



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ A

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

NATHALIE ARBOUR

**INDUCTION ET MODULATION DE CYTOKINES PAR LE  
N-FORMYL-MÉTHIONYL-LEUCYL-PHÉNYLALANINE  
CHEZ LES CELLULES MONONUCLÉAIRES  
DU SANG HUMAIN**

OCTOBRE 1993

A mes parents, Cécile et Yves,  
qui m'ont inspiré le désir d'accomplissement  
et de dépassement de soi.

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
SOMMAIRE	xi
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1.0 INFLAMMATION	
1.1 Définition	3
1.2 Médiateurs importants	4
2.0 FACTEUR NÉCROSANT DES TUMEURS (TNF)	
2.1 Protéine	5
2.2 Récepteurs	6
2.3 Cellules productrices et inducteurs	8
2.4 Effets biologiques	9
2.5 Mécanismes d'action	10
3.0 INTERLEUKINE-1 (IL-1)	
3.1 Protéine	12
3.2 Récepteurs	14
3.3 Cellules productrices et inducteurs	15
3.4 Effets biologiques	16
3.5 Antagoniste du récepteur de l'interleukine-1 (IL-1)	17
4.0 INTERLEUKINE-6 (IL-6)	
4.1 Protéine	19
4.2 Récepteurs	20
4.3 Cellules productrices et inducteurs	22
4.4 Effets biologiques	23
4.5 Facteur nucléaire de l'interleukine-6 (NF-IL6)	24
5.0 N-FORMYL-MÉTHIONYL-LEUCYL-PHÉNYLALANINE (FMLP)	
5.1 Origine	28

5.2 Récepteurs chez l'humain	30
5.3 Signaux de transduction	33
5.4 Effets biologiques	37
5.5 Effets <i>in vivo</i>	40
5.6 Interactions avec les cytokines	41
6.0 LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)	
6.1 Origine et structure	43
6.2 Récepteurs	44
6.3 Effets biologiques	46
6.4 Signaux de transduction	47
6.5 Régulation des effets	48
MÉTHODOLOGIE	49
1.0 PRÉPARATION DES CELLULES SANGUINES HUMAINES	
1.1 Cellules mononucléaires	50
1.2 Cellules adhérentes (monocytes)	51
1.3 Cellules polynucléaires	51
2.0 STIMULATION DES CELLULES SANGUINES	53
3.0 DOSAGES DES CYTOKINES	
3.1 Dosage de l'interleukine-6 (IL-6)	54
3.2 Dosage du facteur nécrosant des tumeurs (TNF)	55
4.0 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES DES CYTOKINES	
4.1 Extraction de l'acide ribonucléique (ARN) total	58
4.2 Électrophorèse de l'ARN	59
4.3 Transfert sur membrane de nylon	60
4.4 Hybridation	61
RÉSULTATS	63
1.0 CINÉTIQUES DE SÉCRÉTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES DU SANG HUMAIN	
1.1 Cinétiques de sécrétion du facteur nécrosant des tumeurs (TNF)	
1.1.1 Sécrétion par les cellules mononucléaires	64
1.1.2 Sécrétion par les cellules mononucléaires adhérentes	68

1.1.3	Sécrétion par les cellules polynucléaires	71
1.2	Cinétiques de sécrétion de l'interleukine-6 (IL-6)	
1.2.1	Sécrétion par les cellules mononucléaires	72
1.2.2	Sécrétion par les cellules mononucléaires adhérentes	78
1.2.3	Sécrétion par les cellules polynucléaires	82
2.0	DOSES-RÉPONSES DE LA SÉCRÉTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉAIRES DU SANG HUMAIN	
2.1	Doses-Réponses de la sécrétion du facteur nécrosant des tumeurs (TNF)	83
2.2	Doses-Réponses de la sécrétion de l'interleukine-6 (IL-6)	86
3.0	EFFETS D'UN PRÉTRAITEMENT A LA TOXINE DE <i>BORDETELLA</i> <i>PERTUSSIS</i> SUR LA SÉCRÉTION DES CYTOKINES	
3.1	Effets sur la sécrétion du facteur nécrosant des tumeurs (TNF)	91
3.2	Effets sur la sécrétion de l'interleukine-6 (IL-6)	94
4.0	EXPRESSION DE GENES DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉAIRES	100
5.0	EFFETS D'UN PRÉTRAITEMENT A LA TOXINE DE <i>BORDETELLA</i> <i>PERTUSSIS</i> SUR L'EXPRESSION DES GENES DES INTERLEUKINE-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ) ET INTERLEUKINE-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	106
	DISCUSSION	112
	CONCLUSION	132
	REMERCIEMENTS	136
	BIBLIOGRAPHIE	137
	ANNEXE: Solutions utilisées pour la méthodologie	168

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique  
ADP: adénosine diphosphate  
AGP: "α1-acid glycoprotein"  
AMP: adénosine monophosphate  
AP-1: "activating protein 1"  
ARN: acide ribonucléique  
ARNm: acide ribonucléique messenger  
CSF-1: "colony stimulating factor-1"  
D.O.: densité optique  
DTT: 1,4-dithiothreitol  
EBSS: "Earle's buffered saline solution"  
ED<sub>50</sub>: dose effectrice à 50%  
FMLP: N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine  
GDP: guanosine diphosphate  
GM-CSF: "granulocyte-macrophage colony stimulating factor"  
gp130: glycoprotéine de 130 kilodaltons  
GRE: "glucocorticoid responsive element"  
GTP: guanosine triphosphate  
Hepes: acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique  
HLA-DR: "Human leucocyte antigen D related"  
H-SFM: "Hybridoma Serum Free Medium"  
IFN $\gamma$ : interféron gamma  
IgG: immunoglobuline de type G  
IL-1 $\alpha$ : interleukine-1 $\alpha$   
IL-1 $\beta$ : interleukine-1 $\beta$   
IL-1ra: antagoniste du récepteur de l'interleukine-1  
IL-1RtI: récepteur de l'interleukine-1 de type I  
IL-1RtII: récepteur de l'interleukine-1 de type II  
IL-6: interleukine-6  
IL-8: interleukine-8  
kDa: kilodaltons  
LBP: "LPS binding protein"  
LPS: lipopolysaccharide  
MTT: bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium  
NF-kB: facteur nucléaire kappa B  
NK: "natural killer"  
PAF: facteur activateur de plaquettes  
pb: paire de base  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandine de type E<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub>: prostaglandine de type I<sub>2</sub>  
PLA<sub>2</sub>: phospholipase de type A<sub>2</sub>  
TAME: "p-toluenesulfonyl-1-arginine methyl ester"

TNF: facteur nécrosant des tumeurs

TNF-R1: récepteur du facteur nécrosant des tumeurs de type 1

TNF-R2: récepteur du facteur nécrosant des tumeurs de type 2

TGF $\beta$ : "transforming growth factor  $\beta$ "



## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>TABLEAU I: Synonymes retrouvés dans la littérature pour identifier les cytokines</b>	<b>25</b>
<b>TABLEAU II: Cellules sécrétrices de cytokines</b>	<b>26</b>
<b>TABLEAU III: Effets biologiques des cytokines</b>	<b>27</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: Le récepteur du FMLP	32
FIGURE 2: Cinétique de la sécrétion du TNF par les cellules mononucléaires du sang humain cultivées en présence de FMLP et/ou de LPS	65
FIGURE 3: Cinétique de la sécrétion du TNF par les cellules mononucléaires adhérentes du sang humain cultivées en présence ou en l'absence de FMLP et/ou de LPS	69
FIGURE 4: Cinétique de la sécrétion d'IL-6 par les cellules mononucléaires du sang humain mises ou pas en présence de FMLP	73
FIGURE 5: Cinétique de la sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de LPS avec ou sans FMLP	75
FIGURE 6: Cinétique de la sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires adhérentes du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS	80
FIGURE 7: Sécrétion de TNF par les cellules mononucléaires du sang humain cultivées avec différentes doses de FMLP et/ou de LPS	84
FIGURE 8: Sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de différentes doses de FMLP et/ou de LPS	89
FIGURE 9: Effets d'un prétraitement à la toxine de <i>Bordetella pertussis</i> sur la sécrétion de TNF par les cellules mononucléaires du sang humain stimulées avec du FMLP et/ou du LPS	92
FIGURE 10: Effets d'un prétraitement à la toxine de <i>Bordetella pertussis</i> sur la sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP	96

FIGURE 11: Effets d'un prétraitement à la toxine de <i>Bordetella pertussis</i> sur la sécrétion d'IL-6 par les cellules mononucléaires mises en présence de LPS ou de la combinaison FMLP + LPS	98
FIGURE 12: Expression de l'ARNm de différentes cytokines par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS	102
FIGURE 13: Rapports densitométriques de l'expression de l'ARNm de différentes cytokines par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS (figure 12)	104
FIGURE 14: Effets d'un prétraitement à la toxine de <i>Bordetella pertussis</i> sur l'expression des gènes de l'IL-1 $\alpha$ et l'IL-1 $\beta$ par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS	108
FIGURE 15: Rapports densitométriques des effets d'un prétraitement à la toxine de <i>Bordetella pertussis</i> sur l'expression des gènes de l'IL-1 $\alpha$ et l'IL-1 $\beta$ par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS (figure 14)	110

## SOMMAIRE

Le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) est un dérivé bactérien capable d'induire et de moduler des réponses cellulaires liées à l'inflammation. Le chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes et l'induction de la flambée oxidative sont des effets bien connus de ce peptide. Les cytokines constituent des messagers intercellulaires importants dans les réponses immunes. L'impact du FMLP sur les cytokines est peu connu. Nous avons évalué les effets du FMLP seul ou en combinaison avec le lipopolysaccharide (LPS), un autre dérivé bactérien, sur l'expression de gène et la sécrétion de cytokines inflammatoires.

Nous avons utilisé des cellules mononucléaires du sang humain comme cible du FMLP étant donné leur rôle majeur dans la sécrétion de cytokines. Des dosages fonctionnels ont été effectués pour doser le TNF- $\alpha$  (lignée L929) et l'IL-6 (lignée B9) présents dans les surnageants cellulaires. Des analyses de type Northern ont été utilisées pour évaluer l'expression des gènes du TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6.

Le FMLP (250  $\mu$ g/mL) contrairement au LPS (100 ng/mL) n'a pas induit la transcription du gène ou la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Il a par contre inhibé la sécrétion du TNF- $\alpha$  induite par le LPS sans modifier l'expression du gène de cette cytokine. L'inhibition est indépendante de la protéine G<sub>i</sub> puisqu'un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* ne l'a pas modifié.

Les effets du FMLP sur la sécrétion d'IL-6 se sont manifestés à partir de 24 heures de stimulation. Le FMLP a induit la sécrétion d'IL-6 au-dessus du niveau du témoin. La combinaison FMLP + LPS a provoqué une sécrétion plus grande que celle observée avec un seul des stimuli. L'induction de la sécrétion d'IL-6 est potentiellement due en partie à l'augmentation de l'expression du gène codant pour cette protéine. Le FMLP a induit l'ARNm codant pour l'IL-6 et ceux des IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . L'induction de la sécrétion d'IL-6 et de l'expression des gènes IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  est sensible à l'action de la toxine de *Bordetella pertussis*. Une ou des protéines G, sont impliquées dans ces effets du FMLP. Il pourrait bien s'agir des protéines G couplées aux récepteurs du FMLP.

Les effets du FMLP: inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  induite par le LPS, l'induction de la sécrétion d'IL-6 et l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 induite par le LPS sont dépendants de la dose de stimuli utilisée. Plus la dose du FMLP est importante ( 125 à 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) plus ces effets sont importants.

Les résultats obtenus démontrent que le TNF- $\alpha$  est régulé par des mécanismes distincts de ceux qui régissent l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6. Le FMLP est à la fois un inducteur et un modulateur de cytokines. Il pourrait éventuellement être utilisé pour contrôler les taux de cytokines.

## INTRODUCTION

L'inflammation est une réponse physiologique pour défendre l'organisme contre des agents physiques, des substances chimiques ou des agents biologiques. Ce processus implique plusieurs types cellulaires et diverses molécules. Les médiateurs cellulaires et moléculaires sont déversés à partir du sang périphérique vers les tissus extravasculaires agressés. La compréhension des mécanismes complexes qui contrôlent l'inflammation est d'une grande importance. Lorsque le processus inflammatoire est dérégulé diverses pathologies surgissent. Les cytokines sont des messagers intercellulaires impliquées dans les réponses immunes telle que l'inflammation. Elles sont organisées dans un réseau complexe dont les composantes et les liens qui les unissent sont partiellement élucidés.

Les bactéries et leurs dérivés sont des déclencheurs importants de ce processus d'inflammation. Le lipopolysaccharide (LPS) est un dérivé bactérien largement utilisé pour étudier les réponses cellulaires. Il provoque plusieurs sécrétions impliquées dans l'inflammation: prostaglandines, cytokines, etc. Le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) est un autre dérivé bactérien. Celui-ci induit le chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes ainsi que la flambée oxidative.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1.0 INFLAMMATION**

### **1.1 DÉFINITION**

L'inflammation est le processus par lequel le corps se défend contre des agents physiques, des substances chimiques ou des agents biologiques. La fonction de l'inflammation est de libérer du plasma et des constituants cellulaires sanguins aux tissus extravasculaires. Le déversement de plasma dans les tissus cause l'oedème et provoque la dilution des substances toxiques et augmente le flot lymphatique. Les cellules phagocytaires infiltrent les tissus et détruisent les pathogènes. Si nécessaire, les tissus endommagés sont remplacés par de la fibrose (Klein, 1990). L'inflammation est un processus impliquant plusieurs médiateurs solubles: prostaglandines, leucotriènes, kinines, cytokines, etc et des médiateurs cellulaires: neutrophiles, lymphocytes, monocytes, macrophages.

La séquence des événements observés est la suivante (Sell, 1987):

- 1- augmentation de flot sanguin (vasodilatation) qui est précédée par une vasoconstriction transitoire
- 2- augmentation de la perméabilité vasculaire menant à l'oedème (vasoperméabilité)
- 3- infiltration par les neutrophiles
- 4- infiltration par les lymphocytes et les macrophages
- 5- résolution (restauration normale de la structure) ou cicatrisation (remplacement des tissus endommagés par des fibroblastes et du collagène)



## 1.2 MÉDIATEURS IMPORTANTS

Dans le processus inflammatoire, les cellules du sang périphérique représentent des médiateurs de premier ordre. Les cellules polynucléaires représentent les premières cellules à migrer vers les sites de réactions. Par la suite, les cellules mononucléaires, soit les lymphocytes et les monocytes/macrophages, sont amenées aux sites inflammatoires.

Les monocytes/macrophages et leurs produits de sécrétion contribuent à l'induction et à la régulation de l'inflammation (Adams et Hamilton, 1992) via

- 1- la phagocytose
- 2- la sécrétion et la régulation d'éléments de la cascade du complément
- 3- la sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6)
- 4- la sécrétion de protéases et d'antiprotéases
- 5- la sécrétion de métabolites de l'acide arachidonique
- 6- la régulation des lymphocytes T et B
- 7- le contrôle de la croissance et de la réplication des fibroblastes.

La présente revue bibliographique s'attardera sur un type de médiateurs solubles soit les cytokines. Au moins trois cytokines sont considérées comme inflammatoires: le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6.

## 2.0 FACTEUR NÉCROSANT DES TUMEURS (TNF)

### 2.1 PROTÉINE

L'entité connue sous le terme de TNF existe sous deux formes: le TNF proprement dit ou TNF- $\alpha$  et la lymphotoxine ou TNF- $\beta$ . D'autres synonymes ont aussi été utilisés dans la littérature (voir tableau 1, p.25). Dans ce qui suit, le terme "TNF" désignera le TNF- $\alpha$  alors que le TNF- $\beta$  sera appelé "lymphotoxine". Nous nous attarderons davantage sur le TNF.

Cette cytokine est synthétisée sous forme de précurseur, l'extrémité N-terminale est par la suite coupée. Le précurseur est composé de 233 acides aminés et est clivé pour donner une protéine mature de 157 acides aminés et de 17,5 kDa, sous sa forme sécrétée (Pennica *et al.*, 1984). Les séquences du TNF et de la lymphotoxine présentent une homologie de seulement 30% l'une avec l'autre (Pennica *et al.*, 1984, Aggarwal *et al.*, 1985). Par contre, ces molécules sont très similaires au niveau de leurs structures tertiaire et quaternaire (Sprang et Eck, 1992). Le TNF est présent sous forme de trimère en solution physiologique, et seulement une faible proportion des molécules sont présentes sous forme de monomère (Sprang et Eck, 1992). Le trimère est la forme stable et biologiquement active (Smith et Baglioni, 1987).

Des molécules de TNF membranaire ont été détectées sur des monocytes stimulés au lipopolysaccharide (LPS) et au myristate de phorbol ainsi que sur un faible pourcentage

de lymphocytes T stimulés avec du phorbol acétate et de l'ionomycine (Kriegler *et al.*, 1988, Hofslis *et al.*, 1989, Kinkhabwala *et al.*, 1990). Cette forme membranaire est une molécule précurseur de TNF de 26 kDa, l'extrémité C-terminale est à l'extérieur alors que l'extrémité N-terminale est à l'intérieur de la cellule (Kriegler *et al.*, 1988). Le TNF membranaire peut induire la mort des cellules tumorales et des cellules porteuses de virus par un contact cellule-cellule (Perez *et al.*, 1990). Ces auteurs suggèrent une action locale par le TNF membranaire plutôt qu'une action systémique, exercée par la forme soluble.

## 2.2 RÉCEPTEURS

Il existe deux types de récepteurs du TNF: le TNF-R1 et le TNF-R2, le premier possède une masse moléculaire de 55 kDa et le second de 75 kDa (Schall *et al.*, 1990, Smith *et al.*, 1990). La lymphotoxine et le TNF se lient avec des affinités comparables aux deux types de récepteurs (Schall *et al.*, 1990, Smith *et al.*, 1990). La constante de dissociation de l'attachement du TNF au TNF-R1 est de 0,5 nM et de 0,1 nM pour l'attachement au TNF-R2 (Tartaglia et Goeddel, 1992). Certaines cellules expriment les deux types de récepteurs alors que d'autres en expriment un seul (Vassalli, 1992). Le TNF-R1 est exprimé préférentiellement sur les cellules d'origine épithéliale tandis que le TNF-R2 est plus abondant sur les cellules myéloïdes (Ding et Porteu, 1992).

Les monocytes et les cellules polynucléaires possèdent environ 500 à 2000 récepteurs du TNF par cellule (Ding et Porteu 1992). Ces cellules expriment des quantités

similaires des deux types de récepteurs à leur surface (Brockhaus *et al.*, 1990, Porteu *et al.*, 1991). Les deux types de récepteurs semblent provoquer un signal de cytotoxicité par un simple signal de liaison croisée, communément appelé "cross linking", ou d'agrégation de récepteurs, puisqu'un anticorps dirigé contre l'un ou l'autre d'entre eux mime l'action du TNF (Engelmann *et al.*, 1990b, Hohmann *et al.*, 1990, Naume *et al.*, 1991).

Des récepteurs solubles sont retrouvés dans l'urine (Engelmann *et al.*, 1990a, Nophar *et al.*, 1990), dans le liquide synovial de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Roux-Lombard *et al.*, 1993) mais aussi dans des échantillons de sang de personnes endotoxémiques et de personnes en santé (Shapiro *et al.*, 1993). La présence de telles molécules en circulation chez l'humain est physiologiquement normale. Ces formes de récepteurs sont sans doute un moyen pour l'organisme de contrôler les réponses au TNF et à la lymphotoxine. Les récepteurs solubles bloquent l'activité biologique du TNF (Adolf et Frühbeis, 1992). Cependant, à faible concentration, les récepteurs solubles stabilisent l'activité de la cytokine et semblent de cette façon la mettre en réserve pour un usage ultérieur, augmentant donc certains effets du TNF (Aderka *et al.*, 1992).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la régulation de ces récepteurs (Ding et Porteu, 1992). Ils semblent avoir des rôles différents et des modes de régulation différents (Hohmann *et al.*, 1990, Erikstein *et al.*, 1991). Heller et collaborateurs (1992) ont associé au TNF-R2 un rôle dans la cytotoxicité induite par le TNF sur des lignées

cellulaires. Tartaglia et Goeddel (1992) ont proposé un rôle pour le TNF-R2 pour des faibles concentrations de TNF alors que le TNF-R1 serait surtout impliqué lorsque le TNF est présent en grande quantité.

### 2.3 CELLULES PRODUCTRICES ET INDUCTEURS

Plusieurs types cellulaires ont la capacité de synthétiser du TNF (voir tableau 2, p.26). Les monocytes et macrophages en constituent une des sources principales. Les lymphocytes T et les cellules NK représentent aussi une grande source potentielle et largement distribuée de TNF et leur apport en TNF peut être critique lors de conditions pathologiques (Vassalli, 1992).

La lymphotoxine et le TNF sont régulés indépendamment l'un de l'autre dans différents tissus (Cuturi *et al.*, 1987, Kasid *et al.*, 1990, Sung *et al.*, 1988a). Par exemple, les cellules mononucléaires du sang humain mises en présence d'IL-1 $\beta$  transcrivent les gènes du TNF et de la lymphotoxine tandis que le GM-CSF induit seulement l'expression du gène du TNF (Kasid *et al.*, 1990).

La production du TNF et de la lymphotoxine est régulée au niveau de: 1) la transcription, 2) la post-transcription pour l'abondance d'ARNm, 3) l'efficacité de la traduction, 4) la maturation de la protéine de façon indépendante l'une de l'autre (Kriegler *et al.*, 1988, Sariban *et al.*, 1988, Horiguchi *et al.*, 1989, Taffet *et al.*, 1989, Han *et al.*,

1990, English *et al.*, 1991).

## 2.4 EFFETS BIOLOGIQUES

Le TNF agit sur une multitude de cellules (voir tableau 3). Les monocytes/macrophages sont non seulement une source primordiale de TNF mais en sont aussi une cible importante. Le TNF provoque le chimiotactisme, la différenciation et l'activation, et prévient l'apoptose des monocytes/macrophages (Mangan *et al.*, 1991, Vassalli, 1992).

Étant donné la capacité du TNF à induire et à moduler d'autres cytokines, ses actions biologiques peuvent être provoquées de façon directe par d'autres cytokines, par exemple l'IL-6 dans l'induction des protéines de la phase aiguë (Vassalli, 1992). Une des actions importantes de cette cytokine est d'augmenter le métabolisme oxydatif et la phagocytose effectués par les cellules polynucléaires dans les réponses inflammatoires (Shalaby *et al.*, 1985, Nathan, 1987).

L'action du TNF sur les cellules endothéliales représente un élément majeur dans les effets systémiques de cette cytokine *in vivo*. Cette cytokine induit la sécrétion de prostaglandine de type I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), de PGE<sub>2</sub>, de facteur activateur de plaquettes (PAF) par les cellules endothéliales et augmente l'activité procoagulante, l'adhérence des leucocytes et l'inhibiteur de plasminogène (Gamble *et al.*, 1992).

Des essais cliniques chez l'humain ont montré que le TNF induit plusieurs effets: leucopénie rapide, diminution du nombre de neutrophiles circulants, une augmentation du niveau de lactoferrine, une augmentation de l'IL-6 circulant, de la fièvre, des maux de tête, une activation de l'activité de coagulation et de l'action antifibrinolytique (Chapman *et al.*, 1987, Van der Poll *et al.*, 1990, Van der Poll *et al.*, 1991). Le TNF est impliqué dans des effets importants sur le métabolisme cellulaire en général mais aussi sur l'organisme dans son ensemble (Arai *et al.*, 1990).

## 2.5 MÉCANISMES D'ACTION

Le TNF peut induire la mort cellulaire par la simple liaison à son récepteur sans entrer dans la cellule (Perez *et al.*, 1990). L'internalisation du ligand n'est donc pas nécessaire pour déclencher la cascade de signaux intracellulaires provoquant les divers effets du TNF. La cascade de signaux de transduction induite par le TNF n'est pas encore parfaitement élucidée. Une des voies d'activation du TNF utilise une protéine G sensible à la toxine de *Bordetella pertussis*, puisqu'un prétraitement à cette toxine bactérienne inhibe certains effets du TNF (Imamura *et al.*, 1988, Brett *et al.*, 1989). D'autres équipes ont identifié la participation des phospholipases A<sub>2</sub>; ces dernières seraient responsables de la synthèse d'eicosanoïdes induite par le TNF (Clark *et al.*, 1988, Neale *et al.*, 1988). Les protéines kinases C et des phospholipases spécifiques de la phosphatidylcholine sont aussi impliquées dans l'activation à la suite de la liaison du TNF à son récepteur (Schütze *et*

*al.*, 1990). Le TNF induit aussi le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et provoque sa transcription chez plusieurs types cellulaires (Duh *et al.*, 1989, Lowenthal *et al.*, 1989, Osborn *et al.*, 1989, Meyer *et al.*, 1991). Ce facteur est impliqué dans l'activation de plusieurs gènes du système immunitaire (IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, IL-2, TNF, chaîne  $\beta$  du récepteur de lymphocyte T, immunoglobulines) (Müller *et al.*, 1993).

L'action du TNF est médiée entre autre par l'induction puissante de superoxydes réactifs non seulement chez les macrophages et les polynucléaires mais aussi chez les cellules cancéreuses (Zimmermann *et al.*, 1989, Yamauchi *et al.*, 1990). Chez ces dernières, cette induction mène à la destruction cellulaire (Zimmermann *et al.*, 1989).



### 3.0 INTERLEUKINE-1 (IL-1)

#### 3.1 PROTÉINE

Il y a deux formes d'interleukine-1: IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . Ces deux protéines sont transcrites et traduites à partir de deux gènes différents et ne représentent pas des formes alléliques d'un même gène (Webb *et al.*, 1986, Lafage *et al.*, 1989).

Le précurseur de l'IL-1 $\alpha$  humaine est un polypeptide long de 271 acides aminés alors que celui de l'IL-1 $\beta$  possède 269 acides aminés (March *et al.*, 1985). Chacun de ces précurseurs a une masse moléculaire d'environ 31 kDa, et aucun ne possède un signal hydrophobique classique à l'extrémité N-terminale, la portion biologiquement active pour ces deux protéines se retrouvant à l'extrémité C-terminale. La pleine longueur du précurseur de l'IL-1 $\alpha$  a une activité biologique alors que le précurseur de l'IL-1 $\beta$  n'en a pas (March *et al.*, 1985, Mosley *et al.*, 1987). Ces deux protéines présentent une homologie de 26% au niveau de la séquence (March *et al.*, 1985). A maturité, toutes deux présentent une masse moléculaire de 17,5 kDa (Aggarwal et Pocsik, 1992).

Une enzyme spécifique pour cliver l'IL-1 $\beta$  a été clonée et caractérisée: il s'agit de l'IL-1 $\beta$  convertase (Cerretti *et al.*, 1992, Thornberry *et al.*, 1992). Cette enzyme serait surtout utilisée chez les monocytes et les macrophages. D'autres enzymes sont possiblement utilisées pour la conversion de IL-1 $\beta$  en protéine mature : élastase, cathepsine G, collagénase, protéase sérine, cathepsine L (Auron *et al.*, 1987, Black *et al.*,

1988, Hazuda *et al.*, 1990). La maturation de la protéine IL-1 $\alpha$  quant à elle, implique une protéase neutre activée avec du calcium (Kobayashi *et al.*, 1990).

On retrouve des protéines IL-1 $\alpha$  à la surface des monocytes humains, macrophages, lymphocytes B, cellules endothéliales, cellules dendritiques et fibroblastes alors que l'on ne retrouve pas d'IL-1 $\beta$  ancrée dans la membrane plasmique (Kurt-Jones *et al.*, 1985, Bakouche *et al.*, 1987, Conlon *et al.*, 1987, Dinarello, 1992). L'IL-1 ancrée dans la membrane est biologiquement active (Kurt-Jones *et al.*, 1985). Par contre, dans le cas des monocytes humains, les expériences de Suttles et collaborateurs (1990) mettent en doute la présence d'IL-1 membranaire, et la démonstration de cette forme de l'IL-1 par d'autres équipes serait en fait due aux conditions expérimentales. D'ailleurs, si de telles protéines étaient exprimées en surface de ces cellules, leur orientation n'est pas encore élucidée (Dinarello, 1992).

Ces cytokines ne sont pas sécrétées par les voies habituelles via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Rubartelli et collaborateurs (1990) ont démontré que chez les monocytes humains, l'IL-1 $\beta$  n'est pas transportée dans le réticulum endoplasmique. Cette protéine est sécrétée par une voie alternative, qui est peut-être utilisée pour éviter le milieu oxydant du lumen du réticulum endoplasmique. La sécrétion de cette protéine est bloquée par des traitements capables d'inhiber l'endocytose; ce qui donne à penser que la voie de recyclage des endosomes peut jouer un rôle dans

l'exportation de cette cytokine. Tout au moins *in vitro*, la maturation de la protéine de 33 à 17 kDa se déroule en partie dans des vésicules qui contiennent ces deux formes des protéines (Rubartelli *et al.*, 1990).

Dans la plupart des tissus humains l'IL-1 $\beta$  est prépondérante sur IL-1 $\alpha$  (Arai *et al.*, 1990). Une stimulation au LPS de monocytes humains déclenche une plus grande expression du gène de l'IL-1 $\beta$  que de l'IL-1 $\alpha$  (Demczuk *et al.*, 1987). Par contre, Lonnemann et collaborateurs ont démontré que ces mêmes cellules synthétisent plus d'IL- $\alpha$  que d'IL-1 $\beta$ , mais que 90% de l'IL-1 $\alpha$  reste associée à la cellule et que 80% de IL-1 $\beta$  est sécrétée (Lonnemann *et al.*, 1989). De plus, les monocytes stimulés au LPS sécrètent l'IL-1 $\beta$  avant l'IL-1 $\alpha$  (Hazuda *et al.*, 1988).

### 3.2 RÉCEPTEURS

Relativement peu de récepteurs de l'IL-1 sont détectés, on en dénombre en général entre 100 et 3000 par cellule (Aggarwal et Pocsik, 1992). Il existe deux types de récepteurs pour cette cytokine. Le récepteur de type I (IL-1RtI) possède une masse moléculaire de 80 kDa (Sims *et al.*, 1989) et le type II (IL-1RtII) une masse de 68 kDa (McMahan *et al.*, 1991). Chacun de ces deux récepteurs se lie aussi bien avec l'IL-1 $\alpha$  qu'avec l'IL-1 $\beta$  (Sims *et al.*, 1989, McMahan *et al.*, 1991).

L'IL-1RtI se retrouve sur les cellules T, les fibroblastes, les cellules endothéliales,

les hépatocytes et les monocytes humains (Dinarello, 1992). A la suite de la liaison du ligand à ce récepteur, on observe rapidement une phosphorylation du récepteur lui-même sur des résidus sérines et thréonines (Gallis *et al.*, 1989). Après l'attachement du ligand au récepteur IL-1RtI sur des fibroblastes ou des lymphocytes T, l'IL-1 est internalisée mais pas dégradée, et on la retrouve dans le noyau même plusieurs heures après la liaison (Mizel *et al.*, 1987, Qwarnstrom *et al.*, 1988, Curtis *et al.*, 1990).

L'IL-1RtII est présent sur les neutrophiles, les cellules de la moelle osseuse et sur des lignées cellulaires de type B (Dinarello, 1992). Une fois le ligand lié à ce récepteur, il y a moins d'internalisation et celle-ci se fait plus lentement (Horuk *et al.*, 1987). Lorsqu'il y a internalisation, l'IL-1 liée est dégradée contrairement à ce que l'on observe avec l'IL-1RtI (Matsushima *et al.*, 1986).

Les récepteurs sont exprimés en permanence sur les cellules mais leur nombre peut être augmenté par divers stimuli. Ainsi, les lectines augmentent le nombre de récepteurs sur les lymphocytes T, tandis que les glucocorticoïdes (Matsushima *et al.*, 1987) et les prostaglandines produisent le même effet sur les lymphocytes B (Muegge et Durum, 1989).

### **3.3 CELLULES PRODUCTRICES ET INDUCTEURS**

Les monocytes/macrophages sont une source importante d'IL-1 à cause de leurs localisations stratégiques et de leur capacité de convertir les précurseurs de cette cytokine,

de façon plus efficace que d'autres types cellulaires (Dinarello et Savage, 1989).

Chez les monocytes/macrophages, la sécrétion de cette cytokine peut être induite par des signaux exogènes, tels le LPS, les parois cellulaires de levure, la lumière ultraviolette, les exotoxines et les antigènes viraux, et par des signaux endogènes, tels les cytokines (TGF $\beta$ , IFN  $\alpha, \beta, \gamma$ , TNF, GM-CSF, IL-1), les leucotriènes, le C5a et les complexes immuns (Muegge et Durum, 1989). D'autres cellules sécrètent aussi de l'IL-1 (voir Tableau 2, p.13). Le LPS est sans doute l'un des plus puissants activateurs. Il provoque la sécrétion d'IL-1 chez les cellules suivantes: lymphocytes B humains (Matsushima *et al.*, 1985), cellules endothéliales (Wagner *et al.*, 1984), cellules épithéliales (Gahring *et al.*, 1984) cellules de Langerhans (Sauder *et al.*, 1984), astrocytes (Fontana *et al.*, 1982).

### 3.4 EFFETS BIOLOGIQUES

Les effets biologiques de l'IL-1 se retrouvent dans presque tous les tissus et organes humains (voir tableau 3, p.14) (Dinarello et Savage, 1989). Chez les monocytes humains, l'IL-1 régule à la hausse le nombre de récepteurs de l'IFN $\gamma$  et augmente l'expression de HLA-DR par lui-même ou augmente cette expression induite par l'IFN $\gamma$ . L'IL-1 provoque donc une immunopotentialisation des monocytes (Krakauer et Oppenheim, 1993). L'IL-1 prolonge l'activité cytotoxique des monocytes et macrophages humains (Onozaki *et al.*, 1985).

