent le flux osmotique est important. La plupart des peptides sont chargés négativement à pH alcalin et vont donc avoir tendance à migrer vers la borne positive, mais la force électrostatique est largement contrebalancée par le flux électroosmotique. Les peptides sont alors séparés suivant leur charge et leur masse.

A pH acide, les peptides chargés positivement migrent dans la même direction que le flux osmotique (Fig. II. 3. B). La séparation des composants de l'échantillon s'effectue alors principalement suivant les charges.

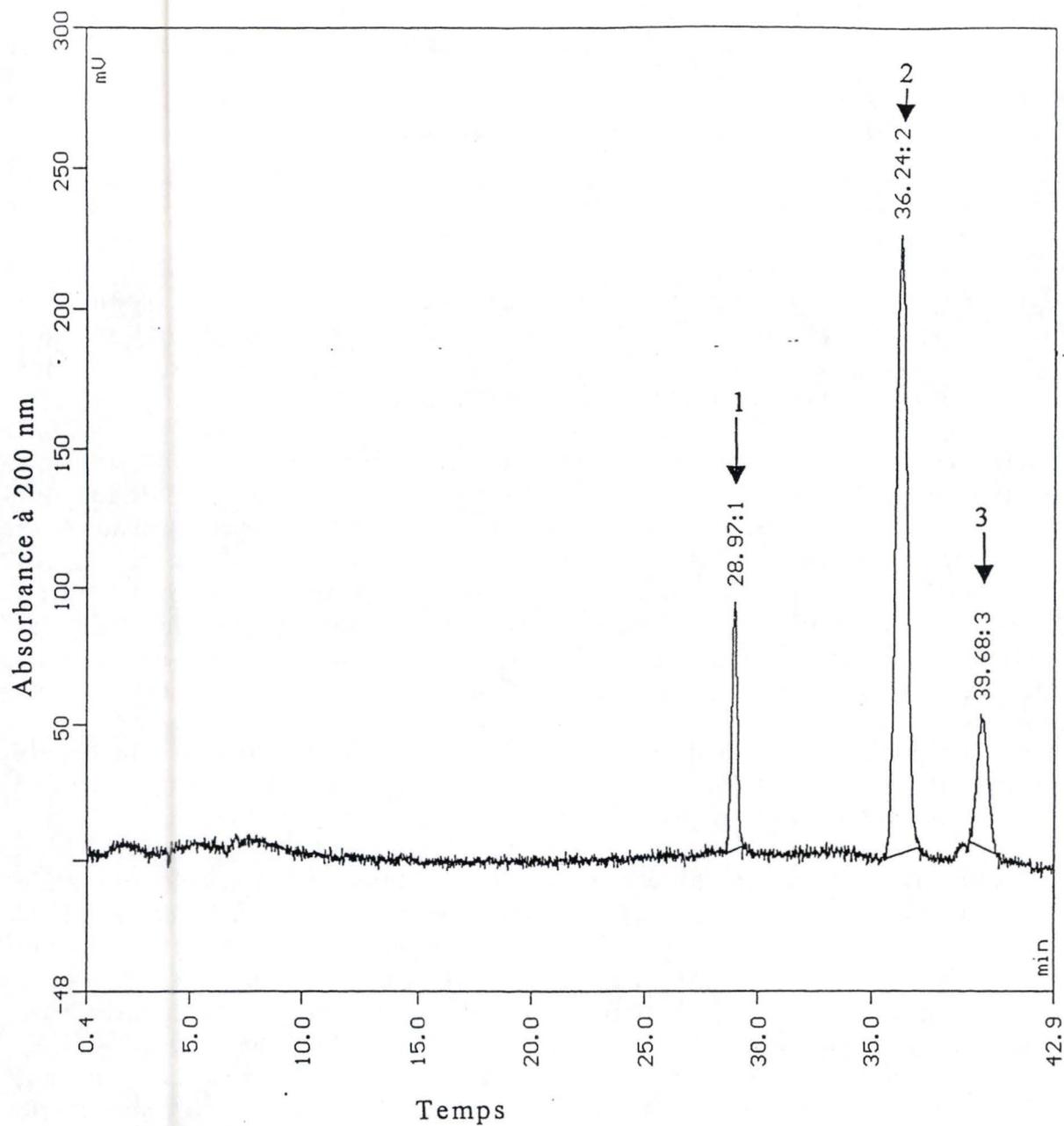


Fig. II. 4.: Profil d'électrophorèse du glutathion oxydé et réduit purifiés. Le pic 1 correspond à du GSSG, le pic 2 au GSH-NEM et le pic 3 au GSH.

2.1. MATERIELS

- PBS: tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 + 0,9 % NaCl.
- Solution de NEM: 25 mM de N-éthyl maléimide (Janssen Chimica, Beerse, Belgium) dissous dans du tampon phosphate (NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,5)
- Tampon d'électrophorèse : NaH_2PO_4 35 mM, pH 2,1 (filtré sur filtres 0,22 μm)
- Homogénéiseur de Dounce serré (2 ml)
- filtres Ultrafree-4 (Biomax 10 K, Millipore, cat # UFV4BGC25)
- Capillaire P150 : 50 μm x 50 cm (Supelco, cat # 75001)
- Solution standard de glutathion : 2 mg de GSSG et de GSH purifiés (Sigma, St Louis, USA), solubilisés dans 1 ml de solution NEM 25 mM. Cette préparation est alors diluée 30 x dans du NEM 25 mM avant injection dans le capillaire.
- Racloir.

2.2. METHODE

2.2.1. Préparation des extraits cellulaires

Les cellules sont cultivées dans des boîtes T75. Lorsqu'elles sont confluentes, le MEM + SB est décanté et remplacé par du MEM + HLA pendant 1 heure. Elles sont ensuite stimulées avec différents médiateurs, pendant des temps variables. Le milieu est ensuite décanté et le tapis cellulaire est rincé deux fois avec 10 ml de PBS froid. Les cellules sont ensuite raclées dans 0,4 ml de NEM et homogénéisées au Dounce.

L'homogénat est centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour pouvoir éliminer les noyaux et les membranes cellulaires (centrifugeuse Heraeus Biofuge 17RS). Les surnageants sont ensuite centrifugés à 2 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C sur filtre Ultrafree-4 de manière à enlever les protéines de poids moléculaire supérieur à 10 000 kD (centrifugeuse Heraeus Labofuge 400R).

Les filtrats sont injectés dans le système d'électrophorèse capillaire grâce à une pression de 40 mbars pendant 4 minutes et vont migrer dans le tampon sous un voltage de 18 kV. L'analyse est réalisée par un système Prince (Lauerlabs, Emmen, Pays-Bas) et la détection en absorbance se fait à 200 nm. Les résultats sont exprimés en mV.

2.2.2. Quantification

L'ajout de NEM est nécessaire afin de protéger le groupement thiol du GSH. L'injection de solution standard (point 2.1.) fait apparaître 3 pics dans le profil d'électrophorèse (Fig. II. 4). Le premier pic correspond au GSSG, le second au GSH-NEM et le troisième au GSH

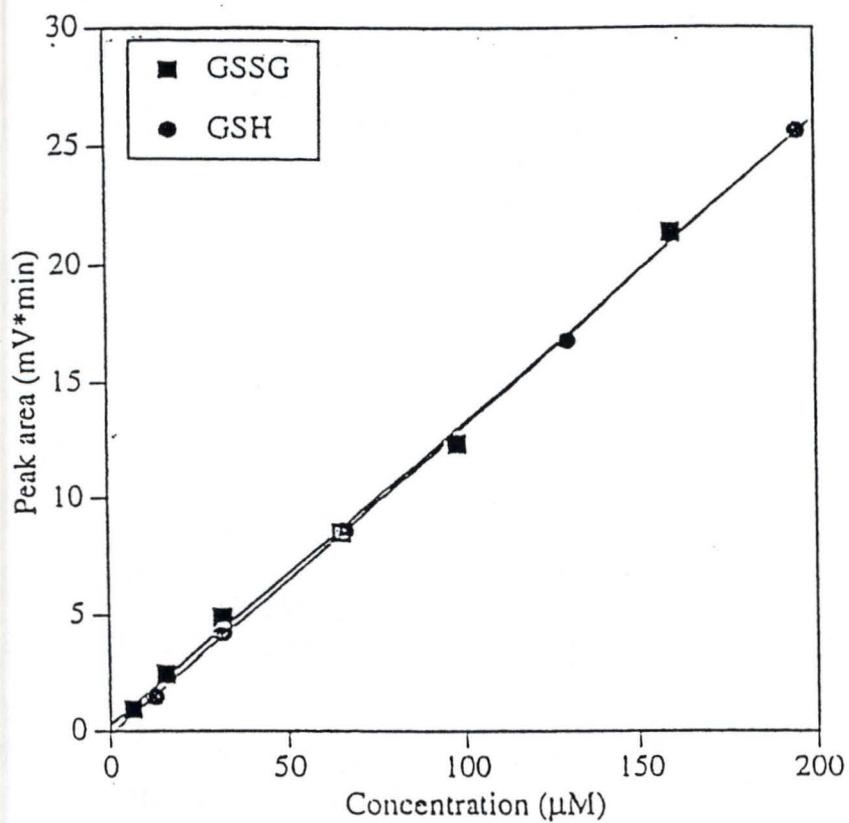


Fig. II. 5.: Courbe de calibration de solution standard de GSSG et GSH. L'aire des pics obtenus après électrophorèse, augmente linéairement avec la concentration en GSSG et GSH. (Renard et al., soumis pour publication).

non lié au NEM. L'aire des pics correspondants augmente linéairement avec la concentration (Fig. II. 5).

Un facteur de correction de 2,4 doit être apporté à l'intégration du pic de GSH car le GSH lié au NEM absorbe 2,4 fois plus que le GSH seul et le GSSG à 200 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de glutathion oxydé par rapport au glutathion total contenu dans l'extrait cellulaire:

$$\frac{\% \text{ GSSG}}{(\text{GSH}/2,4) + \text{GSSG}}$$

3. DOSAGE DE PROTEINES.

Le dosage des protéines présentes dans les extraits cellulaires est réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

3.1. MATERIELS

- Réactif de protéines: bleu de Coomassie brillant G-250 (100 mg dissous dans 50 ml d'éthanol 95 %). 100 ml d'acide phosphorique 85 % sont ajoutés à cette solution qui est filtrée avec un papier Wathman n°1.
- Etalon: albumine sérique bovine (BSA). L'étalon est dilué dans l'eau distillée de manière à obtenir 3 solutions à 2,5, 5 et 7,5 $\mu\text{g/ml}$
- Blancs: 0,8 ml d'eau distillée.
- Echantillons: 0,8 ml d'eau distillée + x μl d'échantillon.

3.2. METHODE

200 μl de colorant sont ajoutés à chaque tube de minute en minute et les tubes sont vortexés. L'absorbance à 595 nm est mesurée après 5 minutes d'incubation avec le colorant. Les échantillons se colorent en bleu, l'intensité de la coloration étant proportionnelle à la quantité de protéines. Les blancs et les 3 solutions étalons sont réalisés en triples, les échantillons en double. On calcule la moyenne des DO des blancs, étalons et échantillons. La moyenne de DO des blancs est ensuite soustraite des moyennes des DO des autres échantillons. On réalise une droite d'étalonnage avec les DO en ordonnée et les 3 solutions étalon en abscisse. L'équation de la droite de régression passant par les 3 points nous permet d'estimer la quantité de protéines de chaque échantillon.

4. WESTERN BLOTS.

Nous avons utilisé la technique du western blot pour détecter la COX-2 dans les extraits cellulaires. Cette technique comprend 6 étapes:

- L'extraction des protéines cellulaires.
- La séparation des protéines par électrophorèse.
- Le transfert des protéines sur un support solide (une membrane de PVDF; NEN, Boston).
- Le traitement de la membrane de manière à limiter la fixation non-spécifique.
- La détection de la protéine d'intérêt par un anticorps spécifique
- La révélation par chémiluminescence.

4.1. MATERIELS

4.1.1. Extraction des protéines

- Tampon de lyse : -0,5 % de Nonidet P-40 (Sigma, USA)
 - EGTA 2 mM (Sigma, USA)
 - Tris 50 mM (Merck, Germany)
 - SDS 0,2 % (Serva, Boehringer Ingelheim)
 - β -Glycérophosphate 1,296 mg/ml (Sigma, USA)
 - NaF 0,42 mg/ml (Merck, Germany)
 - Na_3VO_4 0,184 mg/ml (Sigma, USA)
 - Apoprotine 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (Sigma, USA)
 - Leupeptine 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$
 - Péfabloc 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (Boehringer Mannheim)
- PBS: tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9 %, pH 7,4.

4.1.2. Electrophorèse

- Gel séparateur d'acrylamide à 10 % composé de:
 - 14 ml de tampon Tris 2 M, pH 8,8 (Merck, Allemagne)
 - 12,5 ml d'acrylamide 30 % (Serva, Boehringer Ingelheim) / bisacrylamide 0,15 % (Gibco BRL, UK)
 - 0,187 ml de SDS 20 % (Merck, Allemagne)
 - 10,8 ml de H_2O
 - 20 μl de TEMED (Bio-Rad, USA)
 - 75 μl de persulfate d'ammonium 10 % fraîchement préparé (Serva, Boehringer Ingelheim)
- Gel concentrateur à 3 % composé de:

- 2,5 ml de tampon Tris 0,5 M, pH 6,8 (Merck, Allemagne)
 - 1,5 ml d'acrylamide 30 % / bisacrylamide 0,8 %
 - 50 µl de SDS 20 % (Serva, Boehringer Ingelheim)
 - 15 µl de TEMED (Bio-Rad, USA)
 - 50 µl de persulfate d'ammonium 10 % (fraîchement préparé)
- Tampon d'électrophorèse:
 - Tris 0,0125 M (Merck, Allemagne)/ Glycine 0,1 M (Merck, Allemagne); pH 8,3
 - SDS 0,025 % (Serva, Boehringer Ingelheim)
- Tampon d'échantillon:
 - Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 (Merck, Allemagne)
 - SDS 4,6 % (Serva, Boehringer Ingelheim)
 - Glycérol 20 % (Merck, Allemagne)
 - Bleu de bromophénol 0,006 % (Janssen Chimica, Belgique)
 - β-mercaptoéthanol 10 % (Fluka, Italie)
- Etalon de poids moléculaires (10 µl):
 - 5 µl d'étalon de 45 000 à 200 000 (Bio-Rad, USA)
 - 45 µl de tampon Tris 0,5 M, pH 6,8
 - 50 µl de tampon d'échantillon

4.1.3. Transfert sur une membrane

- Tampon de transfert: Tris 20 mM (Merck, Allemagne), glycine 1 mM, (Merck, Allemagne) pH 8,3. On ajoute du méthanol 20 % final (Janssen Chimica, Belgique).

4.1.4. Traitement de la membrane et révélation

- Solution de coloration au Rouge ponceau: 1 g de Rouge Ponceau (0,2 % final) (Merck, Allemagne) est dissous dans 75 ml d'acide trichloroacétique 20 % (Merck, Allemagne). La solution est portée à un volume de 500 ml avec de l'eau distillée.
- blotto 5 % (fraîchement préparé):
 - PBS: tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9 %, porté à pH 7,4.
 - Lait en poudre 5 % (Gloria)
 - Merthiolate 0,001 % (Fluka, Belgique)
 - Tween 20 0,1 % (Sigma, USA)
- TBS-T: solution TBS + Tween 20 0,1 % pH 7,4:
 - Tris 0,02 M (Merck, Allemagne)
 - NaCl 0,137 M (Merck, Allemagne)
 - Tween 20 0,1 % (Merck, Allemagne)

Une partie de cette solution est conservée telle quelle pour diluer les anticorps, le reste étant additionné de lait en poudre 0,1 % final.

- Anticorps anti-cox-2, anticorps monoclonal de souris dilué 1 000 x dans du TBS-T (0,15 µg/ml) (Transduction Laboratories)
- Anticorps secondaire anti-immunoglobuline de souris lié à la peroxydase de raifort (HRP) dilué 5 000 x (Amersham)
- Révélateur (western blot chemiluminescence, NEN, Boston)
- Hyperfilms MP pour isotopes émettant des radiations β et γ (RPN6, Amersham, Belgique).
- Révélateur dilué 5 x (Ilford, Grande-Bretagne).
- Fixateur dilué 5 x (Ilford, Grande-Bretagne).

4.2. METHODE

4.2.1. Stimulation et préparation des extraits cytosoliques

Les cellules sont repiquées dans des T75. Lorsqu'elles sont confluentes, elles sont rincées 24 heures dans 10 ml de MEM + HLA 0,2 % avant la stimulation. Après l'incubation en présence du stimulant (10 ml d'IL-1 ou de TNF- α) à différents temps les boîtes sont rincées 2 x avec 10 ml de PBS froid.

Nous avons préparé des extraits protéiques totaux en raclant les cellules directement dans 200 µl de tampon de lyse. Les extraits sont ensuite transférés dans des eppendorfs. Ils sont incubés 30 minutes à 4°C puis centrifugés 20 minutes à 13 000 rpm, à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires (centrifugeuse Heraeus Biofuge 17RS). Le surnageant est ensuite aliquoté et congelé à -20°C. On dose les protéines selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

4.2.2. Electrophorèse

Le gel séparateur est coulé entre les plaques de verre jusqu'à environ 1,5 cm en dessous du peigne. On dépose une couche d'isobutanol saturé en eau à la surface du gel afin d'éviter des défauts de polymérisation occasionnés par la présence d'oxygène. Après 1 heure de polymérisation, l'isobutanol est retiré et remplacé par de l'eau. L'eau est retirée complètement et le gel concentrateur est coulé jusqu'au bord des plaques, on place le peigne et on laisse polymériser pendant 45 à 60 minutes. Le peigne est ensuite enlevé et le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse en présence du tampon d'électrode.

Préparation des échantillons: les échantillons sont dilués dans le tampon Tris 0,5 M; pH 6,8 de manière à obtenir 25 µg de protéines dans 20 µl. Les échantillons sont ensuite additionnés d'un volume de tampon d'échantillon égal au volume de protéines déposé sur le gel, soit 20 µl puis dénaturés à 100°C pendant 5 minutes.

Les échantillons sont chargés sur le gel et migrent à 30 mA à travers le gel concentrateur (30 min) puis à 45 mA à travers le gel séparateur (2h30)

4.2.3. Transfert des protéines sur une membrane

On utilise une membrane PVDF (Polyscreen, NEN). Après l'électrophorèse la membrane est assouplie dans du méthanol 100 % pendant 15 minutes puis équilibrée dans du tampon de transfert.

La membrane et le gel sont placés dans un système sandwich et déposés dans l'appareil de transfert, le gel du côté du pôle négatif et la membrane du côté du pôle positif.

Préparation du système "sandwich":

- support en plastic
- tampon "Scotch Brite"
- 2 feuilles de papier Whatman
- membrane PVDF
- gel séparateur
- 2 feuilles de papier Whatman
- Tampon "Scotch Brite"
- support en plastic

On applique une différence de potentiel de 30 volts à 4°C durant la nuit. Les protéines migrent du gel vers la membrane puisque chargées négativement à cause du SDS.

4.2.4. Traitement de la membrane et révélation

Le lendemain matin on termine le transfert en augmentant le voltage à 50 volts pendant 30 minutes.

La membrane est colorée 5 minutes au Rouge Ponceau, puis rincée 2 à 3 fois à l'eau distillée. On marque au crayon la position des protéines étalons.

On décolore la membrane dans du PBS 1 x, puis on la place dans un sac plastique en présence de 30 ml de Blotto 5 % pendant 1 heure à température ambiante sous agitation, afin de limiter les adsorptions non spécifiques.

La membrane est rincée 3 x avec du TBS-T + lait (1 x 15 minutes et 2 x 5 minutes)

On replace la membrane dans un sac plastique pour l'incuber 2h30 en présence de l'anticorps primaire (anti-COX-2).

On enlève la membrane du sac et on la lave 3 x 15 minutes avec du TBS-T + lait.

Pour ajouter l'anticorps secondaire on replace la membrane dans un sac en plastique en présence de l'anticorps anti-souris lié à la HRP pendant 1 heure.

On retire la membrane du sac plastique pour la laver dans du TBS-T, 1 x 15 minutes et 4 x 5 minutes.

La révélation se fait en chémiluminescence, la peroxydase catalysant la réaction de décomposition de l' H_2O_2 en H_2O et $\text{O}_2^{(\cdot)}$. Les anions superoxydes oxydent le luminol qui émettra de la lumière en retournant de son état excité à son état fondamental. La membrane est remplacée dans un sac plastique et mise en présence du liquide de révélation pendant 1 minute. Un maximum de liquide est éliminé et la membrane est placée dans une cassette d'autoradiographie. En chambre noire on expose un film sur la membrane durant environ 10 minutes. Le film est placé dans le révélateur jusqu'à ce que les bandes apparaissent, puis dans l'eau distillée pendant 30 secondes et ensuite dans le fixateur durant 4 minutes. Le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

5. DOSAGE DE L'H₂O₂.

Le dosage d'H₂O₂ intracellulaire a été effectué à l'aide d'une sonde fluorescente en se basant sur la méthode décrite par Legrand-Poels et al. (1997) sur les cellules U937, adaptée aux cellules adhérentes (communication personnelle de Jacques Piette, Université de Liège).

5.1. MATERIELS

- Sonde fluorescente (6 carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate, di(acétoxyméthyl ester), Molecular Probes, n° C-2938) diluée à 20 mM dans du DMSO. $\lambda_{exc} = 504 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 529 \text{ nm}$
- PBS: tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 + 0,9% NaCl.
- MEM + HLA (0,2 %)
- Tampon de lyse:
 - EDTA 0,1 mM (Merck, Allemagne)
 - MgCl₂ 2 mM (Merck, Allemagne)
 - KCl 10 mM (Merck, Allemagne)
 - HEPES 10 mM (Acros, Belgique)
 - Nonidet P-40 0,2 %

5.2. METHODE

La sonde est diluée dans du PBS à 37°C de manière à obtenir une concentration finale à 20 μM . Les cellules sont cultivées dans des T25. Lorsqu'elles sont confluentes, on les rince 1 heure dans du MEM + HLA, puis 2 x avec du PBS à 37°C. La sonde fluorescente est chargée dans les cellules pendant 15 minutes à 37°C, ensuite les cellules sont rincées avec du MEM + HLA.

On stimule les cellules avec l'Il-1 β , le TNF- α à une concentration de 5 ng/ml pendant différents temps ou avec du H₂O₂ à différentes concentrations à 37°C. Après la stimulation, les cellules sont rincées 2 x avec du PBS froid, puis raclées dans 1 ml de tampon de lyse. Les extraits sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré afin de mesurer sa fluorescence dans une cuvette réduite au spectrofluorimètre. Le tampon de lyse sert de blanc.

Après un dosage de protéines selon la méthode de Bradford, on rapporte les unités relatives de fluorescence à 1 μg de protéines.

6. TEST DE CYTOTOXICITE.

Nous avons vérifié que les molécules dont nous étudions l'impact sur les cellules ne sont pas toxiques sur celles-ci. Pour ce faire nous avons utilisé la méthode au bromure d'éthidium et acridine orange (Parks et al., 1979). L'acridine orange pénètre dans les noyaux des cellules vivantes et le colore en vert fluorescent, tandis que le bromure d'éthidium colore en orange le noyau des cellules mortes.

6.1. MATERIELS

- Milieu de culture: MEM + Se + HLA
- PBS: tampon phosphate 10 mM contenant 0,9 % de NaCl et à pH 7,4
- Solution de coloration: 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma, USA) et 15 mg d'acridine orange (Sigma, USA) sont dissous dans 1 ml d'éthanol à 95 % et 49 ml d'eau. Cette solution est fractionnée en aliquots de 1 ml et stockée à -20°C . Nous l'utilisons diluée 100 fois dans du PBS.
- Boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre (Falcon, USA)
- Microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz)

6.2. METHODE

Les cellules adhèrent aux boîtes de Pétri dans 2 ml de MEM + SB. Le milieu est décanté et les cellules sont rincées avec du milieu sans sérum. Ensuite les cellules sont incubées, pendant différents temps, dans 1 ml de MEM + HLA contenant la molécule dont on veut tester la cytotoxicité. Les boîtes contrôles ne reçoivent que du milieu seul. Après l'incubation le milieu est décanté, les boîtes sont rincées avec du PBS, puis on ajoute trois gouttes de la solution de coloration. Les cellules sont alors observées au microscope à fluorescence et on réalise un comptage différentiel (cellules vertes et oranges séparément) sur un total de ± 300 cellules. Le pourcentage de survie est égal au nombre de cellules vertes sur le nombre de cellules totales (vertes et oranges).

7. RETARD SUR GEL

Afin de mettre en évidence la liaison ou la non liaison d'un facteur transcriptionnel à une séquence génomique, nous utilisons la technique de retard sur gel ou "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA).

Un oligonucléotide double brin contenant la séquence cible d'un facteur de transcription est incubé en présence d'un extrait cellulaire avant d'être déposé sur un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes. En cas de présence de la protéine active dans l'extrait cellulaire, elle se lie à l'oligonucléotide marqué. La migration du complexe acides nucléiques-protéine étant plus lente que celle de la sonde libre, on observe un retard de migration par rapport à la sonde seule (fig. II. 6).

7.1 MATERIELS

7.1.1. Extraction protéique

- PBS: tampon phosphate 10 mM additionné de NaCl 0,9 %, porté à pH 7,4
- Tampon de lyse:
 - HEPES: 0,02 M, pH 7,5 (Janssen Chimica, Belgique)
 - NaCl: 0,35 M (Merck, Allemagne)
 - Glycérol: 20 % (Merck, Allemagne)
 - NP-40: 1 % (Sigma, USA)
 - MgCl₂: 1mM (Merck, Allemagne)
 - EDTA: 0,5 mM, pH 7,5 (Titriplex, Merck, Allemagne)
 - EGTA: 0,1 mM, pH 7,5 (Sigma, USA)

Ce tampon est porté à 100 ml, autoclavé et additionné de leupeptine:

- Leupeptine 10 µg/ml final (Sigma, USA)
- Avant chaque utilisation, on ajoute fraîchement:
 - DTT 50 mM final (Sigma, USA)
 - Péfabloc 2 µM final (Boehringer, Allemagne)
 - Aprotinine 0,1 U/ml final (Sigma, USA)

7.1.2. Marquage de la sonde

- Mélange réactionnel (pour un total de 10 μ l):
 - 1 μ l d'oligonucléotide NF- κ B (Proméga n°E329A, USA). Il est constitué de 22 paires de bases et reproduit la séquence enhancer de la chaîne légère des immunoglobulines de cellules B:
5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'
3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'
 - 6,5 μ l d'H₂O
 - 0,5 μ l T4 kinase à 10 U/ μ l (n°174645, Boehringer, Allemagne)
 - 1 μ l [γ -³²P] ATP 3 000 Ci/mmol (NEG-002A, NEN Dupont, Belgique)
- Colonne Quick Spin Sephadex G-25 Fine (Boehringer, Allemagne)
- Tampon TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, pH 8
- Centrifugeuse: Jouan B.311 (Jouan, France)
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)

7.1.3. Liaison sonde-protéine

- Le tampon permettant la liaison entre l'oligonucléotide et les protéines ("binding buffer") est composé de:
 - HEPES: 0,01 M, pH 7,5 (Janssen Chimica, Belgique)
 - Glycérol: 20 % (Merck, Allemagne)
 - KCl: 300 mM (Merck, Allemagne)
 - DTT: 20 mM (Sigma, USA)
- Par échantillon, le mélange réactionnel comprend:
 - 4 μ l d'H₂O
 - 4 μ l de "binding buffer"
 - 2 μ l de poly dI-dC: (Boehringer, Allemagne) resuspendu à une concentration finale de 1 mg/ml dans du tampon Tris 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM. Cette solution est fractionnée et congelée à -20°C.
 - 2 μ l SAB: albumine de sérum bovin sans DNAases (Sigma, USA)
 - fraction d'oligonucléotide marqué correspondant à 20 000 cpm
 - 25 μ g d'extrait protéique
 - 1 μ l de bleu de bromophénol 1 % (dilué dans du tampon de lyse)

7.1.4. Electrophorèse et autoradiographie

- Tampon d'électrophorèse (TBE 10 x):
 - Tris 0,9 M (Janssen Chimica, Belgique)
 - Acide borique 0,9 M (Merck, Allemagne)
 - EDTA 0,02 M (Merck, Allemagne)
- Gel d'électrophorèse (100 ml):
 - 14 ml d'une solution stock d'acrylamide 30 % / bisacrylamide 1 % (concentration finale en acrylamide: 4 %) (Bio-Rad, USA)
 - 5 ml de tampon d'électrophorèse (TBE 10 x)
 - 82,25 ml d'H₂O
 - 50 µl de TEMED (Bio-Rad, USA)
 - 0,6 ml d'une solution fraîche de persulfate d'ammonium 10 %
- Film MP pour isotopes émettant des radiations β et γ (Amersham, Grande-Bretagne)
- Révélateur dilué 5 x (Ilford, Grande-Bretagne)
- Fixateur dilué 5 x (Ilford, Grande-Bretagne)

7.2. METHODE

Nous avons utilisé la méthode décrite par Renard et al. (1997). En voici les différentes étapes:

7.2.1. Culture de cellules

Les cellules sont repiquées dans des T75. Lorsqu'elles sont confluentes, elles sont rincées dans 10 ml de MEM + HLA 0,2 % pendant 30 minutes afin d'éviter les interférences entre molécules stimulatrices et sérum.

Les cellules sont ensuite stimulées durant 30 minutes avec 5 ng/ml d'IL-1, 5 ng/ml de TNF- α ou 50 µg/ml de tunicamycine.

Les boîtes contrôles sont incubées durant 30 minutes dans du milieu seul.

Les cellules stimulées avec l'IL-1 ou le TNF- α , peuvent l'être en présence de PDTC 10⁻⁴ M. Les boîtes sont préincubées une heure dans 10 ml de MEM + HLA + PDTC, ensuite le milieu est décanté et remplacé par du MEM + HLA + PDTC additionné d'IL-1 ou de TNF- α à la concentration de 5 ng/ml.

7.2.2. Extraction des protéines

Après 30 minutes de stimulation, les boîtes sont décantées, et rincées deux fois avec du PBS froid. Les cellules sont alors récoltées dans 1,4 ml de PBS froid, puis centrifugées 10 minutes à 1 000 rpm (centrifugeuse Heuræus Labofuge 400R). On décante le PBS et on resuspend le culot dans 200 µl de tampon de lyse. Après une incubation de 10 minutes à 4°C, le lysat cellulaire est centrifugé 20 minutes à 13 000 rpm afin d'éliminer l'ADN et les débris cellulaires (centrifugeuse Heuræus Biofuge 17RS). Le surnageant est récolté, aliquoté, et congelé à -70°C. un dosage de protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

7.2.3. Marquage de la sonde

Le mélange réactionnel décrit au point 7.1.3. est incubé 15 minutes à 37 °C, puis la réaction est arrêtée en ajoutant 2 µl d'EDTA 0,25 M. Les oligonucléotides sont ensuite séparés des nucléotides radioactifs grâce à une purification sur colonne Quick Spin: le gel de Sephadex est d'abord homogénéisé avant d'être asséché par une centrifugation de deux minutes à 400 g (centrifugeuse Jouan B.311). L'échantillon déposé sur la colonne subit ensuite une centrifugation similaire. La colonne est rincée trois fois avec 50 µl de tampon TE, chaque rinçage étant suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 400 g. L'oligonucléotide marqué est généralement récolté dans l'éluat du deuxième rinçage.

Le marquage de la sonde est évalué à l'aide du compteur à scintillation. La sonde oligonucléotidique est utilisée dans les 3 semaines suivant son marquage.

7.2.4. Liaison sonde-protéines

On décongèle les échantillons et on prélève pour chacun d'eux le volume d'extrait cellulaire correspondant à 25 µg de protéines. Les différents échantillons sont portés à un même volume de tampon de lyse. Les constituants du mélange réactionnel décrit au point 7.1.3. sont rassemblés en un pool qui est distribué dans les différents microtubes contenant les extraits protéiques. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 1 µl de bleu de bromophénol 1 % est ajouté à chaque échantillon avant de charger celui-ci sur le gel.

Pour chaque électrophorèse, on prévoit un puits où l'on fait migrer un contrôle négatif (tampon de lyse sans extrait protéinique + binding mixture contenant la sonde radioactive). Des travaux au laboratoire (Renard et al. , 1997) ont montré précédemment que la bande spécifique active correspond bien à l'hétérodimère p50-p65.

7.2.5. Electrophorèse et autoradiographie

Le gel décrit au point 7.1.4. est coulé dans un système d'électrophorèse Gibco n°V15-17 (Grande-Bretagne). Après une heure de polymérisation, le gel et le tampon d'électrophorèse sont placés dans la cuve afin de subir un 'pré-run' de 90 minutes à 100 V.