L'IL-1 améliore, seule ou en collaboration avec d'autres cytokines tel le GM-CSF, les fonctions accessoires des cellules de Langerhans, des cellules dendritiques et des cellules spléniques présentatrices d'antigène (Koide *et al.*, 1987, Aiello *et al.*, 1988, Heufler *et al.*, 1988). L'IL-1 induit la synthèse de prostaglandines à partir des macrophages, des cellules endothéliales, des cellules synoviales, des fibroblastes et des cellules musculaires (Oppenheim *et al.*, 1986). L'habilité à initier la synthèse de prostaglandines (des molécules ayant des effets locaux et systémiques) est sans doute une des propriétés biologiques les plus importantes de l'IL-1 (Dinarello et Savage, 1989).

L'injection d'IL-1 $\beta$  recombinant chez des patients atteints de cancers métastatiques a provoqué une augmentation transitoire du rythme cardiaque, une faible fièvre, des rigidités et une augmentation transitoire de neutrophiles. Quelques jours après le traitement, on a détecté une augmentation durant plusieurs jours du nombre de plaquettes (Tewari *et al.*, 1990). Cette équipe a donc démontré la faisabilité d'un traitement utilisant l'IL-1 chez l'humain. L'IL-1 agit au niveau local mais aussi systémique.

### 3.5 ANTAGONISTE DU RÉCEPTEUR DE L'INTERLEUKINE-1

L'antagoniste du récepteur de l'interleukine-1 (IL-1ra) est un inhibiteur des IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ . Il bloque l'activité de ces cytokines autant *in vivo* que *in vitro* (Dinarello, 1992). Cette glycoprotéine de 25 kDa peut s'attacher aux deux types de récepteurs: IL-1RtI et IL-1RtII. La séquence en acides aminés de cet inhibiteur présente une homologie de 26%

avec l'IL-1 $\beta$  et de 19% avec l'IL-1 $\alpha$  (Eisenberg *et al.*, 1990, Dinarello, 1992).

Ce polypeptide possède un "peptide signal" classique pour la sécrétion, ce qui le distingue des deux IL-1. L'IL-1ra se démarque des IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  non seulement par son mode de sécrétion mais aussi dans la régulation de l'expression de son gène et de sa synthèse protéique (Arend *et al.*, 1989, Poutsika *et al.*, 1991). Par exemple, le sérum, les IgG, le GM-CSF stimulent les cellules mononucléaires humaines à produire de l'IL-1ra mais pas d'IL-1 $\beta$  (Poutsika *et al.*, 1991). Chez ces cellules une stimulation au LPS provoque une plus grande sécrétion de IL-1ra que de l'IL-1 $\beta$  (Poutsika *et al.*, 1991).

La présence d'IL-1ra dans l'urine de patients atteints de leucémie monocyttaire (Seckinger *et al.*, 1987) ou fiévreux (Liao *et al.*, 1984) démontre la présence *in vivo* d'un tel inhibiteur. La production endogène de l'IL-1ra contribue probablement à limiter la sévérité de certaines maladies mais elle n'est sans doute pas suffisante dans les cas d'infection importante ou d'inflammation aiguë (Dinarello, 1992). Dans certains modèles animaux, cet inhibiteur a déjà été utilisé avec succès pour réduire la sévérité de diverses maladies (Alexander *et al.*, 1991, McCarthy *et al.*, 1991, Dinarello, 1992). Ces résultats encourageants ouvrent la possibilité d'une utilisation similaire chez l'humain.

## 4.0 INTERLEUKINE-6

### 4.1 PROTÉINE

Trois ensembles d'allèles se présentent dans une variété de combinaisons au niveau du gène de l'IL-6 (Bowcock *et al.*, 1989). Les allèles diffèrent de 30 à 230 pb (Bowcock *et al.*, 1989). La protéine est constituée de 212 acides aminés. Elle possède deux sites potentiels de glycosylation de type N et plusieurs de type O ainsi que plusieurs résidues sérines qui peuvent potentiellement être phosphorylés (Hirano *et al.*, 1986, May *et al.*, 1986, Zilberstein *et al.*, 1986).

L'interleukine-6 est sécrétée sous diverses formes par différents types cellulaires (fibroblastes, monocytes, lymphocytes B), avec des masses moléculaires variant de 19 à 70 kDa (May *et al.*, 1988, May *et al.*, 1989, Gross *et al.*, 1989). Ces différences de masses moléculaires sont dues au moins en partie à des phosphorylations sur des résidues sérines et différentes glycosylations de type N et O (Gross *et al.*, 1989, May *et al.*, 1990).

Les modifications post-traductionnelles, comme le degré de glycosylation et de phosphorylation, semblent être spécifiques à certains tissus et pourraient jouer un rôle dans les fonctions biologiques (May *et al.*, 1988, Tanner *et al.*, 1990). Il a été prouvé avec d'autres protéines que la glycosylation rend les protéines plus résistantes à la protéolyse et augmente donc, par le fait même, la demie vie de ces protéines (West 1986,



Rucker et Wold, 1988). Par contre, la glycosylation de l'IL-6 n'est pas essentielle à son activité biologique (Guisez *et al.*, 1991). Non seulement les formes d'IL-6 sécrétées varient d'un type cellulaire à l'autre, mais en plus les agents capables de l'induire diffèrent d'un type cellulaire à l'autre (voir Section 4.3).

## 4.2 RÉCEPTEURS

Le récepteur de l'IL-6 (IL-6R), a une masse moléculaire de 80 kDa à maturité, mais, comme nous le verrons dans un instant, il n'est pas directement impliqué dans les signaux de transduction induits par cette cytokine (Kishimoto *et al.*, 1992). Les cellules qui expriment à leur surface l'IL-6R en possèdent environ 100 à 1000 (Taga *et al.*, 1987, Taga et Kishimoto 1990). Les lymphocytes B lorsqu'ils sont activés, et les lymphocytes T au repos ou activés en expriment un nombre comparable (Hirata *et al.*, 1989). L'expression de récepteur sur les lymphocytes est en conformité avec le moment, dans leur maturation, où l'IL-6 agit sur eux (Taga et Kishimoto, 1990). En effet l'IL-6 agit sur les lymphocytes T tôt dans le processus de leur maturation mais agit seulement sur les lymphocytes B activés et les plasmocytes (Taga et Kishimoto, 1990). Les monocytes et les hépatocytes expriment aussi ce récepteur (Taga et Kishimoto, 1990):

Les molécules d'IL-6 dimériques peuvent se lier au récepteur avec une affinité plus grande que les molécules monomériques (Wijdenes *et al.*, 1991). Les deux molécules peuvent être liées de façon covalente et elles pourraient représenter les protéines de

grande masse moléculaire qui ont été détectées dans les surnageants de divers types cellulaires (Voir 4.1) (Wijdenes *et al.*, 1991).

Une glycoprotéine membranaire de 130 kDa (gp130) est responsable de la transduction du signal de l'IL-6. En se liant à son récepteur, l'IL-6 peut causer des changements qualitatifs à celui-ci et provoquer l'association du complexe IL-6/IL-6R avec la gp130. Cette dernière ne possède pas de site d'attachement pour l'IL-6 mais elle transduit le signal de l'IL-6 (Taga *et al.*, 1989). La gp130 est présente chez presque tous les types cellulaires testés, alors que l'expression de l'IL-6R se limite aux cellules répondant à cette cytokine (Taga et Kishimoto 1992). La gp130 et l'IL-6R se lient via leur portion extracellulaire respective (Taga *et al.*, 1989). Des IL-6R, sous forme soluble, lorsqu'en présence d'IL-6, ont aussi la capacité de se lier à la gp130 (Taga *et al.*, 1989). Il est possible que le rôle de la gp130, dans les tissus normaux dépourvus d'IL-6R, soit de recevoir le signal du complexe soluble IL-6/IL-6R. De plus, en présence des IL-6R solubles dans le sérum, elle pourrait contribuer à l'augmenter la sensibilité des tissus répondant à l'IL-6 (Taga et Kishimoto, 1992).

Lust et collaborateurs (1992) ont démontré la présence d'un ARNm codant pour une forme soluble de IL-6R chez des lignées myéloïdes et aussi dans des leucocytes normaux. Ces récepteurs solubles sont dépourvus de la partie transmembranaire que l'on observe chez les récepteurs ancrés dans les membranes. La présence d'un tel transcrite de gène

suggère un rôle pour les récepteurs solubles. On peut supposer un rôle non pas d'inhibiteur mais d'activateur, contrairement à ce qui se passe dans le cas du TNF (voir section 2.2).

Une équipe du Japon a identifié une protéine se liant à l'IL-6 dans le plasma humain; il s'agit de la macroglobuline- $\alpha$ 2. Cette molécule prévient la protéolyse de la cytokine et pourrait bien jouer un rôle dans la régulation de la quantité d'IL-6 dans le sérum (Matsuda *et al.*, 1989).

#### 4.3 CELLULES PRODUCTRICES ET INDUCTEURS

Diverses cellules ont la capacité de sécréter de l'IL-6 lorsqu'elles sont stimulées (voir tableau 2, p.13). Les mêmes stimuli n'agissent pas tous sur ces différents types cellulaires pour induire la sécrétion de l'IL-6. Par exemple, le TNF et l'IL-1 sont capables d'induire la sécrétion de l'IL-6 par les fibroblastes alors que les monocytes du sang humain ne transcrivent pas le gène de cette cytokine en présence de ces stimuli (Ray *et al.*, 1989a).

Divers stimuli peuvent induire la sécrétion d'IL-6 dans plusieurs types cellulaires. Certains sont endogènes: IL-1 (Van Damme *et al.*, 1987, Sironi *et al.*, 1989), TNF (Zhang *et al.*, 1989, Walther *et al.*, 1988), interférons (Sehgal *et al.*, 1988, Walther *et al.*, 1988), lymphotoxine (Sehgal *et al.*, 1988, Jirik *et al.*, 1989), GM-CSF (Navarro *et*

*al.*, 1989), CSF-1 (Navarro *et al.*, 1989), prostaglandine E<sub>1</sub> (Zhang *et al.*, 1988). D'autres sont exogènes: LPS (Jirik *et al.*, 1989) et les mitogènes de cellules T (Sehgal *et al.*, 1987).

Plusieurs équipes tentent d'élucider les mécanismes impliqués dans l'induction de l'IL-6. L'activation du gène de l'IL-6 implique l'AMP cyclique chez les fibroblastes, les cellules épithéliales (Zhang *et al.*, 1988, Ray *et al.*, 1989b) et les monocytes (Bailly *et al.*, 1990). Les glucocorticoïdes répriment l'expression de l'IL-6 dans plusieurs types cellulaires (Helfgott *et al.*, 1987, Sehgal, 1992). Malgré plusieurs informations sur l'induction de l'IL-6, on ne peut dégager un schéma clair des médiateurs impliqués dans l'induction de cette cytokine.

#### **4.4 EFFETS BIOLOGIQUES**

L'interleukine-6 est une cytokine aux actions pléotropiques (voir tableau 3, p.14). Elle active la transcription des protéines de la phase aiguë dans des hépatocytes humains comme on peut l'observer dans des cas d'inflammation (Castell *et al.*, 1989). Cette propriété lui confère un rôle de molécule d'urgence. La réponse de la phase aiguë se manifeste par des changements dans la concentration de certaines protéines plasmatiques sécrétées par les hépatocytes (Kushner *et al.*, 1989).

Cette cytokine joue un rôle dans l'induction de la croissance et de la

différenciation des lymphocytes T cytotoxiques et dans la prolifération des thymocytes (Garman *et al.*, 1987, Lotz *et al.*, 1988, Okada *et al.*, 1988). L'IL-6 est aussi un médiateur important dans la maturation des macrophages. En effet, elle inhibe la croissance et induit la différenciation des cellules myéloïdes en macrophages (Miyaura *et al.*, 1988, Shabo *et al.*, 1988). Elle est aussi impliquée dans l'induction de la croissance des cellules mésangiales des reins (Horii *et al.*, 1989) et dans l'induction de la différenciation neuronale (Satoh *et al.*, 1988).

#### **4.5 FACTEUR NUCLÉAIRE DE L'INTERLEUKINE-6 (NF-IL6)**

Le NF-IL6 est un facteur nucléaire étroitement lié aux effets de l'IL-6 (Akira *et al.*, 1990, Isshiki *et al.*, 1990). Une stimulation avec l'IL-6 ou des inducteurs d'IL-6 (LPS, IL-1, TNF) induisent des modifications post-traductionnelles sur le NF-IL6 lui donnant une affinité plus élevée pour les séquences de reconnaissance (Poli *et al.*, 1990, Akira 1992). Le NF-IL6 est sans doute un médiateur important des effets de cette cytokine d'autant plus que les motifs d'ADN qu'il reconnaît se retrouvent dans les régions régulatrices de plusieurs gènes de molécules impliquées dans l'inflammation et dans l'hématopoïèse par exemple: G-CSF, TNF, IL-1, IL-6, IL-8, lysozyme, protéines de la phase aiguë (Akira, 1992).

**TABLEAU 1. SYNONYMES RETROUVÉS DANS LA LITTÉRATURE  
POUR IDENTIFIER LES CYTOKINES**

<b>CYTOKINE</b>	<b>SYNONYMES</b>
TNF (a)	Pyrogène endogène (EP) Cachectine
IL-1 (a-b)	Pyrogène endogène (EP) Facteur activateur d'ostéoclastes (OAF) Facteur activateur de lymphocytes (LAF) Facteur stimulateur d'hépatocytes (HSF) Médiateur endogène de leucocytes (LEM) Facteur activateur de fibroblastes (FAF) Facteur activateur de cellules B (BAF) Facteur inducteur de protéolyse (PIF) Cataboline Hémopoïétine-1 (H-1)
IL-6 (a-c)	Facteur stimulateur de cellules B (BSF-2) Interféron $\beta$ 2 (IFN- $\beta$ 2) Facteur stimulateur d'hépatocytes (HSF) Facteur de croissance d'hybridomes (HGF) Protéine de 26 kDa Facteur de croissance de plasmacytomes (PCT-GF) Facteur de différenciation des cellules T cytotoxiques (CDF)

- a) Arai *et al.*, 1990  
b) Aggarwal et Pocsik, 1992  
c) Van Snick, 1990

TABLEAU 2. CELLULES SÉCRÉTRICES DE CYTOKINES

CELLULES	TNF	IL-1	IL-6
monocytes/macrophages	+ <sup>(a)</sup>	+ <sup>(b)</sup>	+ <sup>(c)</sup>
lymphocytes T	+ <sup>(a)</sup>	+ <sup>(b)</sup>	+ <sup>(c)</sup>
lymphocytes B	+ <sup>(a)</sup>	+ <sup>(b)</sup>	+ <sup>(c)</sup>
cellules polynucléaires	+ <sup>(a)</sup>	+ <sup>(d)</sup>	+ <sup>(e)</sup>
fibroblastes	n.d.	+ <sup>(b)</sup>	+ <sup>(c)</sup>
cellules épithéliales	n.d.	+ <sup>(b)</sup>	+ <sup>(f)</sup>
cellules endothéliales	n.d.	+ <sup>(b)</sup>	+ <sup>(c)</sup>
kératinocytes	+ <sup>(a)</sup>	+ <sup>(b)</sup>	+ <sup>(c)</sup>

Légende: + cellules sécrétrices  
 - cellules non-sécrétrices  
 n.d. informations non-disponibles

- a) Vassalli, 1992
- b) Dinarello et Savage, 1989
- c) Heinrich *et al.*, 1990
- d) Oppenheim *et al.*, 1986
- e) Hamid *et al.*, 1992
- f) Wong et Goeddel, 1986

TABLEAU 3: EFFETS BIOLOGIQUES DES CYTOKINES

EFFETS BIOLOGIQUES	TNF	IL-1	IL-6
syndrome du choc toxique	+(a)	+(a)	-(a)
action pyrogénique	+(a)	+(a)	+(a)
somnolence	+(a)	+(a)	-(a)
anorexie	+(e)	+(e)	n.d.
résistance non-spécifique aux infections	+(a)	+(a)	+(a)
induction des protéines de la phase aiguë	+(a)	+(a)	+(a)
activation du macrophages	+(d)	+(c)	n.d.
activation de lymphocytes B	+(a)	+(a)	+(a)
activation de lymphocytes T	+(a)	+(a)	+(a)
activation des cellules précurseurs hématopoïétiques	-(a)	+(a)	+(a)
chimiotactisme des neutrophiles	+(f)	+(c)	n.d.
activation de neutrophiles	+(b)	+(b)	n.d.
activation des cellules endothéliales	+(a)	+(a)	-(a)
activité cytotoxique des cellules NK	+(b)	+(b)	n.d.

Légende: + effet observé  
 - effet absent  
 n.d. informations non-disponibles

- a) Dinarello, 1991
- b) Dinarello, 1992
- c) Oppenheim *et al.*, 1986
- d) Mangan *et al.*, 1991
- e) Rothwell et Grimble, 1992
- f) Beutler et Cerami, 1989



## 5.0 N-FORMYL-MÉTHIONYL-LEUCYL-PHÉNYLALANINE (FMLP)

### 5.1 ORIGINE

Des substances de diverses sources (cellulaires et bactériennes) exercent une action chimiotactique sur des granulocytes (Ward *et al.*, 1968, Schiffmann et Gallin, 1979). Schiffmann et collaborateurs (1975) ont déterminé les propriétés que doivent posséder des peptides synthétiques pour détenir un pouvoir chimiotactique sur les neutrophiles et les macrophages. Ces propriétés sont: 1) posséder un groupement formyl à l'extrémité N-terminale, 2) posséder une méthionine, 3) être constitué d'au moins deux acides aminés, 4) contenir des résidus hydrophobiques (Schiffmann *et al.*, 1975).

Mais quelles sont les sources naturelles de tels peptides? Les procaryotes, dont les bactéries, débutent la traduction de leurs protéines par un groupement méthionyl N-formylé, alors que les eucaryotes débutent cette même traduction par une méthionyl non-coiffée de la sorte. Il arrive fréquemment que l'extrémité N-terminale des protéines bactériennes soit clivée (Adams, 1968). Dans ce cas, le groupement formyl seul est perdu ou la séquence finale de la protéine ne débute pas par une méthionine, suggérant que celle-ci est clivée en cours de route par une enzyme bactérienne.

A partir de filtrats de culture de *Escherichia coli* ou de *Streptococcus sanguis*, il a été démontré que les peptides formylés étaient capables d'exercer une action chimiotactique (Marasco *et al.*, 1984, Miyake *et al.*, 1983). Le peptide chimiotactique

retrouvé en plus grande abondance dans le filtrat de *Escherichia coli* était le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) (Marasco *et al.*, 1984). Ce peptide possède les qualités citées plus haut, et on l'utilisait déjà sous une forme synthétique pour attirer les neutrophiles et les macrophages. Les peptides réactifs de bactéries souvent retrouvées dans l'intestin ont leur extrémité N-terminale coiffée. L'intestin est un réservoir de peptides bactériens qui peuvent promouvoir les réponses inflammatoires lorsqu'ils traversent la muqueuse intestinale (Chadwick *et al.*, 1988).

Broom et collaborateurs (1993) ont recherché la ou les protéine(s) bactérienne(s) dont la traduction débute par la séquence FMLP, le peptide retrouvé en plus grande abondance. Une seule protéine, nommée UmuD, fut identifiée. Elle fait partie de l'opéron SOS, impliqué dans la réparation de l'ADN de la bactérie. Un stress oxydant pour les bactéries, telle que l'augmentation de la pression partielle d'oxygène, (phénomène que les bactéries rencontrent par exemple, lorsqu'elles quittent l'intestin pour envahir certains tissus) active cet opéron, entraînant une plus grande transcription et traduction des protéines de cet opéron. On assiste alors à une augmentation de la protéine UmuD et par conséquent du dérivé FMLP dans le surnageant des bactéries (Broom *et al.*, 1993).

Chez les cellules eucaryotes, il existe aussi une transcription similaire à celle des procaryotes. Au sein des chloroplastes et des mitochondries, les protéines traduites à partir de l'ADN débutent leur séquence en N-terminale par une méthionyl formylée. Il a même

été démontré que des protéines mitochondriales, chimiotactiques pour les polynucléaires, possèdent également une méthionyl formylée à leur extrémité N-terminale (Carp, 1982). Au contraire, les protéines mitochondriales non pourvues de cette extrémité (parce que traduites à partir du code génétique nucléaire) ne démontrent pas de propriété chimiotactique (Carp, 1982). Lorsque les phagocytes rencontrent des débris cellulaires (par exemple aux sites de tissus endommagés), ils peuvent reconnaître des peptides N-formylés provenant de la dégradation de mitochondries.

## 5.2 RÉCEPTEURS CHEZ L'HUMAIN

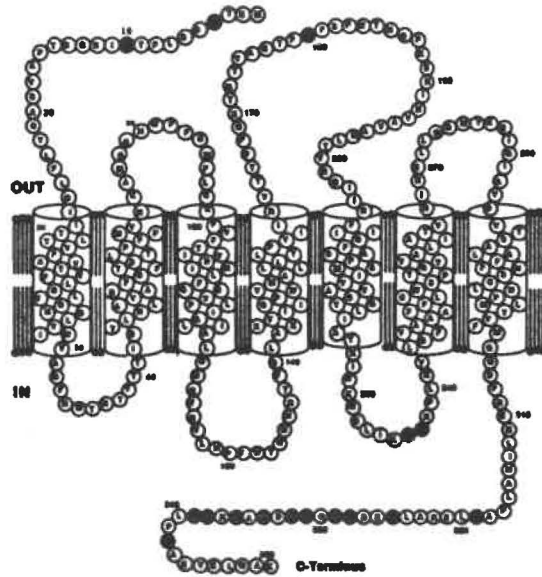
Plusieurs types cellulaires présents dans le sang circulant expriment des récepteurs pour le FMLP. Williams et collaborateurs (1977) ont démontré leur présence sur les leucocytes polynucléaires du sang humain. On a trouvé ce même récepteur sur des monocytes (Weinberg *et al.*, 1981) et des lymphocytes humains (Schubert et Müller, 1989). Environ 90% des monocytes isolés à partir du sang humain expriment ce récepteur (Ohura *et al.*, 1987). Il y aurait environ 50 000 récepteurs par cellules, ce nombre pouvant varier d'un individu à l'autre et selon le stade d'activation des cellules (Sklar *et al.*, 1984).

Plusieurs stimuli comme l'acétate de phorbol myristate, le C5a peuvent réguler à la hausse le nombre de récepteurs (Van Epps *et al.*, 1992). Cette augmentation serait causée par la translocation de récepteurs entreposés dans des granules secondaires spécifiques et par une nouvelle traduction protéique de ces récepteurs (Fletcher *et al.*,

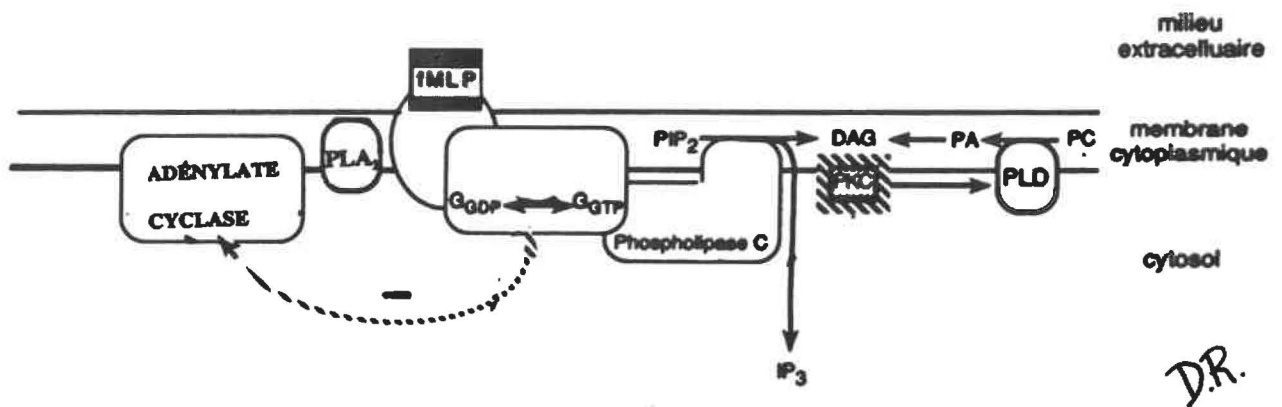
1982, Van Epps *et al.*, 1990). Van Epps et collaborateurs (1992) ont démontré que les monocytes et les neutrophiles régulent à la hausse l'expression de leurs récepteurs par ces mêmes mécanismes. Par contre, la translocation des récepteurs à la surface des cellules se fait plus lentement chez les monocytes que chez les neutrophiles (Van Epps *et al.*, 1992). La capacité des monocytes et neutrophiles d'exprimer en plus grand nombre et même à réexprimer des récepteurs du FMLP démontre leur efficacité à répondre à des stimulations multiples du FMLP.

Le récepteur du FMLP a une masse moléculaire apparente de 55-70 kDa (Schmitt *et al.*, 1983). Selon une structure proposée par Boulay et collaborateurs (1990), une chaîne polypeptidique de 350 acides aminés traverse la membrane plasmique à sept reprises dans une conformation en hélices alpha. L'extrémité N-terminale se situe à l'extérieur alors que celle qui est carboxylée se trouve dans le cytosol (Boulay *et al.*, 1990). On identifie sur la séquence, trois sites potentiels de glycosylation de type N (Boulay *et al.*, 1990) (voir figure 1). Dans la région 5' en amont du gène de ce récepteur, on observe un site AP-1 et un site GRE (Perez *et al.*, 1992b). Ces sites offrent la possibilité de différents modes de régulation de l'expression de ce récepteur. Il a d'ailleurs été démontré que l'expression du récepteur du FMLP était régulée à la hausse en présence de dexaméthasone (Perez *et al.*, 1992a).

**FIGURE 1: LE RÉCEPTEUR DU FMLP**



Snyderman et Uhing 1992



D.R.

Adapté de Snyderman et Uhing 1992

La pochette d'attachement du récepteur ne peut loger plus de six acides aminés (Sklar *et al.*, 1990). On a observé que des tétrapeptides possèdent une plus grande affinité pour le récepteur et une plus grande efficacité pour induire certaines réponses que le tripeptide prototype le plus souvent retrouvé dans la nature, le FMLP (Rot *et al.*, 1987).

On a démontré deux degrés d'affinité pour ce récepteur (Koo *et al.*, 1982). La différence d'affinité ne serait pas due à des récepteurs résultant de gènes différents mais plutôt à des interactions différentes entre le récepteur et la protéine G régulatrice. Ainsi la forme de haute affinité serait dépendante de la présence de protéine G, alors que la forme de moindre affinité ne le serait pas (Williamson *et al.*, 1988, Boulay *et al.*, 1990).

### 5.3 SIGNAUX DE TRANSDUCTION

Les médiateurs potentiellement impliqués dans les signaux de transduction, suite à la liaison du FMLP à son récepteur, sont illustrés sur la figure 1 (p.32). Nous en décrirons ici les grandes lignes.

Les récepteurs des peptides N-formylés présents chez les neutrophiles et les monocytes humains sont couplés à des protéines G. Ces protéines, composées de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), sont imbriquées dans la membrane plasmique des cellules et lient des nucléotides guanines d'où elles tirent leur nom: protéine G. L'attachement de certains ligands à leurs récepteurs provoque l'interconversion d'un GDP par un GTP sur les

protéines G liées à ces récepteurs. La forme de la protéine G liée au GTP stimule ou inhibe l'adénylate cyclase. Les protéines G qui stimulent cette enzyme sont appelées Gs alors que celles qui l'inhibent sont appelées Gi. Les protéines Go, "o" pour autre (other), sont associées au contrôle des canaux ioniques couplés au récepteur. Ce sont Koo et collaborateurs (1983) qui ont démontré la participation d'une protéine G. En présence de GTP, de GDP ou de dérivés GTP non-hydrolysables, ils ont observés que l'attachement du FMLP aux membranes des cellules polynucléaires humaines était diminué.

L'utilisation d'inhibiteur d'activation des protéines G a permis une meilleure caractérisation des protéines G impliquées. La toxine de *Bordetella pertussis* effectue une ADP-ribosylation sur une cystéine près de l'extrémité C-terminale des sous-unités  $\alpha$  des protéines G de type inhibiteur (Gi) et Go (West *et al.*, 1985). En prétraitant les cellules avec cette toxine, on peut inhiber la capacité de ces protéines G d'induire des signaux de transduction et donc des réponses cellulaires.

La toxine de *Bordetella pertussis* inhibe plusieurs effets du FMLP chez les neutrophiles humains: le chimiotactisme, la génération de superoxyde, le relargage d'enzymes lysosomales et l'agrégation des cellules (Lad *et al.*, 1985, Goldman *et al.*, 1985). Chez les monocytes humains, elle inhibe le chimiotactisme, la formation d'inositol triphosphate et la mobilisation d'ions de calcium (Verghese *et al.*, 1986). Il est important de mentionner que le traitement à la toxine de *Bordetella pertussis* n'influence pas le

nombre de récepteurs à la surface des cellules HL-60, des cellules promyéloïdes humaines (Brandt *et al.*, 1985), ce qui suggère que ce n'est pas en diminuant le nombre de récepteurs du FMLP que la toxine inhibe les actions du FMLP mais en agissant au niveau des protéines G.

Différentes équipes ont tenté d'identifier des substrats de la toxine de *Bordetella pertussis* qui seraient impliqués dans une liaison avec le récepteur des peptides N-formylés. Polakis et collaborateurs (1988) ont purifié avec le récepteur une protéine G de 40kDa. Cette dernière est un substrat pour la toxine de *Bordetella pertussis*. En fait, cette protéine de 40kDa pourrait bien être la Gi2 que l'on retrouve sur les membranes de neutrophiles (Goldsmith *et al.*, 1988).

D'autres travaux ont identifié une population de récepteurs de peptides N-formylés qui coéluent en présence de polypeptides de faible masse moléculaire (24 et 26 kDa) se liant au GTP (Polakis *et al.*, 1989). Ces protéines G monomériques présentent beaucoup d'homologie avec la famille des produits de l'oncogène *ras*. Tous ces résultats suggèrent fortement que les récepteurs des peptides N-formylés sont non seulement directement couplés à des protéines G hétérotrimériques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) mais aussi à des protéines G de faible masse moléculaire (Snyderman et Uhing, 1992).

Toute une cascade d'événements intracellulaires est déclenchée en réponse au



FMLP. L'attachement du ligand au récepteur provoque la substitution du GDP pour un GTP situé sur la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G hétérotrimérique de type inhibitrice. Celle-ci une fois activée, va stimuler une phospholipase C (Verghese *et al.*, 1986). En fait, le FMLP peut activer plusieurs phospholipases: phospholipase  $A_2$ , phospholipase C et phospholipase D (Cockcroft et Stutchfield, 1989). L'activation de la phospholipase  $A_2$  est indépendante de l'activation de la phospholipase C (Cockcroft et Stutchfield, 1989). La phospholipase  $A_2$  est impliquée dans le relargage d'arachidonate en clivant l'acide gras (Cockcroft et Stutchfield, 1989).

La protéine  $G_{i2}$  stimule la phospholipase C chez les neutrophiles humains (Smith *et al.*, 1986). Cette phospholipase C induit la dégradation de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en inositol triphosphate et 1,2-diacylglycérol (Smith *et al.*, 1986). Ce dernier composé est connu pour sa capacité d'activer les protéines kinases C, d'autres médiateurs importants dans les activations cellulaires. Gaudry et collaborateurs (1988) ont démontré l'implication de protéines kinases C dans le chimiotactisme induit par le FMLP en inhibant la locomotion des neutrophiles par un traitement des cellules avec le H-7, un inhibiteur de protéines kinases C.

La phospholipase D serait impliquée dans l'activation des neutrophiles humains par le FMLP (Pai *et al.*, 1988, Agwu *et al.*, 1989). Le substrat de choix pour cette phospholipase D est le phosphatidylcholine qui est dégradé en acide phosphatidique et en

choline (Pai *et al.*, 1988, Agwu *et al.*, 1989). L'acide phosphatidique est par la suite clivé en diacylglycérol, un messager intracellulaire.

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans l'arrêt de la réponse cellulaire au FMLP (Snyderman et Uhing, 1992). En plus de la séparation physique entre les protéines G et les récepteurs, les polynucléaires sont capables d'hydrolyser le FMLP à leur surface cellulaire (Yuli et Snyderman, 1986). L'enzyme responsable de cette hydrolyse est une métalloprotéinase qui pourrait bien être une encéphalinase (Snyderman et Uhing, 1992). D'autres équipes ont aussi démontré que, lors de l'internalisation dans les lysosomes qui permet le recyclage des récepteurs, le ligand attaché au récepteur subit une hydrolyse (Niedel *et al.*, 1979).