Les échantillons sont ensuite déposés au fond des puits et migrent pendant 2h30 à 100 V, jusqu'à ce que le front de migration atteigne les deux tiers de la hauteur du gel. Le gel est alors démoulé, placé entre un papier Whatman et un papier cellophane, puis séché sous vide à 80°C pendant une heure. Le gel est autoradiographié pendant 3 jours en présence d'un film MP pré-flashé.

Après 3 jours, nous révélons le film en le plaçant 4 minutes dans le révélateur, puis 30 secondes dans de l'eau distillée, et enfin 4 minutes dans le fixateur. Le film est rincé à l'eau courante avant d'être séché à l'air libre.

7.2.6. Quantification

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

ET DISCUSSIONS

RESULTS

STIMULATION	CTL	CTL-	IL-1	IL-1	TNF	TNF
PDTC	-	-	-	+	-	+

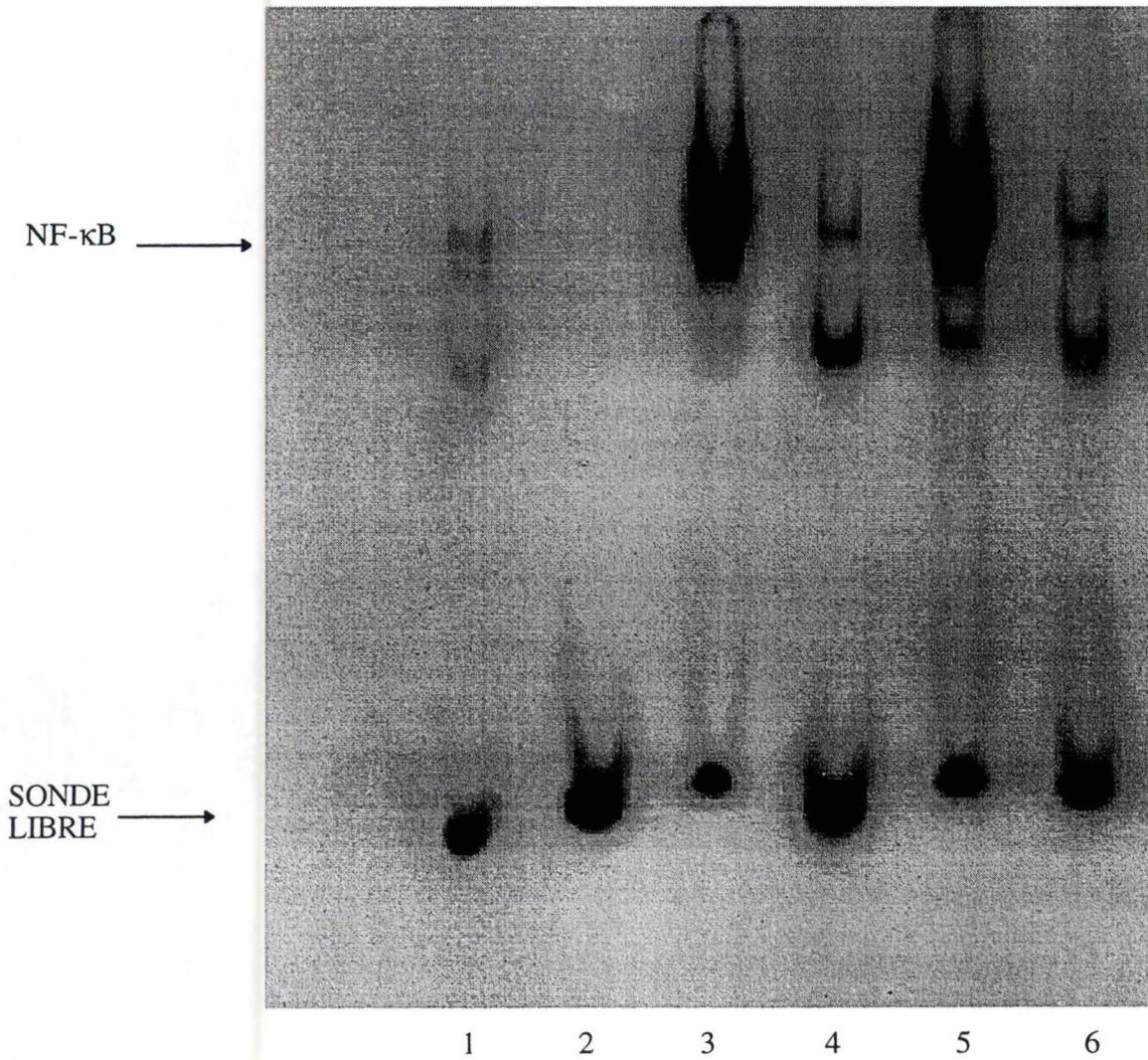


Fig. III. 1.: Autoradiographie d'un gel d'EMSA. La piste 1 correspond au contrôle (WI-38 VA13 incubées 30 minutes dans du MEM + HLA). La piste 2 correspond au contrôle négatif (mélange réactionnel + sonde, sans extrait cellulaire). Les pistes 3-4 et 5-6 correspondent respectivement aux extraits de cellules incubées 30 minutes avec de l'IL-1 (5 ng/ml) et du TNF (5 ng/ml), en présence de PDTC 10^{-4} M (piste 4 et 6).

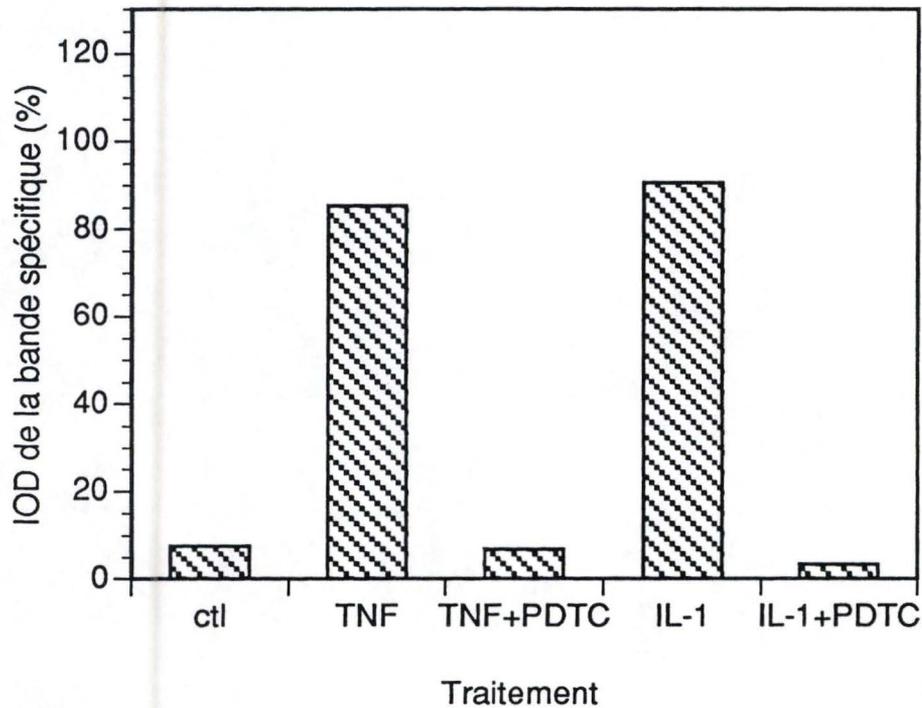


Fig. III. 2. : Effet du PDTC sur la liaison de NF- κ B actif à sa sonde spécifique. Les WI-38 VA13 sont incubées 30 minutes en présence de TNF- α ou d'IL-1 β 5 ng/ml en présence ou non de PDTC 10⁻⁴ M. Des cellules incubées 30 minutes dans du MEM + HLA servent de contrôle. L'IOD représente l'intégration de la densité optique de la bande retardée par la liaison de NF- κ B à la sonde. Le pourcentage d'IOD représente la fraction d'IOD de la bande spécifique par rapport à l'IOD totale sur la piste, soit la fraction de sonde qui est reconnue par NF- κ B actif.

1. ACTIVATION DE NF- κ B PAR L'IL-1 ET LE TNF- α

L'IL-1 et le TNF sont les deux principaux activateurs du facteur de transcription NF- κ B. Nous avons voulu vérifier cette activation dans des WI-38 VA13, fibroblastes immortalisés.

La mesure de l'activation de NF- κ B peut se réaliser de plusieurs manières. Nous en avons choisi deux:

- Le retard sur gel où l'on peut visualiser directement une activation et que l'on appelle encore EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).
- L'expression de gènes sous la dépendance de NF- κ B comme la COX-2 et l'IL-6.

1.1. EXPERIENCES DE RETARD SUR GEL

Nous savons que l'IL-1 β active NF- κ B dans les WI-38 VA13 et que cette activation est inhibée par le PDTC (Renard et al., 1997). Afin de vérifier si le TNF- α exerce un effet équivalent sur ces cellules nous avons réalisé une expérience de retard sur gel (voir point 7 du chapitre Matériels et méthodes).

La figure III. 1 montre une autoradiographie du gel. En observant cette radiographie on constate la présence de trois bandes principales, la bande se trouvant dans le bas du gel correspondant à la sonde radioactive libre. Dans le haut du gel on peut distinguer deux bandes retardées, la première correspond au facteur NF- κ B lié à la sonde. Ceci a été montré par Renard et al. (1997) dans une expérience dite de supershift. En effet, si les lysats de cellules stimulées par l'IL-1 β sont préincubées avec des anticorps anti-p50 ou anti-p65 (les sous-unités principales de NF- κ B), c'est la première bande qui est retardée par rapport aux extraits cellulaires non additionnés d'anticorps. On voit clairement qu'en présence de TNF- α , comme en présence d'IL-1 β , cette sonde spécifique est très marquée. On voit également qu'en présence de PDTC 10⁻⁴M, la sonde spécifique correspondant à l'hétérodimère p50/p65, diminue considérablement, pour les 2 cytokines.

Les autoradiographies des gels EMSA peuvent être analysées par un système d'analyse d'image (Visage 10, Millipore), ce qui permet d'avoir une meilleure idée de l'importance relative des différentes sondes pour une piste donnée. Les résultats sont donnés en IOD (integrated optical density). C'est ce qui a été fait pour le gel illustré à la figure III. 1 (Fig. III. 2). Cette figure montre clairement que pour les cellules stimulées, la sonde correspondant à l'hétérodimère actif p50/p65 représente plus de 80 % de la radioactivité totale de la piste, alors que pour les cellules non stimulées, elle représente moins de 10

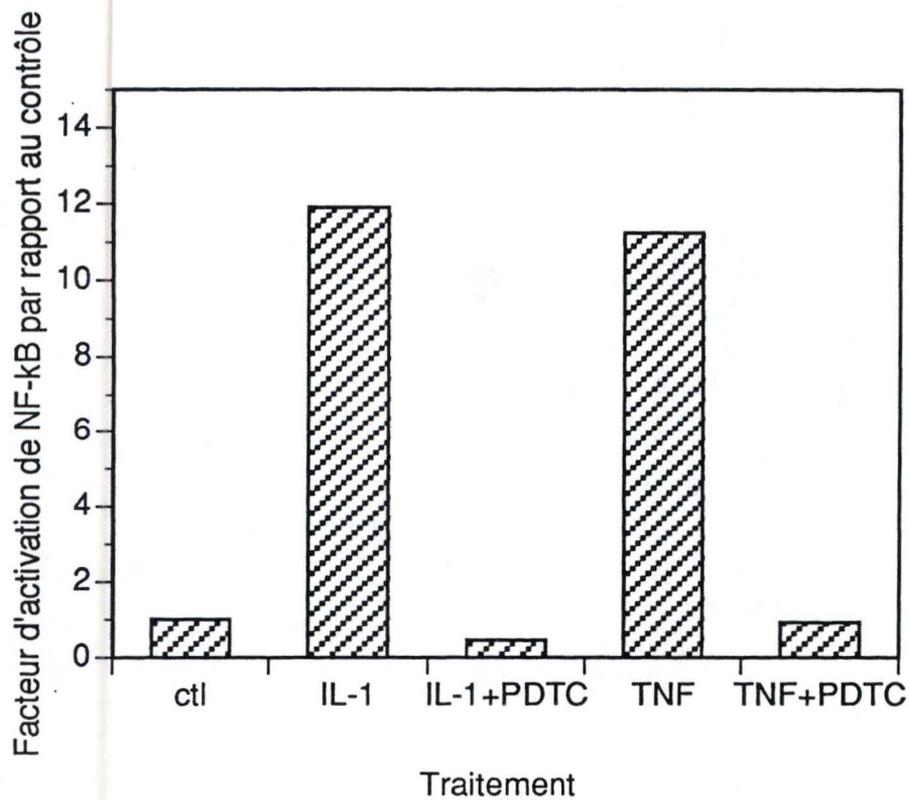
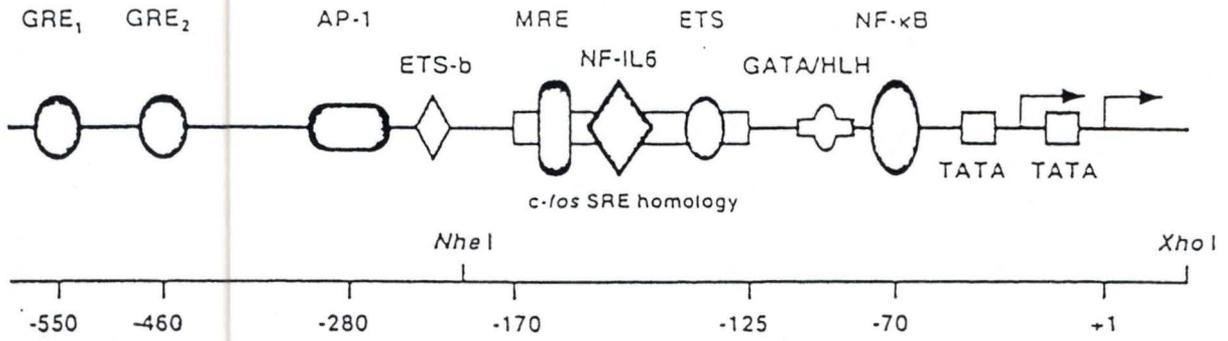


Fig. III. 3. : Effet du PDTC sur la liaison spécifique de NF- κ B à la sonde. Les WI-38 VA13 sont incubées 30 minutes avec de l'IL-1 ou du TNF 5 ng/ml dilués dans du MEM + HLA additionné ou non de PDTC 10^{-4} M. Le contrôle correspond à des cellules incubées 30 minutes dans du MEM + HLA seul. Les résultats représentent le rapport de l'IOD obtenue pour un traitement donné, par rapport à l'IOD obtenue pour les cellules contrôles. Pour les cellules contrôles, ce rapport égale 1.

A



B

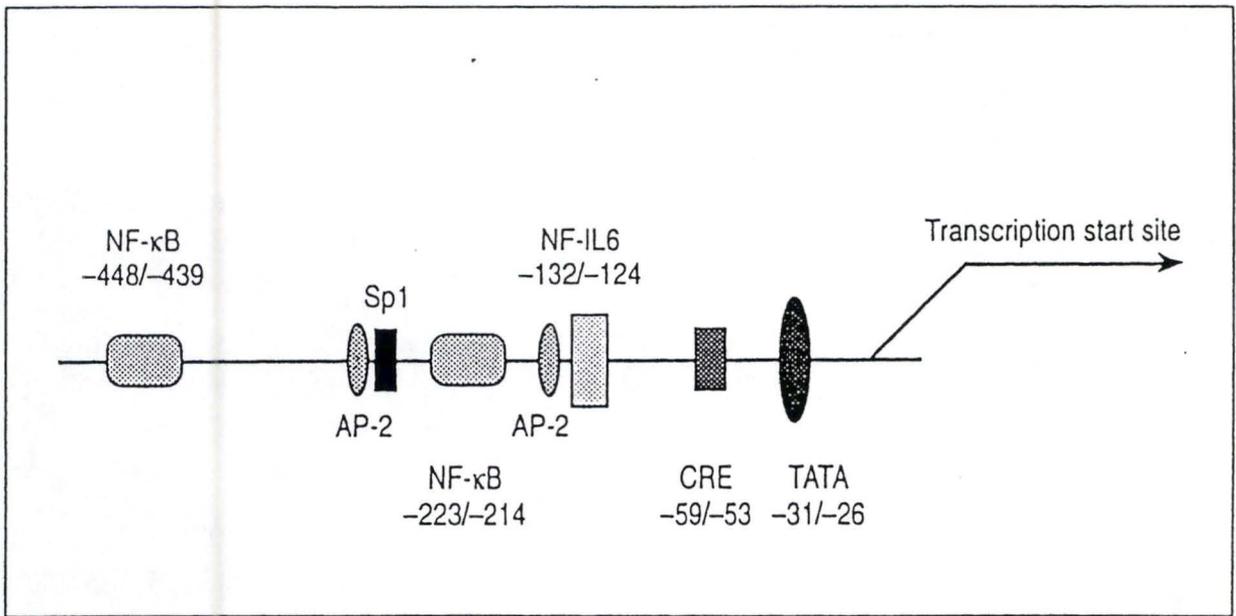


Fig. III. 4.: Représentation schématique des promoteurs pour les gènes encodant l'IL-6 (A) (Koj, 1996) et la COX-2, forme inductible de la cyclooxygénase (B) (Crofford, 1996).