#### 5.4 EFFETS BIOLOGIQUES

Le FMLP cause d'une part le chimiotactisme et d'autre part l'induction de sécrétion par les cellules. Les concentrations nécessaires sont plus faibles, la  $ED_{50}$  de  $7 \times 10^{-11}$  M pour le chimiotactisme chez les neutrophiles de lapin tandis que pour le relargage d'enzymes lysosomales par ces mêmes cellules la  $ED_{50}$  est de  $2,4 \times 10^{-10}$  M (O'Flaherty *et al.*, 1978b). Autant chez les neutrophiles que chez les monocytes, un facteur de dix dans la concentration du FMLP différencie l'action chimiotactique de l'action sécrétoire (Snyderman et Uhing, 1992). Les mécanismes impliqués dans le chimiotactisme et l'activation cellulaire sont sans doute différents. Si on regarde les événements

intracellulaires faisant suite à l'attachement du ligand au récepteur on s'aperçoit qu'une stimulation chimiotactique induit une hydrolyse rapide de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate résultant en la production de diacylglycérol et d'inositol triphosphate. Lors d'une stimulation pour induire la sécrétion de divers facteurs ces étapes sont suivies par un influx de calcium, qui active la protéine kinase C, et par l'activation de la phospholipase D par un mécanisme spécifique à la phosphatidylcholine (Snyderman et Uhing, 1992). Cela reflète ce qui pourrait réellement se produire *in vivo*; les cellules sont d'abord amenées aux sites de l'inflammation par de faibles concentrations puis, rendues aux sites, elles sont activées pour diverses sécrétions.

Le taux d'incorporation par les granulocytes humains de molécules de peptides formylés est de 5000 molécules à la minute par cellule durant les 10-15 premières minutes pour une concentration de 50nM de FMLP (Jesaitis *et al.*, 1983). Lors du chimiotactisme, les cellules incorporent probablement les complexes ligand-récepteurs et recyclent les récepteurs à la surface cellulaire alors que les peptides semblent être retrouvés intacts dans le cytosol (Jesaitis *et al.*, 1983).

Les neutrophiles et les macrophages migrent dans un gradient de concentration en réponse à la présence de peptides N-formylés (Schiffmann *et al.*, 1975). Ces cellules deviennent en grande partie polarisées en présence de ce facteur chimiotactique. La polarisation permet aux cellules de débiter leur locomotion, donc de migrer dans le

gradient de concentration. Les monocytes perdent leur polarité plus rapidement que les neutrophiles (Islam et Wilkinson, 1988).

La flambée oxydative consiste en la réduction ou l'excitation de molécules d'oxygène pour libérer des molécules plus réactives tels l'anion superoxide, le peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxylés. Ces molécules sont impliquées dans les réponses inflammatoires pour contrer la présence de pathogènes. Plusieurs enzymes sont impliquées dans cette chaîne de réactions. Les neutrophiles, les éosinophiles et les monocytes/macrophages possèdent la capacité de former ces métabolites oxygénés suite à des stimulations variées. Le FMLP initie la flambée oxydative par des voies d'activation séquentielles chez ces cellules (Truett *et al.*, 1988).

Suite à une stimulation par le FMLP, l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> déclenche le relâchement intracellulaire de l'acide arachidonique qui est transformé en leucotriènes via la voie de la 5-lipoxygénase permettant la sécrétion entre autres de LTB<sub>4</sub>, un autre facteur chimiotactique (Salari *et al.*, 1985).

Le FMLP induit aussi la synthèse nouvelle d'ARN dans les neutrophiles via un mécanisme qui utilise une ou des protéine(s) G et la phosphorylation de tyrosine(s) par contre cette nouvelle synthèse s'effectue indépendamment de l'AMPC (Beaulieu *et al.*, 1992).

### 5.5 EFFETS *IN VIVO*

Divers animaux (cochons d'Inde, lapins, souris) ont été utilisés pour évaluer les effets du FMLP lorsqu'administré par différentes voies: sang, aérosol, suppositoire. Plusieurs effets, autant néfastes que bénéfiques, ont été observés.

Le FMLP, injecté par voie intraveineuse à des lapins, provoque une diminution dramatique mais transitoire de la pression sanguine. On assiste aussi à une augmentation du rythme respiratoire. En fait, le FMLP induit une neutropénie associée à une augmentation du niveau de la lactoferrine plasmatique. Ces expériences suggèrent fortement que le FMLP induit une dégranulation des cellules polynucléaires *in vivo* (Lash *et al.*, 1983).

L'administration intraveineuse de FMLP à des cochons d'Inde cause une bronchoconstriction, une augmentation de la vasoperméabilité, une augmentation du nombre de leucocytes séquestrés au niveau des poumons, une leucopénie et une vasoconstriction. Tous ces effets peuvent être inhibés par un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* injectée par la même voie (Arreto *et al.*, 1993).

Un traitement par le FMLP au niveau de la trachée, chez des souris déjà injectées avec de la silice, favorise la libération des particules interstitielles en provoquant une réponse inflammatoire qui enlève la silice et diminue la réponse fibrotique. On peut donc

utiliser le FMLP pour favoriser une réponse inflammatoire bénéfique (Adamson *et al.*, 1992).

Chez l'humain, une équipe a effectué la première phase d'un traitement potentiel en utilisant le FMLP. Des patients atteints de mélanome métastatique et de cancer du colon ont reçu des injections de FMLP couplé à une IgG anti-mélanome. Les patients n'ont pas développé de réponse humorale anti-IgG souris. Cette étude démontre la possibilité d'administrer un tel composé, jusqu'à 2,5mg par injection intraveineuse. Le FMLP pourrait augmenter le nombre de macrophages locaux dans certains cancers et devenir un instrument de thérapie antitumorale (Obrist *et al.*, 1991).

## 5.6 INTERACTIONS AVEC LES CYTOKINES

Plusieurs études ont démontré le pouvoir pré-activateur de différentes cytokines sur des cellules subséquentement stimulées avec un facteur chimiotactique. Les cellules polynucléaires préincubées avec du GM-CSF montrent, en réponse à une stimulation au FMLP: 1) une augmentation du métabolisme oxydatif (Weisbart *et al.*, 1985, English *et al.*, 1988) 2) une potentialisation de l'agrégation de cellules (Conti *et al.*, 1992) et 3) une plus grande sécrétion de PAF par la voie de la PLA<sub>2</sub>/ acétyltransférase (Wirthmueller *et al.*, 1989).

Le GM-CSF favorise l'expression des récepteurs du FMLP chez les neutrophiles

humains et augmente la densité de ces récepteurs (English *et al.*, 1988). Une exposition brève des neutrophiles humains au GM-CSF augmente le nombre de récepteurs de FMLP de haute affinité alors qu'une exposition prolongée favorise plutôt une expression de récepteur de faible affinité, correspondant à la préactivation pour le métabolisme oxydatif (Weisbart *et al.*, 1986). Cette cytokine potentialise aussi la mobilisation de calcium induite par ce facteur chimiotactique (Naccache *et al.*, 1988).

Le TNF est un agent efficace pour "préparer" (priming) les neutrophiles à être stimulés par le FMLP, par exemple dans l'induction de la dégranulation de ces cellules. Le TNF augmente le nombre de récepteurs de faible affinité du FMLP chez ces cellules (O'Flaherty *et al.*, 1991). Un prétraitement avec le TNF suivi d'une stimulation par le FMLP inhibe la migration des polynucléaires humains. Le TNF provoque l'adhérence des cellules aux surfaces et ainsi affecte peut-être le récepteur du FMLP ou altère la liaison du récepteur au cytosquelette (Vollmer *et al.*, 1992).

L'IFN- $\gamma$  utilisé comme prétraitement augmente la flambée oxydative des cellules induite par le FMLP (Kumaratilake *et al.*, 1990). De plus cette cytokine augmente l'expression de récepteurs du FMLP ainsi que l'expression des protéines G couplées aux récepteurs (G $\alpha$ 2 et G $\alpha$ 3) chez les cellules HL-60, une lignée promyélocytique (Klein *et al.*, 1992).

## **6.0 LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)**

### **6.1 ORIGINE ET STRUCTURE**

Le LPS (ou les endotoxines) est issu des bactéries Gram négatives et est composé d'une partie lipidique appelée lipide A et d'une partie polysaccharidique. La partie polysaccharidique consiste en une région centrale et en des unités oligosaccharidiques répétitives (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1990). Ces unités répétitives lorsque présentes définissent l'antigène dit O, celui-ci varie d'une souche à l'autre. Les souches bactériennes possédant cet antigène sont appelées "lisses" (smooth) à cause de leur apparence en culture. En l'absence de ces unités répétitives, la souche bactérienne est alors dite "rugueuse" (rough) (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1990). Le lipide A est constitué de dimères phosphorylés de glucosamine qui portent de trois à sept acides gras, la longueur des acides gras pouvant varier de 10 à 17 carbones (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1990).

La structure des molécules de LPS influence leur capacité d'induire des réponses immunologiques chez l'hôte (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1990). Les formes "lisses" sont des inducteurs plus puissants en général que les correspondantes "rugueuses" (Mannel et Falk, 1989). Il existe aussi des différences entre les différentes variétés de bactéries, dans leur capacité d'induire certaines sécrétions comme par exemple l'IL-1. Ces différences peuvent être dues à des variations biochimiques au niveau du lipide A ou de la région centrale (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1990). En général, les observations



faites *in vitro* sur la capacité de certaines variétés biochimiques de LPS, reflètent bien les observations obtenues dans les modèles animaux *in vivo* (Kido *et al.*, 1984).

Le LPS peut se lier aux membranes cellulaires sous sa forme moléculaire (Kang *et al.*, 1992), en agrégats, en micelles (Kang *et al.*, 1990), ou encore sous forme de complexes avec des protéines de 60 kDa appelées communément LBP. Les LBP sont présentes dans le sérum et se lient au LPS.

## 6.2 RÉCEPTEURS

Le LPS interagit avec presque tous les types cellulaires, de façon spécifique ou non-spécifique (Rothfield et Horne, 1967, Morrison et Ulevitch, 1978, Morrison, 1989). Dans le cas des monocytes/macrophages, au moins quatre sites d'attachement, soit pour la partie lipidique, soit pour la partie polysaccharidique du LPS ont été identifiés.

Le premier de ces sites d'attachement est le récepteur (CD11b/CD18) pour le fragment iC3b du complément (Wright et Jong, 1986). Le CD18 se lie au LPS à la surface des bactéries ou aux érythrocytes enrobés de LPS (Wright et Jong, 1986). Ce récepteur participe à la phagocytose des bactéries, sans l'intervention d'IgG opsonisée et du facteur C3 du complément, mais il n'est pas impliqué dans les signaux de transduction (Kang *et al.*, 1992). Le complexe CD11/18 peut contribuer à la réponse au LPS des cellules phagocytaires mononucléaires mais n'est pas essentiel pour la stimulation au LPS (Wright

*et al.*, 1990b, Chen *et al.*, 1992).

Un second récepteur consiste en une protéine de 80kDa (Lei et Morrison 1988, Wright *et al.*, 1989a). Des anticorps dirigés contre cette protéine peuvent induire la transcription des gènes de l'IL-1 et du TNF (Chen *et al.*, 1992). Il s'agit donc d'un récepteur impliqué dans les effets biologiques du LPS.

Un troisième récepteur est le CD14. L'attachement du LPS au CD14 ne se fait pas de façon directe, mais se produit via la LBP (Wright *et al.*, 1989b, Schumann *et al.*, 1990). Le CD14 reconnaît le complexe LPS-LBP, il participe à l'ingestion de LPS et à l'induction de la synthèse de TNF (Wright *et al.*, 1990a). L'expression de CD14, à la surface de monocytes humains, est régulée à la hausse par le LPS (Brugger *et al.*, 1991).

Un quatrième site de liaison a été identifié sur des macrophages humains. Il s'agit d'une protéine de 95 kDa (Hampton *et al.*, 1988). Le lipide A s'attache à ce type de récepteur (Hampton *et al.*, 1991). Celui-ci joue un rôle important dans l'endocytose de LPS (Wright, 1991). Les particules de LPS ingérées via ces récepteurs sont métabolisées en substances moins actives par les lysozymes (Hampton *et al.*, 1991).

D'autres récepteurs non-spécifiques pour le LPS sont aussi utilisés. Le récepteur spécifique pour le D-mannose et le récepteur spécifique pour le D-galactose peuvent servir

à lier le LPS puisque que l'antigène spécifique O est composé en grande partie de ces deux sucres (Chen *et al.*, 1992). De plus, des gangliosides peuvent faire partie d'un complexe liant le LPS (Morrison, 1989).

Enfin, l'attachement non-spécifique du LPS est peut-être le mécanisme le plus commun pour l'entrée de cette molécule dans les monocytes/macrophages et pour l'interaction avec des membranes variées: appareil de Golgi, mitochondries, membrane nucléaire, lysosome, réticulum endoplasmique rude (Kang *et al.*, 1990, Kang *et al.*, 1992). Une chose est certaine, il n'y a pas de récepteur unique pour le LPS (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1990).

### 6.3 EFFETS BIOLOGIQUES

L'endotoxine est un puissant activateur et peut agir sur plusieurs types cellulaires mais on se limitera ici à son action sur les monocytes/macrophages, un type cellulaire cible important. Le LPS produit plusieurs effets sur ces cellules: modulation de l'expression de récepteurs de surface impliqués dans l'adhésion des protéines de matrice (Kang *et al.*, 1992); décomposition de l'intégrité morphologique; perte d'enzymes par fuite à travers la membrane plasmique (McGivney et Bradley, 1979a, McGivney et Bradley, 1979b); influx de calcium dans les mitochondries (Kang, 1990); attachement à l'enveloppe nucléaire ce qui peut causer sa destruction et faciliter la diffusion du LPS au nucléoplasme (Kang *et al.*, 1992). Du LPS a été localisé dans le noyau de monocytes humains (Kang

*et al.*, 1990). Il possède donc la capacité d'agir au niveau du noyau et une diminution de la quantité d'ADN a été observée dans les cellules mises en présence de LPS (Nagao *et al.*, 1984, Haraguchi *et al.*, 1987).

Le LPS peut induire la production:

- d'activité procoagulante (Semeraro *et al.*, 1983),
- de PAF (Leaver *et al.*, 1990)
- d'IL-1 (Haeffner-Cavaillon *et al.*, 1984)
- de TNF (Hofsli *et al.*, 1989),
- d'IL-6 (Ray *et al.*, 1989a),
- des prostaglandines (Kurland et Bockman, 1978, Luderitz *et al.*, 1989).
- des composantes du complément entre autres le C3 (Strunk *et al.*, 1985).

#### 6.4 SIGNAUX DE TRANSDUCTION

Les voies de transduction de signaux induits par le LPS, menant à l'activation des macrophage, impliquent plusieurs molécules: une protéine G, la myristoyl transférase, la phospholipase C et la protéine kinase C (Chen *et al.*, 1992). L'implication d'une protéine G sensible à la toxine de *Bordetella pertussis* qui inhibe l'adénylate cyclase a été démontrée dans une lignée macrophagique murine (Jakway et DeFranco, 1986).

Le NF-kB est aussi impliqué dans les signaux de transduction d'une stimulation au

LPS (Shakhov *et al.*, 1990). Le LPS induit l'expression de plusieurs gènes de compétence dont les produits sont impliqués dans la formation de complexes AP-1, ces derniers participent à l'activation de gènes (Introna *et al.*, 1987).

### 6.5 RÉGULATIONS DES EFFETS

Plusieurs études ont démontré que les macrophages convertissent les molécules de lipides A en une forme moins toxique, en enlevant les acides gras non-hydrolysables par les acyloxyacyl hydrolases (Munford, 1986) . Ces cellules sont aussi capables de modifier le LPS ingéré en enrichissant le contenu lipidique et en raccourcissant l'antigène O (Fox *et al.*, 1989) ou en déphosphorylant la partie lipide A (Peterson et Munford, 1987). Les modifications à la molécule de LPS seraient responsables de la détoxification de cette molécule (Kang *et al.*, 1992). Le LPS ingéré peut être excrété par exocytose ou retenu dans les macrophages sous forme de micelles (Fox *et al.*, 1989). Le LPS libéré par exocytose possède encore certaines de ses activités biologiques comme, par exemple, l'induction d'IL-1 (Duncan *et al.*, 1986). Les cellules modifient donc le LPS et en contrôlent la quantité en circulation.

## **MÉTHODOLOGIE**

## **1.0 PRÉPARATION DES CELLULES SANGUINES HUMAINES**

### **1.1 CELLULES MONONUCLÉAIRES**

Le sang de donateurs volontaires, non-fumeurs, ne souffrant pas de maladies apparentes était recueilli dans cinq tubes Vacutainer stériles de 15 mL contenant 286 USP par mL de sodium héparine comme anti-coagulant (Becton Dickinson). Ces tubes étaient centrifugés durant dix minutes à 600g dans le but de séparer divers éléments, en commençant par le bas du tube après centrifugation: les érythrocytes, les globules blancs et enfin le sérum (technique dite "buffy coat"). Le sérum était recueilli, décomplémenté par chauffage durant 30 minutes à 56°C et centrifugé durant dix minutes à 650g dans le but d'éliminer la majorité des agrégats de lipides et les plaquettes sanguines. Les globules blancs récupérés ont été resuspendus dans du EBSS (Gibco) contenant 10mM d'Hepes (Gibco), à un volume final d'environ 20-25 mL. Les leucocytes ont ensuite été déposés délicatement sur des gradients de Ficoll-Paque (Pharmacia) d'une densité de  $1,077 \pm 0,001\text{g}/\mu\text{L}$ , à raison de trois mL de Ficoll-Paque pour six à sept mL de la suspension cellulaire par tube de polypropylène stérile de 15 mL (Sarstedt). Une centrifugation de 25 minutes à 350g a permis de séparer les cellules mononucléaires, des cellules polynucléaires et des érythrocytes restants, ceux-ci se retrouvant au fond du tube. Les cellules recueillies ont été lavées deux fois dans du EBSS pour enlever l'excès de Ficoll. La quantité de cellules mononuclées finalement resuspendues dans du EBSS a été évaluée à l'aide d'un comptage différentiel en diluant un échantillon de la suspension cellulaire avec du bleu de méthylène dissout dans de l'acide acétique 6%; ce colorant met en

évidence la morphologie des noyaux. La viabilité des cellules était évaluée à l'aide d'une coloration au bleu de trypan. Finalement les cellules étaient resuspendues à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules par mL dans du RPMI 1640 avec glutamine (Gibco), Hepes (10mM), pénicilline (50 U.I./mL), streptomycine (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et contenant  $5 \times 10^{-5}$  M de 2-mercaptoéthanol (Sigma) et 2,5 à 5 % de sérum homologue décomplémenté et centrifugé. Ce milieu constitue ce que nous appellerons RPMI complet.

### **1.2 CELLULES ADHÉRENTES (MONOCYTES)**

Lorsque mentionné, les cellules mononucléaires ont été placées dans des plaques de 24 puits à raison d'un mL de la suspension cellulaire ( $2 \times 10^6$  cellules/mL) par puits. Une incubation de deux heures à  $37^\circ\text{C} + 5\%$  de  $\text{CO}_2$  a permis l'adhérence des monocytes. Les cellules non-adhérentes (principalement les lymphocytes) ont été éliminées en lavant trois fois les puits des plaques avec du EBSS tempéré à  $37^\circ\text{C}$ . Un volume d'un mL de RPMI complet était ensuite ajouté à chacun des puits pour procéder à la stimulation des cellules.

### **1.3 CELLULES POLYNUCLÉAIRES**

Le sang recueilli de la même façon que mentionné dans la section 1.1 était délicatement déposé, à raison de six mL sur 3,5 mL de Polymorphprep T.M. (Nycomed) (densité de  $1,113 \pm 0,001\text{g}/\text{mL}$ ), dans des tubes stériles de 15 mL en polypropylène. Une centrifugation de 20-25 minutes à 600g a permis de séparer les types cellulaires: les



cellules mononucléaires formaient le premier anneau, et le deuxième anneau contenait les polynucléaires au dessus des érythrocytes. Les cellules polynucléaires recueillies ont été lavées dans du PBS, sans magnésium et sans calcium (Gibco), centrifugées durant sept minutes à 500g, puis resuspendues durant quelques secondes dans dix mL d'eau distillée stérile pour lyser les érythrocytes. Par la suite, 30 mL de PBS étaient ajoutés pour rétablir l'isotonicité de la suspension cellulaire. Les cellules étaient lavées dans du PBS puis, leur nombre et leur viabilité évalués par une coloration au bleu de méthylène et au bleu de trypan. Finalement la concentration cellulaire a été ajustée à  $2 \times 10^6$  /mL dans du RPMI complet.

## 2.0 STIMULATION DES CELLULES SANGUINES

Le FMLP (Sigma) utilisé était d'abord dissout dans du diméthyl sulfoxide à une concentration de  $250\mu\text{g}/\mu\text{L}$  et conservé à  $-70^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation. Il était alors dilué dans du RPMI complet pour obtenir la concentration finale désirée.

Le LPS (souche E.coli 0127:B8) (Sigma) était d'abord dissous dans du EBSS à raison de  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  et conservé à  $4^{\circ}\text{C}$ .

La toxine de *Bordetella pertussis* (Sigma) était dissoute à raison de  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  dans du PBS et conservée à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation. Avant l'addition de la toxine aux cellules, nous avons procédé à son activation. Ainsi  $100\mu\text{L}$  de la solution de toxine étaient d'abord ajoutés à  $800\mu\text{L}$  de PBS et  $100\mu\text{L}$  de 1,4-dithiothreitol (DTT) (Sigma)  $200\text{ mM}$  dans du PBS et passé sur un filtre de cellulose acétate stérile de porosité  $0.22\mu\text{m}$ . La solution finale était incubée une heure à  $37^{\circ}\text{C}$  pour activer la toxine.

### **3.0 DOSAGES DES CYTOKINES**

#### **3.1 DOSAGE DE L'INTERLEUKINE-6 (IL-6)**

Pour déterminer la quantité d'IL-6 présente dans les surnageants de cellules stimulées, nous avons utilisé la lignée cellulaire B9, dépendante de l'IL-6 (généreusement fournie par le Dr M. Rola-Pleszczynski, Sherbrooke, Québec, Canada). Cette lignée était maintenue en culture dans du RPMI 1640 avec glutamine(Gibco), Hepes (Gibco)(10 mM), pénicilline (Gibco) (50 U.I./mL) et streptomycine (Gibco) (50 µg/mL), 10% de sérum de veau,  $5 \times 10^5$ M de 2-mercaptoéthanol et, comme source d'IL-6, 5% de surnageant de culture de cellules Raw 264.7 stimulées (voir annexe 1).

Pour s'assurer que les cellules soient en croissance exponentielle lors du test, la veille de leur utilisation, les cellules B9 étaient centrifugées et resuspendues dans du milieu de culture frais à raison de  $5 \times 10^5$  cellules par mL. La journée du test, 50 µL de H-SFM\* (voir annexe 1) par puits étaient déposés dans des plateaux stériles de 96 puits à fond plat (ICN). Les surnageants de culture à doser étaient dilués au demi en quadruplicats en laissant la première colonne libre de surnageant, pour le contrôle de la croissance des B9 sans surnageant. Les cellules B9 étaient lavées quatre fois avec du EBSS, afin d'enlever l'IL-6 présente dans le milieu de culture. Finalement, les cellules étaient resuspendues dans du H-SFM\* et ajustées à la concentration de  $1 \times 10^5$  cellules/mL. La viabilité des cellules était évaluée lors d'un comptage avec du bleu de trypan. Cinquante µL par puits de cette suspension cellulaire étaient ajoutés aux plateaux contenant les surnageants dilués.

Les plateaux étaient ensuite incubés quatre jours à 37°C + 5% CO<sub>2</sub>. Durant les cinq dernières heures de culture, nous avons ajouté 100 µL de bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT) (Sigma) (voir annexe 1). Le MTT est incorporé dans les mitochondries des cellules vivantes qui le convertissent en cristaux de formazan, la quantité de cristaux de formazan est proportionnelle au nombre de cellules. A la fin de la période d'incubation, les plateaux étaient centrifugés durant cinq minutes à 500 g, puis le liquide des puits était aspiré en utilisant une pipette à canaux multiples. Les cristaux de formazan dans le fond des puits étaient dissous avec 100 µL/puits d'isopropanol acide (0,04M HCl) (Fisher). A l'aide d'un lecteur de plaques (Biotek Instruments, modèle ELB09), l'absorbance, à la longueur d'onde de 540 nm, était lue puis la valeur était soustraite de celle obtenue du témoin négatif, i.e. les cellules seules sans surnageant.

La valeur moyenne des quadruplicats donnant la plus haute densité optique était considérée comme 100% , donc correspondant à la croissance maximale des cellules lors du test . Toutes les valeurs ont été transformées en pourcentage de croissance cellulaire. Les courbes ont été tracées sur du papier gradué en "unités de probabilité" (probit). L'inverse de la dilution représentant 50% de croissance était considéré comme le nombre d'unités d'IL-6 présente dans le surnageant.

### **3.2 DOSAGE DU FACTEUR NÉCROSANT DES TUMEURS (TNF)**

Pour l'évaluation de la quantité de TNF, nous avons utilisé la lignée cellulaire

murine L929, sensible à l'action cytotoxique de cette cytokine. Ces cellules étaient maintenues en culture dans du RPMI 1640 avec glutamine, Hépes, antibiotiques et 5% de sérum de veau. Elles étaient décollées du plastique du flacon de culture avec de la trypsine (5000 U/mL) (Gibco) incubée une à deux minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS puis ajustées à  $3 \times 10^5$  cellules par mL.

La veille du test, 75  $\mu$ L de cette suspension cellulaire étaient déposés dans chacun des puits de plaques stériles à 96 puits, excepté dans la première colonne utilisée comme témoin négatif. Les plaques étaient incubées jusqu'au lendemain à 37°C + 5% CO<sub>2</sub>. Le jour du test, nous ajoutons 75  $\mu$ L d'actinomycine D (2  $\mu$ g/mL) (Boehringer-Mannheim) dans chacun des puits pour augmenter la sensibilité des cellules et pour arrêter leur division cellulaire. Les surnageants de culture à doser étaient dilués au quart en triplicats en ajoutant 50  $\mu$ L du surnageant dans les puits de la première rangée. Deux colonnes par plaque étaient laissées sans surnageant comme contrôle des cellules seules. Dans l'une de ces colonnes de l'actinomycine D était rajoutée comme témoin positif, représentant le maximum de cellules viables dans le test. Dans l'autre colonne, les cellules ne recevaient pas d'actinomycine D, ceci pour s'assurer que lors du test les cellules se sont multipliées dans les plaques. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C + 5% CO<sub>2</sub> durant 16 à 20 heures. Après cette période, nous avons enlevé le milieu de culture des plaques par décantation. Les cellules viables ont ensuite été fixées durant cinq minutes avec une solution de 5% de formaldéhyde dilué dans du PBS (50  $\mu$ L/puits), puis la formaldéhyde

a été retirée et les plaques rincées à l'eau courante. Les cellules fixées ont été colorées avec une solution de cristal violet à 1% dans de l'eau distillée (50 µL/puits), pendant cinq autres minutes. Le colorant a été enlevé et les plaques rincées à l'eau courante pour retirer l'excès du colorant. Après séchage des plaques, un volume de 100 µL d'acide acétique à 33% dans de l'eau distillée a été déposé dans chacun des puits et l'absorbance à 540 nm a été mesurée. La formule mathématique utilisée pour calculer le pourcentage de cytotoxicité de chacune des dilutions des échantillons est la suivante:

$$\% \text{ cyto} = 1 - \frac{(\text{D.O. éch.} - \text{D.O. min})}{\text{D.O. max}} \times 100$$

% cyto: pourcentage de cytotoxicité

D.O. éch: moyenne de la densité optique du triplicat de l'échantillon

D.O. min :moyenne de la densité optique minimale, c'est-à-dire le bruit de fond de la première colonne où il n'y avait aucune cellule

D.O. max: moyenne de la densité optique maximale, colonne où les cellules ont été incubées sans surnageant donc le nombre maximal de cellules présentes dans les puits.

Les pourcentages de cytotoxicité ont été portés sur du papier gradué en "unités de probabilité" (probit). L'inverse de la dilution correspondant à 50 % de cytotoxicité était considéré comme le nombre d'unités de TNF par mL de surnageant de culture.

## 4.0 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES DES CYTOKINES

### 4.1 EXTRACTION DE L'ARN TOTAL

Pour l'analyse de l'expression de l'ARNm, les cellules, à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules par mL, ont été stimulées pendant sept heures avec  $250 \mu\text{g/mL}$  de FMLP et/ou  $100 \text{ ng/mL}$  de LPS dans des tubes de polypropylène (Sarstedt) de 50 mL. Nous avons procédé à une agitation délicate des cellules, à toutes les heures. Lorsque mentionné, les cellules ont reçu un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* ( $50 \text{ ng/mL}$ ) de 12 -15 heures avant la stimulation au FMLP et/ou LPS.

Après la stimulation, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS sans calcium et magnésium, à la température de la pièce. Pour éviter la présence d'ARNases, la verrerie ainsi que les embouts de pipette, les tubes à centrifugation et les tubes Eppendorf utilisés ont été au préalable traités (voir annexe 1).

Après le deuxième lavage, les cellules ont été lysées avec 3,5 mL d'une solution de guanidinium 4M (voir annexe 1) par échantillon et les tubes agités au vortex. A l'aide d'une seringue de cinq mL (Becton Dickinson) munie d'une aiguille 20G1 (Becton Dickinson), les échantillons ont été plusieurs fois aspirés et refoulés sur le bord d'un tube de 15 mL dans le but de bien fragmenter l'ADN. Les lysats de cellules ont été ensuite délicatement déposés sur 1,5 mL de chlorure de césium (voir annexe 1) dans un tube de polyallomère de cinq mL (Becton Dickinson). Nous avons procédé à une

ultracentrifugation (Beckman modèle L5-75) à 130 000 g à l'aide d'un rotor SW50.1 durant 18 heures à 20°C. L'arrêt de la centrifugation a été effectué sans freinage. Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines et l'ADN a été retiré et chacun des culots d'ARN a été solubilisé dans un volume de 360  $\mu\text{L}$  de tampon TES (voir annexe 1). Les échantillons ont ensuite été transférés dans des tubes Eppendorf (Fisher) pour compléter le reste des opérations. Un volume de 40  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3 M par tube a été ajouté pour faciliter la précipitation de l'ARN. Nous avons ensuite ajouté un mL d'éthanol 100%, agité au vortex puis congelé à -70°C durant au moins une heure. Les échantillons ainsi refroidis ont ensuite été centrifugés durant 15 minutes à 12 000 g. Les surnageants ont été retirés, 360  $\mu\text{L}$  d'eau traitée au DEPC, 40  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3M et un mL d'éthanol 100% furent ajoutés. Les échantillons ont été agités au vortex puis remis au congélateur à -70°C pour une heure au minimum. Suite à cette deuxième précipitation, on a enlevé la totalité du surnageant, asséché les culots et resuspendu ceux-ci dans 10-25  $\mu\text{L}$  d'eau traitée au DEPC.

#### 4.2 ÉLECTROPHORESE DE L'ARN

L'ARN total extrait de chacun des échantillons a été séparé selon la masse moléculaire sur un gel d'agarose à 1.2 % (voir annexe 1). Le gel a d'abord été coulé dans une plaque à électrophorèse de 10 cm x 15 cm. Une fois le gel coulé, le peigne à 15 dents fut déposé pour laisser environ un mL d'espace entre l'extrémité des dents du peigne et le fond de la plaque à électrophorèse. Nous avons laissé le gel se solidifier



environ 20-25 minutes avant de retirer le peigne et de l'immerger dans le tampon d'électrophèse. Ce tampon est du MOPS 1X (voir annexe 1), déposé dans la cuve à électrodes en quantité suffisante pour recouvrir d'au moins un cm le dessus du gel.

L'ARN resuspendu dans du tampon d'échantillon (voir annexe 1) a été dénaturé dix minutes à 65°C. Un  $\mu\text{L}$  d'une solution de bromure d'éthidium (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fut ajouté à chacun des échantillons pour pouvoir par la suite visualiser l'ARN sous les rayons ultraviolets. Les échantillons furent ensuite déposés dans les puits du gel. La migration des ARN fut effectuée à un voltage de 12-20 volts durant 18 heures (source de tension: BioRad modèle 500/200). Après une migration suffisante des ARN, le gel a été photographié sous ultraviolets et filtre rouge à l'aide d'une caméra Polaroid MP-4 munie d'un film Polaroid en noir et blanc (Professionnel 667).

### 4.3 TRANSFERT SUR MEMBRANE DE NYLON

Les ARN ont été transférés sur une membrane de nylon (Hybond N de Amersham) à l'aide de l'appareil Vacuum Gene de LKB (modèle 2016). Une solution dénaturante (voir annexe 1) a tout d'abord été versée sur le gel durant une période de cinq minutes, puis une solution neutralisante (voir annexe 1) l'a remplacée durant cinq autres minutes. Nous avons poursuivi le transfert en versant une solution 20 X SSC (voir annexe 1) sur le gel. Par la suite, nous avons exposé la membrane deux minutes à des rayons ultraviolets pour fixer les ARN de façon covalente en utilisant une lampe u.v. (Fotodyne-shortwave

uv). A la suite de ces traitements, la membrane était prête à être utilisée pour l'hybridation des différentes sondes.

#### 4.4 HYBRIDATION

Les membranes ont tout d'abord subi une préhybridation d'au moins quatre heures afin de bloquer les sites non-utilisés sur celles-ci. Pour chaque membrane, huit mL d'une solution de préhybridation (voir annexe 1) furent ajoutés dans un tube de borosilicate (préalablement siliconé avec du diméthyl dichlorosilane) placé sous rotation dans un incubateur à hybridation (Robins Scientific modèle 310) ajusté à 42°C. Après avoir retiré la solution de préhybridation sept mL d'une solution d'hybridation (voir annexe 1) contenant la sonde radiomarquée désirée furent ajoutés durant au moins 12-15 heures.

Les sondes commerciales (Amgen) disponibles pour les gènes suivants ont été utilisées: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF et  $\beta$ -actine. Pour l'IL-6 nous avons utilisé une chaîne oligonucléotidique ayant la séquence suivante: 5'GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G 3' (Hirano *et al.*, 1986, séquence de l'amorce 3' pour l'amplification de la séquence d'IL-6 humaine de la compagnie Clontech). Les sondes oligonucléotidiques ont été radiomarquées avec de l'ATP [<sup>32</sup>P] en gamma (ICN) (voir annexe 1).

Après l'hybridation la membrane était lavée deux fois pendant 15 minutes avec une solution 2 X SSC et 0.1 % SDS à 42°C puis deux autres fois durant 15 minutes avec une

solution 0.2 X SSC et 0.2 % SDS. La membrane était épongée avec un papier Whatmann et enveloppée dans un papier "saran". Par la suite elle était exposée à un film Kodak X-OMAR à -70°C dans une cassette d'exposition contenant un écran intensificateur (Sigma). Après une exposition suffisante, les films ont été développés à l'aide d'un développeur automatique Kodak (X-OMAT M20 Processor).

Par la suite, nous avons déhybridé la membrane et procédé à l'hybridation avec d'autres sondes. Quatre lavages de 20 minutes chacun, dans un tampon de déhybridation (voir annexe 1) à 65°C, ont permis de retirer en totalité l'acide nucléique attaché de façon non-covalente à la membrane. Une préhybridation suivie d'une hybridation avec la sonde désirée étaient effectuées sur cette membrane de la même façon que mentionné plus haut.

L'intensité des bandes sur les autoradiogrammes a été évaluée à l'aide d'un vidéodensitomètre Bio-Rad (modèle 620). Nous avons utilisé, pour l'analyse mathématique, la surface des pics obtenus par l'analyse du logiciel 1DPACK du vidéodensitomètre pour des densités se situant entre 0,2 et 1,2 (valeurs directement proportionnelles aux bandes).

## **RÉSULTATS**

## **1.0 CINÉTIQUES DE SÉCRÉTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉAIRES DU SANG HUMAIN**

La capacité des cellules mononucléaires du sang humain de sécréter des cytokines en présence de certains stimuli a été évaluée à l'aide de tests fonctionnels, c'est-à-dire des tests qui mesurent la quantité biologiquement active de ces cytokines. Pour la détection du TNF, un test de cytotoxicité a été effectué sur la lignée L929, sensible à cette cytokine. Quant à l'IL-6, elle a été détectée à l'aide d'un test de prolifération de la lignée B9 dont la croissance dépend de cette cytokine. Des cinétiques de sécrétion allant jusqu'à deux jours après la stimulation ont été effectuées.

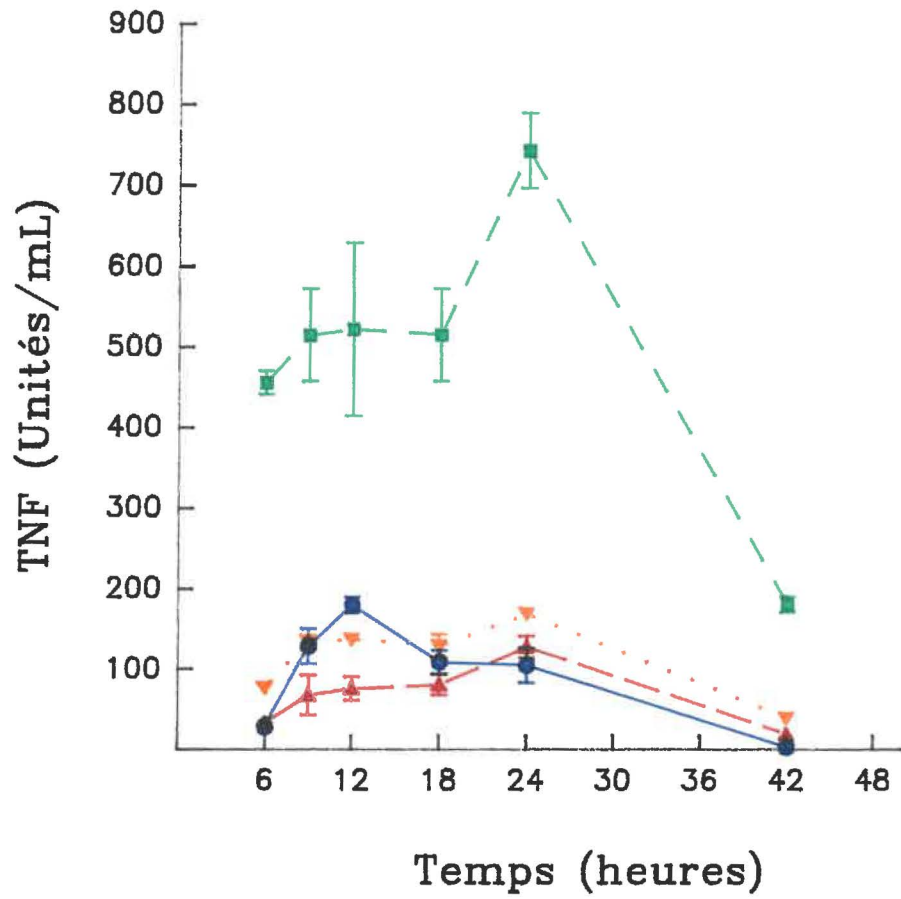
### **1.1 CINÉTIQUES DE SÉCRÉTION DU FACTEUR NÉCROSANT DES TUMEURS (TNF)**

#### **1.1.1 SÉCRÉTION PAR LES CELLULES MONONUCLÉAIRES**

Lors de la purification des cellules mononucléaires, un compte différentiel a été effectué et, selon les donneurs 10 et 20% des cellules mononucléaires avaient l'apparence de cellules polynucléaires. Dans un premier temps, la cinétique de la sécrétion du TNF a été évaluée avec les cellules mononucléaires du sang humain stimulées par le FMLP et/ou le LPS. Des résultats représentatifs, obtenus avec un donneur, sont illustrés à la figure 2. Chacun des points de la cinétique correspond à un puits indépendant. La courbe témoin représente les cellules cultivées sans l'ajout de stimulus. Elle indique donc le niveau basal de sécrétion.

**FIGURE 2:** Cinétique de la sécrétion du TNF par les cellules mononucléaires du sang humain cultivées en présence de FMLP et/ou de LPS.

Les cellules mononucléaires du sang humain ont été mises en culture dans du RPMI contenant 2,5% de sérum autologue. Au temps zéro, pour chacun des points de la cinétique  $2 \times 10^6$  cellules étaient mises en culture en l'absence ou en présence de FMLP ( $250\mu\text{g}$ ) et/ou de LPS (100 ng) pour un volume final de un mL dans des plateaux de 24 puits. Les surnageants étaient prélevés au temps indiqué et entreposés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'au jour du dosage du TNF ou de l'IL-6. Le TNF était évalué à l'aide de la lignée sensible L929. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée sur le dosage de TNF réalisé en triplicat. Le graphique présente les résultats obtenus pour un donneur mais il est représentatif de résultats obtenus avec quatre donneurs différents.



● CONTROLE

▲ FMLP

■ LPS

▼ FMLP + LPS

Vers 12 heures, nous observons une légère hausse de ce niveau de base, suivie d'une baisse jusqu'à la fin de la période d'observation. Dans toutes les expériences individuelles effectuées avec des donneurs différents, le niveau basal de sécrétion du TNF par les cellules mononucléaires était peu élevé comparativement à la sécrétion élevée obtenue avec le LPS. Dans certains cas, nous détectons moins de 4 unités/mL de cette cytokine dans les cultures témoins tout au long de la cinétique.

Les cellules stimulées avec 250  $\mu\text{g/mL}$  (571,5  $\mu\text{M}$ ) de FMLP ont sécrété une quantité comparable au témoin, parfois même inférieure, par exemple entre 9 et 18 heures. Ceci a été observé dans toutes les expériences effectuées. L'ajout de 100 ng/mL de LPS a provoqué une sécrétion importante. Dès six heures, nous avons noté une augmentation importante de la quantité de TNF. Cette augmentation atteint un maximum à environ 24 heures, puis le niveau de sécrétion diminue. Les cellules de d'autres donneurs présentaient une sécrétion maximale à 12 ou 18 heures au lieu de 24 heures. Dans tous les cas, les sécrétions maximales ont été obtenues lors de la stimulation des cellules avec du LPS.

Lorsque le FMLP et le LPS ont été ajoutés en même temps aux cellules mononucléaires, la quantité de TNF détectée a été similaire au groupe témoin. La figure 2 montre que les trois courbes: témoin, FMLP, et FMLP + LPS sont semblables. Chez certains donneurs, le niveau de sécrétion des cellules stimulées à la fois par le FMLP et



le LPS, se situait au-dessus du témoin (mais il était toujours nettement inférieur à celui du LPS seul). La sécrétion des cellules stimulées par les deux stimuli à la fois, a toujours été nettement inférieur aux niveaux de la sécrétion en présence de LPS seul, particulièrement durant les premières 24 heures.

### 1.1.2 SÉCRÉTION PAR LES CELLULES MONONUCLÉAIRES ADHÉRENTES

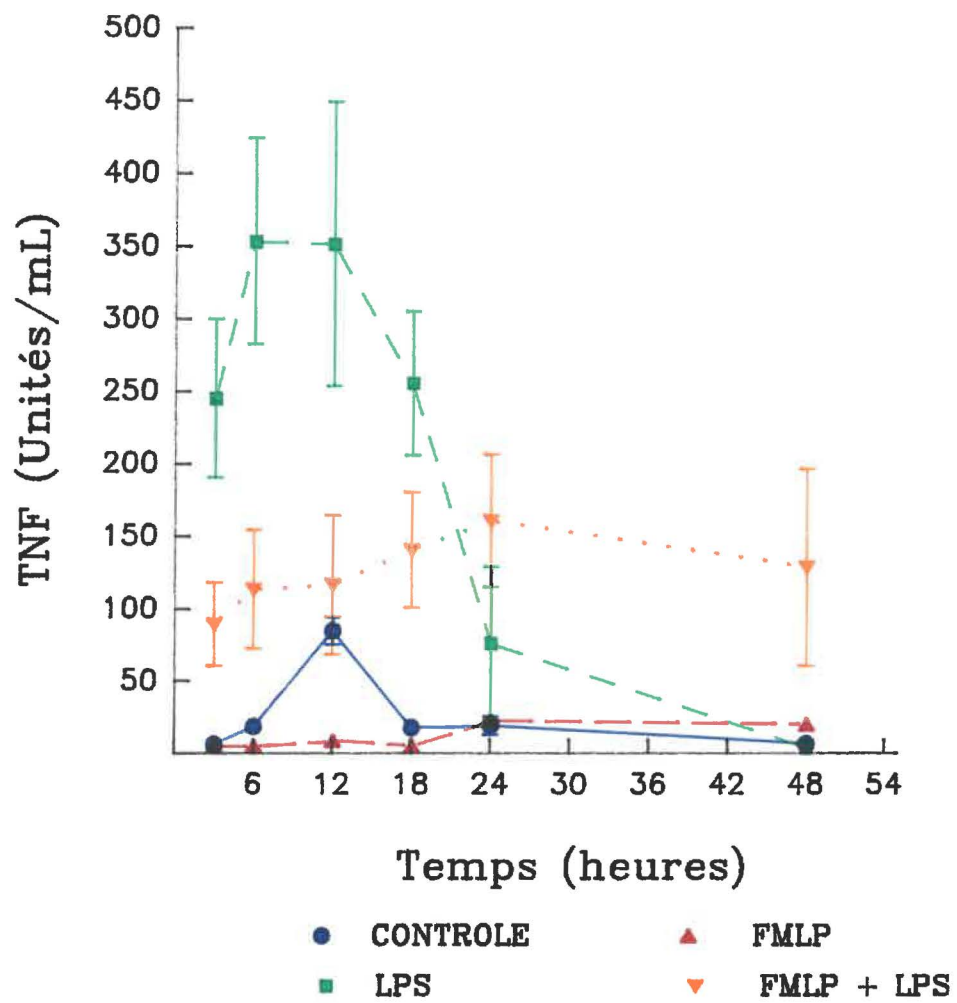
Le même type d'expérience a été effectué en utilisant cette fois des cellules mononucléaires adhérentes. Avant la stimulation par le LPS et/ou le FMLP, nous avons fait adhérer les cellules, puis nous les avons lavées pour retirer les cellules non-adhérentes. La stimulation des cellules s'est effectuée de la même manière que celle décrite à la figure 2. Ces résultats sont présentés sur la figure 3.

La courbe témoin obtenue avec les cellules sans stimulus extérieur, montre un certain niveau de base qui augmente jusqu'à 12 heures pour redescendre par la suite pratiquement à zéro. Les cellules mononucléaires adhérentes, tout comme les cellules mononucléaires totales, secrètent peu de TNF en l'absence de stimulus extérieur.

Les cellules en présence de FMLP secrètent moins de TNF que les cultures témoins surtout à 12 heures. Dans toutes les expériences effectuées, la sécrétion, en présence de FMLP, a été égale ou inférieure au niveau basal de sécrétion de la même préparation cellulaire.

**FIGURE 3:** Cinétique de la sécrétion du TNF par les cellules mononucléaires adhérentes du sang humain cultivées en présence ou en l'absence de FMLP et/ou de LPS.

Les cellules mononucléaires du sang humain ont d'abord été mises en culture dans des plateaux de 24 puits à raison de  $2 \times 10^6$  cellules/puits dans du RPMI contenant 5% de sérum autologue pour une période de deux heures à 37°C. Au temps zéro, chacun des puits a été lavé trois fois avec du EBSS tiède pour retirer les cellules non-adhérentes. Un volume de un mL de RPMI contenant 2,5% de sérum autologue et du LPS(100 ng/mL) et/ou du FMLP(250µg/mL) a été ajouté à chacun. Chacun des points de la cinétique était un puits distinct. Les surnageants ont été récoltés aux temps indiqués et entreposés à -20°C jusqu'au jour du dosage de TNF. Le graphique est représentatif des résultats obtenus avec quatre donneurs différents.



La cinétique de sécrétion pour les cellules stimulées avec le LPS, démontre qu'une quantité appréciable est décelable dès la troisième heure de stimulation. Le "maximum" de sécrétion se situe à environ 6 et 12 heures. La quantité décelée diminue par la suite, pour devenir comparable à celle des cultures témoins. La quantité de TNF détectée, suite à la stimulation par le LPS de cellules mononucléaires adhérentes, se compare à celle détectée lors de la stimulation de cellules mononucléaires totales.

Les surnageants de cellules obtenus de la combinaison des deux stimuli, contiennent une quantité nettement inférieure à celle décelée dans les cellules cultivées avec le LPS seulement, durant les premiers 18 heures. Par la suite, le niveau est comparable à celui observé avec le LPS seulement ou légèrement supérieur. En fait, les cinétiques des sécrétions sont différentes. Dans le cas de la stimulation avec le LPS, nous assistons à une montée suivie d'une descente de la sécrétion, alors que, dans le cas de la combinaison LPS + FMLP, le niveau de sécrétion semble plutôt stable. Dans toutes les expériences effectuées avec des cellules mononucléaires adhérentes, le niveau de TNF obtenu avec la combinaison LPS + FMLP était toujours inférieur, en comparaison avec celui de la stimulation LPS, pour les premières 18 ou 24 heures. Après ce temps, les quantités détectées étaient similaires dans les deux groupes: FMLP + LPS et LPS.

### 1.1.3 SÉCRÉTION PAR LES CELLULES POLYNUCLÉAIRES

Nous avons effectué les cinétiques avec des cellules polynucléaires. Dans les

conditions expérimentales choisies: stimulation avec du LPS (100 ng/mL) et/ou du FMLP (250 µg/mL (571,5 µM)), aucune quantité de TNF biologiquement actif n'a été détecté. Ces expériences ont été effectuées avec trois donneurs distincts.

## 1.2 CINÉTIQUES DE SÉCRÉTION DE L'INTERLEUKINE-6 (IL-6)

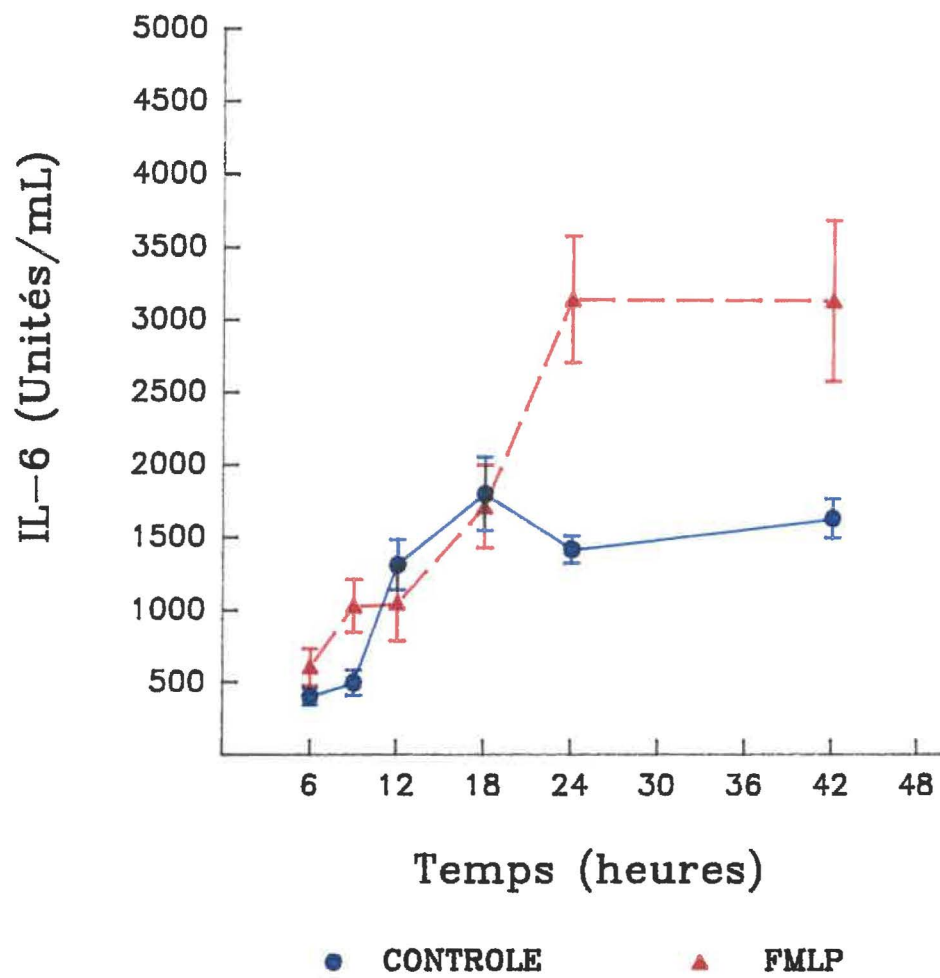
### 1.2.1 SÉCRÉTION PAR LES CELLULES MONONUCLÉAIRES

L'évaluation des cinétiques de sécrétion de l'IL-6 a été effectuée avec les mêmes types de stimulation que pour le TNF. Les figures 4 et 5 présentent les cinétiques de sécrétion de l'IL-6 par les cellules mononucléaires totales. Étant donné le nombre élevé d'unités détectées dans les surnageants de cellules cultivées avec le LPS seul ou en combinaison avec le FMLP, une échelle différente (figure 5) de celle présentant les résultats obtenus avec le contrôle et les cellules cultivées en présence de FMLP (figure 4), a été utilisée afin de faciliter l'évaluation des résultats.

La cinétique du témoin, c'est-à-dire des cellules cultivées sans ajout de stimulus extérieur, est présentée sur la figure 4. Une certaine quantité est détectable dès 6 heures et atteint son maximum vers les 18 heures. Puis jusqu'à la fin de l'expérience, la quantité d'IL-6 détectée reste relativement stable. Dans toutes les expériences effectuées, un certain niveau d'IL-6 était détecté dans les échantillons témoins. Nous remarquons que le nombre d'unités/mL détecté est supérieur à celui que nous avons observé dans le cas du TNF.

**FIGURE 4:** Cinétique de la sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires du sang humain mises ou pas en présence de FMLP.

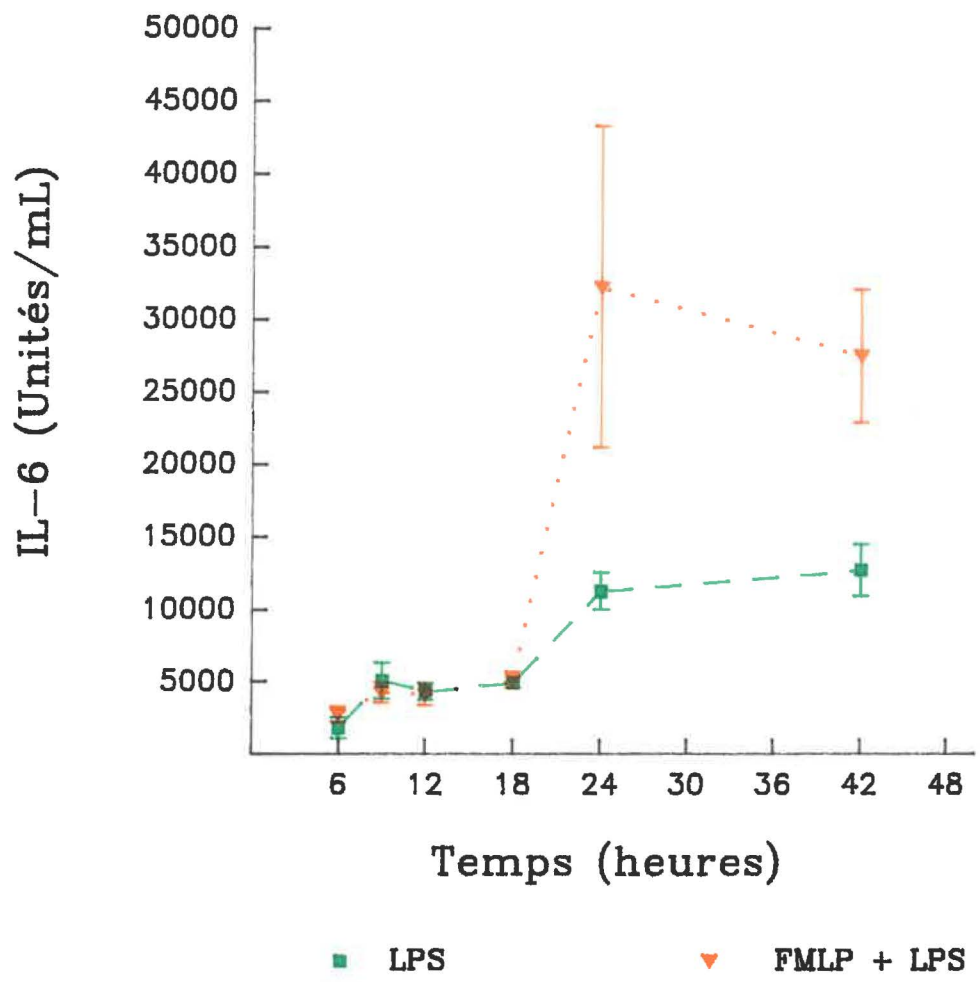
Les cellules ont été traitées de la même façon que celle décrite à la figure 1. L'IL-6 a été dosée à l'aide de la lignée B9, dépendante de cette cytokine. Les résultats présentés sont ceux obtenus avec un donneur. Des résultats similaires ont été obtenus avec trois donneurs différents. Des doses de 250 $\mu$ g/mL de FMLP ont été utilisées. Les barres verticales représentent les erreurs standard calculées sur les dosages de cytokine réalisés en quadruplicat.



**FIGURE 5:** Cinétique de la sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires du sang humains mises en présence de LPS avec ou sans FMLP

Voir la description de la figure 4.





La présence de 250 $\mu$ g/mL de FMLP n'affecte pas la quantité d'IL-6 décelée jusqu'à 18 heures de stimulation; mais à partir de 24 heures et jusqu'à 42 heures, la sécrétion des cellules stimulées avec du FMLP est au-dessus de la sécrétion des cellules témoins. Dans toutes les expériences effectuées avec des cellules mononucléaires, la quantité de cette cytokine détectée en présence de FMLP était supérieure au contrôle pour les points de 24 heures et plus.

Il est bon de souligner que le FMLP, en aucun cas, n'a provoqué une sécrétion de TNF, détectable dans nos conditions expérimentales. Étant donné que les mêmes surnageants de culture étaient utilisés pour le dosage des deux cytokines, nous pouvons affirmer que les différences observées entre le TNF et l'IL-6, ne sont pas causées par le fait que les résultats proviennent d'expériences différentes.

Rappelons que le nombre d'unités/mL d'IL-6 dans la culture témoin présenté sur la figure 4 n'excédait pas 2000. Un nombre d'unités au-delà de 5000 a été observé dès 6 heures pour les cellules cultivées en présence de LPS seul ou associé au FMLP (figure 5). La sécrétion d'IL-6 induite par le LPS augmente lentement jusqu'à 24 heures et par la suite, la quantité demeure stable.

La combinaison FMLP + LPS donne une cinétique de sécrétion comparable à celle observée avec le LPS seul, jusqu'à 18 heures. A partir de 24 heures, la quantité

d'IL-6 est de beaucoup supérieure à celle observée pour les stimulations avec un seul stimulus. A 24 heures par exemple, la stimulation par le FMLP a provoqué la sécrétion d'environ 3200 unités/mL (figure 4), comparativement à 11 000 unités/mL (figure 5) avec le LPS. La quantité détectée suite à la stimulation par les deux stimuli combinés, dépasse les 30 000 unités/mL (figure 5). D'une part, la sécrétion induite par le FMLP seul dépasse celle du témoin, à partir de 24 heures et ce pour plus de six donneurs testés, mais cette sécrétion est inférieure à celle induite par la stimulation au LPS. D'autre part, la sécrétion induite par la combinaison des deux stimuli est comparable à celle observée dans le cas de la stimulation au LPS mais, à partir de 24 heures, la quantité d'IL-6 détectée est supérieure aux stimulations par un stimulus.

Chez d'autres donneurs, par contre, la sécrétion d'IL-6 détectée suite à la stimulation par le FMLP + le LPS, était comparable, tout au long de la cinétique, à celle détectée pour la stimulation par le LPS seul. Chez trois donneurs, la combinaison FMLP + LPS a augmenté la quantité détectée, par rapport à la stimulation au LPS; alors que chez trois autres donneurs, l'ajout de FMLP au LPS n'a pas modifié la cinétique observée en présence d'un seul stimulus, le LPS.

### 1.2.2 SÉCRÉTION PAR DES CELLULES MONONUCLÉAIRES ADHÉRENTES

Une cinétique de sécrétion d'IL-6 a également été effectuée avec des cellules mononucléaires adhérentes (figure 6). La quantité sécrétée sans ajout de stimulus

extérieur (courbe témoin) est faible en comparaison aux autres courbes où un ou deux stimuli ont été ajoutés.

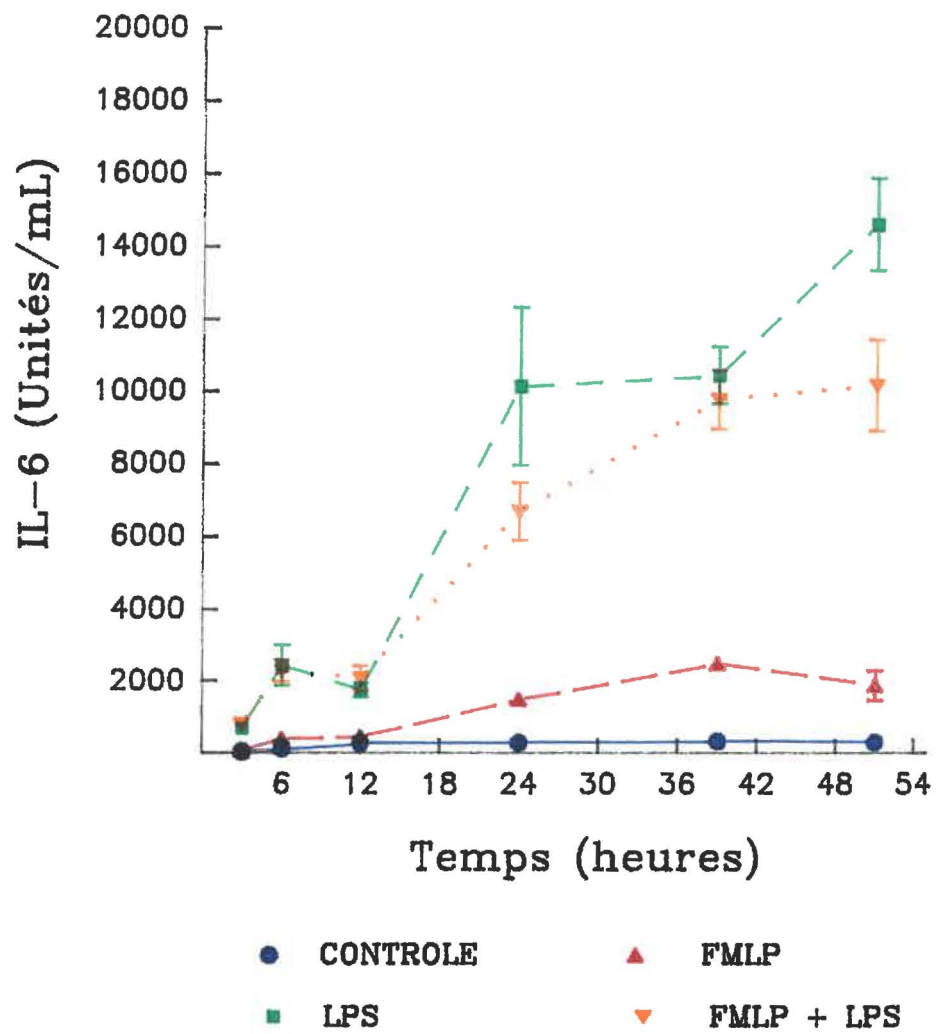
Lorsque les cellules mononucléaires adhérentes sont cultivées en présence du FMLP seul, nous assistons à une augmentation de la sécrétion à partir de 24 heures, et ceci dure jusqu'à la fin de l'expérience soit après plus de 50 heures. Les cellules stimulées avec du LPS, sécrètent beaucoup plus d'IL-6 que les cellules témoins, particulièrement à partir de 6 heures. Cette sécrétion augmente progressivement jusqu'à la fin de l'expérience.

L'ajout de FMLP à la stimulation par le LPS modifie très peu la sécrétion induite par le LPS seul. Nous observons une légère diminution, à certains points de la cinétique. Chez trois autres donneurs, nous avons pu observer une augmentation de la sécrétion de l'IL-6 par la double stimulation FMLP et LPS comparativement à la stimulation au LPS seulement.

Nous avons observé que le nombre d'unités de cette cytokine varie d'un donneur à l'autre, mais, par contre, les différences relatives entre les quatre types de courbes: témoin, FMLP, LPS, FMLP + LPS, restent similaires.

**FIGURE 6:** Cinétique de la sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires adhérentes du sang humain mises en présence de LPS et/ou de FMLP.

Pour légende voir la figure 3.



Dans le cas du TNF et de l'IL-6, les cinétiques obtenues à partir des cellules mononucléaires totales et celles obtenues à partir des cellules mononucléaires adhérentes présentent des caractéristiques tout à fait similaires. Toutes les autres expériences présentées ont été effectuées avec les cellules mononucléaires totales.

### 1.2.3 SÉCRÉTION PAR LES CELLULES POLYNUCLÉAIRES

Les cellules polynucléaires stimulées avec du LPS (100 ng/mL) et/ou du FMLP (250  $\mu$ g/mL (571,5  $\mu$ M)) n'ont sécrété aucune quantité d'IL-6 détectable par le test de dosage que nous avons utilisé et ce pour une cinétique s'étalant sur deux jours.

## **2.0 DOSES-RÉPONSES DE LA SÉCRÉTION DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉAIRES DU SANG HUMAIN**

Les cellules mononucléaires ont été stimulées avec différentes doses de FMLP et de LPS pour vérifier les effets observés sur les cinétiques avec d'autres doses de stimuli.

### **2.1 DOSES-RÉPONSES DE LA SÉCRÉTION DU FACTEUR NÉCROSANT DES TUMEURS (TNF)**

La figure 7 représente les quantités de TNF détectées en réponse à des doses de LPS de: 0; 0,5; 5 et 50 ng/mL, et à des doses de FMLP de: 0; 31 (71  $\mu$ M); 125 (285,8  $\mu$ M) et 500  $\mu$ g/mL (1 143  $\mu$ M) dans des cultures de cellules mononucléaires stimulées durant 24 heures.