%. En présence de PDTC, la sonde spécifique représente également moins de 10 %, bien que les cellules aient été stimulées avec les cytokines. Enfin, on peut estimer le facteur d'activation de l'hétérodimère p50/p65 dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles (Fig. III. 3). On constate qu'une stimulation des WI-38 VA 13 à l'IL-1 β permet une activation de NF- κ B d'un facteur 11,9. En présence de PDTC le facteur d'activation n'est plus que de 0,4. En ce qui concerne la stimulation au TNF- α elle active NF- κ B respectivement d'un facteur 11,2 et 0,9 sans et avec PDTC.

1.2. INDUCTION DES GENES SOUS LE CONTROLE DE NF- κ B

NF- κ B régule l'expression de nombreux gènes (voir point 3.3.3. de l'introduction). Au laboratoire, Renard et al. (1997) ont montré que dans les cellules WI-38 VA13, l'IL-1 β induisait la synthèse et la sécrétion de l'IL-6. Le gène de la COX-2 (cyclooxygénase-2) ou COX inductible, étant sous le contrôle de NF- κ B (Fig. III. 4) nous avons voulu savoir si une stimulation des cellules par l'IL-1 et le TNF induisait une néoexpression de la COX-2 dans les WI-38 VA13 et si cette expression était inhibée par le PDTC. Feng et son équipe ont en effet montré que des scavengers de radicaux hydroxyles inhibent l'induction de l'expression de la COX-2 par l'IL-1 β et le TNF- α (Feng et al., 1995).

Nous avons utilisé la technique du western blot. En bref, les cellules ont été stimulées pendant 3h30, 7h et 24h en présence d'IL-1 (5 ng/ml) et de TNF- α (5 ng/ml), en présence ou non de PDTC, 10^{-4} M. Le contrôle correspond aux cellules non stimulées. Les cellules ont ensuite été traitées spécifiquement pour le western blot (point 4.2.1. du chapitre Matériels et méthodes). Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à obtenir un marquage spécifique pour une bande au poids moléculaire attendu (700 kDa), malgré plusieurs tentatives, probablement en raison de problèmes de spécificité de l'anticorps anti-COX-2. Un nouvel anticorps a été commandé, mais nous n'avons pas eu l'occasion de le tester dans le cadre de ce travail.

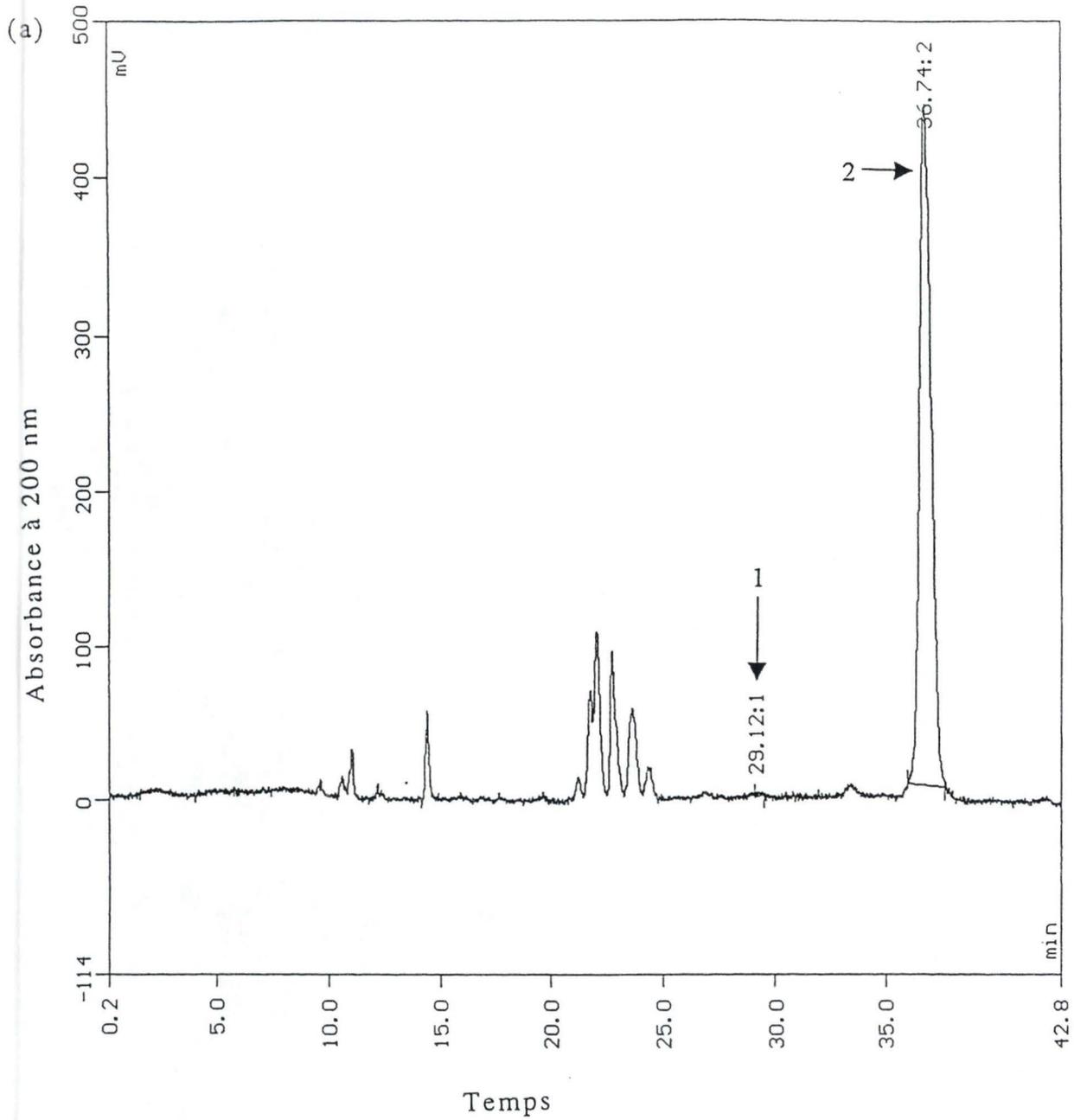
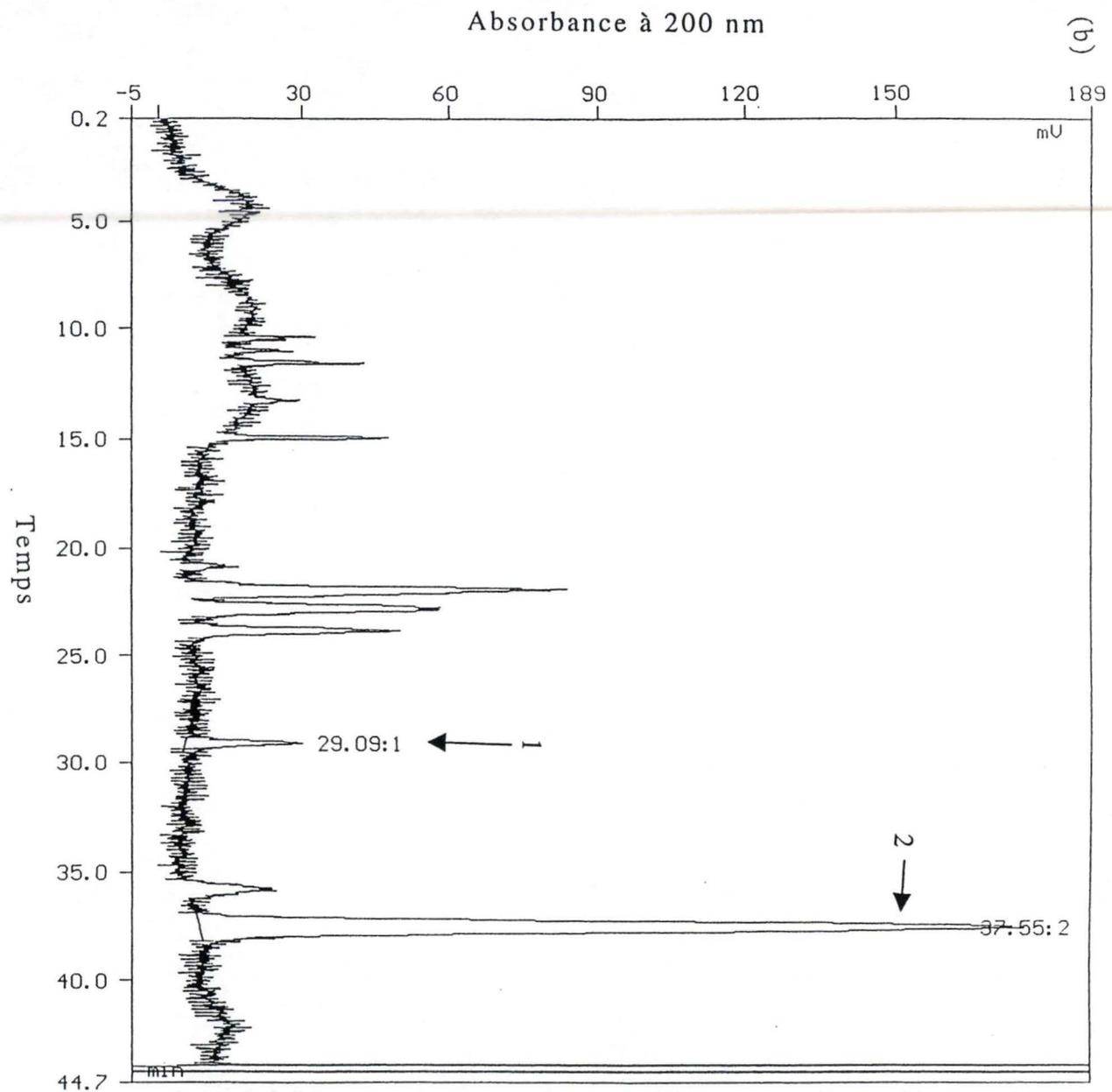
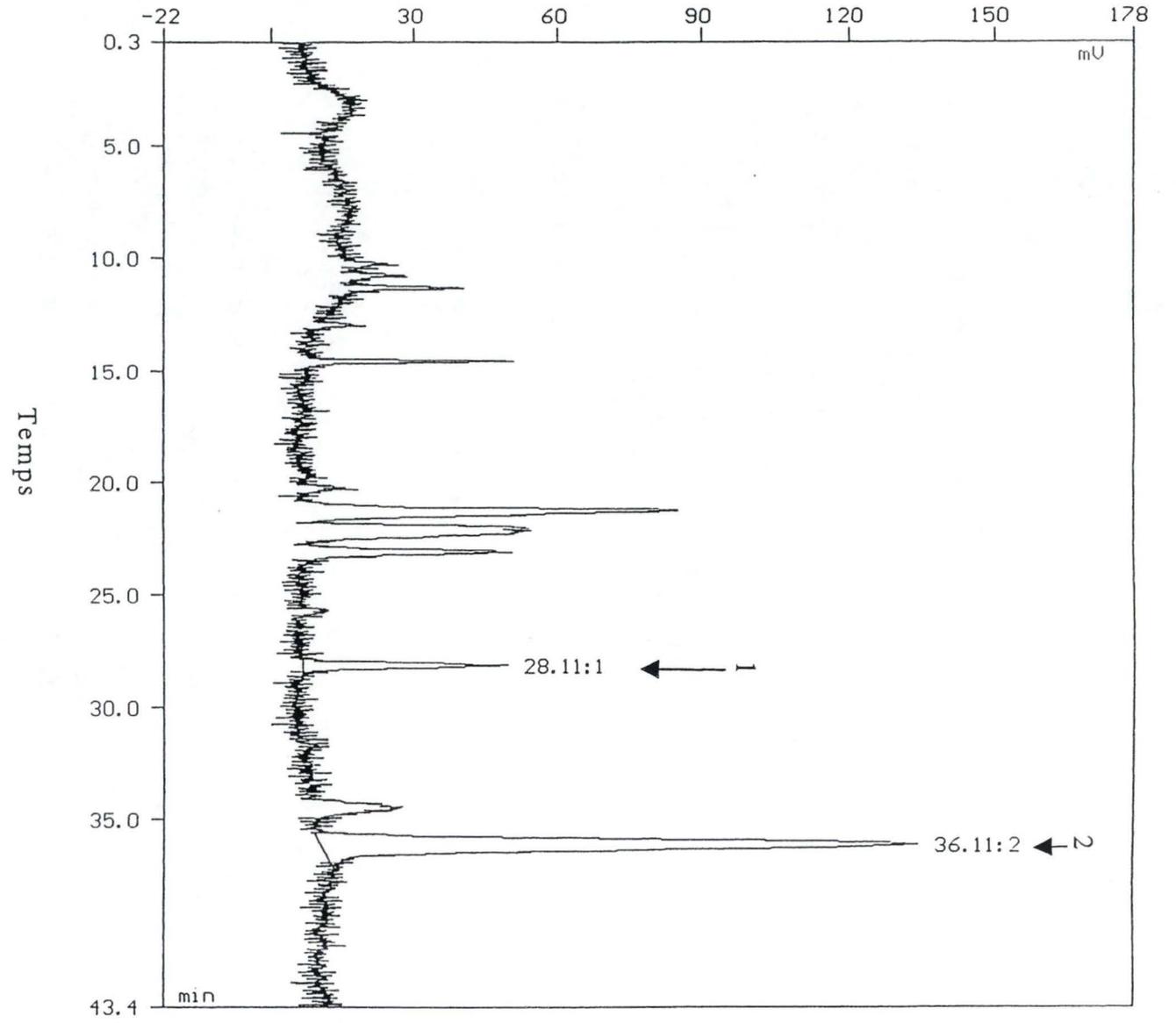


Fig. III. 5. : Profils d'électrophorèse d'extraits cellulaires. Les WI-38 VA13 sont incubées 10 minutes; (a) dans du MEM + HLA 0,2 %, (b) dans H₂O₂ 0,5 mM dilué dans du MEM + HLA, (c) dans H₂O₂ 1 mM dilué dans du MEM + HLA. Le pic n°1 correspond au GSSG, le pic n°2 correspond au GSH.



Absorbance à 200 nm

(c)



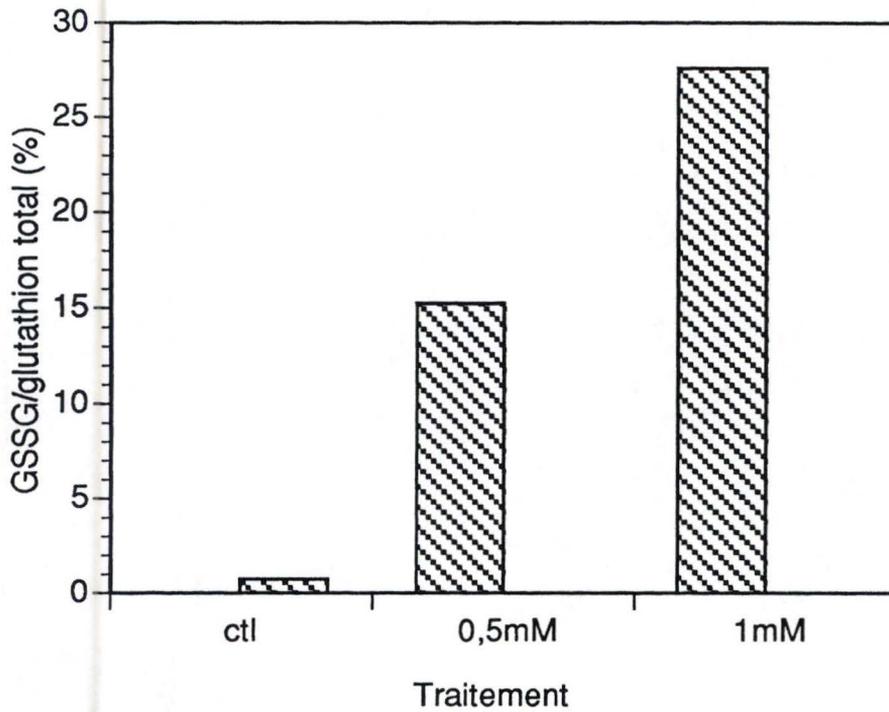


Fig. III. 6.: Effet du peroxyde d'hydrogène sur le glutathion oxydé. Les WI-38 VA13 sont incubées 10 minutes en présence de peroxyde d'hydrogène 0,5 ou 1 mM. Le glutathion a également été dosé dans des cellules contrôle non stimulées (incubées 10 minutes dans du MEM + HLA). Les résultats sont exprimés par rapport au glutathion total contenu dans les cellules (GSH + GSSG) comme expliqué au point 2.2.2. du chapitre %atériels et méthodes.