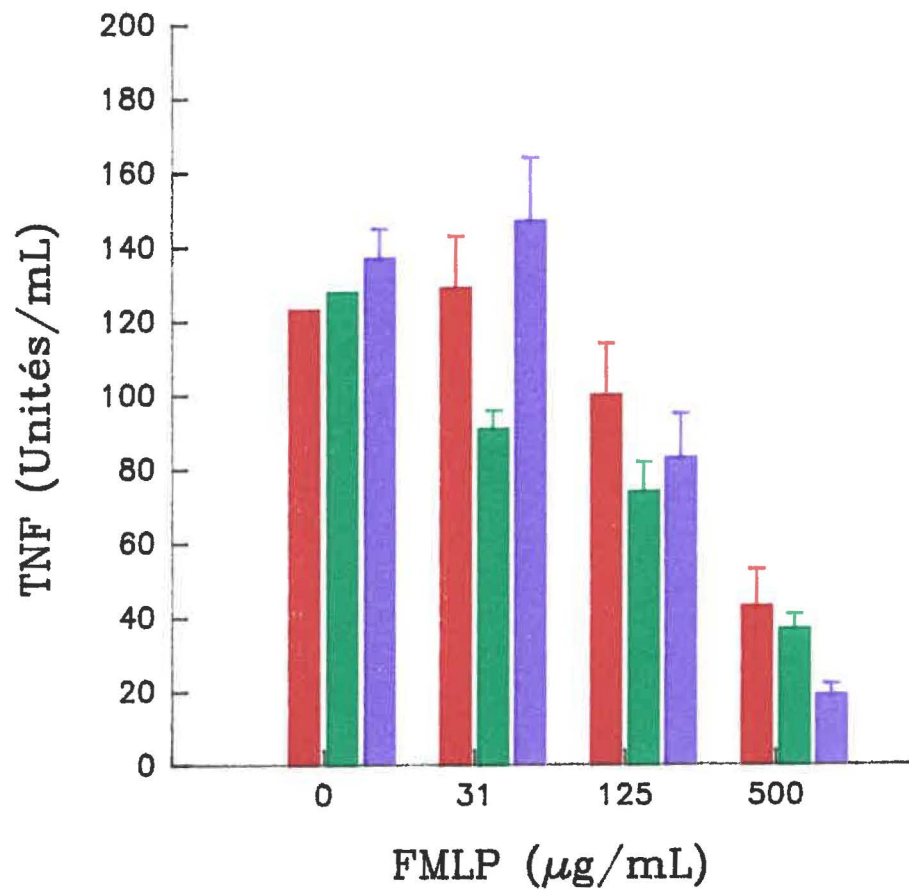
En absence de LPS, les cellules stimulées par différentes doses de FMLP ont sécrété des niveaux de TNF inférieurs à 4 unités/mL, c'est pourquoi ces résultats ne sont pas visibles sur l'histogramme. Tout comme pour les résultats présentés précédemment, le FMLP seul n'a pas induit la sécrétion de TNF au-dessus du témoin, quelle que soit la dose utilisée.

Une dose aussi petite que 0,5 ng/mL de LPS déclenche une sécrétion de TNF bien au-dessus de la valeur témoin. Nous observons une certaine tendance à une dépendance vis-à-vis de la dose de LPS.



**FIGURE 7:** Sécrétion de TNF par des cellules mononucléaires du sang humain cultivées en présence de différentes doses de LPS et/ou de FMLP.

Les cellules mononucléaires ( $2 \times 10^6$  cellules/mL) ont été mises en présence de différentes doses de FMLP et/ou de LPS pour une période de 24 heures. Les surnageants ont ensuite été prélevés et entreposés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour du dosage du TNF et de l'IL-6. Pour les échantillons ne contenant pas de LPS moins de quatre unités/mL de TNF ont été détectées. Les résultats sont représentatifs de deux donneurs différents. Les barres verticales représentent l'erreur standard calculée sur le dosage de TNF. Lorsque l'erreur standard est minimale celles-ci n'apparaissent pas sur le graphique.



■ CONTROLE      ■ LPS 0,5ng/mL  
■ LPS 5 ng/mL    ■ LPS 50 ng/mL

La sécrétion semble croissante pour 0,5; 5 et 50 ng/mL de LPS en l'absence de FMLP. En présence de 31  $\mu\text{g/mL}$  (71  $\mu\text{M}$ ) de FMLP nous observons une inhibition seulement dans le cas d'une stimulation avec 5 ng/mL de LPS. Par contre, avec des doses de 125 et 500  $\mu\text{g/mL}$  (1,143 mM) de FMLP, la sécrétion détectée a été inhibée dans tous les cas. Cette inhibition est plus importante pour la dose de 500 que de 125  $\mu\text{g/mL}$  (285,8  $\mu\text{M}$ ). Nous pouvons aussi noter que la sécrétion induite par la plus grande dose de LPS (50 ng/mL) a été inhibée plus fortement que les sécrétions induites par des doses plus faibles de LPS (0,5 et 5 ng/mL) pour la plus grande dose de FMLP (500  $\mu\text{g/mL}$  (1,143 mM)).

Dans toutes les expériences indépendantes effectuées, les doses de 125 (285,8  $\mu\text{M}$ ) et 500  $\mu\text{g/mL}$  (1,143 mM) de FMLP ajoutées aux différentes concentrations de LPS, ont diminué les quantités de TNF détectées, en comparaison avec les quantités détectées avec les mêmes doses de LPS mais en absence de FMLP. Dans tous les cas, la dose de 500  $\mu\text{g/mL}$  (1,143 mM) était plus efficace que des doses inférieures de FMLP dans la diminution du nombre d'unités/mL détectées suite à la stimulation par le LPS.

## **2.2 DOSES-RÉPONSES DE LA SÉCRÉTION DE L'INTERLEUKINE-6 (IL-6)**

La sécrétion de l'IL-6, par des cellules mononucléaires totales, a aussi été évaluée avec diverses doses de LPS et de FMLP. Ces résultats sont illustrés à la figure 8. Tout d'abord, pour les cellules n'ayant reçu aucun stimulus extérieur, nous observons un niveau

basal de sécrétion relativement faible. Lorsque des doses croissantes de FMLP (31; 125 et 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1,143 mM)) sont ajoutées aux cellules, nous observons une augmentation croissante de cette sécrétion. Cette augmentation est très visible particulièrement à la dose la plus élevée soit 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1,143 mM), mais elle est présente à la dose de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (285,8  $\mu\text{M}$ ).

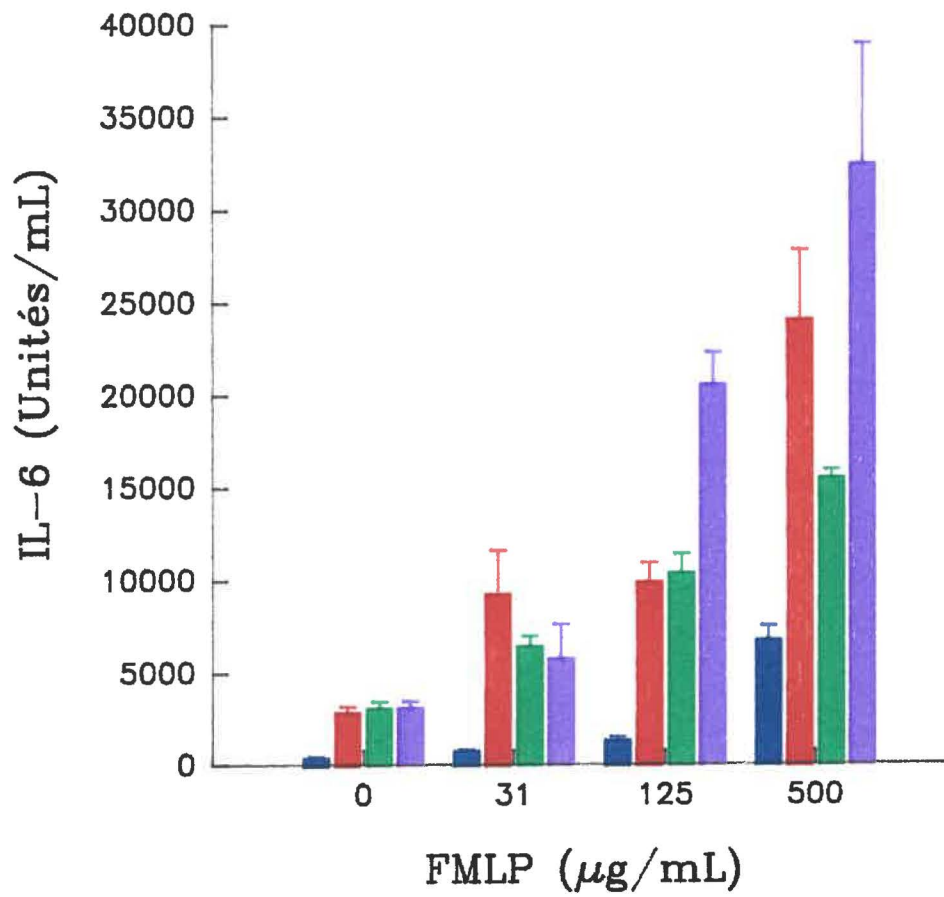
En l'absence de FMLP les quantités d'IL-6 détectées pour des doses de 0,5; 5 et 50 ng/mL de LPS sont comparables et sont toutes au-dessus du témoin. Dans le cas du donneur présenté, la quantité d'IL-6 détectée en présence de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1,143 mM) de FMLP est même au-dessus des quantités observées avec les différentes doses de LPS seul. Cette observation ne s'est pas vérifiée dans le cas de tous les donneurs. Par contre, dans tous les cas, les stimulations par le LPS ou par le FMLP étaient bien au-dessus du niveau basal de sécrétion.




La combinaison des stimulations FMLP + LPS présentent des quantités plus élevées, comparativement à la stimulation avec le LPS seul ou avec le FMLP seul. Cet accroissement de sécrétion augmente proportionnellement à la dose de FMLP ajoutée au LPS. C'est à la dose de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1,143 mM) que nous observons la plus grande augmentation. Pour l'expérience présentée, la combinaison FMLP (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1,143 mM)) + LPS (0,5 ng/mL) a induit une plus grande production d'IL-6 que la combinaison FMLP (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1,143 mM)) + LPS (5 ng/mL). Chez tous les donneurs utilisés dans

ces expériences, le FMLP à une dose de 500  $\mu\text{g/mL}$  (1,143 mM), a augmenté la quantité d'IL-6 sécrétée en présence de LPS aux diverses doses ( 0,5; 5 et 50 ng/mL).

**FIGURE 8:** Sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de différentes doses de FMLP et/ou de LPS.

Pour légende, voir figure 7.



	LPS 0 ng/mL		LPS 0,5ng/mL
	LPS 5 ng/mL		LPS 50 ng/mL

### **3.0 EFFETS D'UN PRÉTRAITEMENT A LA TOXINE DE *BORDETELLA PERTUSSIS* SUR LA SÉCRÉTION DES CYTOKINES**

La toxine de *Bordetella pertussis*, un inhibiteur des protéines G de type inhibiteur a été utilisé afin d'évaluer l'implication possible de telles protéines G dans le contrôle de la sécrétion du TNF et de l'IL-6, résultant des stimulations au FMLP et/ou au LPS. La moitié des puits ont été traités avec 50 ng/mL de toxine de *Bordetella pertussis* durant 18 heures. Par la suite, tous les puits ont été stimulés durant six heures, dans le cas du TNF et pendant 24 heures, dans le cas de l'IL-6, avec le ou les stimuli choisis (FMLP ± LPS).

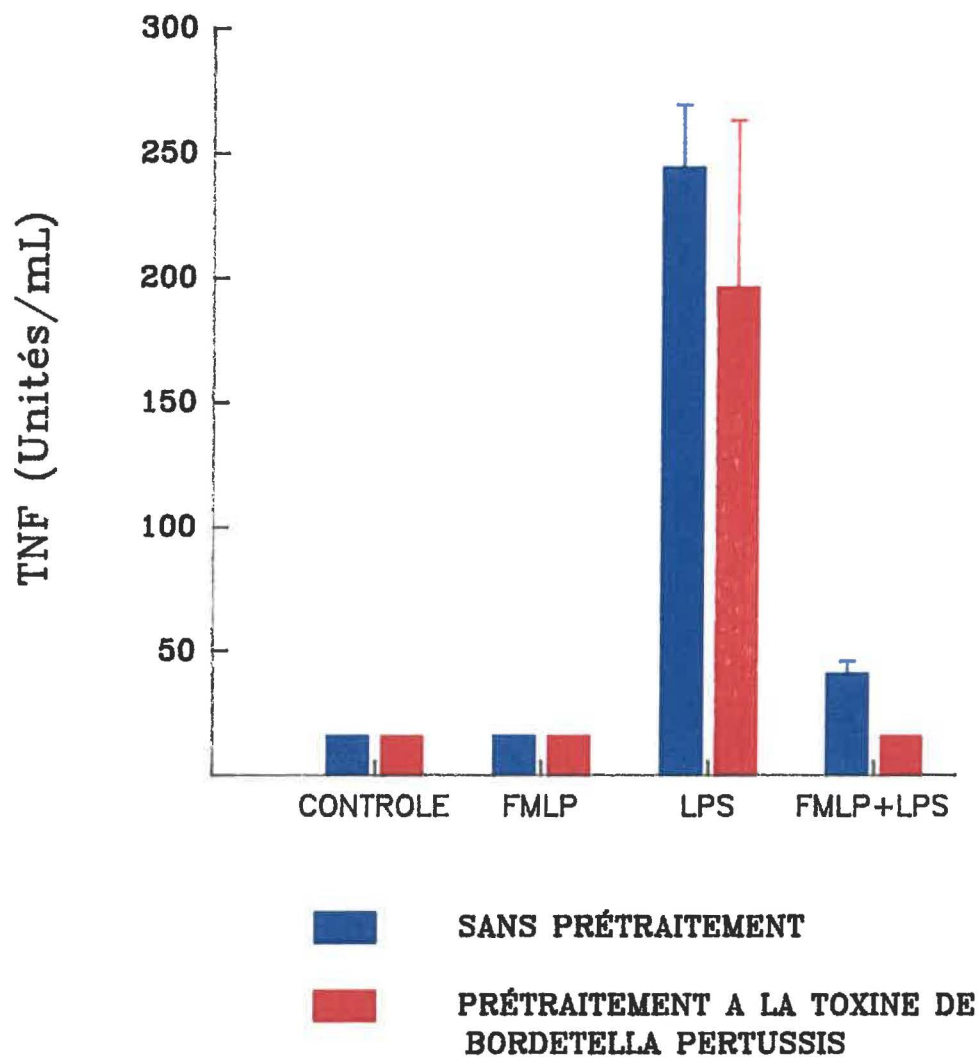
#### **3.1 EFFETS SUR LA SÉCRÉTION DU FACTEUR NÉCROSANT DES TUMEURS (TNF)**

Les résultats de la figure 9 sont représentatifs de quatre donneurs différents. La toxine de *Bordetella pertussis* ne modifie pas le niveau basal de sécrétion. La stimulation par le FMLP n'a pas provoqué de sécrétion détectable au-dessus du témoin avec ou sans le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis*. Le LPS, tel qu'observé précédemment, stimule fortement la sécrétion de TNF, par rapport aux contrôles, et le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* ne le modifie pas. Les cellules stimulées par la combinaison FMLP + LPS sécrètent des quantités de TNF bien inférieures à celles obtenues avec les stimulations au LPS seul, mais légèrement au-dessus des niveaux de contrôle.



**FIGURE 9:** Effets d'un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* sur la sécrétion de TNF par les cellules mononucléaires du sang humain stimulées avec du FMLP et/ou du LPS.

Les cellules mononucléaires du sang humain ont été mises en culture dans du RPMI contenant 2,5% de sérum autologue, à raison de  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Les cellules qui ont subi le prétraitement ont été mises en présence de 50 ng/mL de toxine de *Bordetella pertussis* 18 heures avant l'ajout des stimuli. Le FMLP (250  $\mu$ g/mL) et/ou le LPS (100 ng/mL) ont été ajoutés aux puits adéquats pour une stimulation de 6 heures. Les surnageants ont par la suite été récoltés et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour du dosage de TNF. Les résultats présentés sont représentatifs de quatre donneurs différents. Ils représentent la moyenne des valeurs de TNF obtenus dans trois puits différents et les barres verticales représentent l'erreur standard calculée sur cette moyenne.



Le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* abaisse légèrement cette quantité de cytokine déjà peu élevée.

En résumé le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* a peu d'effet sur la production de TNF. Cette toxine bactérienne n'a pas d'effet sur la lignée indicatrice (L929). Ce n'est donc pas via un effet sur la méthode de dosage de TNF que le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* aurait pu influencer les résultats présentés.

### **3.2 EFFETS SUR LES SÉCRÉTIONS D'INTERLEUKINE-6 (IL-6)**

Les figures 10 et 11 représentent les résultats obtenus pour l'IL-6. Les cellules mises en culture sans stimulation sécrètent environ 180 unités/mL d'IL-6 alors que, l'ajout de FMLP provoque la sécrétion de plus de 1 000 unités/mL de cette même cytokine. Le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* diminue légèrement le niveau basal de sécrétion d'IL-6 et cela à toutes les doses utilisées. Les niveaux de sécrétion observés lors de la combinaison du prétraitement et de la stimulation au FMLP se comparent aux niveaux obtenus avec les cellules n'ayant pas été stimulées au FMLP. La toxine de *Bordetella pertussis* inhibe de façon très nette l'augmentation d'IL-6 induite par la présence du FMLP.

Les effets d'un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* ont aussi été

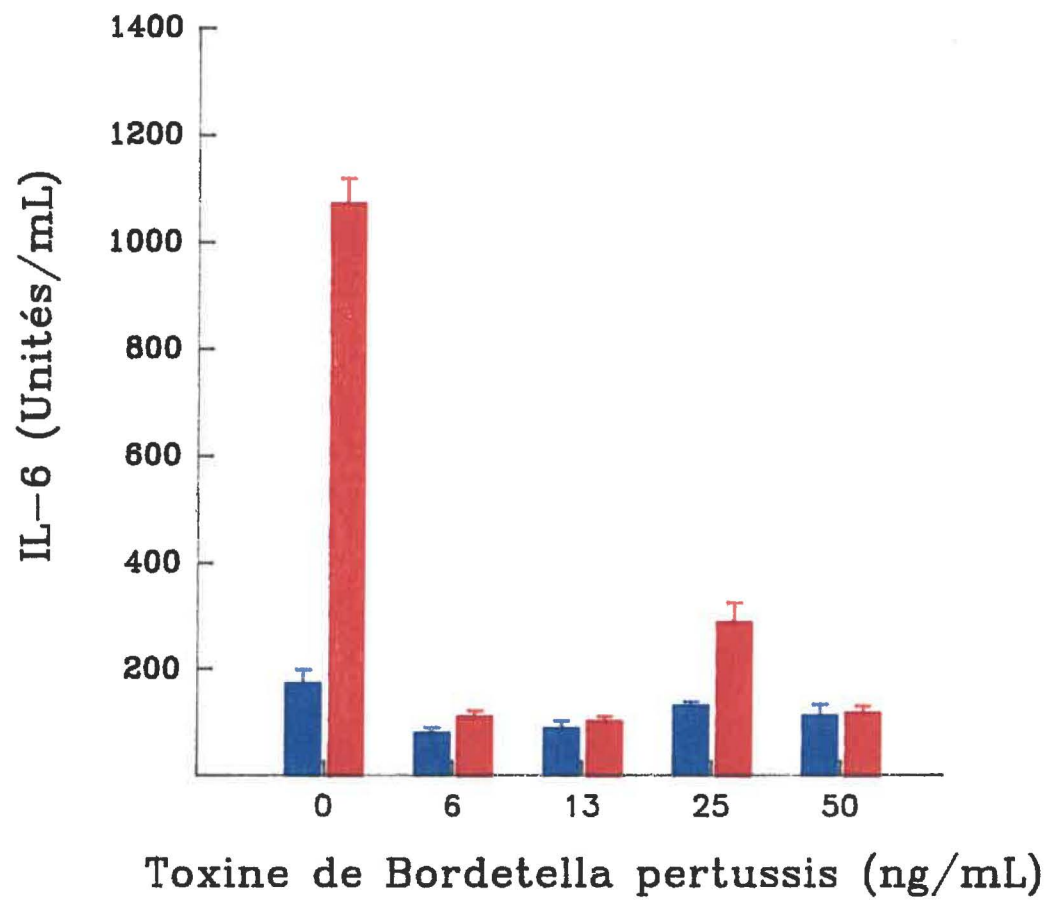
évalués pour les sécrétions d'IL-6 en présence de LPS. Les résultats représentatifs de quatre donneurs sont présentés sur la figure 11. Tout comme pour les résultats de la figure 10, le prétraitement diminue le niveau basal de sécrétion de cette cytokine par les cellules mononucléaires humaines. De même, il diminue l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 induite par la stimulation par le LPS seul.

Lorsque les cellules ont été stimulées avec la combinaison FMLP + LPS, la quantité d'IL-6 est élevée. Le prétraitement à la toxine bactérienne a diminué de façon drastique cette sécrétion. La sécrétion de la combinaison FMLP + LPS avec le prétraitement est comparable à la stimulation au LPS ayant aussi subi le prétraitement.

Le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* diminue de façon très importante la sécrétion d'IL-6 induites par les stimulations au FMLP et/ou au LPS. Nous n'observons aucun effet par la toxine de *Bordetella pertussis* en elle-même, sur la lignée indicatrice utilisée, la B9. Ce n'est donc pas au niveau de la technique de dosage de la cytokine que la toxine bactérienne a agit mais plutôt au niveau de la biosynthèse de l'IL-6.

**FIGURE 10:** Effets d'un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* sur la sécrétion d'IL-6 par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP

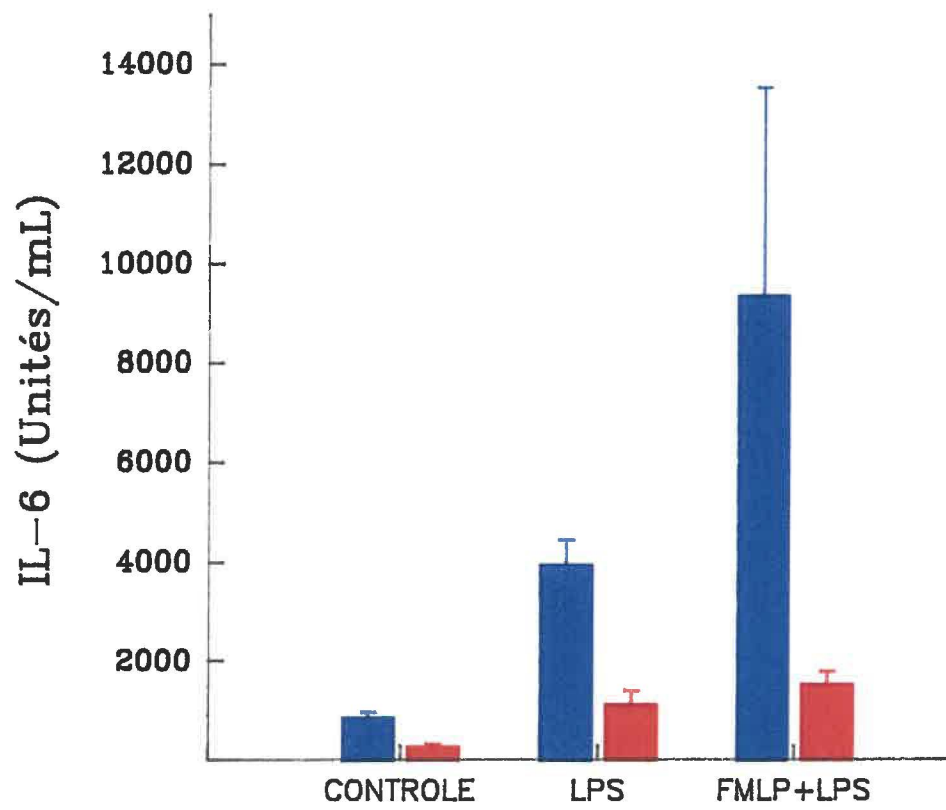
Les cellules mononucléaires du sang humain dans du RPMI contenant 2,5% de sérum autologue ont été mises en culture à raison de  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Les cellules ont été mises en présence de doses variées de toxine de *Bordetella pertussis* (0, 3, 12 et 50 ng/mL) pour une période de 18 heures. Une dose de 250  $\mu\text{g/mL}$  de FMLP a été ensuite ajoutée dans les puits adéquats pour une période de 24 heures. A la fin de la période de stimulation, les surnageants de culture ont été récoltés et congelés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'au jour du dosage de l'IL-6. Les résultats présentés sont représentatifs de trois donneurs. Les barres verticales représentent l'erreur standard sur le dosage de cytokine.



■ CONTROLE  
■ FMLP (250 µg/mL)

**FIGURE 11:** Effets d'un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* sur la sécrétion d'IL-6 par les cellules mononucléaires mises en présence de LPS ou de la combinaison FMLP + LPS.

Dans chacun des puits  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans du RPMI contenant 2,5% de sérum autologue ont été déposées. Les cellules qui ont subi un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* ont été mises en présence de 50 ng/mL de cette toxine pour une période de 18 heures. On a ensuite procédé à la stimulation en ajoutant aux puits adéquats 100 ng/mL de LPS avec ou sans 250  $\mu$ g/mL de FMLP. Après une période de 24 heures, les surnageants des cellules stimulées ont été récoltés et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour du dosage de la cytokine. Chacun des résultats présentés est la moyenne de trois puits de stimulation distincts et les barres verticales représentent l'erreur standard de cette moyenne. Les résultats présentés sont représentatifs de quatre donneurs différents.



**SANS PRÉTRAITEMENT**



**PRÉTRAITEMENT A LA TOXINE DE  
BORDETELLA PERTUSSIS**



## 4.0 EXPRESSION DE GENES DE CYTOKINES PAR LES CELLULES MONONUCLÉAIRES

L'expression des gènes des cytokines suivantes : TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 a été mesurée dans des cellules mononucléaires du sang humain, mises en présence de FMLP et/ou de LPS. En fait, ce que nous mesurons, c'est la quantité d'ARNm qui code pour ces gènes, dont nous avons modulé l'expression dans des conditions expérimentales déjà établies. Les résultats présentés dans la figure 12 sont représentatifs de quatre donneurs. Les cellules ont été cultivées durant de sept heures avant l'extraction de l'ARN.

La figure 13 présente les résultats quantitatifs en rapports densitométriques des autoradiogrammes présentés à la figure 12. Les histogrammes représentent les résultats de chacune des cytokines par rapport aux résultats du gène contrôle, la  $\beta$ -actine. Cette analyse permet de comparer au sein d'un même groupe les puits de l'un à l'autre.

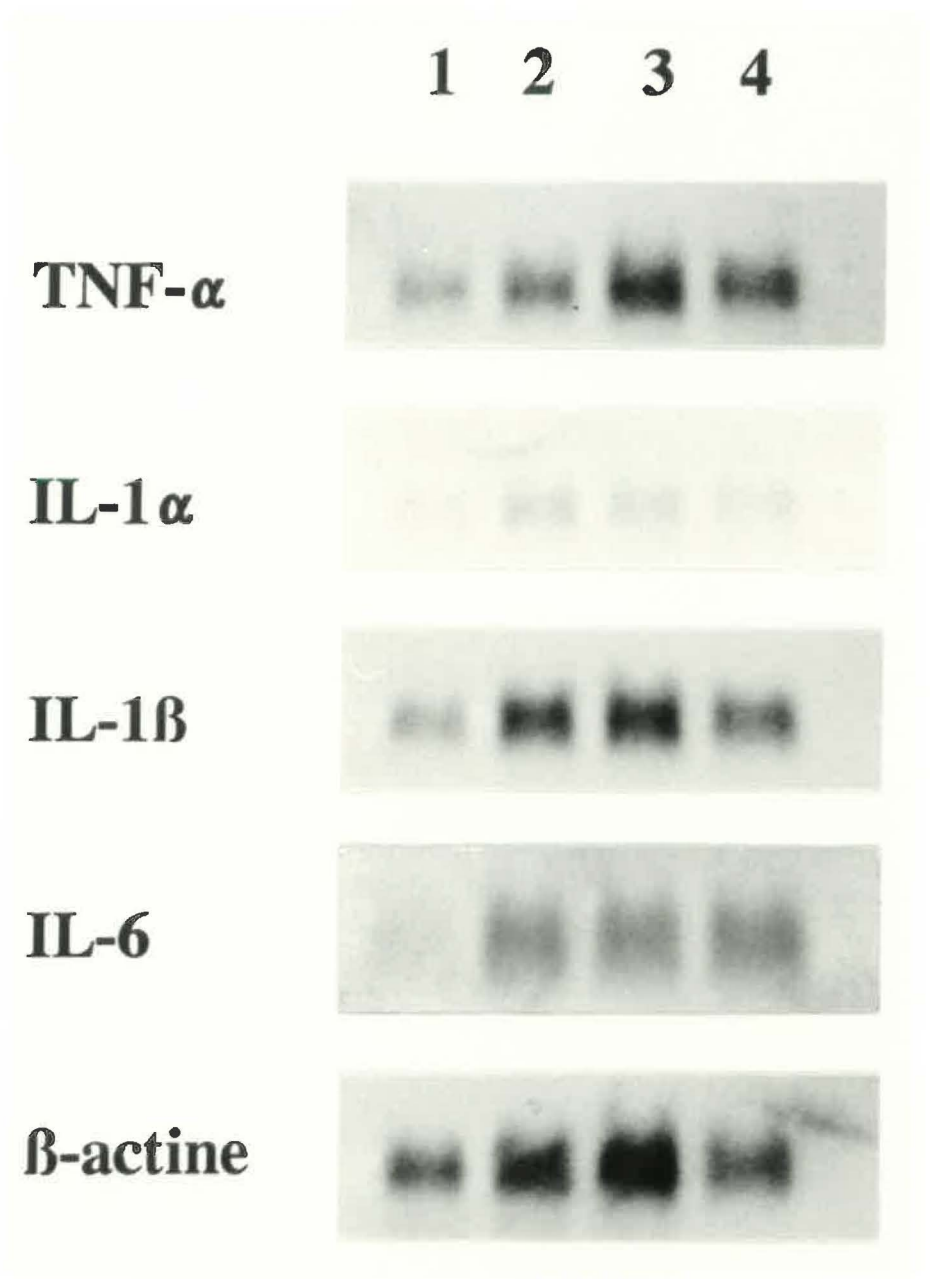
Dans le premier puits, nous avons déposé l'ARN des cellules non-stimulées. Nous observons une très faible expression de tous les gènes des cytokines étudiés: TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6. Dans le puits 2, les cellules ont été mises en présence de FMLP (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (571,5  $\mu\text{M}$ )). La quantité d'ARNm codant pour le TNF varie à peine en comparaison avec le témoin (puits 1). Le FMLP ne modifie donc pas la quantité d'ARNm de cette cytokine. Par contre, pour les gènes de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, nous observons une nette augmentation de la quantité d'ARNm comparativement au témoin.

Dans le puits 3, nous voyons que l'ARN extrait des cellules préalablement stimulées avec du LPS, contient une quantité très appréciable d'ARNm des quatre cytokines étudiées. Ce stimulus induit donc très efficacement un niveau d'expression plus élevé pour ces cytokines, par rapport au contrôle.

Le puits 4 représente l'ARN des cellules qui ont été stimulées simultanément avec du FMLP et du LPS. Pour les quatre cytokines, le résultat est similaire à celui obtenu avec la stimulation au LPS seul.

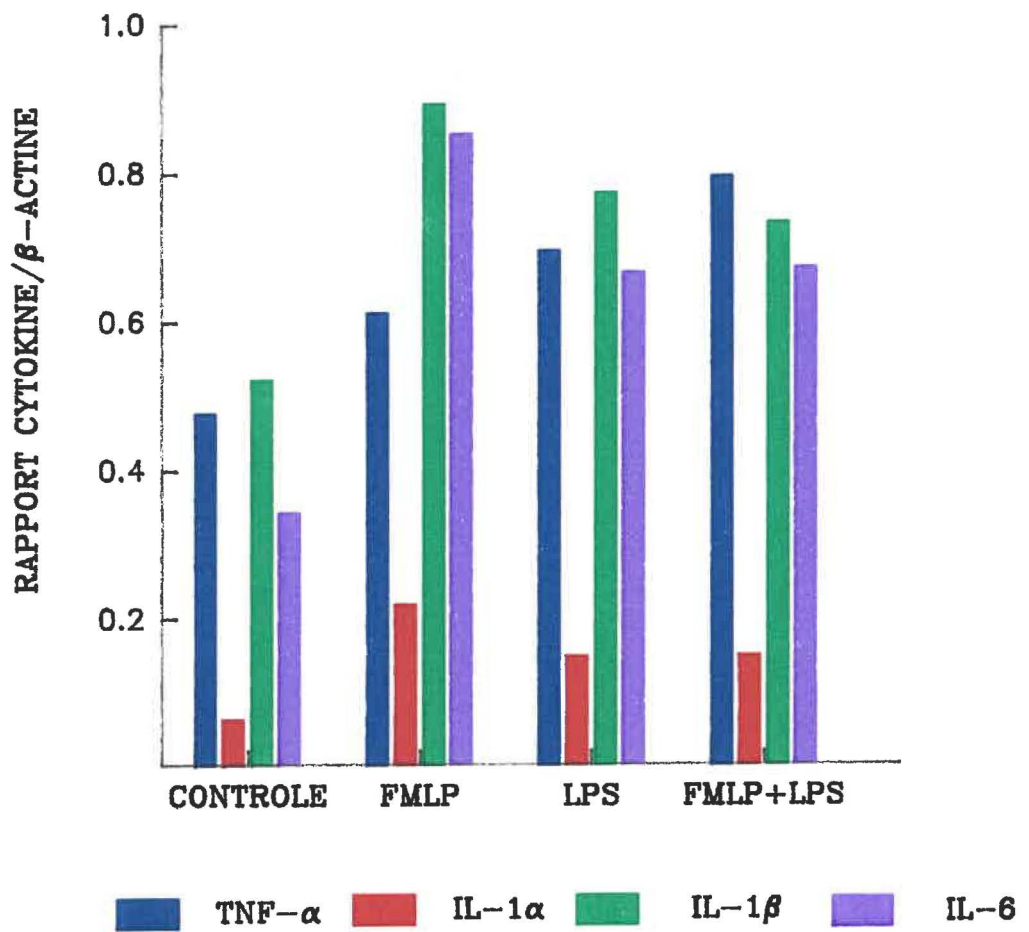
**FIGURE 12:** Expression de l'ARNm de différentes cytokines par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS.