2. MISE EN EVIDENCE D'UN STRESS OXYDATIF INDUIT PAR L'IL-1 β ET LE TNF- α

Comme nous en avons parlé dans l'introduction (point 2.3.3), les ROIs sont supposés agir comme messagers secondaires dans l'activation de NF- κ B. Dans le cas du TNF- α l'augmentation d'espèces oxydantes dans la cellule proviendrait d'un dérèglement de la chaîne mitochondriale transportant les électrons. Dans le cas de l'IL-1 β le mécanisme conduisant à un stress oxydatif n'est pas connu.

Dans ce chapitre nous avons essayé de préciser la nature du stress oxydatif induit par l'IL-1 β et le TNF- α . Pour ce faire, nous nous sommes focalisés d'une part sur la balance GSSG/GSH; d'autre part sur une production éventuelle de H₂O₂.

2.1. MODIFICATION DE LA BALANCE GSSG/GSH

Le rapport glutathion oxydé (GSSG), glutathion réduit (GSH) semble influencer de manière significative l'activation de NF- κ B dans certaines cellules (Staal et al., 1990; Schreck et al., 1991; Renard et al., 1997).

Au repos la concentration en glutathion réduit est de 1 à 2 mM tandis que le glutathion oxydé se trouve à une concentration beaucoup plus faible de l'ordre du μ M (Piccoli et al., 1994).

2.1.1. Dosage du glutathion

Le glutathion n'est pas un métabolite stable et il est difficile à doser. Parmi les nombreuses méthodes décrites pour doser et sa forme réduite et sa forme oxydée, nous avons choisi la méthode de Piccoli et al. (1994), par électrophorèse capillaire. Cette méthode décrite pour des globules rouges a été adaptée et modifiée pour pouvoir s'appliquer aux cellules WI-38 VA13 adhérentes (Renard et al., soumis pour publication) (voir point 2 du chapitre Matériels et méthodes). Une droite d'étalonnage a également été établie pour le GSSG et le GSH comme décrit dans les Matériels et méthodes, point 2). Nous avons tout d'abord testé la méthode en incubant les cellules 10 minutes en présence d'H₂O₂ 0,5 et 1 mM. Le peroxyde d'hydrogène, après être rentré dans la cellule, est réduit en H₂O par la glutathion peroxydase, le GSH étant transformé en GSSG.

Les résultats obtenus après électrophorèse capillaire (Fig. III. 5) montrent bien une augmentation du pic de GSSG grâce aux droites d'étalonnage, on peut convertir les données et les exprimer en % de GSSG par rapport au glutathion total (Fig. III. 6). Cette figure montre

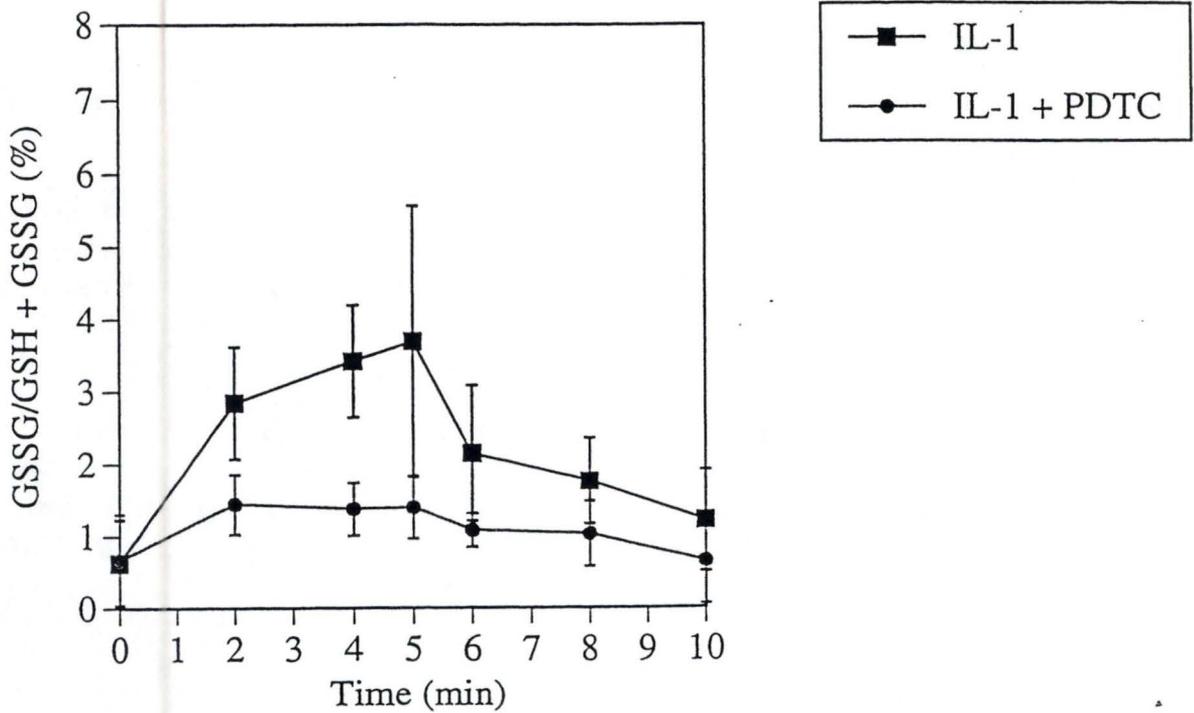


Fig. III. 7.: Effet de l'IL-1 (5 ng/ml) sur le glutathion oxydé. Les cellules WI-38 VA13 sont incubées pendant différents laps de temps avec l'IL-1 β . Le glutathion est ensuite dosé comme décrit précédemment. L'expérience a été réalisée en présence (\bullet), ou en l'absence (\blacksquare) de PDTC. Chaque valeur représente la moyenne de 4 expériences indépendantes \pm un écart-type.

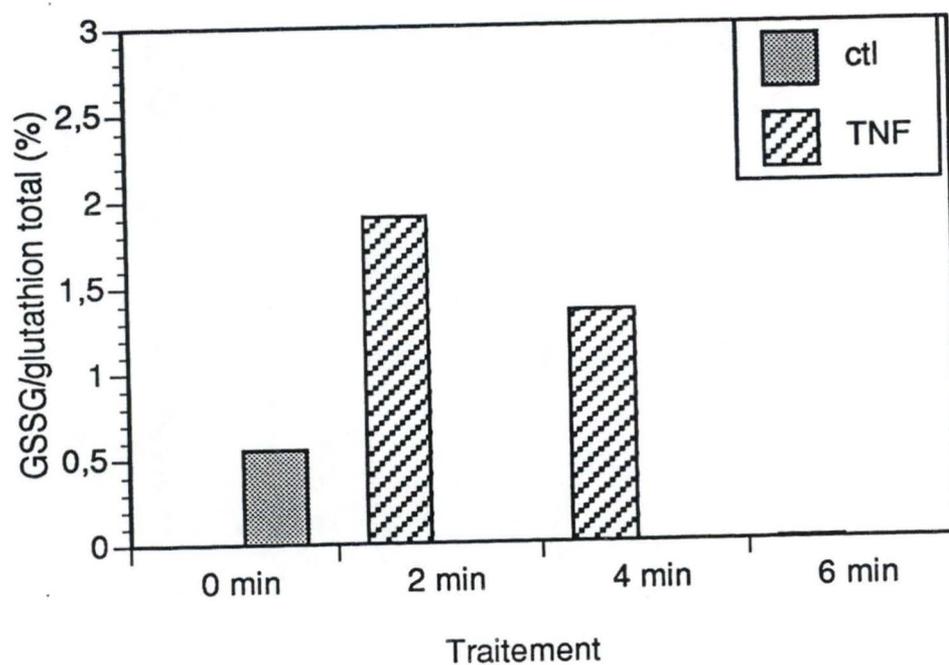


Fig. III. 8.: Effet du TNF sur le glutathion oxydé. Les WI-38 VA13 sont incubées pendant différents temps, 2, 4 et 6 minutes, avec du TNF 5 ng/ml. Le glutathion a aussi été dosé dans des cellules contrôle non stimulées. Nous avons choisi un contrôle à 0 minutes. Les résultats sont exprimés par rapport au glutathion total contenu dans les cellules (GSH + GSSG) comme expliqué au point 2.2.2. du chapitre Matériels et méthodes.

bien l'élévation du glutathion oxydé. On note également une augmentation du rapport GSSG/GSH: il est respectivement de 1/136, 1/6 et 1/3 dans les cellules contrôles, stimulées par H₂O₂ 0,5 mM et stimulées par H₂O₂ 1 mM.

2.1.2. Effets des cytokines sur la balance GSSG/GSH

Les résultats obtenus avec le H₂O₂ nous ont confirmé qu'une augmentation du GSSG dans la cellule est mesurable par l'électrophorèse capillaire. Nous avons alors testé l'effet de l'IL-1 β sur le glutathion, en collaboration avec Patricia Renard. Les cellules ont été incubées pendant des temps courts (entre 0 et 10 minutes) avec l'IL-1 β (5 ng/ml) et ensuite traitées pour le dosage du glutathion par électrophorèse capillaire. Les résultats obtenus sont renseignés à la figure III. 7. Cette figure montre que dans les cellules WI-38 VA13, le niveau basal de GSSG atteint un peu moins de 1 %. Après stimulation à l'IL-1 β , le GSSG augmente et atteint entre 3 et 4 % du glutathion total. Mais cette modification du rapport GSSG/GSH est transitoire: elle est maximale après 5 minutes d'incubation avec l'IL-1 à 5 ng/ml et disparaît après 10 minutes. Le rapport GSSG/GSH est très différent de celui obtenu lors d'une incubation avec H₂O₂.

Ce graphique permet également de constater l'effet du PDTC, antioxydant, sur les cellules stimulées par l'IL-1. En présence de PDTC on constate qu'on annule presque totalement l'accroissement du taux de glutathion oxydé. Le PDTC est fréquemment utilisé pour inhiber l'activité de NF- κ B (Schreck et al., 1992; Renard et al., 1997).

Nous avons ensuite testé l'effet du TNF- α sur le rapport GSSG/GSH. Les cellules sont incubées en présence de 5 ng de TNF- α par millilitre pendant 2, 4 et 6 minutes, puis traitées pour l'électrophorèse capillaire. Les résultats sont alors exprimés en pourcentage de glutathion oxydé par rapport au glutathion total. Le graphique de la figure III. 8. permet de constater un léger accroissement du rapport glutathion oxydé/glutathion total. Cependant le maximum de ce rapport se situe à 2,35 % (TNF 2 minutes) tandis que dans le cas de l'H₂O₂ il était de 27,6 % (H₂O₂ 1 mM, 10 minutes). Comme dans le cas de l'IL-1, l'augmentation du rapport est transitoire. Les rapports GSSG/GSH sont respectivement de 1/181, 1/52, 1/73 et 1/999 pour les cellules contrôles, stimulées avec le TNF 2, 4 et 6 minutes.

2.1.3. Discussion

Les expériences que nous avons menées nous permettent de constater que l'IL-1 β et le TNF- α modifient la balance GSSG/GSH intracellulaire en faveur du GSSG, même si cette augmentation est transitoire et beaucoup moins marquée qu'en présence de H₂O₂.

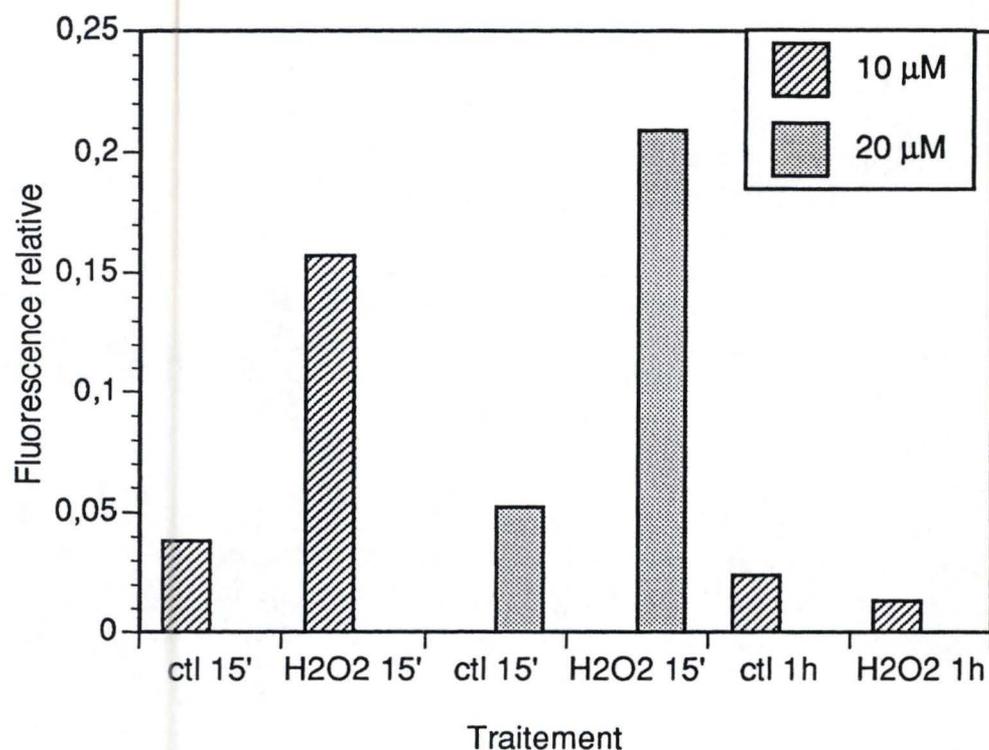


Fig. III. 9.: Mise au point d'un protocole pour le dosage de l'H₂O₂ intracellulaire grâce à une sonde fluorescente dans les WI-38 VA13. Les cellules sont chargées 15 minutes ou 1 heure avec la sonde 20 μM ou 10 μM, diluée dans du PBS à 37°C, ceci pour des cellules contrôles (incubées 10 minutes dans du milieu seul après la charge) et pour des cellules incubées en présence d'H₂O₂ 1 mM après la charge. Les résultats sont exprimés en fluorescence relative c'est-à-dire en unités de fluorescence par μg de protéines (voir point 5. 2 du chapitre Matériels et méthodes).

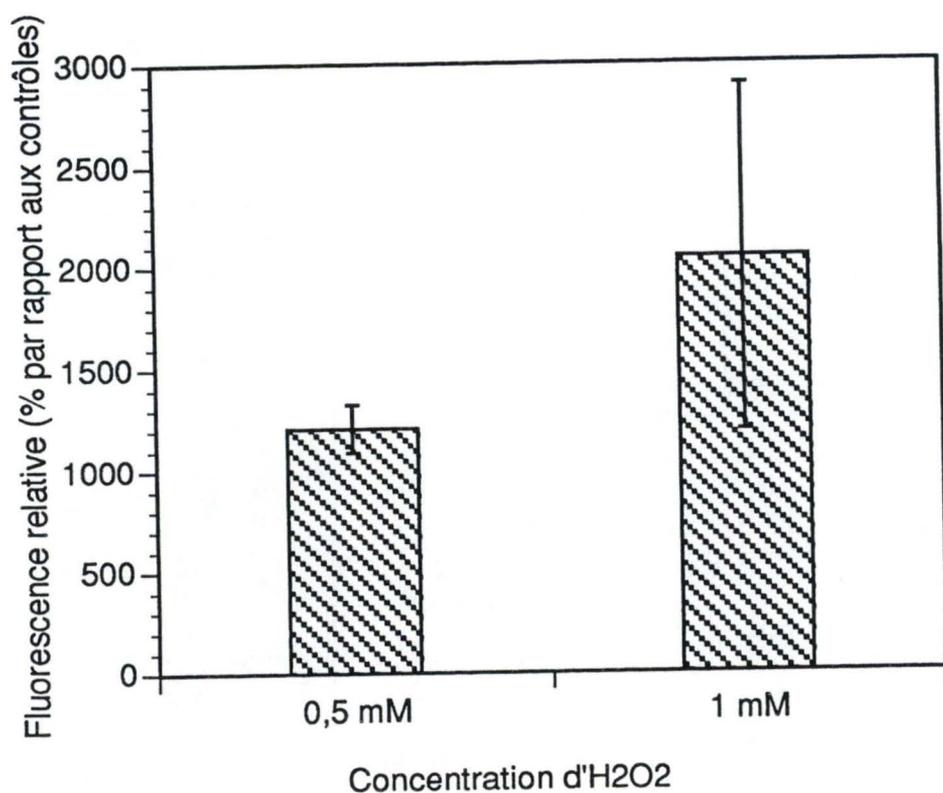


Fig. III. 10.: Effet de l'H₂O₂ exogène sur la concentration intracellulaire en H₂O₂. Les WI-38 VA13 sont incubées en présence d'H₂O₂ 0,5 et 1 mM dilué dans du MEM + HLA pendant 10 minutes. Le peroxyde d'hydrogène est dosé au moyen d'une sonde fluorescente comme décrit dans les Matériels et méthodes. Les résultats sont exprimés en fluorescence relative des cellules traitées par rapport aux cellules contrôles (incubées dans du MEM + HLA) (en %), dont nous fixons arbitrairement la fluorescence par μ g de protéines à 100 %. Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne de 3 données \pm un écart-type.

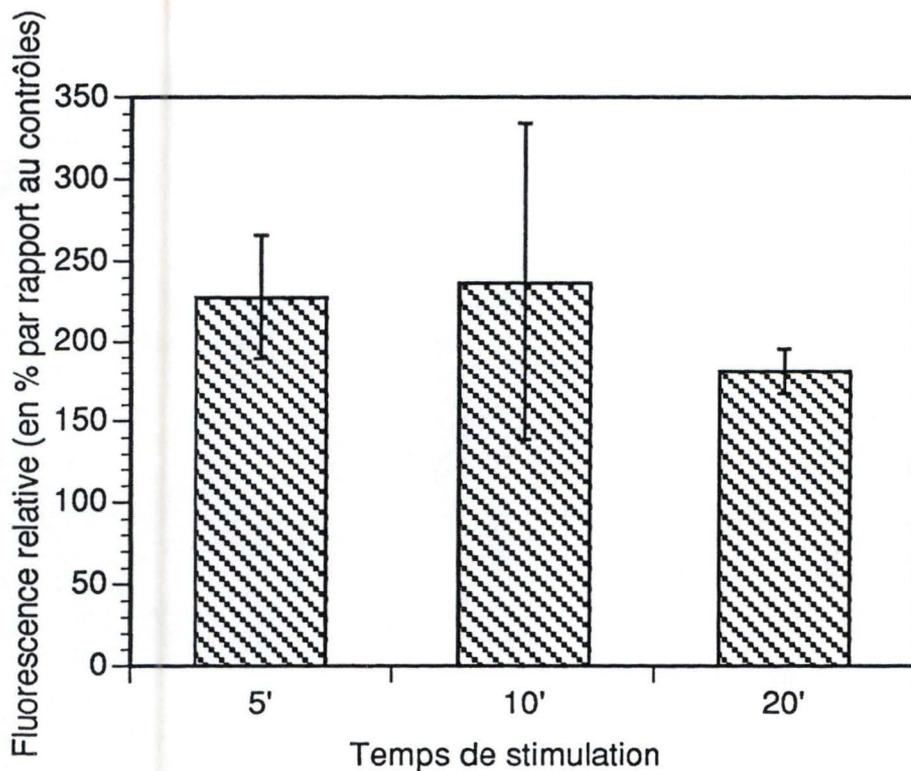


Fig. III. 11.: Effet de l'IL-1 sur la production d'H₂O₂ intracellulaire. Les WI-38 VA13 sont incubées en présence d'IL-1 (0,5 ng/ml) dilué dans du MEM + HLA, durant différents temps. L'H₂O₂ est dosé au moyen d'une sonde fluorescente. Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles (incubées dans du MEM + HLA) dont nous fixons arbitrairement la fluorescence par μ g de protéines à 100 %. (IL-1 5' est exprimé par rapport à un contrôle 5', IL-1 10' et 20' sont exprimés par rapport à un contrôle 20'). Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 données \pm un écart-type.

L'IL-1 β et le TNF- α induisent donc bien un léger stress oxydant dans les WI-38 VA13.

La méthode de dosage du GSSG et GSH par électrophorèse capillaire a donc permis de donner des précisions sur la nature du stress oxydant induit par les deux cytokines. Mais c'est une méthode délicate, qui consomme beaucoup de matériel cellulaire (une boîte de 75 cm² par point) et qui est donc très mal adaptée pour suivre le stress oxydant au cours du temps ou dans une gamme importante de conditions expérimentales différentes. C'est pour ces raisons que nous avons cherché un test plus facile pour suivre le stress oxydant intracellulaire, en nous basant sur des travaux similaires réalisés dans d'autres modèles cellulaires (Legrand-Poels, 1997). Nous avons donc choisi de mesurer la production intracellulaire de H₂O₂, d'autant plus que des liens existent entre H₂O₂ et GSSG.

2.2. PRODUCTION D'H₂O₂ INTRACELLULAIRE

Pour vérifier ce lien, nous avons voulu savoir si les WI-38 VA13 stimulées par l'IL-1 β ou par le TNF- α produisaient bien de l'H₂O₂. Pour ce faire nous avons utilisé une sonde fluorescente intracellulaire spécifique du peroxyde d'hydrogène.

Nous avons d'abord mis au point la concentration et le temps de charge de la sonde. Les cellules sont incubées avec du peroxyde d'hydrogène 1 mM après avoir chargé la sonde 15 minutes ou 1 heure et ceci avec 2 concentrations en sonde, 10 μ M et 20 μ M (Fig. III. 9). La charge est réalisée avec la sonde diluée dans du PBS à 37°C.

Nous avons immédiatement éliminé le temps de charge d'une heure, car les cellules mouraient massivement. Nous avons choisi un temps de charge de 15 minutes avec la sonde à 20 μ M, cette concentration donnant les meilleurs résultats.

2.2.1. Effet d'H₂O₂ exogène

Une première expérience en incubant les cellules 10 minutes en présence de deux concentrations en H₂O₂, 0,5 et 1 mM, nous a permis d'évaluer la validité de la technique (Fig. III. 10). A la concentration de 0,5 mM, la fluorescence augmente de 12 fois et à la concentration de 1 mM elle augmente de 10 fois par rapport aux cellules contrôles.

2.2.2. Effet des cytokines

La technique étant au point, nous avons testé l'effet de l'IL-1 β sur la production d'H₂O₂ avec trois temps de stimulation: 5, 10 et 20 minutes et deux contrôles à 5 et 20 minutes (Fig. III. 11). On observe bien une augmentation de la fluorescence de 2,3 fois à 5 minutes par rapport au

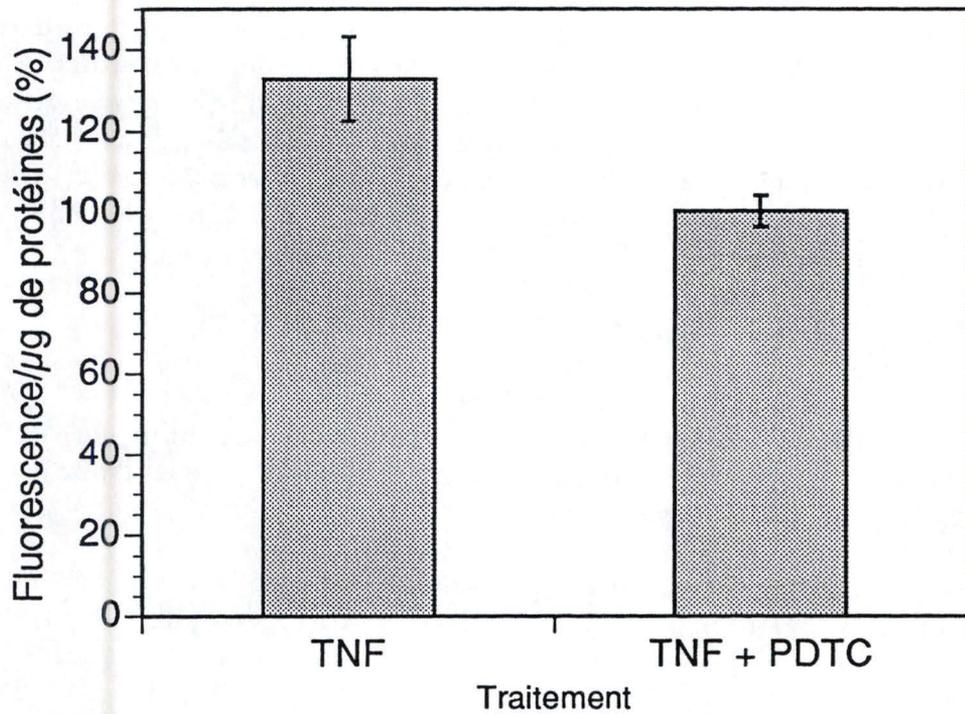


Fig. III.12.: Effet du PDTC sur la production d' H₂O₂ intracellulaire. Les WI-38 VA13 sont incubées durant 10 minutes en présence de 5 ng/ml de TNF- α dilué dans du MEM + HLA, additionnés ou non de PDTC 100 μ M. Les résultats sont exprimés par rapport à un contrôle 10 minutes (cellules incubées dans du MEM + HLA) dont nous fixons arbitrairement la fluorescence par μ g de protéines à 100 %. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3 données \pm un écart-type.

contrôle 5 minutes et de 3 et 1,8 fois à respectivement 10 minutes et 20 minutes par rapport au contrôle 20 minutes. Ceci permet de penser que l'IL-1 β induit la production d'H₂O₂ dans les WI-38 VA13.

Nous avons ensuite testé si le TNF- α avait également la propriété d'induire la production de peroxyde d'hydrogène dans les cellules WI-38 VA13 et si cette production pouvait être annulée par le PDTC.

Les résultats présentés à la figure III. 12 ont confirmé nos espoirs. Après 10 minutes d'incubation des cellules avec 5 ng/ml de TNF- α , la fluorescence est 1,32 fois plus élevée que dans les cellules contrôles, tandis qu'en présence de PDTC la fluorescence est égale à celle des cellules contrôles.

2.3. DISCUSSION

Il est généralement admis que dans les voies de transduction de l'IL-1 et du TNF aboutissant à l'activation de NF- κ B, des espèces oxydantes interviennent. Nous savons maintenant que l'IL-1 β et le TNF- α sont tous deux capables d'induire une production intracellulaire d'H₂O₂ dans les WI-38 VA13. Dans le cas du TNF- α nous savons que cette production est annulée par le PDTC, un antioxydant reconnu pour inhiber l'activation de NF- κ B. Dans le cas de l'IL-1, nous avons eu des problèmes de reproductibilité avec le PDTC. Depuis, du PDTC a été recommandé, mais nous n'avons plus eu le temps de le tester sur la production d'H₂O₂ dans les cellules stimulées à l'IL-1. De plus, en ce qui concerne l'oxydation du glutathion, les 2 cytokines induisent bien son oxydation, même s'il s'agit d'un processus limité et transitoire.

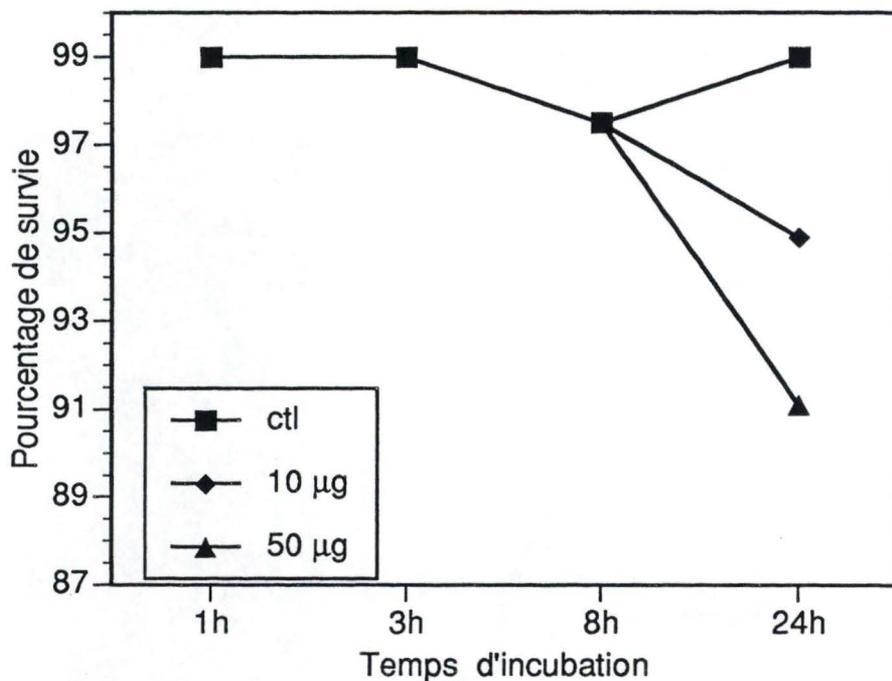
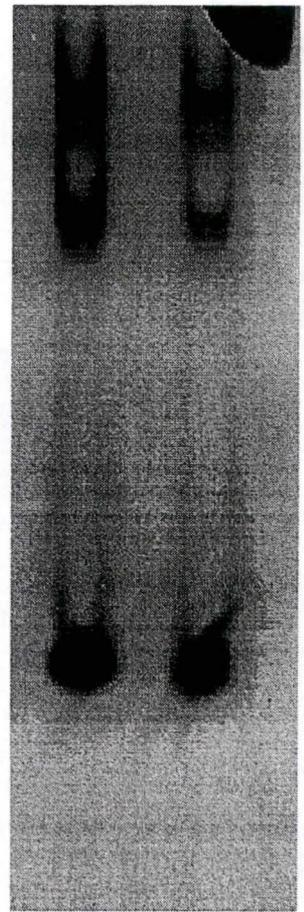


Fig. III. 13.: Courbe de cytotoxicité de la tunicamycine. Les cellules sont cultivées dans des boîtes de petri avec différentes concentrations en tunicamycine. Après les temps d'incubation indiqués, on rince les cellules, on ajoute le colorant (acridine orange/bromure d'éthidium) et on calcule le pourcentage de cellules encore vivantes. On compte 300 cellules dans 3 champs différents.

Fig. III. 14.: Autoradiographie d'un gel d'EMSA. La piste 1 correspond aux extraits de WI-38 VA13 incubées 3 heures avec de la tunicamycine 50 ng/ml diluée dans du MEM + HLA. La piste 2 correspond au contrôle (cellules incubées 3 heures dans du MEM + HLA)



1

2

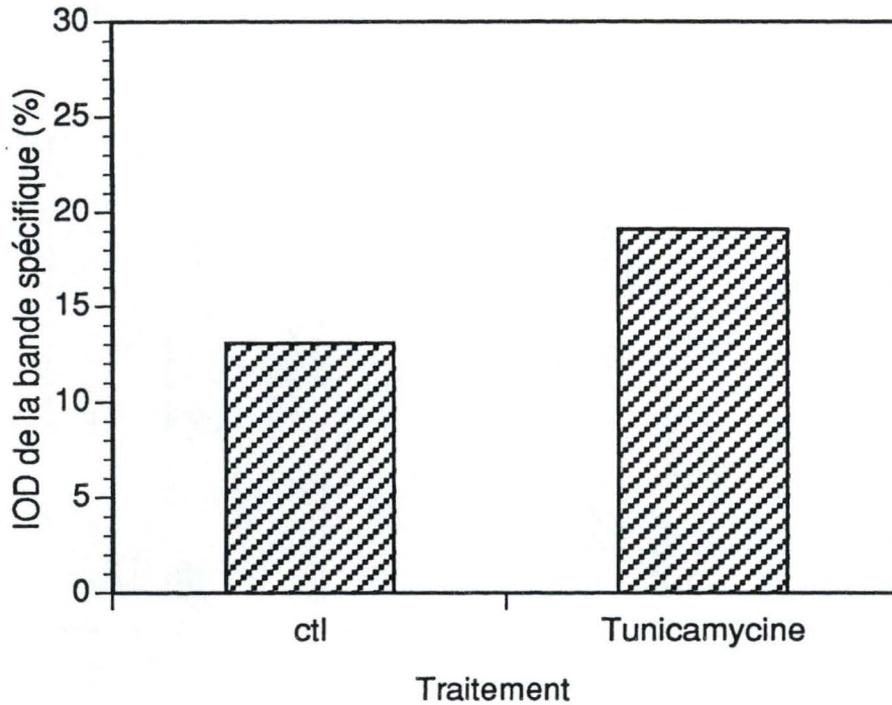


Fig. III. 15.: Effet de la tunicamycine sur la liaison de NF- κ B actif à sa sonde spécifique. Les WI-38 VA13 sont incubées 3 heures avec de la tunicamycine à 50 μ g/ml dilué dans du MEM + HLA. Des cellules incubées 3 heures dans du MEM + HLA servent de contrôle. L'IOD représente l'intégration de la densité optique de la bande retardée par la liaison de NF- κ B à la sonde. Le pourcentage d'IOD représente la fraction d'IOD de la bande spécifique par rapport à l'IOD totale sur la piste, soit la fraction de sonde qui est reconnue par NF- κ B actif.