Les cellules mononucléaires du sang humain ont été cultivées dans du RPMI contenant 5% de sérum autologue à raison de  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Les cellules ont été stimulées durant sept heures avant de procéder à l'extraction d'ARN sur un gradient de chlorure de césium. L'ARN isolé à partir de  $1,55 \times 10^7$  cellules par échantillon a été utilisé pour effectuer le transfert de type Northern. Des hybridations avec les différentes sondes ont été effectuées. La  $\beta$ -actine sert de contrôle de la quantité d'ARN mise dans chacun des puits. Puits 1: ARN isolé à partir de cellules en culture seulement; Puits 2: ARN des cellules mises en présence de 250  $\mu$ g/mL de FMLP; Puits 3: ARN des cellules mises en présence de 100 ng/mL de LPS; Puits 4: ARN des cellules mises en présence de 250  $\mu$ g/mL de FMLP et 100 ng/mL de LPS. La membrane hybridée avec les différentes sondes a été exposée à  $-70^\circ\text{C}$  pour les périodes suivantes: TNF- $\alpha$ , 48 heures; IL-1 $\alpha$ , 24 heures; IL-1 $\beta$ , 45 minutes; IL-6, 20 heures et  $\beta$ -actine, 45 minutes. Les résultats présentés ont été obtenus avec un donneur et sont représentatifs de ceux obtenus avec trois autres donneurs.



**FIGURE 13:** Rapports densitométriques de l'expression de l'ARNm de différentes cytokines par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS.

L'intensité des bandes sur les autoradiogrammes de la figure 12 a été évaluée à l'aide d'un vidéodensitomètre Bio-Rad (modèle 620) et du logiciel 1DPACK. Les histogrammes représentent pour chacun des échantillons le rapport de la surface (largeur (mm) X hauteur (densité optique) de la bande de la cytokine donnée sur celle de la  $\beta$ -actine correspondante.



## **5.0 EFFETS D'UN PRÉTRAITEMENT A LA TOXINE DE *BORDETELLA PERTUSSIS* SUR L'EXPRESSION DES GENES DES INTERLEUKINE-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ) et INTERLEUKINE-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

L'influence du FMLP sur l'expression de gènes de cytokines, dans des cellules mononucléaires prétraitées avec la toxine de *Bordetella pertussis* puis stimulées avec le FMLP et/ou le LPS a été étudiée. La même préparation cellulaire a été utilisée pour tous les échantillons. Toutes les stimulations ont été faites en même temps.

Dans les quatre premiers puits de la figure 14, nous retrouvons le même type de résultats que ceux présentés à la figure 12. Les quatre derniers puits contiennent l'ARN des cellules ayant reçu un traitement à la toxine de *Bordetella pertussis* avant la stimulation au FMLP et/ou au LPS. Dans le puits 1, nous retrouvons l'ARN des cellules n'ayant reçu aucune stimulation, le puits correspondant dans le groupe des cellules prétraitées à la toxine de *Bordetella pertussis* se situe dans le puits 5. Un certain niveau de base d'expression des gènes est détecté et n'est pas affecté par le prétraitement à la toxine bactérienne.

Dans le puits 2, l'ARN extrait des cellules stimulées avec du FMLP (250 $\mu$ g/mL) démontre une augmentation de l'expression des gènes des deux cytokines. Par contre, le puits 6 correspondant ayant reçu le prétraitement présente un niveau d'expression des gènes comparable au contrôle. Le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* inhibe

l'augmentation de l'expression des deux gènes induite par le FMLP.

Dans le puits 3, où une stimulation au LPS a été effectuée, nous observons un niveau d'expression des gènes supérieur à celui que nous retrouvons dans le puits contrôle. Le puits correspondant dans le groupe du prétraitement, le puits 7 présente une quantité d'ARNm plus élevée que celle dans le puits contrôle, par contre, cette augmentation est inférieure à celle nous retrouvons dans le premier groupe. La toxine de *Bordetella pertussis* inhibe partiellement l'augmentation de l'expression des gènes de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ , causée par une stimulation au LPS.

Dans le dernier puits de chacun des groupes, nous retrouvons l'ARN de cellules ayant été stimulées avec la combinaison FMLP + LPS. Nous observons un niveau d'expression des cytokines au-dessus de celui obtenu pour les cellules ayant été stimulées avec un ou l'autre des stimuli. Dans le second groupe, l'augmentation d'expression est inférieure. Ainsi la toxine de *Bordetella pertussis* inhibe partiellement l'augmentation de l'expression des gènes de l'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  due à la double stimulation FMLP et LPS. Dans le cas de l'IL-1 $\beta$ , le niveau d'expression est très comparable à celui que nous retrouvons dans le puits 7, stimulation au LPS seul après le prétraitement. Les résultats exprimés en rapport de densitométrie sont présentés sur la figure 15.



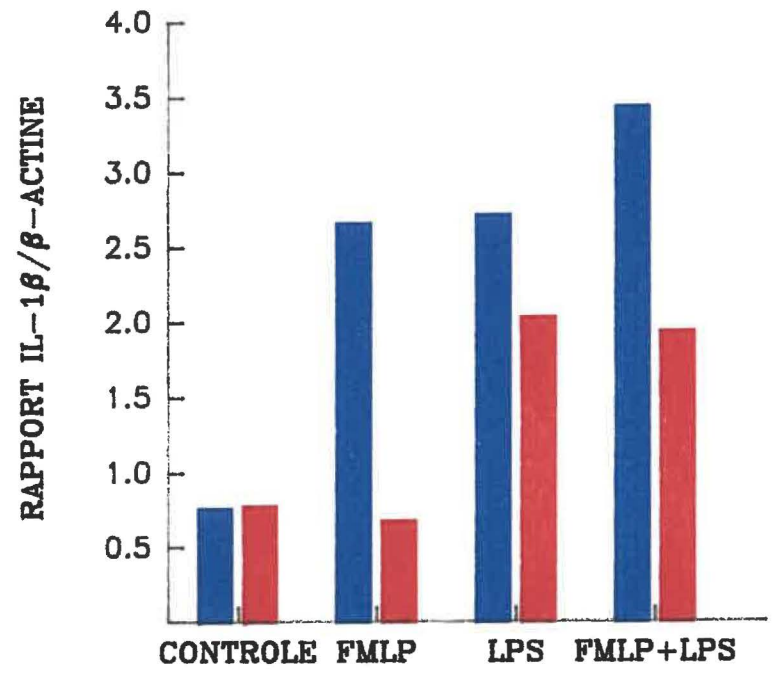
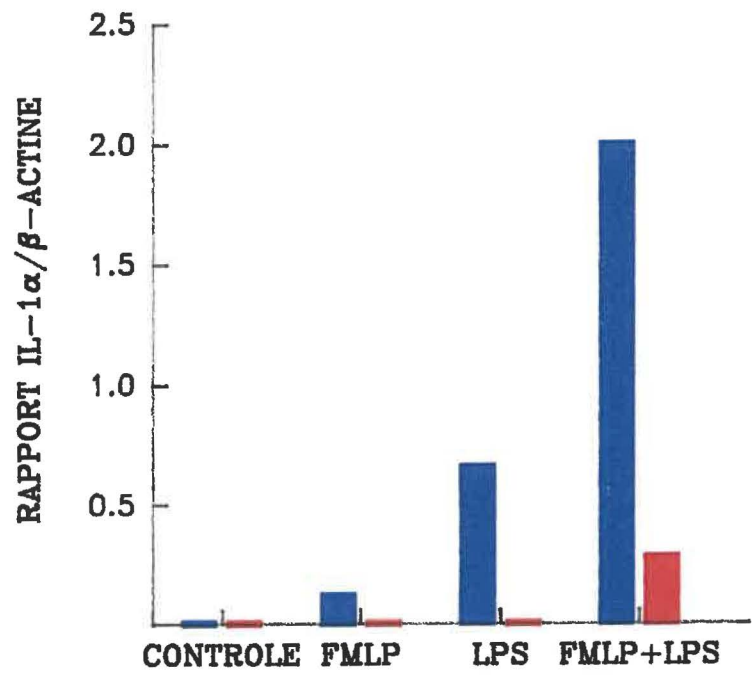
**FIGURE 14:** Effets d'un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* sur l'expression des gènes de l'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS.

Les cellules mononucléaires du sang humain ont été mises en culture dans du RPMI contenant 5% de sérum autologue à raison de  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Celles qui ont subi le prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* ont été mises en présence de 50ng/mL de cette toxine 18 heures avant l'ajout de FMLP (250  $\mu$ g/mL) et/ou de LPS (100ng/mL) pour une stimulation de six heures. Les cellules contrôles, n'ayant pas reçu un tel prétraitement, ont été mises en culture et stimulées pour 6 heures en même temps que l'autre groupe. L'ARN isolé à partir de  $1,1 \times 10^7$  cellules par échantillon a été utilisé. Des hybridations avec les différentes sondes ont été effectuées. La  $\beta$ -actine sert de contrôle de la quantité d'ARN mise dans chacun des puits. Puits 1 à 4: ARN isolé à partir des cellules n'ayant pas reçu de prétraitement à la toxine pertussis **1:** cellules non-stimulées, **2:** cellules mises en présence de FMLP, **3:** cellules mises en présence de LPS, **4:** cellules mises en présence de FMLP et de LPS. Puits 5 à 8: ARN isolé à partir des cellules prétraitées à la toxine pertussis puis stimulées **5:**cellules non-stimulées **6:** cellules mises en présence de FMLP **7:** cellules mises en présence de LPS **8:**cellules mises en présence de FMLP + LPS. Les résultats présentés sont représentatifs de deux donneurs. La membrane a été hybridée avec les différentes sondes à -70°C pour les périodes suivantes: IL-1 $\alpha$ , 24 heures; IL-1 $\beta$ , 1 heure et  $\beta$ -actine, 45 minutes.



**FIGURE 15:** Rapports densitométriques des effets d'un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* sur l'expression des gènes de l'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  par des cellules mononucléaires du sang humain mises en présence de FMLP et/ou de LPS.

L'intensité des bandes de la figure 14 a été évaluée de la même façon que précédemment décrit à la figure 13.



SANS PRÉTRAITEMENT  
 PRÉTRAITEMENT A LA TOXINE DE BORDETELLA PERTUSSIS

## **DISCUSSION**

Le FMLP est un facteur chimiotactique bien connu mais on lui attribue aussi d'autres fonctions comme, par exemple, l'induction de la flambée oxidative (Snyderman et Uhing, 1992). Comme d'autres molécules actives, le FMLP pourrait potentiellement induire et moduler d'autres réponses inflammatoires. Le but de ce travail consistait à évaluer les effets du FMLP, seul et en combinaison avec du LPS, sur la sécrétion de cytokines d'une part, et sur l'expression de gènes de cytokines d'autre part. Nous avons utilisé des cellules mononucléaires du sang humain à cause de leur rôle primordial dans les mécanismes de l'inflammation et parce qu'elles constituent une source importante de cytokines inflammatoires.

Des donneurs, non-fumeurs et ne souffrant pas de maladies apparentes, ont été choisis comme source de cellules sanguines humaines. Il a été démontré dans la littérature que les fumeurs, ainsi que les patients souffrant de certaines pathologies, possèdent des profils de sécrétions de cytokines modifiés, par rapport à des individus non-fumeurs et en bonne santé (Voth *et al.*, 1990, Safieh-Garabedian *et al.*, 1993, Yamaguchi *et al.*, 1993). La séparation du sang a été effectuée moins de 20 minutes après les prélèvements pour favoriser la mesure optimale de cytokines (Exley et Cohen, 1990). Pour purifier les monocytes tout en se débarrassant presque entièrement des autres populations cellulaires, nous avons utilisé la technique d'adhérence qui est largement employée dans la littérature (Ho *et al.*, 1987, Navarro *et al.*, 1989, Standiford *et al.*, 1992). Les lignées L929 et B9 que nous avons utilisées pour doser respectivement le TNF et l'IL-6, ont été souvent

utilisées par d'autres équipes pour doser les cytokines dans des surnageants de cellules humaines (Feist *et al.*, 1992, DeForge *et al.*, 1992). Étant donné la grande variabilité dans les niveaux de sécrétion d'un donneur à l'autre, chacune des expériences représente les résultats obtenus avec la même préparation cellulaire obtenue à partir d'un même donneur. Les expériences ont été répétées avec plusieurs donneurs indépendants.

Nous avons, tout d'abord, déterminé les cinétiques de sécrétions de TNF et d'IL-6 par les cellules mononucléaires et les cellules mononucléaires adhérentes. Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux populations de cellules (figures 2,3,4,5, et 6). De faibles niveaux de TNF et d'IL-6 ont été détectés dans les surnageants de cellules mononucléaires mises en culture sans ajout de stimulus.

Lorsque les cellules ont été mises en présence de LPS, nous observons une augmentation importante de la quantité de TNF et d'IL-6 biologiquement actifs dans les surnageants des cellules mononucléaires totales ou adhérentes. La sécrétion de TNF survient tôt après la stimulation (voir figures 2 et 3). Nous pouvons observer une diminution importante de cette quantité lorsque la durée de la stimulation augmente. En effet, aux alentours de 45 à 50 heures, le niveau de TNF mesuré est redescendu pour se retrouver à peu près au niveau du témoin. La cinétique de sécrétion de l'IL-6 est différente. Jusqu'à 24 heures, les quantités détectées augmentent puis demeurent relativement stables. Le maximum de sécrétion de cette cytokine survient plus tard que

pour le TNF et les quantités ne diminuent pas de façon importante jusqu'à la fin de la cinétique. Des doses de LPS relativement faibles (0,5 ng/mL) ont induit ces sécrétions au-dessus du niveau du contrôle (voir figure 7), ce qui confirme des faits publiés (Hofsli *et al.*, 1989). Le LPS constitue un inducteur important pour le TNF et l'IL-6 (Hofsli *et al.*, 1989, Ray *et al.*, 1989a).

Andersson et Matsuda (1989) ont démontré par une analyse cellulaire que, lors de la stimulation de cellules mononucléaires du sang humain avec 100 ng/mL de LPS, les monocytes étaient les seules cellules à sécréter du TNF et de l'IL-6, à en juger par la morphologie et une coloration spécifique des monocytes. Après 30 minutes de stimulation au LPS, environ 50% des monocytes sécrètent du TNF, le pic de sécrétion est à deux heures quand 80% des monocytes sécrètent cette cytokine. A partir de la quatrième heure, il y a une diminution importante du pourcentage de cellules sécrétrices de TNF (Andersson et Matsuda, 1989). A trois heures, 90% des monocytes sécrètent de l'IL-6. Une quantité importante de monocytes continuent de sécréter de l'IL-6 durant les premières 24 heures de stimulation (Andersson et Matsuda, 1989). Nos résultats concordent bien avec ceux obtenus par ces auteurs. La quantité d'IL-6 demeure élevée tout au long de la cinétique, comparativement à celle du TNF. Nous avons aussi obtenu une sécrétion d'IL-6 plus tardive que celle du TNF. Andersson et Matsuda (1989) ont bien démontré que la sécrétion maximale du TNF est atteinte avant celle de l'IL-6.



Une des causes possibles de la diminution de TNF dans les surnageants serait la consommation de cette cytokine par les cellules présentes dans le milieu. Le TNF a pour cible les monocytes (Ding *et al.*, 1988, Drapier *et al.*, 1988), les lymphocytes T activés (Scheurich *et al.*, 1987), les lymphocytes B (Vassalli, 1992), les cellules polynucléaires (Beutler et Cerami, 1989). Lors de l'incubation des cellules mononucléaires du sang humain avec des cytokines recombinantes, il n'y a pas eu de consommation observée (Andersson et Matsuda, 1989), mais ce protocole ne reflète pas nécessairement la destinée des cytokines qui ont été sécrétées. En effet, plusieurs mécanismes sont possibles pour réguler la quantité de TNF présente dans le milieu. D'autres équipes ont démontré une diminution importante de TNF bioactif, au cours du temps, lors de l'activation de cellules sanguines par le LPS (DeForge *et al.*, 1992). Lors de l'injection d'endotoxine à des volontaires humains, le maximum de sécrétion de TNF a été atteint à deux heures dans le plasma des patients (Michie *et al.*, 1988). Il existe donc *in vitro* et *in vivo* des mécanismes de régulation de la quantité de cette cytokine dans le plasma. Les cellules répondent à la stimulation au LPS d'une façon très contrôlée, et ceci constitue sans doute un mécanisme limitant la sécrétion d'un produit qui pourrait devenir toxique (Kriegler *et al.*, 1988, Sariban *et al.*, 1988, Horiguchi *et al.*, 1989, Han *et al.*, 1990, English *et al.*, 1991).

Une exposition aussi courte que 5 à 15 minutes est suffisante pour induire la transcription du TNF chez les monocytes humains (Gallay *et al.*, 1993). Des doses aussi

faibles que 10 pg/mL de LPS sont capables d'induire cette sécrétion (Morin *et al.*, 1991) chez les cellules mononucléaires du sang humain. Il n'est donc pas surprenant qu'avec une dose de 0,5 ng/mL, soit 50 pg/mL, nous ayons détecté une augmentation de la sécrétion des cytokines.

Lorsque nous avons stimulé les cellules avec du FMLP, aucune sécrétion majeure de TNF n'a été observée (voir les figures 2,3 et 7). Dans certains cas, nous avons même détecté une légère baisse du niveau basal. Nous pouvons donc conclure que, dans nos conditions expérimentales, le FMLP ne provoque pas d'augmentation de sécrétion de cette cytokine.

La même stimulation au FMLP a provoqué une augmentation de la sécrétion de l'IL-6 et cela, à partir de 24 heures (voir les figures 4 et 6) tant pour les cellules mononucléaires totales que pour les cellules mononucléaires adhérentes. A notre connaissance, c'est la première fois que l'induction de la sécrétion de cette cytokine par ce stimulus est rapportée. L'induction par ce stimulus est nettement au-dessus du niveau de la culture témoin.

Les cellules mises en présence de la combinaison FMLP + LPS ont sécrété une quantité de TNF biologiquement actif, en dessous des niveaux observés avec le LPS seul. Cette observation s'est avérée vraie dans le cas des cellules mononucléaires totales et aussi

dans le cas des cellules mononucléaires adhérentes (voir les figures 2 et 3). Cette diminution importante a été notée dès les débuts de la cinétique, soit après trois et six heures de stimulation. A la fin de la cinétique, alors que les quantités de TNF induites par le LPS diminuent, nous observons une stabilisation de cette cytokine quand les cellules ont été mises en présence des deux stimuli. Le FMLP à différentes concentrations, ajouté au LPS, a fortement inhibé les quantités de TNF détectées. Cet effet se manifeste surtout aux concentrations de 125 (285,8  $\mu\text{M}$ ), 250 (571,5  $\mu\text{M}$ ) et 500  $\mu\text{g/mL}$  (1,143 mM), ce qui correspond à une concentration plus de 1000 fois supérieure à la concentration de LPS utilisée (0,5 à 100 ng/mL). C'est aussi une concentration nettement supérieure à celles nécessaires pour induire le chimiotactisme ( $3 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/mL}$ ) ou le relargage d'enzymes lysosomales ( $1 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ ) (O'Flaherty *et al.*, 1978b).

Les figures 5, 6 et 8 montrent clairement que le FMLP augmente la sécrétion d'IL-6 induite par le LPS chez les cellules mononucléaires du sang humain et en particulier chez les cellules mononucléaires adhérentes. Cependant, chez certains donneurs, le FMLP n'a pas augmenté de façon appréciable une sécrétion induite par 100 ng/mL de LPS. La sécrétion maximale de cette cytokine était peut-être atteinte par cette seule stimulation d'où l'impossibilité de l'augmenter encore davantage par l'ajout de FMLP. Les résultats obtenus avec des doses inférieures de LPS démontrent clairement l'augmentation de la sécrétion de cette cytokine lorsque les deux stimuli sont combinés (voir figure 8). Nous remarquons que l'induction et l'augmentation de la sécrétion de l'IL6 surviennent plus tard

que l'induction déclenchée par le LPS.

Un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis* a inhibé l'induction de la sécrétion mais aussi l'augmentation de la sécrétion de l'IL-6 (voir figures 10 et 11). En fait, la toxine bactérienne a ramené la sécrétion induite par la combinaison FMLP + LPS à un niveau inférieur comparable au LPS seul prétraité (voir figure 10). Il a été rapporté dans la littérature que cette toxine bactérienne, en inhibant le couplage protéine G-récepteur était capable d'inhiber plusieurs des effets du FMLP sur les monocytes humains (Verghese *et al.*, 1986). Une protéine G sensible à cette toxine bactérienne semble être impliquée dans l'induction et l'augmentation de la sécrétion de l'IL-6 par le FMLP. On sait que le récepteur de ce peptide est couplé à de telles protéines (Snyderman et Uhing, 1992), l'effet d'induction et d'augmentation par le FMLP sur les cellules mononucléaires pourrait s'effectuer via le récepteur de celui-ci.

Le prétraitement avec la toxine de *Bordetella pertussis* a aussi inhibé en partie la stimulation de la sécrétion d'IL-6 induite par le LPS sur les cellules mononucléaires (dans le cas du TNF, la diminution de sécrétion n'était pas importante). Ces inhibitions ont été partielles et pourraient être dues à la liaison de la toxine de *Bordetella pertussis* avec le LPS. On a rapporté dans la littérature que cette toxine bactérienne possède la capacité de se lier à l'endotoxine (Lei et Morrison, 1993). Une telle liaison pourrait empêcher une partie des molécules de LPS de se lier aux récepteurs des cellules sanguines. Une partie

des nombreux signaux de transduction impliqués dans l'activation par le LPS utilisent des protéines G sensibles à la toxine de *Bordetella pertussis* (Jakway et DeFranco, 1986), d'où une inhibition partielle du signal.

Pour une étude quantitative adéquate de l'expression des gènes des cytokines, chez les cellules mononucléaires, nous avons comparé les bandes obtenues suite à l'hybridation des gènes des cytokine avec celle obtenue avec les mêmes échantillons pour le gène de la  $\beta$ -actine. D'autres équipes ont aussi utilisé la  $\beta$ -actine comme gène contrôle de la quantité d'ARN présente dans différents échantillons (Bazzoni *et al.*, 1991).

L'analyse de type Northern (voir figure 12) démontre qu'il y a une faible transcription des gènes TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 en l'absence de stimulus extérieur. Osipovich et collaborateurs (1993) ont montré que l'adhérence au plastique n'induit pas la transcription du gène du TNF mais induit légèrement celle de l'IL-1 $\beta$ . Lorsque les cellules ne sont pas adhérees, elles présentent des niveaux bas ou négligeables d'expression de ces gènes (Osipovich *et al.*, 1993). Nous avons obtenu de très faibles niveaux d'expression pour les cytokines mais l'IL-1 $\beta$  semble avoir un niveau de base plus élevé.

Le LPS a induit une transcription importante de tous les gènes de cytokines étudiées: TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 (voir figure 12). Après sept heures de stimulation

avec le LPS, les quantités d'ARNm sont nettement supérieures à celle du contrôle. Il avait déjà été démontré que le LPS induit l'expression de ces gènes chez les cellules mononucléaires (Hofsli *et al.*, 1989). Une stimulation au LPS induit donc la transcription de ces gènes. Une plus grande transcription des gènes du TNF et de l'IL-6 semble être directement reliée à l'augmentation de sécrétion que nous avons observée pour ces deux cytokines.

Sur la figure 12, nous pouvons voir que le FMLP a provoqué une augmentation de l'expression des gènes de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6. A notre connaissance, ces observations n'ont pas encore été présentées dans la littérature. Le FMLP semble être capable d'induire une plus grande transcription de ces gènes. Cette étape serait un des mécanismes par lequel ce stimulus induit une plus grande sécrétion de l'IL-6 (voir figure 4). Le FMLP est donc capable d'agir dès le début de la cascade menant à la sécrétion de cytokine, soit au niveau de la transcription de gènes. Ce stimulus n'a aucun effet sur le niveau basal d'expression du TNF.

Le niveau d'expression du gène du TNF par rapport au gène de la  $\beta$ -actine est comparable entre les puits 3 et 4 qui correspondent respectivement aux stimulations LPS seul et FMLP + LPS (voir figure 12). Le FMLP n'a donc aucun effet au niveau de l'expression de ce gène soit seul ou en combinaison avec un autre puissant activateur. L'inhibition de sécrétion du TNF lorsque le FMLP est utilisé en combinaison avec le LPS

n'agit pas au niveau de l'expression du gène de cette cytokine. Cette même combinaison de stimuli a provoqué chez certains donneurs, un niveau d'expression des gènes des IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  supérieur à l'induction provoquée par le LPS (voir figures 14 et 15). Nous pouvons affirmer que le FMLP induit l'expression des gènes des IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6. Cette observation est nouvelle et indique une capacité d'induire des transcriptions de gènes de cytokines inflammatoires par ce peptide. Ces résultats nous fournissent une preuve que la transcription du gène du TNF ne semble pas être régulée par les mêmes mécanismes qui contrôlent la transcription des gènes des autres cytokines évaluées.

Un prétraitement par la toxine de *Bordetella pertussis* a inhibé l'induction d'expression de gènes pour IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  due au FMLP (voir figure 14). Le prétraitement par la toxine semble avoir inhibé seulement en partie l'induction de ces gènes par le LPS, surtout pour l'IL-1 $\beta$ , mais en totalité l'induction supplémentaire due à la contribution du FMLP (voir figure 14). L'induction et l'augmentation de l'expression des gènes de l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  par le FMLP implique tout au moins en partie une protéine G sensible à la toxine de *Bordetella pertussis*. Comme mentionné précédemment il pourrait s'agir des protéines liées aux récepteurs du peptide.

On a rapporté que l'IL-1 $\beta$  induit l'expression de gène ainsi que la sécrétion de l'IL-6, chez les monocytes humains mais de façon moins importante que le LPS (Gross *et al.*, 1993). Étant donné l'induction du gène de l'IL-1 $\beta$  par le FMLP, l'induction de la sécrétion de l'IL-6 par le FMLP, relativement tardive, puisque survenant après 24 heures,

pourrait être la conséquence directe de l'induction de l'IL-1 $\beta$ . Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant des anticorps dirigés contre l'IL-1. Le FMLP peut induire et augmenter l'IL-6 par divers mécanismes. L'augmentation de l'expression de gène semble impliquée mais cela peut ne pas être le seul facteur. D'autres mécanismes telles que une plus grande stabilité de l'ARNm, une augmentation de la traduction, une amélioration du processus de sécrétion, l'induction de d'autres messagers capables d'induire cette cytokine comme l'IL-1 $\beta$ , peuvent aussi être utilisées pour augmenter les quantités d'IL-6 détectées.

On avait déjà noté l'influence du FMLP sur la sécrétion de TNF et d'IL-1 par des macrophages péritonéaux murins (Tremblay *et al.*, 1991). Des souris ont été injectées dans le péritoine avec du FMLP avant la récolte des macrophages péritonéaux. Ces derniers ont été par la suite stimulés avec du LPS *in vitro*. A certaines doses et dans certaines cinétiques d'injection de FMLP, ce peptide a inhibé les sécrétions de ces cytokines induites par le LPS (Tremblay *et al.*, 1991).

Schlinder et collaborateurs en 1990 ont rapporté que les monocytes humains en réponse au FMLP ne transcrivent aucune des cytokines testées: TNF, IL-1 et IL-6. Leurs conditions expérimentales différent beaucoup des nôtres. Entre autres, au niveau de la concentration de FMLP. Ces derniers ont utilisé une concentration de ce peptide comparable aux concentrations utilisées pour induire le chimiotactisme des cellules, soit  $\approx 10^{-10}$  M, alors que nous avons utilisé des doses très supérieures (soit 250  $\mu\text{g/mL}$  (571,5



$\mu\text{M}$ ). Nous avons aussi observé que l'induction de l'IL-6 par le FMLP était dose-dépendante (voir figure 8).

Les doses de FMLP que nous avons utilisées sont nettement supérieures aux doses normalement employées. Les quantités physiologiques de ce facteur chimiotactique, dans la circulation sanguine ou aux régions d'inflammation, ne sont pas connues. Au site d'une infection ou de nécrose de tissus, le FMLP pourrait être présent en plus grande quantité que lorsqu'il est en circulation. D'autres facteurs sécrétés par les cellules sanguines ou par d'autres types cellulaires, (comme par exemple les cellules épithéliales), peuvent aussi être présents *in vivo*, en même temps que le FMLP. Ces molécules pourraient amplifier le phénomène que nous observons: une induction et une modulation de l'expression des gènes et de la sécrétion de cytokines. Des doses inférieures de FMLP pourraient être suffisantes pour induire les mêmes effets étant donné la coopération de d'autres molécules. L'action simultanée de plusieurs facteurs reflète sans doute davantage la situation *in vivo*. Il a été démontré que le FMLP injecté *in vivo*, chez la souris, peut inhibé la sécrétion de cytokine. Une injection intrapéritonéale de FMLP, quelques heures avant la récolte des macrophages péritonéaux, inhibe la sécrétion de TNF par ces cellules, induite par une stimulation subséquente au LPS (Tremblay *et al.*, 1991). Ces résultats sont obtenus avec des doses de FMLP variant de 1 à 7000  $\mu\text{M}$ , à raison de un mL par souris (Tremblay *et al.*, 1991). Des doses élevées de FMLP peuvent donc être utilisées *in vivo* pour moduler les sécrétions de cytokines.

Le mécanisme qui sous-tend l'inhibition du TNF provoquée par le FMLP sur la sécrétion induite par le LPS n'implique pas l'accumulation d'ARNm codant pour cette cytokine. Comme cette inhibition ne peut pas être levée par un prétraitement à la toxine de *Bordetella pertussis*, elle pourrait donc être indépendante des protéines G sensibles à cette toxine. D'autres éléments peuvent être impliqués. Par exemple nous pouvons penser que le FMLP pourrait: 1) diminuer la vitesse de traduction de l'ARNm codant pour le TNF; 2) provoquer une traduction de protéines erronées donc biologiquement inactives; 3) bloquer ou modifier le processus de maturation de la protéine qui est tout d'abord synthétisée sous forme de précurseur et qui doit donc être clivée adéquatement pour libérer une protéine biologiquement active (Pennica *et al.*, 1984); 4) bloquer ou modifier le processus de sécrétion de la protéine; 5) nuire à la formation de trimère de TNF, ce trimère étant la forme biologiquement active de cette cytokine (Smith et Baglioni, 1987); 6) bloquer l'attachement de la cytokine aux récepteurs du TNF présents sur la lignée indicatrice via un inhibiteur.

Il a récemment été démontré que, dans certaines conditions expérimentales, des récepteurs solubles du TNF se retrouvent en solution. Dans le sang de personnes en santé de tels récepteurs ont été décelés (Shapiro *et al.*, 1993). Les récepteurs solubles peuvent bloquer *in vitro* l'activité biologique du TNF (Adolf et Frühbeis, 1992). Il a été démontré que le FMLP est capable d'induire le relargage des deux types de récepteurs par les cellules polynucléaires (Porteu et Nathan, 1990). De plus des récepteurs solubles du TNF,

sécrités par des PMN stimulés au FMLP sont capables d'inhiber la détection de cette cytokine dans un dosage fonctionnel de la bioactivité sans pour autant affecter ou affecter à un moindre degré les dosages en ELISA (Engelberts *et al.*, 1991). Un tel effet n'a pas encore été rapporté dans la littérature pour les cellules monocytaires. A supposer que des cellules polynucléaires présentes en faible quantité dans nos préparations cellulaires relarguent des récepteurs solubles du TNF et bloquent ainsi l'activité biologique détectable, ce mécanisme ne pourrait pas expliquer les résultats obtenus avec les cellules adhérentes. En effet, dans ce dernier cas, la présence des cellules polynucléaires est pratiquement nulle, et ces cellules ne peuvent donc pas jouer un rôle dans la diminution de TNF observée. Par contre, si les monocytes eux-mêmes relarguent des récepteurs solubles pour le TNF, ce processus pourrait expliquer, du moins en partie, les inhibitions obtenues autant avec les cellules mononucléaires totales que celles obtenues avec les cellules mononucléaires adhérentes. Le dosage de ces récepteurs solubles, combiné à un dosage du TNF, par une technique indépendante de la présence de récepteurs solubles dans le milieu pourrait nous indiquer si le FMLP ajouté au LPS diminue la quantité réelle sécrétée de cette cytokine ou si, au contraire, c'est la bioactivité du TNF qui est neutralisée par la présence de récepteurs solubles. La sécrétion d'inhibiteurs autres que les récepteurs solubles pourrait aussi bien être impliquée pour expliquer la diminution d'activité biologique du TNF observée.

D'autres explications peuvent être envisagées: on sait que les macrophages

internalisent leurs récepteurs de TNF en réponse à une stimulation au LPS (Chen *et al.*, 1992). Ainsi ces cellules pourraient devenir résistantes à l'action du TNF parce qu'elles auraient internalisé leurs récepteurs avant la sécrétion du TNF (Ding *et al.*, 1989). On pourrait dire que ces cellules consomment peu de TNF. Le FMLP pourrait venir bloquer cette internalisation de récepteurs. Les monocytes ayant davantage de récepteurs que lors d'une stimulation au LPS seulement consommeraient davantage de TNF, ce qui aurait pour résultat de diminuer la quantité de TNF disponible dans le surnageant. Un tel processus n'a pas encore été démontré pour les monocytes ou les lymphocytes humains et l'effet du FMLP sur celui-ci serait inconnu.

Un des effets du LPS sur le TNF est d'augmenter l'efficacité de la traduction via la répression de la séquence en 3' non-traduite TTATTTAT qui favorise la dégradation de l'ARNm et qui supprime sa traduction (Shaw et Kamen, 1986, Han *et al.*, 1990). Le FMLP pourrait peut-être inhiber cet effet du LPS. Mais cette action s'exercerait-elle seulement sur ce gène? Cela semble peu probable car cette séquence a été retrouvée sur d'autres gènes, tels des oncogènes et d'autres cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) (Caput *et al.*, 1986). Nous avons d'ailleurs observé que le FMLP n'a pas d'effet inhibant sur les cytokines IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  qui possèdent aussi cette séquence.