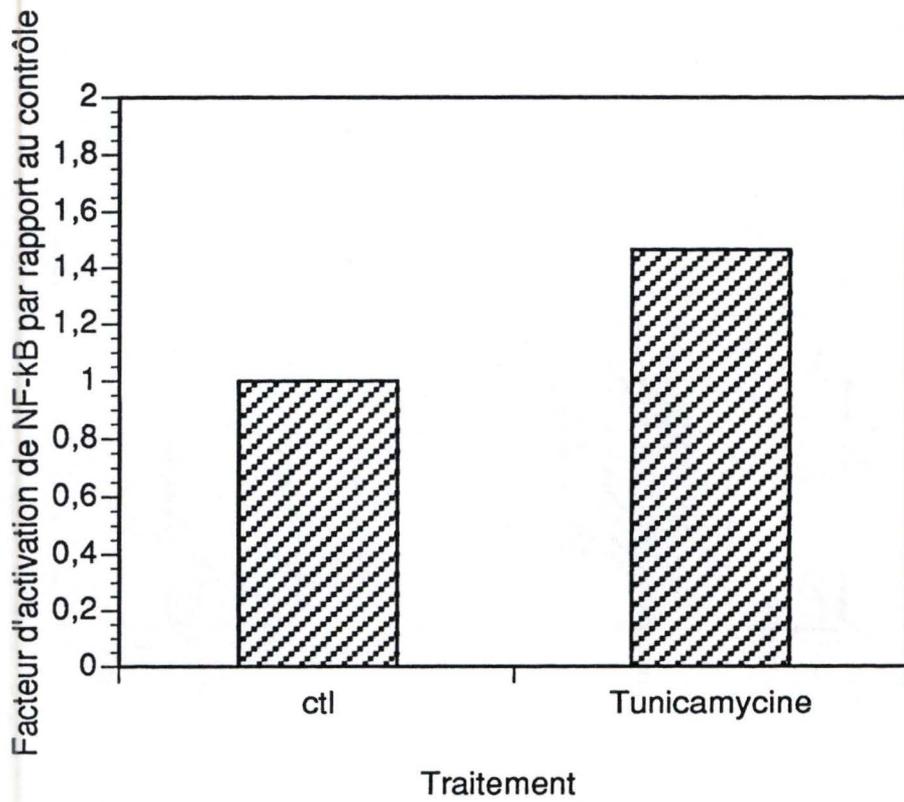


Fig. III. 16.: Effet de la tunicamycine sur la liaison spécifique de NF- κ B à la sonde. Les WI-38 VA13 sont incubées 3 heures avec de la tunicamycine à 50 ng/ml diluée dans du MEM + HLA. Le contrôle correspond à des cellules incubées 3 heures dans du MEM + HLA seul. Les résultats représentent l'IOD (%) et sont exprimés par rapport au contrôle. Nous considérons que dans les cellules contrôles, NF- κ B est activé 1 fois.

3. LA SURCHARGE DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET ACTIVATION DE NF- κ B DANS LES CELLULES WI-38 VA13

3.1. EFFETS SUR L'ACTIVATION DE NF- κ B

- 1) Nous avons vu au point 2.3.1. de l'introduction que la tunicamycine provoque une surcharge du réticulum endoplasmique susceptible d'activer NF- κ B via des mécanismes récepteurs indépendants. Avant de tester l'effet de la tunicamycine sur les WI-38 VA13 nous avons réalisé un test de cytotoxicité (Fig. III. 13). Les cellules ont été incubées avec 10 (♦) ou 50 (▲) μ g/ml de tunicamycine diluée dans du MEM + HLA pendant 1, 3, 8 et 24 heures. Les cellules contrôles (■) sont incubées dans du MEM + HLA seul.
- 2) Nous avons ensuite effectué un retard sur gel ou EMSA avec des extraits de cellules ayant été incubées en présence de tunicamycine (50 μ g/ml) pendant trois heures (Fig. III. 14).
- 3) Après analyse d'image du gel (Fig. III. 15), on constate un très léger accroissement de l'IOD (intégration de densité optique) des extraits cellulaires ayant été traités à la tunicamycine, par rapport au contrôle. L'activation de NF- κ B est de 1,5 fois (Fig. III. 16). Etant donné qu'il s'agit d'une expérience préliminaire, il est clair que cette expérience doit être répétée, avant de pouvoir tirer des conclusions plus définitives.

3.2. DISCUSSION

Même si l'activation de NF- κ B n'est pas spectaculaire, les résultats semblent encourageants et l'activation de NF- κ B par surcharge du RER constitue une nouvelle voie qui mérite d'être explorée plus à fond. Cette voie pourrait impliquer des radicaux libres comme messagers secondaires car l'activation de NF- κ B peut être inhibée par le PDTC, en tout cas dans les cellules HeLa (Pahl et Baeuerle, 1995). Malheureusement nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse avec le WI-38 VA13, car l'action conjuguée de la tunicamycine et du PDTC semble être très toxique (résultats non montrés).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

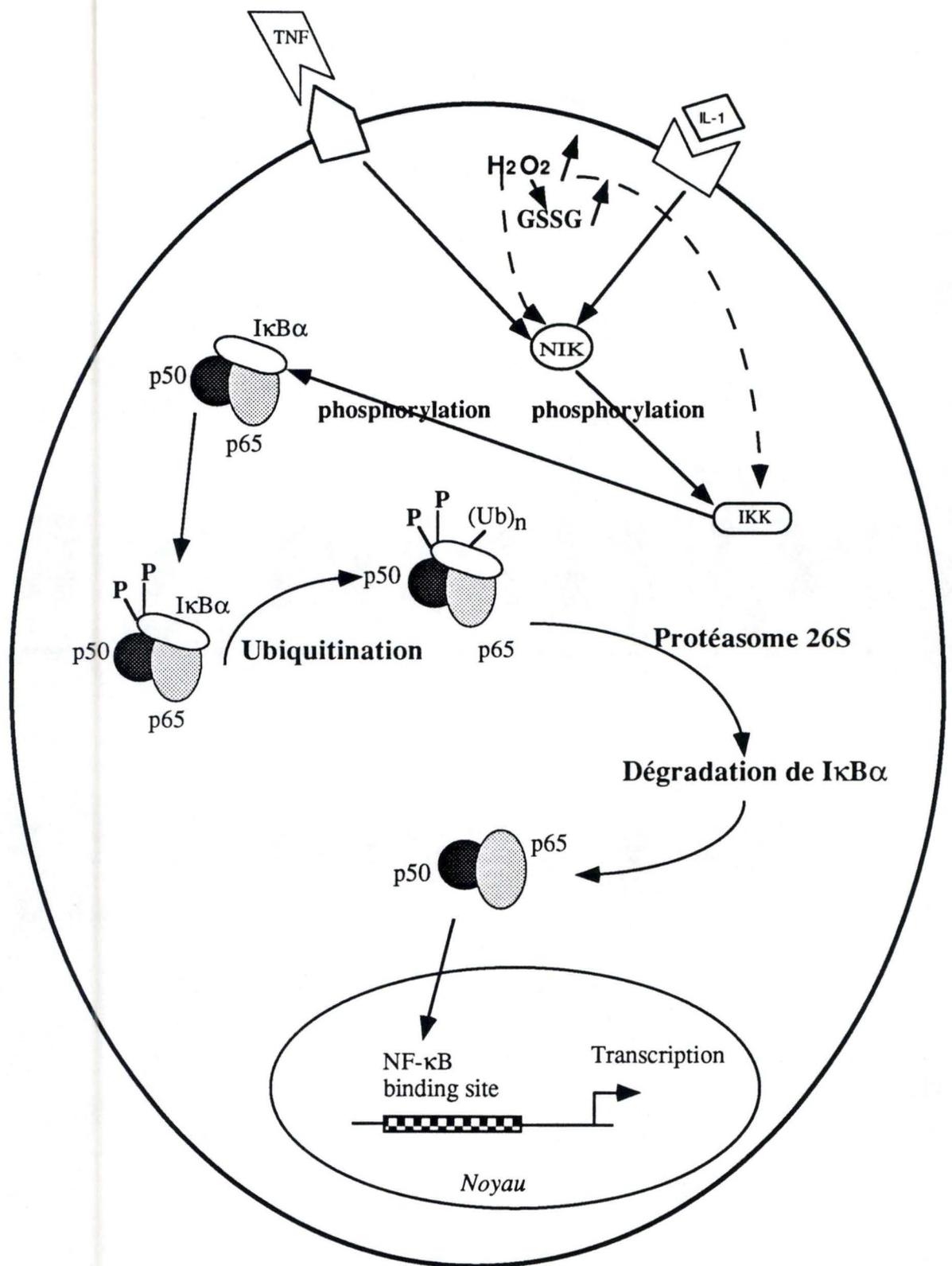


Fig. IV. 1.: Schéma du mécanisme d'activation de NF-κB par le TNF et l'IL-1. La liaison des cytokines à leurs récepteurs induit une augmentation de la concentration intracellulaire en H₂O₂ et en glutathion oxydé (GSSG). Les cascades de l'IL-1 et du TNF convergent vers NIK qui phosphoryle IKK. Celle-ci devient capable de phosphoryler IκB, qui sera alors dégradée. NF-κB est alors capable de pénétrer dans le noyau et de se lier aux motifs κB. On ne connaît pas l'endroit où H₂O₂ et GSSG agissent.

Le facteur de transcription NF- κ B étant ubiquiste et jouant un rôle primordial dans la réponse inflammatoire, il pourrait à long terme devenir la cible d'interventions thérapeutiques limitant son activité dans les cas d'inflammations chroniques et maladies immunitaires (Peltz, 1997). Des molécules inhibant son activité pourraient également contribuer à lutter contre les virus (HIV, CMV...) l'utilisant pour leur propre réplication. La compréhension des mécanismes moléculaires de son activation est donc primordiale.

On sait aujourd'hui que les principaux activateurs de NF- κ B, l'IL-1 et le TNF utilisent des voies de transduction convergeant à la protéine NIK. Cette protéine phosphoryle le dimère IKK α -IKK β qui, une fois activé, phosphoryle à son tour I κ B, la sous-unité inhibitrice de NF- κ B. La phosphorylation de I κ B est suivie de son ubiquitination, signal de dégradation par le protéasome. Une fois I κ B détruite, NF- κ B peut se déplacer du cytoplasme vers le noyau où il se lie à sa séquence d'ADN cible et active la transcription de gènes de réponse inflammatoire.

Afin de mieux comprendre ces voies de transduction, nous avons mesuré le pouvoir oxydant de l'IL-1 β et du TNF- α , dans un modèle de fibroblastes humains puisque des espèces oxydantes semblent contrôler l'activation ou l'inhibition de ces voies.

Nous avons également exploré, dans le même modèle cellulaire, les effets d'un autre type d'activation de NF- κ B, en ajoutant la tunicamycine, responsable d'une surcharge du réticulum endoplasmique, stress intracellulaire qui du moins dans certains types cellulaires, active NF- κ B.

1. INDUCTION DE ROIS PAR L'IL-1 β ET LE TNF- α

Nous avons vu au point 2 du chapitre "Résultats et discussions" que le TNF- α et l'IL-1 β induisent un accroissement transitoire du taux de glutathion oxydé dans le WI-38 VA13. Nous avons ensuite vérifié que ces deux cytokines induisent dans les cellules une production de peroxydes, rapidement transformés en eau par la glutathion peroxydase. Nous avons montré que parmi ces peroxydes, les WI-38 VA13 produisent de l'H₂O₂ en réponse aux stimulations à l'IL-1 β et au TNF- α . Dans le cas du TNF- α nous avons montré que le PDTC inhibe cette production d'H₂O₂.

Par la technique du retard sur gel, nous savons que ce même PDTC inhibe l'activation de NF- κ B induite par l'IL-1 β ou le TNF- α . On peut donc conclure à une implication de l'H₂O₂ dans l'activation de NF- κ B induite par ces deux cytokines. Ce travail confirme donc bien que dans les cellules WI-38 VA13, l'IL-1 et le TNF- α induisent un stress oxydant intracellulaire et que ce stress se manifeste par une augmentation transitoire de H₂O₂ ou de glutathion oxydé (Fig. IV. 1).

Ces deux molécules peuvent donc être considérées comme de véritables messagers secondaires.

2. EFFET DE LA TUNICAMYCINE

La tunicamycine induit une surcharge du réticulum endoplasmique en inhibant la glycosylation des protéines. Cette surcharge semble activer NF- κ B dans les WI-38 VA13. Les conditions d'activation devraient toutefois être optimisées, avant de pouvoir confirmer et d'étudier plus en détails l'effet de surcharge du réticulum endoplasmique dans ce modèle cellulaire. Mais si ces données se confirment, nous pourrions vérifier si les mécanismes moléculaires en jeu sont comparables à ceux enregistrés par les cytokines.

3. PERSPECTIVES

Au laboratoire, nous avons déjà étudié les effets de l'IL-1 sur la sécrétion de l'IL-6, celle-ci étant également inhibée par le PDTC (Renard et al., 1997). Une des perspectives de ce travail est de vérifier si les effets du PDTC s'observent sur d'autres gènes induits par l'IL-1, qui contiennent des sites consensus pour NF- κ B dans leurs promoteurs, telle la cyclo-oxygénase 2 (ou COX-2).

Cependant, deux questions brûlantes se posent encore toujours: pourquoi et via quels mécanismes le H₂O₂ intracellulaire augmente-t-il et quelles sont les cibles moléculaires sensibles à ce stress oxydatif. Ce sont des questions difficiles à aborder.

A court terme, on peut néanmoins aborder le problème de l'identification des cibles moléculaires du stress oxydant induit par les cytokines. Au laboratoire, Patricia Renard a commencé à aborder ce problème par la technique d'électrophorèse en gels bidimensionnels pour obtenir les patterns de phospho-protéines dans les cellules non stimulées, stimulées avec les 2 cytokines et ce en présence ou non de PDTC.

On peut également essayer d'identifier les enzymes redox-sensibles, très probablement des phosphatases ou kinases. Guy et al. (1993) avaient déjà signalé une phosphatase redox-sensible pouvant jouer un rôle dans la transduction du signal de l'IL-1 et du TNF- α . Wilhelm et al. (1997) démontrent que plusieurs membres de la famille des MAP kinases sont aussi régulés par les niveaux de glutathion intracellulaire. Enfin, à notre connaissance il n'existe pas de données publiées sur les effets du PDTC sur les activités des kinases NIK et IKK.

EXENNV

LISTE DES ABBREVIATIONS

AA: acide arachidonique
ADN: acide désoxyribonucléique
AMPC: adénosine monophosphate cyclique
BCNU: bischloroéthylnitrosourée
BSA: sérum albumine bovine
CASP: caspase
COX-2: cyclooxygénase 2
CTL: contrôle
DAG: diacylglycérol
DD: death domain
DMSO: diméthylsulfoxyde
DO: densité optique
DTT: dithiothréitol
EDTA: éthylène diamine tétra-acétate
EGTA: ethylene glycol-bis (β -aminoéthyl éther) tetraacetic acid
ELAM: Endothelial Leukocyte Adhesion molecule
EMSA: electrophoretic mobility shift assay
FADD: fas-associated death domain
GSH: glutathion réduit
GSSG: glutathion oxydé
HEPES: 2-hydroxy-ethyl-1-Piperazine-ethanesulfonic acid
HLA: hydrolysats de lactalbumine
HPLC: high performance liquid chromatography
HRP: horse raddish peroxidase
hsp: heat shock protein
I κ -B: inhibitory subunit kappa B
ICAM: Molécule d'Adhérence InterCellulaire
IKK: I κ B kinase
IL-1 β : interleukine-1 β
IL-1 α : interleukine 1 α
IOD: intégration de densité optique
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MEM: minimum essential medium
NEM: N-ethylmaleimide
NF- κ B: nuclear factor kappa B
NIK: NF- κ B inducing kinase
NLS: nuclear localizing sequence
NO: oxyde nitrique
Nonidet P 40 (NP 40): nonionic detergent
NOS: nitic oxyde synthase
PAF: platelet-activated factor
PBS: phosphate buffer saline

PDTC: pyrrolidine dithiocarbamate
PG: prostaglandines
PGE₂: prostaglandine E₂
PKA: protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC: protéine kinase dépendante de la PLC
PLA₂: phospholipase A₂
PLC: phospholipase C
PMN: polymorphonucléaire neutrophile
PVDF: difluorure de polyvinylidène
RIP: receptor interacting protein
ROI: reactive oxygen intermediate
RPM: rotation par minute
RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SB: sérum bovin
SDS: sodium dodécyl sulphate
SMase: sphingomyélinase
TBE: tris buffer EDTA
TBS: tris buffer saline
TEMED: N,N',N',N', tétra-méthyl-éthylènediamine
TNF- α : tumor necrosis factor α
TRADD: TNF receptor-associated death domain
TRAF: TNF-R associated factor
Tris: Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
UV: ultraviolet
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

BIBLIOGRAPHIE

Auron, P. E., A. C. Webb, L. J. Rosenwasser, S. F. Mucci, A. Rich, S. M. Wolff, and C. A. Dinarello. "Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984): 7907-7911.

Bauerle, P. "Pro-inflammatory signaling: Last pieces in the NF- κ B puzzle?" *Curr. Biol.* 1998, 19-22.

Blank, V., P. Kourilsky, and A. Israël. "NF- κ B and related proteins: Rel/dorsal homologues meet ankyrin-like repeats." *Trends Biochem. Sci.* 17 (1992): 135-140.

Bonizzi, G., E. Dejardin, B. Piret, J. Piette, M. P. Merville, and V. Bours. "Interleukin-1 beta induces nuclear factor kappa B in epithelial cells independently of the production of reactive oxygen intermediates." *Eur. J. Biochem.* 242 (1996): 544-549.

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

Brooks, J. W., and S. B. Mizel. "Interleukin-1 signal transduction." *Eur. Cytokine Netw.* 5, no. 6 (1994): 547-561.

Camussi, G., E. Albano, C. Tetta, and F. Bussolino. "The molecular action of tumor necrosis factor- α ." *Biochem. J.* 202 (1991): 3-14.

Cao, Z., W. J. Henzel, and X. Gao. "IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor." *Science* 271 (1996): 1128-1131.

Cao, Z., J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama, and D. V. Goeddel. "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." *Nature* 383 (1996): 443-446.

Cetkovic-Cvrlje, M. "Nicotinamide and dexamethasone inhibit interleukin-1-induced nitric oxide production by RINm5F cells without decreasing messenger RNA expression for nitric oxide synthase." *Endocrinology* 133 (1993): 1739.

Clark, M. A., S. E. Özgür, Conway T. M., J. Disposito, S. T. Crooke, and J. S. Bomalasdi. "Cloning of a phospholipase A2-activating protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991): 5418-5422.

Cooper, G. M. *The cell, a molecular approach*. ASM Press ed, 1997.

Costello, R., P. Lecine, B. Kahn-Perlès, M. Algarté, C. Lipcey, D. Olive, and J. Imbert. "Activation du système de facteurs de transcription Rel/NF- κ B." *Med. Sci.* 11 (1995): 957-963.

Crofford, L. J. "Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in synovial tissues of arthritic patients." In *New targets in inflammation*, 1996.

di Giovine, F. S., and W. Duff. "Interleukin-1: the first interleukin." *Immunol. Today* 11, no. 1 (1990): 13-20.

Dinarello, C. A. "Biology of interleukin 1." *FASEB J.* 2 (1988): 108-115.

Dinarello, C. A. "The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor." *Immunol. Lett.* 16 (1987): 227-232.

Dinarello, C. A. "The interleukin-1 family: 10 years of discovery." *FASEB J.* 8 (1994): 1314-1325.

Duan, H., and V. M. Dixit. "RAIDD is a new 'death' adaptor molecule." *Nature* 385 (1997): 86-89.

Feldmann, M. "Coopération cellulaire dans la réponse anticorps." In *Immunologie*, edited by I. M. Roitt, J. Brostoff and D. K. Male, 1994.

Feng, L., Y. Xia, G. E. Garcia, D. Hwang, and C. B. Wilson. "Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide." *J. Clin. Invest.* 95 (1995): 1669-1675.

Fessenden, R. W., and N. C. Verma. "A time-resolved electron spin resonance study of the oxidation of ascorbic acid by hydroxyl radical." *Biophys. J.* 24 (1978).

Goossens, V., J. Grooten, K. De Vos, and W. Fiers. "Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995): 8115-8119.

Grimm, S., and P. A. Baeuerle. "The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits." *Biochem. J.* 290 (1993): 297-308.

Guy, G. R., J. Cairns, S. B. Ng, and Y. H. Tan. "Inactivation of a redox-sensitive protein phosphatase during the early events of tumor necrosis factor/ interleukin-1 signal transduction." *J. Biol. Chem.* 268 (1993): 2141-2148.

Heller, R., and M. Krönke. "Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways." *J. Cell Biol.* 126, no. 1 (1994): 5-9.

Hennet, T., C. Richter, and E. Peterhans. "Tumor necrosis factor- α induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells." *Biochem J.* 289 (1993): 587-592.

Hochstrasser, M. "Ubiquitin, proteasomes and the regulation of intracellular protein degradation." *Curr. Op. Cell Biol.* 7 (1995): 215-223.

Hsu, H., H-B. Shu, M-P. Pan, and D. V. Goeddel. "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." *Cell* 84 (1996): 299-308.

Hsu, H., J. Xiong, and D. V. Goeddel. "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation." *Cell* 81 (1995): 495-504.

Ip, Y. T., M. Reach, Y. Engstrom, L. Kadalayil, H. Cai, S. Gonzalez-Crespo, K. Tatei, and M. Levine. "Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in drosophila." *Cell* 75 (1993): 753-763.

Israël, A. "A role for phosphorylation and degradation in the control of NF- κ B activity." *Trends Genet.* 11, no. 6 (1995): 203-205.

Kagan, B. L., R. L. Baldwin, D. Munoz, and B. J. Wisnieski. "Formation of ion-permeable channels by tumor necrosis factor- α ." *Science* 255, no. 5050 (1992): 1427-30.

Klein, J. *Immunology*. Cambridge, Blackwell Scientific Publication ed, 1990.

Kohno, T., M. T. Brewer, S. L. Baker, P. E. Schwartz, M. W. King, K. K. Hale, C. H. Squires, R. C. Thompson, and J. L. Vanice. "A second tumor necrosis factor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990): 8331-8335.

Koj, A. "Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines." *Biochim. Biophys. Acta* 1317 (1996): 84-94.

Kuno, K., and K. Matsushima. "The IL-1 receptor signaling pathway." *J. Leukocyte Biol.* 56, no. 5 (1994): 542-547.

Larrick, J. W., and S. L. Kunkel. "The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response." *Pharm. Res.* 5, no. 3 (1988): 129-139.

Lee, M. D., A. Zentella, and P. H. Pedala. "Effect of endotoxin-induced monokines on glucose metabolism in the muscle cell line L6." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987): 2590-2594.

Lee, S. W., A-P. Tsou, H. Chan, J. Thomas, K. Petrie, E. M. Eugui, and A. C. Allison. "Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 β gene and decrease the stability of interleukin 1 β mRNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988): 1204-1208.

Legrand-Poels, S., S. Maniglia, J. Boelaert, and J. Piette. "Activation of the transcription factor NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated U937 cells." *Biochem. Pharmacol.* 1997, 339-346.

Liu, Z-G., H. Hsu, D. Goeddel, and M. Karin. "Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death." *Cell* 87 (1996): 565-576.

Low, S. C., and M. J. Berry. "Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes." *Trends Biochem. Sci.* 21, no. 6 (1996): 203-8.

Male, D. K. "Migration et inflammation." In *Immunologie*, edited by Roitt, Brostoff and Male, 1994.

Malinin, N., M. Boldin, A. Kovakenko, and D. Wallach. "MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1." *Nature* 385 (1997): 540-544.

Martin, M. U., and W. Falk. "The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction." *Eur. Cytokine Netw.* 8, no. 1 (1997): 5-17.

Mathias, S., K. A. Dressler, and R. N. Kolesnick. "Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor α ." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991): 10009-10013.

Meier, B., H. Radeke, S. Selle, G. Habermehl, K. Resch, and H. Sies. "Human fibroblasts release low amounts of reactive oxygen species in response to the potent phagocyte stimulants, serum-treated zymosan, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, leukotriene B4 or 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate." *Biol. Chem.* 371 (1990): 1021-1025.

Minden, A., A. Lin, M. McMahon, C. Lange-Carter, B. Dérijard, R. J. Davis, G. L. Johnson, and M. Karin. "Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK." *Science* 7 (1994): 50-55.

Munoz, C., D. Pascual-Salcedo, M. del Carmen Castellanos, A. Alfranca, J. Aragones, A. Vara, J. M. Redondo, and M. O. de Landazuri. "Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF- κ B and AP-1 transcription factors activity." *Blood* 88, no. 9 (1996): 3482-3490.

Newton, R., L. M. Kuitert, I. M. Adcock, and P. J. Barnes. "Cytokine induction of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells." *Life Sci.* 60, no. 1 (1997): 67-78.

Nicola, N. A. *Cytokines and their receptors*. Oxford university press ed, 1997.

Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, and R. Lobb. "Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes." *Cell* (1989): 1203-1211.

Pahl, H., and P. Baeuerle. "A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF- κ B." *EMBO J.* 14 (1995): 2580-2588.

Parks, D., V. Bryan, V. Oi, and L. Herzenberg. "Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with fluorescence-activated cell sorter." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979): 1962-1966.

Peltz, G. "Transcription factors in immune-mediated disease." *C. Op. Biotechnol.* 8, no. 4 (1997): 467-473.

Peters, J-M. "Proteasomes: protein degradation machines of the cell." *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994): 377-382.

Piccoli, G., M. Fiorani, B. Biagiarelli, F. Palma, L. Potenza, A. Amicucci, and V. Stocchi. "Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range." *J. Chromatogr. A.* 676 (1994): 239-246.

Pigeolet, E. "Comportement de la glutathion peroxydase au cours du vieillissement cellulaire et en conditions oxydantes." Thèse de doctorat, FUNDP, 1990.

Platanias, L. C., and N. J. Vogelzang. "Interleukin-1: biology, pathophysiology, and clinical prospects." *Am. J. Med.* 89 (1990): 621-626.

Priestle, J. P., H. P. Schar, and M. G. Grutter. "The three-dimensional structure of human interleukin-1 beta refined to 2.0 Å resolution." *Prog. Clin. Bio. Res.* 349 (1990): 297-307.

Pryor, W. A. *Free radicals in biology*. Edited by W. A. Pryor. Academic Press ed. 6 vols. Vol. 1, 1976.

Rawn, J. D. *Biochimie*. Editions Universitaires ed, 1990.

Remacle, J., M. Raes, O. Toussaint, P. Renard, and G. Rao. "Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function." *Mutat. Res.* 316, no. 3 (1995): 103-122.

Renard, P. "Régulation par l'interleukine 1 du facteur transcriptionnel NF- κ B dans l'activation de fibroblastes humains en culture. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène et des phosphorylations." Thèse de doctorat, FUNDP, 1997.

Renard, P., E. Delaive, J. Remacle, and M. Raes. "Effect of interleukin-1 on glutathione oxidation in cultured human fibroblasts." soumis à publication.

Renard, P., M-D. Zachary, C. Bougelet, M-C. Mirault, G. Hageman, J. Remacle, and M. Raes. "Effects of Antioxidant Enzyme Modulations on Interleukin-1-induced Nuclear Factor Kappa B Activation." *Biochem. Pharmacol.* 1997, 149-160.

Rice-Evans. "Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states." In *New comprehensive biochemistry*, edited by C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, 1994.

Rice-Evans, C. A., A. T. Diplock, and M. C. R. Symons. *Techniques in free radical research*. Edited by R. H. Burdon and P. H. van Knippenberg. Elsevier ed, 1991.

Roitt, I. M., and D. Male. "Intraduction au système immunitaire." In *Immunologie*, edited by I. M. Roitt, J. Brostoff and D. K. Male, 12, 1994.

Rook, G. "Réponses à médiation cellulaire." In *Immunologie*, edited by I. M. Roitt, J. Brostoff and D. K. Male, 1994.

Rothe, M., M-G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Aytres, and D. V. Goeddel. "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." *Cell* 83 (1995): 1243-1252.

Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel, and D. V. Goeddel. "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." *Cell* 78 (1994): 681-692.

Schmidt, K. N., P. Amstad, P. Cerutti, and P. A. Baeuerle. "The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B." *Chem. Biol.* 2 (1995): 13-22.

Schreck, R., and P. A. Baeuerle. "A role for oxygen radical as second messengers." *Trends Cell Biol.* 1 (1991): 39-43.

Schreck, R., B. Meier, D. N. Männel, W. Dröge, and P. A. Baeuerle. "Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor B activation in intact cells." *J. Exp. Med.* 175 (1992): 1181-1194.

Schreck, R., P. Rieber, and P. A. Baeuerle. "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1." *EMBO J.* 10, no. 8 (1991): 2247-2258.

Schulze-Osthoff, K., A. Bakker, B. Vanhaesebroeck, R. Beyaert, W. Jacob, and W. Walter Fiers. "Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions." *J. Biol. Chem.* 267, no. 8 (1992): 5317-5323.

Schulze-Osthoff, K., R. Beyaert, V. Vandevoorde, G. Haegeman, and W. Fiers. "Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF." *EMBO J.* 12, no. 8 (1993): 3095-3114.

Shirakawa, F., U. Yamashita, M. Chedid, and S. B. Mizel. "Cyclic AMP-an intracellular second messenger for interleukin1." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988): 8201-8205.

Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown. "Structure, regulation and function of NF- κ B." *Annu. Rev. Cell Biol.* 10 (1994): 405-455.

Sims, J. E., M. A. Gayle, J. L. Slack, M. R. Alderson, T. A. Bird, J. G. Giri, F. Colotta, F. Re, A. Mantovani, K. Shanebeck, K. H. Grabstein, and S. K. Dower. "Interleukin1 signaling occurs via the type I receptor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993): 6155-6159.

Song, H. Y., C. H. Régnier, C. J. Kirschning, D. V. Goeddel, and M. Rothe. "Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor- κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997): 9792-9796.

Staal, F., M. Roederer, L. Herzenberg, and L. Herzenberg. "Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor κ B and transcription of human immunodeficiency virus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 9943-9947.

Stancovski, I., and D. Baltimore. "NF- κ B Activation: The I κ B Kinase Revealed?" *Cell* 91 (1997): 299-302.

Stylianou, E., L. A. J. O'Neill, L. Rawlinson, M. R. Edbrooke, P. Woo, and J. Saklatvala. "Interleukin 1 induces NF- κ B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes." *Biochem. J.* 267, no. 22 (1992): 15836-15841.

Tiku, M. L., J. B. Liesch, and F. M. Robertson. "Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines." *J. Immunology* 145 (1990): 690-696.

Trauth, B. C., and J. Keeseey. *Guide to cell proliferation and apoptosis methods*. Boehringer Mannheim ed, 1997.

Van Lint, J., P. Agostinis, V. Vandevoorde, G. Haegeman, W. Fiers, W. Merlevede, and J. Vandenneede. "Tumor necrosis factor stimulates multiple serine/threonine proteine kinases in Swiss 3T3 and L929 cells." *J. Biol. Chem.* 267 (1992): 25916-25921.

Vandenabeele, P., W. Declercq, R. Beyaert, and W. Fiers. "Two tumour necrosis factor receptors: structure and function." *Trends Cell Biol.* 5 (1995): 392-399.

Wallach, D., M. Boldin, E. Varfolomeev, R. Beyaert, P. Vandenabeele, and W. Fiers. "Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding." *FEBS Lett.* 410 (1997): 96-106.

Warren, H. S., D. B. Donner, G. F. Starnes Jr, and M. F. Brennan. "Modulation of endogenous hormone action by recombinant human tumor necrosis factor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987): 8619-8622.

Wilhelm, D., K. Bender, A. Knebel, and P. Angel. "The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents." *Mol. Cell Biol.* 17, no. 8 (1997): 4792-4800.

Winyard, P. G., C. J. Morris, V. R. Winrow, M. Zaidi, and D. R. Blake. "Free radical pathways in the inflammatory response." In *Free radical damage and its control*, edited by C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, 1994.

Wong, G. H., J. H. Elwell, L. W. Oberley, and D. V. Goeddel. "Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor." *Cell* 58, no. 5 (1989): 923-31.

Woronicz, J. D., X. Gao, Z. Cao, M. Tothe, and D. V. Goeddel. "I κ B kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK." *Science* 278 (1997): 866-869.

Zubay. *Biochemistry*. Addison Wesley ed, 1983.