Un exemple de molécule inductrice et modulatrice de cytokines chez les cellules mononucléaires du sang humain a été rapporté, il s'agit d'un inhibiteur de la protéase

sérine (TAME: p-toluenesulfonyl-l-arginine methyl ester). Ce dernier est capable d'inhiber la sécrétion du TNF mais pas celle de l'IL-1 $\alpha$  induite par le LPS. Cette inhibition n'affecte pas le niveau d'ARNm du TNF ou le niveau de TNF situé à la surface cellulaire (Scuderi, 1989). Nous pouvons nous demander si le FMLP et le TAME utilisent les mêmes mécanismes pour moduler de façon différentielle la sécrétion de ces cytokines inflammatoires ?

L'AGP, une glycoprotéine de la phase aiguë, augmente la production par les monocytes humains de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et du TNF induites par le LPS. Par contre, l'AGP seul n'a pas d'effet sur la sécrétion de ces cytokines. Des résultats similaires ont été obtenus aussi bien avec les dosages fonctionnels qu'avec les tests ELISA (Boutten *et al.*, 1992). Voici donc l'exemple d'un autre stimulus capable d'augmenter la sécrétion de certaines cytokines inflammatoires induite par le LPS.

Les productions d'IL-6, d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et de TNF induites par le LPS sont régulées de diverses façons chez les monocytes humains. Par exemple, l'augmentation de l'AMPc par des agents tels le PGE<sub>2</sub>, augmente la production d'IL-6, n'a pas d'effet sur la sécrétion d'IL-1  $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  mais inhibe la production du TNF (Bailly *et al.*, 1990). On peut donc constater que ces cytokines, quoique toutes induites par le LPS, sont modulées et contrôlées de façons diverses par un mécanisme impliquant l'AMPc. Cette observation est intéressante car le FMLP induit une augmentation de l'AMPc (Verghese

*et al.*, 1985). Ce médiateur intracellulaire pourrait être impliqué dans nos observations.

D'autres facteurs chimiotactiques peuvent induire la sécrétion de cytokines, par exemple, le C5a stimule les sécrétions de TNF, d'IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  par des cellules mononucléaires humaines (Okusawa *et al.*, 1988). Le facteur chimiotactique C3a induit la synthèse et la sécrétion de l'IL-1 chez les monocytes humains et il augmente la sécrétion induite par le LPS (Haeffner-Cavaillon *et al.*, 1987). Il est donc tout à fait plausible que le FMLP, en tant de facteur chimiotactique, vienne s'ajouter à la liste des inducteurs de cytokines.

L'influence possible de la présence de cellules polynucléaires a été évaluée. Des préparations de polynucléaires ont été soumises aux stimulations: FMLP, LPS et FMLP + LPS. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pu détecter la présence du TNF ni de l'IL-6 dans les surnageants de  $2 \times 10^6$  cellules/mL, soumises aux mêmes concentrations de stimuli et durant les mêmes périodes de stimulation que les préparations de cellules mononucléaires. L'implication possible de ces cellules n'est cependant pas à rejeter *a priori*. Nous pouvons tout au moins affirmer que l'implication de ces cellules dans les résultats obtenus ne serait pas directe. En effet, si ces cellules seules ne sécrètent pas de cytokine détectable, elles pourraient, par contre, influencer les autres cellules présentes ou encore être elles-mêmes influencées par la présence des cellules mononucléaires.

D'autres laboratoires ont démontré la capacité des cellules polynucléaires de sécréter ces cytokines (Palma *et al.*, 1992) mais leurs conditions expérimentales différaient des nôtres. Ils ont utilisé des préparations cellulaires à une concentration de  $3 \times 10^6$  cellules/mL dans un milieu contenant du RPMI et 2 % de sérum de foetus de veau. Les concentrations de LPS (E.coli sérotype 0111:B4) étaient de 100 à 1000 ng/mL (Palma *et al.*, 1992). Une autre équipe a, par contre, démontré que comparativement au sérum autologue, le sérum de veau provoquait une plus grande production des cytokines IL-6 et TNF chez les cellules mononucléaires humaines et ce même en l'absence de stimulus extérieur (Andersson et Matsuda, 1989). La même observation pourrait peut-être s'appliquer aux cellules polynucléaires.

Les résultats négatifs obtenus dans nos expériences, par opposition aux résultats positifs obtenus par Palma et collaborateurs (1992) pourraient être dus à différents facteurs liés aux conditions expérimentales différentes tel qu'un sérotype différent de LPS utilisé. La sécrétion de cytokines par ces cellules ne semblent pas faire l'unanimité parmi les différents laboratoires. Une autre équipe a démontré que les cellules polynucléaires humaines mises en présence de LPS n'ont pas transcrit ou sécrété d'IL-6 et cela, même dans des conditions *a priori* favorables ( $10^7$  cellules/mL et  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS) (Bazzoni *et al.*, 1991). Par contre, dans ces mêmes conditions ces cellules ont transcrit et sécrété du TNF (Dubravec *et al.*, 1990, Bazzoni *et al.*, 1991).

Nous croyons avoir démontré que le FMLP est non seulement un inducteur mais aussi un modulateur de cytokines. Sa présence possible dans l'organisme humain lors d'infections bactériennes ou de dommages tissulaires (dégradation de mitochondries) provoquerait non seulement le chimiotactisme des cellules tel que l'on connaît, mais en plus l'induction et la modulation de plusieurs réponses immunes importantes dans les réactions de l'hôte, par exemple les cytokines.



## **CONCLUSION**

La littérature présente le FMLP comme un inducteur et modulateur de réponses cellulaires impliquées dans l'inflammation: le chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes, et l'induction de la flambée oxidative (Snyderman et Uhing, 1992). Les objectifs de ce travail consistaient à évaluer les effets du FMLP seul ou en combinaison avec le LPS sur la sécrétion et l'expression de gènes de cytokines inflammatoires. Nous avons utilisé des cellules mononucléaires du sang humain à cause de leur rôle primordial dans la sécrétion de ces cytokines et parce qu'elles sont une cible *in vitro* et *in vivo* du FMLP.

Les effets du FMLP sur la sécrétion d'IL-6 se sont manifestés à partir de 24 heures de stimulation. Ce stimulus a induit la sécrétion de cette cytokine au dessus du niveau contrôle. La combinaison FMLP + LPS a provoqué une sécrétion plus grande que celle observée avec un seul des stimuli. Les impacts du FMLP sur la sécrétion d'IL-6 sont dose-dépendants. A mesure que la dose de FMLP seul ou en combinaison avec le LPS augmente, la production d'IL-6 augmente. L'induction de la sécrétion d'IL-6 est potentiellement due en partie à l'augmentation de l'expression de ce gène. En effet, le FMLP a induit l'ARNm codant pour cette cytokine et aussi ceux des IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ .

L'induction de la sécrétion d'IL-6 et de l'expression des gènes IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  causée par le FMLP est sensible à la toxine de *Bordetella pertussis*. Une ou des protéines G<sub>i</sub> serait impliquée dans les effets du FMLP. Il pourrait bien s'agir des protéines G

couplées aux récepteurs du FMLP (Snyderman et Uhing, 1992). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre le récepteur du FMLP pourrait compléter nos informations sur le rôle des récepteurs dans l'induction de cytokines.

Le FMLP seul n'a pas induit la transcription du gène ou la sécrétion de TNF. En combinaison avec le LPS, ce peptide a inhibé la sécrétion du TNF sans provoquer de changement au niveau de l'expression du gène. L'inhibition du TNF induit par le LPS est dose-dépendante; plus la dose de FMLP est élevée, plus l'inhibition est importante. Cette inhibition n'est pas sensible à la toxine de *Bordetella pertussis*. Le FMLP utilise sans doute un mécanisme indépendant de protéine G<sub>i</sub> pour influencer la sécrétion du TNF. Plusieurs mécanismes alternatifs impliquant différentes étapes de la sécrétion et la détection du TNF bioactif ont été présentés dans la discussion.

D'autres cytokines pourraient être induites ou modulées par le FMLP, par exemple, l'IL-8 qui est induite par le TNF, l'IL-1 et le LPS (DeForge *et al.*, 1992). Plusieurs expériences pourraient permettre de mieux cerner les impacts du FMLP sur des cytokines:

- 1) l'évaluation de la vitesse de transcription et de traduction des cytokines
- 2) la détection des quantités totales des cytokines sécrétées par des méthodes de dosages indépendants de l'activité biologique
- 3) la détection de TNF sécrété par un dosage indépendant de la liaison à un récepteur soluble pour vérifier l'implication de tel récepteur

4) l'utilisation d'anticorps dirigés contre des cytokines pour vérifier l'interdépendance des effets du FMLP sur plusieurs cytokines étant donné que celles-ci forment un réseau d'inter-régulation.

Les impacts du FMLP sur les différentes cytokines nous indiquent que le TNF est régulé par des mécanismes distincts de ceux qui régissent l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6. Nos résultats démontrent pour le FMLP des rôles d'inducteur et de modulateur de cytokines chez les cellules mononucléaires du sang humain. La capacité d'induire des cytokines du FMLP est un phénomène qui n'a pas encore été décrit dans la littérature mais qui pourrait éventuellement être utilisé pour contrôler les taux de cytokines lors de pathologies reliées à ces messagers intercellulaires.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au docteur Daniel Oth, le directeur de ce travail. Sa générosité, sa confiance, son enthousiasme et sa grande disponibilité ont été précieux au cours des deux années passées dans son laboratoire. J'en ressors mieux formée et empreinte du désir d'aller encore plus loin. Il restera un conseiller mais aussi un excellent ami. Daniel, merci pour tout!

Je ne peux pas passer sous silence l'aide généreuse de mes deux collègues de laboratoire: Pierre Tremblay et Daniel Rochefort. Chacun à sa façon m'a initiée aux techniques et aux analyses utilisées. Je garderai un excellent souvenir des taquineries et des nombreuses heures passées à travailler ou à discuter du travail mais aussi de la vie!

Deux belles femmes, dans tout le sens du mot, ont été des conseillères, des confidentes et des amies inestimables: Mireille Varin et Ginette Mercier. Leur expérience partagée, leur disponibilité et leur sourire ont été des compagnons de route irremplaçables.

Je remercie de façon spéciale Sylvie Racicot pour la révision de ce document. Enfin, à toutes celles et tous ceux dans mon entourage qui par leur patience et leur générosité ont été présents et encourageants au cours de cette formation académique et de cette expérience humaine, je vous dis merci!

## **BIBLIOGRAPHIE**

- ADAMS, J.M. 1968. On the release of the formyl group from nascent protein. *J.Mol.Biol.* **33**: 571-589.
- ADAMS, D.O. et T.A. HAMILTON 1992. Macrophages as destructive cells in host defense. Dans **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, 2nd ed. eds. J.I. Gallin, I.M. Goldstein et R. Snyderman. Raven Press New-York. pp.637-662.
- ADAMSON, I.Y.R., H. PRIEDITIS et D.H. BOWDEN 1992. Instillation of chemotactic factor to silica-injected lungs lowers interstitial particle content and reduces pulmonary fibrosis. *Am.J.Pathol.* **141**: 319-326.
- ADERKA, D., H. ENGELMANN, Y. MAOR, C. BRAKEBUSCH et D. WALLACH 1992. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J.Exp.Med.* **175**: 323-329.
- ADOLF, G.R. et B. FRUHBEIS 1992. Monoclonal antibodies to soluble human TNF receptor (TNF binding protein) enhance its ability to block TNF toxicity. *Cytokine* **4**:180-184.
- AGGARWAL, B.B, W.J. KOHR, P.E. HASS, B. MOFFAT, S.A. SPENCER, W.J. HENZEL, T.S. BRINGMAN, G.E. NEDWIN, D.V. GOEDDEL et R.H. HARKINS 1985. Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J.Biol.Chem.* **260**: 2345-2354.
- AGGARWAL, B.B. et E. POCSIK 1992. Cytokines: from clone to clinic. *Arch.Biochem.Biophys.* **292**: 335-359.
- AGWU, D.E., L.C. McPHAIL, M.C. CHABOT, L.W. DANIEL, R.L. WYKLE et C.E. McCALL 1989. Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *J.Biol.Chem.* **264**: 1405-1413.
- AIELLO, F.B., D.L. LONGO et S.K. DURUM 1988. A missing signal on fixed antigen-producing cells. *FASEB J.* **2**: A7798.
- AKIRA, S., H. ISSHIKI, T. SUGITA, O. TANABE, S. KINOSHITA, Y. NISHIO, T. NAKAJIMA, T. HIRANO et T. KISHIMOTO 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* **9**: 1897-1906.
- AKIRA, S. 1992. NF-IL6 and gene regulation. *Res.Immunol.* **143**: 734-739.

- ALEXANDER, H.R., G.M. DOHERTY, C.M. BURESH, D.J. VENZON et J.A. NORTON 1991. A recombinant human receptor antagonist to interleukin 1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. *J.Exp.Med.* **173**: 1029-1032.
- ANDERSSON, U. et T. MATSUDA 1989. Human interleukin 6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  production studied at a single-cell level. *Eur.J.Immunol.* **19**: 1157-1160.
- ARAI, K.-I., F. LEE, A. MIYAJIMA, S. MIYATAKE, N. ARAI et T. YOKOTA 1990. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu.Rev. Biochem.* **59**: 783-836.
- AREND, W.P., F.G. JOSLIN, R.C. THOMPSON et C.H. HANNUM 1989. An IL-1 inhibitor from human monocytes. Production and characterization of biologic properties. *J.Immunol.* **143**: 1851-1858.
- ARRETO, C.D., M.F. BUREAU, A. IMAIZUMI et B.B. VARGAFTIG 1993. Pharmacological differentiation by pertussis toxin of the *in vivo* acute responses to fMLP and PAF in guinea-pig lungs. *Br.J. Pharmacol.* **108**:412-417.
- AURON, P.E., S.J.C. WARNER, A.C. WEBB, J.G. CANNON, H.A. BERNHEIM, K.J.P.W. McADAM, L.J. ROSENWASSER, G. LOPRESTE, S.F. MUCCI et C.A. DINARELLO 1987. Studies on the molecular nature of human interleukin 1. *J.Immunol.* **138**: 1447-1456.
- BAILLY, S., B. FERRUA, M. FAY et M.A. GOUGEROT-POCIDALO 1990. Differential regulation of IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine* **2**: 205-210.
- BAKOUICHE, O., D.C. BROWN et L.B. LACHMAN 1987. Subcellular localization of human monocyte interleukin 1: evidence for an inactive precursor molecule and a possible mechanism for IL-1 release. *J.Immunol.* **138**: 4249-4255.
- BAZZONI, F., M.A. CASSATELLA, C. LANDANNA et F. ROSSI 1991. Phagocytosis of opsonized yeast induces tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA accumulation and protein release by human polymorphonuclear leukocytes. *J.Leukoc.Biol.* **50**: 223-228.
- BEAULIEU, A.D., R. PAQUIN, P. RATHANASWAMI et S.R. McCOLL 1992. Nuclear signaling in human neutrophils. Stimulation of RNA synthesis is a response to a limited number of proinflammatory agonists. *J.Biol.Chem.* **267**: 426-432.
- BEUTLER, B. et A. CERAMI 1989. The biology of cachectin/TNF- a primary mediator of the host response. *Ann.Rev.Immunol.* **7**: 625-655.



BLACK, R.A., S.R. KRONHEIM, M. CANTRELL, M.C. DEELEY, C.J. MARCH, K.S. PRICKETT, J. WIGNALL, P.J. CONLON, D. COSMAN, T.P. HOPP et D. Y. MOCHIZUKI 1988. Generation of biologically active interleukin-1 $\beta$  by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J.Biol.Chem.* **263**:9437-9442.

BOULAY, F., M. TARDIF, L. BROUCHON et P. VIGNAIS 1990. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* **29**: 11123-11133.

BOUTTEN, A., M. DEHOUX, M. DESCHENES, J.-D. ROUZEAU, P.N. BORIES et G. DURAND 1992.  $\alpha$ -acid glycoprotein potentiates lipopolysaccharide-induced secretion of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  by human monocytes and alveolar and peritoneal macrophages. *Eur.J.Immunol.* **22**: 2687-2695.

BOWCOCK, A.M., A. RAY, H.A. ERLICH et P.B. SEHGAL 1989. The molecular genetics of beta-2 interferon/interleukin-6 (IFN $\beta$ 2/IL6). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **557**: 345-352.

BRANDT, S.J., R.W. DOUGHERTY, E.G. LAPETINA et J.E. NIEDEL 1985. Pertussis toxin inhibits chemotactic peptide-stimulated generation of inositol phosphates and lysosomal enzyme secretion in human leukemic (HL-60) cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3277-3280.

BRETT, J., H. GERLACH, P. NAWROTH, S. STEINBERG, G. GODMAN et D. STERN 1989. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J.Exp.Med.* **169**: 1977-1991.

BROCKHAUSS, M., H.-J. SCHOENFELD, E.-J. SCHLAEGER, W. HUNZIKER, W. LESSLAUER et H. LOETSCHER 1990. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **87**: 3127-3131.

BROOM, M.F., R.M. SHERRIFF, D.M. FERRY et V.S. CHADWICK 1993. Formylmethionyl-leucylphenylalanine and the SOS operon in *Escherichia coli* : a model of host-bacterial interactions. *Biochem. J.* **91**: 895-900.

BRUGGER, W., D. REINHARDT, C. GALANOS et R. ANDREESEN 1991. Inhibition of *in vitro* differentiation of human monocytes to macrophages by lipopolysaccharides (LPS): phenotypic and functional analysis. *Int. Immunol.* **3**: 221-227.

CAPUT, D., B. BEUTLER, K. HARTOG, R. THAYER, S. BROWN-SHIMER et A. CERAMI 1986. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untruncated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* **83**:1670-1674.

CARP, H. 1982. Mitochondrial *N*-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med.* **155**: 264-275.

CASTELL, J.V., M.J. GOMEZ-LECHON, M. DAVID, T. ANDUS, T. GEIGER, R. TRULLENQUE, R. FABRA et P.C. HEINRICH 1989. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* **242**: 237-239.

CAVAILLON, J.-M. et N. HAEFFNER-CAVAILLON 1990. Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. *Cytokine* **2**: 313-329.

CERRETTI, D.P., C.J. KOZLOSKY, B. MOSLEY, N. NELSON, K. VAN NESS, T.A. GREENSTREET, C.J. MARCH, S.R. KRONHEIM, T. DRUCK, L.A. CANNIZZARO, K. HUEBNER et R.A. BLACK 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science* **256**: 97-100.

CHADWICK, V.S., D.M. MELLOR, D.B. MYERS, A.C. SELDEN, A. KESHAVARZIAN, M.F. BROOM et C.H. HOBSON 1988. Production of peptides inducing chemotaxis and lysosomal enzyme release in human neutrophils by intestinal bacteria in vitro and in vivo. *Scand. J. Gastroenterol.* **23**: 121-128.

CHAPMAN, P.B., T.J. LESTER, E.S. CASPER, J.L. GABRILOVE, G.Y. WONG, S.J. KEMPIN, P.J. GOLD, S. WELT, R.S. WARREN, H.F. STARNES, S.A. SHERWIN, L.J. OLD et H.F. OETTGEN 1987. Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J.Clin.Oncol.* **5**: 1942-1951.

CHEN, T.-Y., M.-G. LEI, T. SUZUKI et D.C. MORRISON 1992. Lipopolysaccharide receptors and signal transduction pathways in mononuclear phagocytes. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **181**: 169-188.

CLARK, M.A., M.J. CHEN S.T. CROOKE et J.S. BOMALASKI 1988. Tumour necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2-activating protein in endothelial cells. *Biochem. J.* **250**: 125-132.

COCKCROFT, S. et J. STUTCHFIELD 1989. The receptor for ATP and F-metleuphe are independently coupled to phospholipases C and A<sub>2</sub> via G-protein(s). Relationship between phospholipase C and A<sub>2</sub> activation and exocytosis in HL60 cells and human neutrophils. *Biochem. J.* **263**: 715-723.

CONLON, P.J., K.H. GRABSTEIN, A. ALPERT, K.S. PRICKETT., T.P. HOPP et S. GILLIS 1987. Localization of human mononuclear cell interleukin 1. *J.Immunol.* **139**: 98-102.

CONTI, P., M. REALE, R.C. BARBACANE, M.R. PANARA, M. BONGRAZIO, S. FIORE, J.W. MIER et R.A. DEMPSEY 1992. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor potentiates human polymorphonuclear leukocyte aggregation responses to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Immunol. Lett.* **32**: 71-80.

CURTIS, B.M., M.B. WIDMER, P. DEROSS et E.E. QWARNSTROM 1990. IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J.Immunol.* **144**: 1295-1303.

CUTURI, M.C., M. MURPHY, M.P. COSTA-GIOMI, R. WEINMANN, B. PERUSSIA et G. TRINCHIERI 1987. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J.Exp.Med.* **165**: 1581-1594.

DEFORGE, L.E., J.S. KENNEY, M.L. JONES, J.S. WARREN et D.G. REMICK 1992. Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J.Immunol.* **148**: 2133-2141.

DEMCZUK, S., C. BAUMBERGER, B. MARCH et J.M. DAYER 1987. Expression of human IL-1 alpha and beta messenger RNAs and IL-1 activity in human peripheral blood mononuclear cells. *J.Mol.Cell.Immunol.* **3**: 255-265.

DINARELLO, C.A. et N. SAVAGE 1989. Interleukin-1 and its receptor. *Crit.Rev.Immunol.* **9**: 1-20

DINARELLO, C.A. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonist. *Blood* **77**: 1627-1652.

DINARELLO, C.A. 1992. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor in systemic responses to infection and inflammation. Dans **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, 2<sup>nd</sup> eds. Gallin J.I., I.M. Goldstein et R. Snyderman. Raven Press New York. pp.211-232.

DING, A.H., C.F. NATHAN et D.J. STUEHR 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J.Immunol.* **141**: 2407-2412.

DING, A.H., E. SANCHEZ, S. SRIMAL et C.F. NATHAN 1989. Macrophages rapidly internalize their tumor necrosis factor receptors in response to bacterial lipopolysaccharide. *J.Biol.Chem.* **264**: 3924-3929.

DING, A.H. et F. PORTEU 1992. Regulation of tumor necrosis factor receptors on phagocytes. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **200**: 458-465.

DRAPIER, J.-C., J. WIETZERBIN et J.B.HIBBS Jr. 1988. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur.J.Immunol.* **18**: 1587-1592.

DUBRAVEC, D.B., D.R. SPRIGGS, J.A. MANNIK et M.L. RODRICK 1990. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6758-6761.

DUH, E.J., W.J. MAURY, T.M. FOLKS, A.S. FAUCIM et A.B. RABSON 1989. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5974-5978.

DUNCAN, R.L. Jr., J. HOFFMAN, V.L. TESH et D.C. MORRISON 1986. Immunologic activity of lipopolysaccharides released from macrophages after the uptake of intact *E. coli in vitro*. *J.Immunol.* **136**: 2924-2929.

EISENBERG, S.P., R.J. EVANS, W.P. AREND, E. VERDERBER, M. T. BREWER, C.H. HANNUM et R.C. THOMPSON 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* **343**: 341-346.

ENGELBERTS, I., S. STEPHENS, G.J.M. FRANCO, C.J. VAN DER LINDEN et W.A. BUURMAN 1991. Evidence for different effects of soluble TNF-receptors on various TNF measurements in human biological fluids. *Lancet* **338**: 515-516.

ENGELMANN, H., D. NOVICK et D. WALLACH 1990a. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. *J. Biol. Chem.* **265**: 1531-1536.

ENGELMANN, H., H. HOLTSMANN, C. BRAKEBUSCH, Y.S. AVNI, I. SAROV, Y. NOPHAR, E. HADAS, O. LEITNER et D. WALLACH 1990b. Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J.Biol.Chem.* **265**: 14497-14504.

ENGLISH, B.K., W.M. WEAVER et C.B. WILSON 1991. Differential regulation of lymphotoxin and tumor necrosis factor genes in human T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* **266**: 7108-7113.

ENGLISH, D., H.E. BROXMEYER, T.G. GABIG, L.P. AKARD, D.E. WILLIAMS et R. HOFFMAN 1988. Temporal adaptation of neutrophil oxidative responsiveness to n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Acceleration by granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J.Immunol.* **141**: 2400-2406.

ERIKSTEIN, B.K., E.B. SMELAND, H.K. BLOMHOFF, S. FUNDERUD, K. PRYDZ, W. LESSLAUER et T. ESPEVIK 1991. Independent regulation of 55 kDa and 75 kDa tumor necrosis factor receptors during activation of human peripheral blood B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **21**: 1033-1037.

EXLEY, A.R. et J. COHEN 1990. Optimal collection of blood samples for the measurement of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Cytokine* **2**: 353-356.

FEIST, W., A.J. AULMER, M.H. WANG, J. MUSEHOLD, C. SCHLUTER, J. GERDES, H. HERZBECK, H. BRADE, S. KUSUMOTO et T. DIAMANTSTEIN 1992. Modulation of lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6 by a synthetic precursor Ia of lipid A. *Fems Microbiol. Immunol.* **4**: 73-89.

FLETCHER, M.P., B.E. SELIGMANN et J.I GALLIN 1982. Correlation of human neutrophil secretion, chemoattractant receptor mobilization, and enhanced functional capacity. *J.Immunol.* **128**: 941-948.

FONTANA, A., F. KRISTENSEN, R. DUBS, D. GEMSA et E. WEBER 1982. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C<sub>6</sub> glioma cells. *J.Immunol.* **129**: 2413-2419.

FOX, E.S., P. THOMAS et S.A. BROITMAN 1989. Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of 3H, 14C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* **96**: 456-461.

GAHRING, L., M. BALTZ, M.B. PEPYS et R. DAYNES 1984. Effect of ultraviolet radiation on production of epidermal cell thymocyte-activating factor/interleukin 1 *in vivo* and *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 1198-1202.

GALLAY, P., C.V. JONGENELL, C. BARRAS, M. BURNIER, J.-D. BAUMGARTNER, M.P. GLAUSSER et D. HEUMANN 1993. Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocytes. J. Immunol. **150**: 5086-5093.

GALLIS, B., K.S. PRICKETT, J. JACKSON, J. SLACK, K. SCHOOLEY, J.E. SIMS et S.K. DOWER 1989. IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. J.Immunol. **143**: 3235-3240.

GAMBLE, J.R., W.B. SMITH et M.A. VADAS 1992. TNF modulation of endothelial and neutrophil adhesion. Dans **Tumor necrosis factors. The molecules and their emerging role in medicine.** ed. B. Beutler Raven Press. New York. pp.65-86.

GARMAN, R.D., K.A. JACOBS, S.C. CLARK et D.H. RAULET 1987. B-cell stimulatory factor 2 ( $\beta 2$  interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. Proc.Natl. Acad. Sci. USA **84**: 7629-7633.

GAUDRY, M., A. PERIANIN, C. MARQUETTY et J. HAKIM 1988. Negative effect of a protein kinase C inhibitor (H-7) on human polymorphonuclear neutrophil locomotion. Immunology **63**: 715-719.

GOLDMAN, D.W., F.-H. CHANG, L.A. GIFFORD, E.J. GOETZL et H.R. BOURNE 1985. Pertussis toxin inhibition of chemotactic factor-induced calcium mobilization and function in human polymorphonuclear leukocytes. J.Exp. Med. **162**: 145-156.

GOLDSMITH, P., K. ROSSITER, A. CARTER, W. SIMONDS, C.G. UNSON, R. VINITSKY et A.M. SPIEGEL 1988. Identification of the GTP-binding protein encoded by  $G_{\beta 3}$  complementary DNA. J.Biol. Chem. **263**: 6476-6479.

GROSS, V., T. ANDUS, J. CASTELL, D. VOM BERG, P.C. HEINRICH et W. GEROK 1989. O- and N- glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6. FEBS Lett. **247**: 323-326.

GROSS, V. P.M. VILLIGER, B. ZHANG et M. LOTZ 1993. Retinoic acid inhibits interleukin-1-induced cytokine synthesis in human monocytes. J.Leukoc. Biol. **54**: 125-1132.

GUISEZ, Y., B. TISON, J. VANDEKERCKHOVE, J. DEMOLDER, G. BAUW, G. HAEGEMAN, W. FIERS et R. CONTRERAS 1991. Production and purification of recombinant human interleukin-6 secreted by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. **198**: 217-222.

HAEFFNER-CAVAILLON, N., J.M. CAVAILLON, M. MOREAU et L. SZABO 1984. Interleukin 1 secretion by human monocytes stimulated by the isolated polysaccharide region of the *Bordetella pertussis* endotoxin. Mol. Immunol. **21**: 389-395.

HAEFFNER-CAVAILLON, N., J.-M. CAVAILLON, M. LAUDE et M.D. KAZATCHKINE 1987. C3a(C3adesArg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes. J.Immunol. **139**:794-799.

HAMID, Q., J. BARKANS, Q. MENG, S. YING, J.S. ABRAMS, A.B. KAY et R. MOQBEL 1992. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. Blood **80**: 1496-1501.

HAMPTON, R.Y., D.T. GOLENBOCK et C.R. RAETZ 1988. Lipid A binding sites in membranes of macrophage tumor cells. J.Biol.Chem. **263**: 14802-14807

HAMPTON, R.Y., D.T. GOLENBOCK, M. PENMAN, M. KRIEGER et C.R. RAETZ 1991. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. Nature **352**: 342-344.

HAN, J., T. BROWN et B. BEUTLER 1990. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. J.Exp. Med. **171**: 465-475.

HARAGUCHI, T., S. NAGAO, A. TANAKA et H. NAGANO 1987. Preferential loss of DNA polymerase alpha following suppression of replicative DNA synthesis of guinea pig macrophages by the immunostimulants myramyl dipeptide or lipopolysaccharide. J.Leukoc. Biol. **41**: 170-176.

HAZUDA, D.J., J.C. LEE et P.R. YOUNG 1988. The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$ . J.Biol.Chem. **263**: 8473-8479.

HAZUDA, D.J., J. STICKLER, F. KUEPPERS, P.L. SIMON et P.R. YOUNG 1990. Processing of precursor interleukin 1  $\beta$  and inflammatory disease. J.Biol.Chem. **265**:6318-6322.

HEINRICH, P.C., J.V. CASTELL et T. ANDUS 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **265**: 621-636.

HELFGOTT, D.C., L.T. MAY, Z. STHOEGER, I. TAMM et P.B. SEHGAL 1987. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of  $\beta_2$  interferon by human fibroblasts. *J.Exp. Med.* **166**: 1300-13 .

HELLER, R.A., K. SONG, N. FAN et D.J. CHAN 1992. The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* **70**: 47-56.

HEUFLER, C., F. KOCH et G. SCHULER 1988. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J.Exp.Med.* **167**: 700-705.

HIRANO, T., K. YASUKAWA, H. HARADA, T. TAGA, Y. WATANABE, T. MATSUDA, S. KASHIWAMURA, K. NAKAJIMA, K. KOYAMA, A. IWAMATSU 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324**: 73-76.

HIRATA, Y., T. TAGA, M. HIBI, N. NAKANO, T. HIRANO et T. KISHIMOTO 1989. Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies. *J.Immunol.* **143**: 2900-2906.

HO, Y.S., W.M.G. LEE et R. SNYDERMAN 1987. Chemoattractant-induced activation of c-fos gene expression in human monocytes. *J.Exp.Med.* **165**:1524-1538

HOFSLI, E., O. BAKKE, U. NONSTAD et T. ESPEVIK 1989. A flow cytometric and immunofluorescence microscopic study of tumor necrosis factor production and localization in human monocytes. *Cell.Immunol.* **122**: 405-415.

HOHMANN, H.-P., M. BROCKHAUSS, P.A. BAEUERLE, R. REMY, R. KOLBECK et A.P.G.M. VAN LOON. 1990. Expression of the types A and B tumor necrosis factor (TNF) receptors is independently regulated, and both receptors mediate activation of the transcription factor NF-kB. *J.Biol.Chem.* **265**: 22409-22417.

HORIGUCHI, J., D. SPRIGGS, K. IMAMURA, R. STONE, R. LUEBBERS et D. KUFEL 1989. Role of arachidonic acid metabolism in transcriptional induction of tumor necrosis factor gene expression by phorbol ester. *Mol.Cell.Biol.* **9**: 252-258.



HORII, Y., A. MURAGUCHI, M. IWANO, T. MATSUDA, T. HIRAYAMA, H. YAMADA, Y. FUJII, K. DOHI, H. ISHIKAWA, Y. OHMOTO, K. YOSHIZAKI, T. HIRANO et T. KISHIMOTO 1989. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.* **143**: 3949-3955.

HORUK, R., J.J. HUANG, M. COVINGTON et R.C. NEWTON 1987. A biochemical and kinetic analysis of the interleukin-1 receptor. Evidence for differences in molecular properties of IL-1 receptors. *J.Biol.Chem.* **262**: 16275-16278.

IMAMURA, K., M.L. SHERMAN, D. SPRIGGS et D. KUFEL 1988. Effect of tumor necrosis factor on GTP binding and GTPase activity in HL-60 and L929 cells. *J.Biol.Chem.* **263**: 10247-10253.

INTRONA, M., R.C. BAST Jr., C.S. TANNENBAUM, T.A. HAMILTON et D.O. ADAMS 1987. The effect of LPS on expression of the early "competence" genes JE and KC in murine peritoneal macrophages. *J.Immunol.* **138**: 3891-3896.

ISLAM, L.N. et P.C. WILKINSON 1988. Chemotactic factor-induced polarization, receptor redistribution, and locomotion of human blood monocytes. *Immunology* **64**: 501-507.

ISSHIKI, H., S. AKIRA, O. TANABE, T. NAKAJIMA, T. SHIMAMOTO, T. HIRANO et T. KISHIMOTO 1990. Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol.Cell. Biol.* **10**: 2757-2764.

JACKAWAY, J.P. et A.L. DEFRANCO 1986. Pertussis toxin inhibition of B cell and macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide. *Science* **234**: 743-746.

JESAITIS, A.J., J.R. NAEMURA, R.G. PAINTER, L.A. SKLAR et C.G. COCHRANE 1983. The fate of an N-formylated chemotactic peptide in stimulated human granulocytes. Subcellular fractionation studies. *J.Biol.Chem.* **258**: 1968-1977.

JIRIK, F.R., T.J. PODOR, T. HIRANO, T. KISHIMOTO, D.J. LOSKUTOFF, D.A. CARSON et M. LOTZ 1989. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J.Immunol.* **142**: 144-147.

KANG, Y.H. 1990. Effects of bacterial lipopolysaccharide and calmodulin on Ca<sup>2+</sup>-ATPase and calcium in human natural killer cells, studied by a combined technique of immunoelectron microscopy and ultracytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **38**: 359-370.

KANG, Y.H., R.S. DWIVEDI et C.H. LEE 1990. Ultrastructural and immunocytochemical study of the uptake and distribution of bacterial lipopolysaccharide in human monocytes. *J.Leukoc. Biol.* **48**: 316-332.

KANG, Y.-H., C.-H. LEE, R.L. MONROY, R.S. DWIVEDI, C. ODEYALE et H.H. NEWBALL 1992. Uptake, distribution and fate of bacterial lipopolysaccharides in monocytes and macrophages: an ultrastructural and functional correlation. *Electron Microsc. Rev.* **5**: 381-419.

KASID, A., E.P. DIRECTOR, M.C. STOVROFF, M.T. LOTZE et S.A. ROSENBERG 1990. Cytokine regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and - $\beta$  (lymphotoxin)-messenger RNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res.* **50**: 5072-5076.

KIDO, N., I. NAKASHIMA et N. KATO 1984. Correlation between strong adjuvanticity of Klebsiella O3 lipopolysaccharide and its ability to induce interleukin-1 secretion. *Cell. Immunol.* **85**: 477-486.

KINKHABWALA, M., P. SEHAJPAL, E. SKOLNIK, D. SMITH, V.K. SHARMA, H. VLASSARA, A. CERAMI et M. SUTHANTHIRAN 1990. A novel addition to the T cell repertory. Cell surface expression of tumor necrosis factor/cachectin by activated normal human T cells. *J.Exp.Med.* **171**: 941-946.

KISHIMOTO, T., S. AKIRA et T. TAGA 1992. IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int.J.Immunopharmacol.* **14**:431-438.

KLEIN, J. 1990. *Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Boston. 508p.

KLEIN, J.B., J.A. SCHERZER et K.R. MCLEISH 1992. INF- $\gamma$  enhances expression of formyl peptide receptors and guanine nucleotide-binding proteins by HL-60 granulocytes. *J.Immunol.* **148**: 2483-2488.

KOBAYASHI, Y., K. YAMAMOTO, T. SAIDO, H. KAWASAKI, J.J. OPPENHEIM et K. MATSUSHIMA 1990. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 $\alpha$ . *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **87**: 5548-5552.

KOIDE, S.L., K. INABA et R.M. STEINMAN 1987. Interleukin 1 enhances T-dependent immune responses by amplifying the function of dendritic cells. *J.Exp.Med.* **165**: 515-530.

KOO, C., R.J. LEFKOWITZ et R. SNYDERMAN 1982. The oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocyte membranes exists in two affinity states. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**: 442-449.

KOO, C., R.J. LEFKOWITZ et R. SNYDERMAN 1983. Guanine nucleotides modulate the binding affinity of the oligopeptide chemoattractant receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J.Clin.Invest.* **72**: 748-753.

KRAKAUER, T. et J.J. OPPENHEIM 1993. IL-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  each up-regulate both the expression of IFN- $\gamma$  receptors and enhance IFN- $\gamma$ -induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J.Immunol.* **150**: 1205-1211.

KRIEGLER, M., C. PEREZ, K. DEFAY, I. ALBERT et S.D. LU 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**: 45-53.

KUMARATILAKE, L.M., A. FERRANTE, E.J. BATES et I.C. KOWANKO 1990. Augmentation of the human monocyte/macrophage chemiluminescence response during short-term exposure to interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha. *Clin. Exp. Immunol.* **80**: 257-262.

KURLAND, J.I. et R. BOCKMAN 1978. Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J.Exp.Med.* **147**: 952-957.

KURT-JONES, E.A., J.-M. KIELY et E.R. UNANUE 1985. Conditions required for expression of membrane IL-1 on B cells. *J.Immunol.* **135**: 1548-1550.

KUSHNER, I., M. GANAPATHI et D. SCHULTZ 1989. The acute phase response is mediated by heterogenous mechanisms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **557**: 19-29.

LAD, P.M., C.V. OLSON et P.A. SMILEY 1985. Association of the N-formyl-met-leu-phe receptor in human neutrophils with a GTP-binding protein sensitive to pertussis toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 869-873.

LAFAGE, M., N. MAROC, P. DUBREUIL, R. DE WAAL MALEFIJT, M.-J. PEBUSQUE, Y. CARCASSONNE et P. MANNONI 1989. The human interleukin-1 $\alpha$  gene is located on the long arm of chromosome 2 at band q13. *Blood* **73**: 104-107.

LASH, J.A., T.D. COATES, J. LAFUZE, R.L. BAEHNER et L.A. BOXER 1983. Plasma lactoferrin reflects granulocyte activation *in vivo*. *Blood* **61**: 885-888.

LEAVER, H.A., T.M. QU, G. SMITH, A. HOWEI, W.B. ROSS et P.L. YAP 1990. Endotoxin release platelet-activating factor from human monocytes *in vitro*. *Immunopharmacology* **20**: 105-113.

- LEI, M.G. et D.C. MORRISON 1988. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. II. Membrane localization and binding characteristics. *J.Immunol.* **141**: 1006-1011.
- LEI, M.G. et D.C. MORRISON 1993. Lipopolysaccharide interaction with S2 subunit of pertussis toxin. *J.Biol.Chem.* **268**: 1488-1493.
- LIAO, Z., R.S. GRIMSHAW et D.L. ROSENSTREICH 1984. Identification of a specific interleukin 1 inhibitor in the urine of febrile patients. *J.Exp. Med.* **159**: 126-136.
- LONNEMANN, G., S. ENDRES, J.W.M. VAN DER MEER, J.G. CANNON, K.M. KOCH et C.A. DINARELLO 1989. Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. *Eur.J.Immunol.* **19**: 1531-1536.
- LOTZ, M., F. JIRIK, P. KABOURIDIS, C. TSOUKAS, T. HIRANO, T. KISHIMOTO et D.A. CARSON 1988. B Cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J.Exp.Med.* **167**: 1253-1258.
- LOWENTHAL, J.W., D.W. BALLARD, E. BOHNLEIN et W.C. GREENE 1989. Tumor necrosis factor alpha induces proteins that bind specifically to kappa B-like enhancer elements and regulate interleukin 2 receptor alpha-chain gene expression in primary human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 2331-2335.
- LUDERITZ, T., K. BRANDENBURG, U. SEYDEL, A. ROTH, C. GALANOS et E.T. RIETSCHHEL 1989. Structural and physicochemical requirements of endotoxins for the activation of arachidonic acid metabolism in mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Eur. J.Biochem.* **179**: 11-16.
- LUST, J.A., K.A. DONOVAN, M.P. KLINE, P.R. GREIPP, R.A. KYLE et N.J. MAIHLE 1992. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* **4**: 96-100.
- MANGAN, D.F., G.R. WELCH et S.M. WAHL 1991. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J.Immunol.* **146**: 1541-1546.
- MANNEL, D.N. et W. FALK 1989. Optimal induction of tumor necrosis factor production in human monocytes requires complete S-form lipopolysaccharide. *Infect.Immun.* **57**: 1953-58.

MARASCO, W.A., S.H. PHAN, H. KRUTZSCH, H.J. SHOWELL, D.E. FELTNER, R. NAIRN, E.L. BECKER ET P.A. WARD 1984. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **259**: 5430-5439.

MARCH, C.J., B. MOSLEY, A. LARSEN, D.P. CERRETTI, G. BRAEDT, V. PRICE, S. GILLIS, C.S. HENNEY, S.R. KRONHEIM, K. GRABSTEIN, P.J. CONLON, T.P. HOPP et D. COSMAN 1985. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Nature **315**: 641-647.

MATSUDA, T., T. HIRANO, S. NAGASAWA et T. KISHIMOTO 1989. Identification of  $\alpha$ 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. J.Immunol. **142**: 148-152.

MATSUSHIMA, K., A. PROCOPIO, H. ABE, G. SCALA, J.R. ORTALDO et J.J. OPPENHEIM 1985. Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B lymphocytes. J.Immunol. **135**: 1132-1136.

MATSUSHIMA, K., J. YODOI, Y. TAGAYA et J.J. OPPENHEIM 1986. Down-regulation of interleukin 1 (IL 1) receptor expression by IL 1 and fate of internalized <sup>125</sup>I-labeled IL 1 $\beta$  in a human large granular lymphocyte cell line. J.Immunol. **137**: 3183-3188.

MATSUSHIMA, K., Y. KOBAYASHI, T.D. COPELAND T. AKAHOSHI et J.J. OPPENHEIM 1987. Phosphorylation of a cytosolic 65kDa protein induced by interleukin 1 in glucocorticoid pretreated normal human peripheral blood mononuclear leukocytes. J.Immunol. **139**: 3367-3374.

MAY, L.T., D.C. HELFGOTT et P.B. SEHGAL 1986. Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**: 8957-8961.

MAY, L.T., U. SANTHANAM, S.B. TATTER, N. BHARDWAJ, J. GHRAYEB et P.B. SEHGAL 1988. Phosphorylation of secreted forms of human  $\beta$ 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6. Biochem.Biophys.Res.Comm. **152**: 1144-1150.

MAY, L.T., U. SANTHANAM, S.B. TATTER, J. GHRAYEB et P.B. SEHGAL 1989. Multiple forms of human interleukin-6. Phosphoglycoproteins secreted by many different tissues. Ann. N.Y. Aca. Sci. **557**: 114-121.

MAY, L.T., J.E. SHAW et P.B. SEHGAL 1990. Cell-type heterogeneity of human IL-6. FASEB J. **4**: A1712.

McCARTHY, P.L. Jr., S. ABHYANKAR, S. NEBEN, G. NEWMAN, C. SIEFF, R.C. THOMPSON, S.J. BURAKOFF et J.L.M. FERRARA 1991. Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. *Blood* **78**: 1915-1918.

McGIVNEY, A. et S.G. BRADLEY 1979a. Effects of bacterial endotoxin on lysosomal and mitochondrial enzyme activities of established cell cultures. *J. Reticuloendothelial Society* **26**: 307-316.

McGIVNEY, A. et S.G. BRADLEY 1979b. Action of bacterial endotoxin and lipid A on mitochondrial enzyme activities of cells in culture and subcellular fractions. *Infect.Immun.* **25**: 664-671.

McMAHAN, C.J., J.L. SLACK, B. MOSLEY, D. COSMAN, S.D. LUPTON, L.L. BRUNTON, C.E. GRUBIN, J.M. WIGNALL, N.A. JENKINS, C.I. BRANNAN, N.G. COPELAND, K. HUEBNER, C.M. CROCE, L.A. CANNIZZARRO, D. BENJAMIN, S.K. DOWER, M.K. SPRIGGS et J.E. SIMS 1991. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.* **10**: 2821-2832.

MEYER, R., E.N. HATADA, H.-P. HOHMANN, M. HAIKER, C. BARTSCH, U. ROTH LISBERGER, H.-W. LAHM, E.J. SCHLAEGER, A.P.G.M. VAN LOON et C. SCHEIDEREIT 1991. Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor  $\kappa$ B: the level of its mRNA is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 966-970.

MICHIE, H.R., K.R. MANOGUE, D.R. SPRIGGS, A. REVHAUG, S. O'DWYER, C.A. DINARELLO, A. CERAMI, S.M. WOLFF et D.W. WILMORE 1988. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N.Engl.J. Med.* **318**: 1481-1486.

MIYAKE, Y., T. YASUHARA, K. FUKUI, H. SUGINAKA, T. NAKAJIMA et T. MORIYAMA 1983. Purification and characterization of neutrophil chemotactic factors of *Streptococcus sanguis*. *Biochem.Biophys.Acta* **758**: 181-186.

MIYAURA, C., K. ONOZAKI, Y. AKIYAMA, T. TANIMAYA, T. HIRANO, T. KISHIMOTO et T. SUDA 1988. Recombinant human interleukin 6 (B-cell stimulatory factor 2) is a potent inducer of differentiation of mouse myeloide leukemia cells (M1). *FEBS Lett.* **234**: 17-21

- MIZEL, S.B., P.L. KILIAN, J.C. LEWIS, K.A. PAGANELLI, R.A. CHIZZONITE 1987. The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. *J.Immunol.* **138**: 2906-2912.
- MORIN, M., R. SCHINDLER, G. WAKABAYASHI, G. DAUMY, C.A. DINARELLO et J.A. GELFAND 1991. Picogram concentrations of endotoxin stimulate synthesis of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by human peripheral blood mononuclear cells exposed to recombinant C5a. *Eur.Cytokine Network* **2**: 27-30.
- MORRISON, D.C. et R.J. ULEVITCH 1978. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *Am. J. Pathol.* **93**: 526-617.
- MORRISON, D.C. 1989. The case for specific lipopolysaccharide receptors expressed on mammalian cells. *Microbial Pathogenesis* **7**: 389-398.
- MOSLEY, B., D.L. URDAL, K.S. PRICKETT, A. LARSEN, D. COSMAN, P.J. CONLON, S. GILLIS et S.K. DOWER 1987. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 $\alpha$  precursor but not the interleukin-1 $\beta$  precursor. *J.Biol.Chem.* **262**:2941-2944.
- MUEGGE, K. et S.K. DURUM 1989. The role of interleukin-1 in the immune response. Dans **Interleukin-1, inflammation and disease** R.Bomford et B. Herderson eds. Research monographs in cell and tissues physiology 16 general editors J.T. Dingle et J.L. Gordon pp.107-122.
- MULLER, J.M., H.W.L. ZIEGLER-HEITBROCK et P.A. BAEUERLE 1993. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* **187**: 233-256.
- MUNFORD, R.S. 1986. Deacylation of bacterial endotoxins by neutrophils and macrophages: early observations and hypotheses. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* **8**: 63-65.
- NACCACHE, P.H., N. FAUCHER, P. BORGEAT, J.C. GASSON et J.F. DIPERSIO 1988. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the excitation-response coupling sequence in human neutrophils. *J. Immunol.* **140**: 3541-3546.
- NAGAO, S., S. IKEGAMI et A. TANAKA 1984. Inhibition of macrophage DNA synthesis by immunomodulators. II. Characterization of the suppression by myramyl dipeptide or lipopolysaccharide [3H]thymidine incorporation into macrophages. *Cell. Immunol.* **89**: 427-438.

- NATHAN, C.F. 1987. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J.Clin. Invest.* **80**: 1550-1560.
- NAUME, B., R. SHALABY, W. LESSLAUER et T. ESPEVIK 1991. Involvement of the 55- and 75- kDa tumor necrosis factor receptors in the generation of lymphocyte-activated killer cell activity and proliferation of natural killer cells. *J.Immunol.* **146**: 3045-3048.
- NAVARRO, S., N. DEBILI, J.-F. BERNAUDIN, W. VAINCHENKER et J. DOLY 1989. Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. *J.Immunol.* **142**: 4339-4345.
- NEALE, M.L., R.A. FIERA et N. MATTHEWS 1988. Involvement of phospholipase A2 activation in tumour cell killing by tumor necrosis factor. *Immunology* **64**: 81-85.
- NIEDEL, J., S. WILKINSON et P. CUATRECASAS 1979. Receptor-mediated uptake and degradation of <sup>125</sup>I-chemotactic peptide by human neutrophils. *J.Biol. Chem.* **254**: 10700-10706.
- NOPHAR, Y., O. KEMPER, C. BRAKEBUSCH, H. ENGELMANN, R. ZWANG, D. ADERKA, H. HOLTSMANN et D. WALLACH 1990. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J.* **9**: 3269-3278.
- OBRIST, R., J. SCHMIDLI, R. MULLER, H. GALLATI et J.P. OBRECHT 1991. Acute and subacute toxicity of chemotactic conjugates between monoclonal antibody and fMet-Leu-Phe in humans: a phase I clinical trial. *Cancer Immunol.Immunother.* **32**: 406-408.
- O'FLAHERTY, J.T., H.J. SHOWELL, D.L. KREUTZER, P.A. WARD et E.L. BECKER 1978. Inhibition of *in vivo* and *in vitro* neutrophil responses to chemotactic factors by a competitive antagonist. *J.Immunol.* **120**: 1326-1332.
- O'FLAHERTY, J.T., A.G. ROSSI, J.F. REDMAN et D.P. JACOBSON 1991. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates expression of receptors for formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, leukotriene B<sub>4</sub>, and platelet-activating factor. Dissociation from priming in human polymorphonuclear neutrophils. *J.Immunol.* **147**: 3842-3847.
- OHURA, K., I.M KADONA, L.M. WAHL, D.E. CHENOWETH et S.M. WAHL 1987. Co-expression of chemotactic ligand receptors on human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **138**: 2633-2639.



- OKADA, M., M. KITAHARA, S. KISHIMOTO, T. MATSUDA, T. HIRANO et T. KISHIMOTO 1988. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J.Immunol.* **141**: 1543-1549.
- OKUSAWA, S., K.B. YANCEY, J.W.M. VAN DER MEER, S. ENDRES, G. LONNEMANN, K. HEFTER, M.M. FRANK, J.F. BURKE, C.A. DINARELLO et J.A. GELFAND 1988. C5a stimulates secretion of tumor necrosis factor from human mononuclear cells in vitro. Comparison with secretion of interleukin 1 $\beta$  and interleukin 1 $\alpha$ . *J.Exp. Med.* **168**: 443-448.
- ONOZAKI, K., K. MATSUSHIMA, E. S. KLEINERMAN, T. SAITO et J.J. OPPENHEIM 1985. Role of interleukin 1 in promoting human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. *J.Immunol.* **135**: 314-320.
- OPPENHEIM, J.J., E.J. KOVACS, K. MATSUSHIMA et S.K.DURUM 1986. There is more than one interleukin 1. *Immuno. Today* **7**: 45-56.
- OSBORN, L., S. KUNKEL et G.J. NABEL 1989. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2336-2340.
- OSIPOVICH, O.A., K.V. FEGEDING, N.I. MISUNO, T.S. KOLESNIKOVA, I.K. SAVOSTIN, A.B. SUDARIKOV et N.N. VOITENOK 1993. Differential action of cycloheximide and activation stimuli on transcription of tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and p53 genes in human monocytes. *J.Immunol.* **150**: 4958-4965.
- PAI, J.-K., W.I. SIEGEL, R.W. EGAN et M.M. BILLAH 1988. Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. *J.Biol.Chem.* **263**:12472-12477.
- PALMA, C., A. CASSONE, D. SERVOUSEK, C.A. PEARSON et J.Y. DJEU 1992. Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **60**: 4604-4611.
- PENNICA, D., G.E. NEDWIN, J.S. HAYFLICK, P.H. SEEBURG, R. DERYNCK, M.A. PALLADINO, W.J. KOHR, B.B. AGGARWAL et D.V. GOEDDEL 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**: 724-729.

- PEREZ, C., I. ALBERT, K. DEFAY, N. ZACHARIADES, L. GOODING et M. KRIEGLER 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* **63**: 251-258.
- PEREZ, H.D., E. KELLY et R. HOLMES 1992a. Regulation of formyl peptide receptor expression and its mRNA levels during differentiation of HL-60 cells. *J.Biol.Chem.* **267**:358-363.
- PEREZ, H.D, R. HOLMES, E. KELLY, J. MCCLARY, Q. CHOU et W.H. ANDREWS 1992b. Cloning of the gene coding for a human receptor for formyl peptides. Characterization of a promoter region and evidence for polymorphic expression. *Biochemistry* **31**: 11595-11599.
- PETERSON, A.A. et R.S. MUNFORD 1987. Dephosphorylation of the lipid A moiety of *Escherichia coli* lipopolysaccharide by mouse macrophages. *Infect. Immun.* **55**: 974-978.
- POLAKIS, P.G. , R.J. UHING et R. SNYDERMAN 1988. The formylpeptide chemoattractant receptor copurifies with a GTP-binding protein containing a distinct 40-kDa pertussis toxin substrate. *J.Biol.Chem.* **263**: 4969-4976.
- POLAKIS, P.G., T. EVANS et R. SNYDERMAN 1989. Multiple chromatographic forms of the formylpeptide chemoattractant receptor and their relationship to GTP-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res.Commun.* **161**: 276-283.
- POLI, V., F.P. MANCINI et R. CORTESE 1990. IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell* **63**: 643-653.
- PORTEU, F., M. BROCKHAUSS, D. WALLACH, H. ENGELMANN et C.F. NATHAN 1991. Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75 kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils. *J.Biol.Chem.* **266**: 18846-18853.
- PORTEU, F. et C. NATHAN 1990. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J.Exp.Med.* **172**: 599-607.
- POUTSIAKA, D.D., B.D. CLARK, E. VANNIER et C.A. DINARELLO 1991. Production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta by peripheral blood mononuclear cells is differentially regulated. *Blood* **78**: 1275-1281.

- QWARNSTROM, E.E., R.C. PAGE, S. GILLIS et S.K. DOWER 1988. Binding, internalization, and intracellular localization of interleukin-1 $\beta$  in human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**: 8261-8269.
- RAY, A., S.B. TATTER, U. SANTHANAM, D.C. HELFGOTT, L.T. MAY et P.B. SEHGAL 1989a. Regulation of expression of interleukin-6. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **557**: 353-361.
- RAY, A., P. SASSONE-CORSI et P.B. SEHGAL 1989b. A multiple cytokine-and second messenger-responsive element in the enhancer of the human interleukin-6 gene: similarities with c-fos gene regulation. *Mol.Cell. Biol.* **9**: 5537-5547.
- ROT, A., L.E. HENDERSON, T.D. COPELAND et E.J. LEONARD 1987. A series of six ligands for the human formyl peptide receptor: tetrapeptides with high chemotactic potency and efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7967-7071.
- ROTHFIELD, L. et R.W. HORNE 1967. Reassociation of purified lipopolysaccharide and phospholipid of the bacterial cell envelope: electron microscopic and monolayer studies. *J.Bacteriol.* **93**: 1705-1721.
- ROTHWELL, N.J. et R.F. GRIMBLE 1992. Metabolic and nutritional effects of TNF. Dans **Tumor necrosis factors. The molecules and their emerging role in medicine.** ed. B. Beutler. Raven Press. New York. pp.237-254.
- ROUX-LOMBARD, P., L. PUNZI, F. HASLER, S. BAS, S. TODESCO, H. GALLATI, P.-A. GUERNE, J.-M. DAYER 1993. Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum.* **36**: 485-489.
- RUBARTELLI, A., F. COZZOLINO, M. TALIO et R. SITIA 1990. A novel secretory pathway for interleukin-1 $\beta$ , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**: 1503-1510.
- RUCKER, R.B. et F. WOLD 1988. Cofactors in and as posttranslational protein modifications. *FASEB J.* **2**: 2252-2261.
- SAFIEDH-GARABEDIAN, B., K. AHMED, M.A. KHAMASHTA, N.A. TAUB et G.R. HUGUES 1993. Thymulin modulates cytokine release by peripheral blood mononuclear cells: a comparison between healthy volunteers and patients with systemic lupus erythematous. *Int.Archi. Allergy Immunol.* **101**: 126-131.
- SALARI, H., P. BRAQUET, P. NACCACHE et P. BERGEAT 1985. Characterization of effect of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine on leukotriene synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* **9**: 127-138.

- SARIBAN, E., K. IMAMURA, R. LUEBBERS et D. KUFÉ 1988. Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *J.Clin.Invest.* **81**: 1506-1510.
- SATOH, T., S. NAKAMURA, T. TAGA, T. MATSUDA, T. HIRANO, T. KISHIMOTO et Y. KAZIRO 1988. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol.Cell. Biol.* **8**: 3546-3549.
- SAUDER, D.N., C.A. DINARELLO et V.B. MORHENN 1984. Langerhans cell production of interleukin-1. *J. Invest. Dermatol.* **82**: 605-607.
- SCHALL, T.J., M. LEWIS, K.J. KOLLER, A. LEE, G.C. RICE, G.H.W. WONG, T. GATANAGA, G. A. GRANGER, R. LENTZ, H. RAAB, W.J. KOHR et D.V. GOEDDEL 1990. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* **61**: 361-370.
- SCHEURICH, P., B. THOMA, U. UCER et K. PFIZENMAIER 1987. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ : induction of TNF receptors on human T cells and TNF- $\alpha$  mediated enhancement of T cell responses. *J.Immunol.* **138**: 1786-1790.
- SCHIFFMANN, E., B.A. CORCORAN et S.M. WAHL 1975. N-Formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 1059-1062.
- SCHIFFMANN, E. et J.I. GALLIN 1979. Biochemistry of phagocyte chemotaxis. *Curr. Topics Cell. Regul.* **15**: 203-261.
- SCHINDLER, R., J.A. GELFAND et C.A. DINARELLO 1990. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood* **76**: 1631-1638.
- SCHMITT, M., R.G. PAINTER, A.J. JESAITIS, K. PREISSNER, L.A. SKLAR et C.G. COCHRANE 1983. Photoaffinity labeling of the N-formyl peptide receptor binding site on intact human polymorphonuclear leukocytes. A label suitable for following the fate of the receptor-ligand complex. *J.Biol.Chem.* **258**: 649-654.
- SCHUBERT, T. et W.E. MULLER 1989. N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induced accumulation of inositol phosphates indicates the presence of oligopeptide chemoattractant receptors on circulating human lymphocytes. *FEBS letters* **257**: 174-176.

- SCHUMANN, R.R., S.R. LEONG, G.W. FLAGGS, P.W. GRAY, S.D WRIGHT, J.C. MATHISON, P.S. TOBIAS et R.J. ULEVITCH 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**: 1429-1431.
- SCHUTZE, S., S. NOTTROT, K. PFIZENMAIER et M. KRONKE 1990. Tumor necrosis factor signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of protein kinase C. *J.Immunol.* **144**: 2604-2608.
- SCUDERI, P. 1989. Suppression of human leukocyte tumor necrosis factor secretion by the serine protease inhibitor p-toluenesulfonyl-l-arginine methyl ester (TAME). *J.Immunol.* **143**: 168-173.
- SECKINGER, P., J.W. LOWENTHAL, K. WILLIAMSON, J.-M. DAYER et H. ROBSON MACDONALD 1987. A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. *J.Immunol.* **139**: 1546-1549.
- SEHGAL, P.B., Z. WALTHER et I. TAMM 1987. Rapid enhancement of  $\beta_2$ -interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **84**: 3663-3667.
- SEHGAL, P.B., D.C. HELFGOTT, U. SANTHANAM, S.B. TATTER, R.H. CLARICK. J. GHAYEB et L.T. MAY 1988. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the  $\beta_2$ -interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. *J.Exp.Med.* **167**: 1951-1956.
- SEHGAL, P.B. 1992. Regulation of IL6 gene expression. *Res. Immunol.* **143**:724-734.
- SELL, S., *Immunology, immunopathology and immunity*. 4<sup>th</sup> ed. New-York. Elsevier, 1987. 852p.
- SEMERARO, N., A. BIONDI, R. LORENZET, D. LOCATI, A. MANTOVANI et M.B. DONATI 1983. Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophages from diverse anatomical sites. *Immunology* **50**: 529-535.
- SHABO, Y., J. LOTEM, M. RUBINSTEIN, M. REVEL, S.C. CLARK, S.F. WOLF, R. KAMEN et L. SACHS 1988. The myeloid blood cell differentiation-inducing protein MGI-2A is interleukin-6. *Blood* **72**: 2070-2073.
- SHAKHOV, A.N., M.A. COLLART, P. VASSALLI, S.A. NEDOSPASOV et C.V. JONGENEEL 1990. kB-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor  $\alpha$  gene in primary macrophages. *J.Exp.Med.* **171**: 35-47.

SHALABY, M.R., B.B. AGGARWAL, E. RINDERKNECHT, L.P. SVEDERSKY, B.S. FINDLE et M.A. PALLADINO Jr. 1985. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferons- $\gamma$  and tumor necrosis factors. *J. Immunol.* **135**: 2069-2073.

SHAPIRO, L. B.D., CLARK, S.F. ORENCOLE, D.D. POUTSIKA, E.V. GRANOWITZ et C.A. DINARELLO 1993. Detection of tumor necrosis factor soluble receptor p55 in blood samples from healthy and endotoxemic humans. *J.Infect.Dis.* **167**: 1344-1350.

SHAW, G. et R. KAMEN 1986. A conserved AY sequence form the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**: 659-667.

SIMS, J.E., R.B. ACRES, C.E. GRUBIN, C.J. McMAHAN, J.N. WIGNALL, C.J. MARCH et S.K. DOWER 1989. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **86**: 8946-8950.

SIRONI, M., F. BREVIARIO, P. PROSERPIO, A. BIONDI, A. VECCHI, J. VAN DAMME, E. DEJANA et A. MANTOVANI 1989. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J.Immunol.* **142**: 549-553.

SKLAR, L.A., D.A. FINNEY, Z.G. OADES, A.J. JESAITIS, R.C. PAINTER et C.G. COCHRANE 1984. The dynamics of ligand-receptor interactions. Real-time analyses of association, dissociation, and internalization of an N-formyl peptide and its receptors on the human neutrophil. *J.Biol. Chem.* **259**: 5661-5669.

SKLAR, L.A., S.P. FAY, B.E. SELIGMANN, R.J. FREER, N. MUTHUKUMARASWAMY et H. MUELLER 1990. FLuorescence analysis of the size of a binding pocket of a peptide receptor at natural abundance. *Biochemistry* **29**: 313-316.

SMITH, C.A., T. DAVIS, D. ANDERSON, L. SOLAM, M.P. BECKMANN, R. JERZY, S.K. DOWER, D. COSMAN et R.G. GOODWIN 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**: 1019-1023.

SMITH, C.D. C.C COX et R. SNYDERMAN 1986. Receptor-coupled activation of phosphoinositide-specific phospholipase C by an N protein. *Science* **232**:97-100.

SMITH, R.A. et C. BAGLIONI 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J.Biol.Chem.* **262**: 6951-6954.

- SNYDERMAN, R. et R.J. UHING 1992. Chemoattractant stimulus-response coupling. Dans **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, 2<sup>nd</sup>eds. Gallin J.I., I.M. Goldstein et R.Snyderman. Raven Press. New York. pp.421-439.
- SPRANG, R.S. et M.J. ECK 1992. The 3-D structure of TNF. Dans **Tumor necrosis factors. The molecules and their emerging role in medicine**. ed. B. Beutler. Raven Press. New York. pp.11-32.
- STANDIFORD, T.J., T. LINDSTEN, C.B. THOMPSON, R.M. STRIETER et S.L. KUNKEL 1992. Interleukin-4 differentially regulates tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression by human T lymphocytes and monocytes. *Pathobiology* **60**: 100-107.
- STRUNK, R.C., A.S. WHITEHEAD et F.S. COLE 1985. Pretranslational regulation of the synthesis of the third component of complement in human mononuclear phagocytes by the lipid A portion of lipopolysaccharide. *J.Clin. Invest.* **76**: 985-990.
- SUNG, S.-S.J., J.M. BJORND AHL, C.Y. WANG, H.T. KAO et S.M. FU 1988. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD3 antibody. *J.Exp.Med.* **167**: 937-953.
- SUTTLES, J., L.M. CARRUTH et S.B. MIZEL 1990. Detection of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the supernatants of paraformaldehyde-treated human monocytes. Evidence against a membrane form of IL-1. *J.Immunol.* **144**: 170-174.
- TAFFET, S.M., K.J. SINGHEL, J.F. OVERHOLTZER et S.A. SHURTLEFF 1989. Regulation of tumor necrosis factor expression in a macrophage-like cell line by lipopolysaccharide and cyclic AMP. *Cell. Immunol.* **120**: 291-300.
- TAGA, T., Y. KAWANIXHI, R.R. HARDY, T. HIRANO et T. KISHIMOTO 1987. Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. *J.Exp.Med.* **166**: 967-981.
- TAGA, T., M. HIBI, Y. HIRATA, K. YAMASAKI, K. YASUKAWA, T. MATSUDA, T. HIRANO et T. KISHIMOTO 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**: 573-581.
- TAGA, T. et T. KISHIMOTO 1990. IL-6 receptor Dans: **Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation** vol. 1 Academic Press. pp.219-243.
- TAGA, T. et T. KISHIMOTO 1992. Role of a two-chain IL-6 receptor system in immune and hematopoietic cell regulation. *Crit. Rev. Immunol.* **11**: 265-280.

- TANNER, J.E., N.D. GOLDMAN et G. TOSATO 1990. Biochemical and biological analysis of human interleukin 6 expressed in rodent and primate cells. *Cytokine* **2**: 363-374.
- TARTAGLIA, L.A. et D.V. GOEDDEL 1992. Two TNF receptors. *Immunology Today* **13**: 151-153.
- TEWARI, A., W.C. BUHLES JR et H.F. STARNES JR. 1990. Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet* **336**:712-714.
- THORNBERRY, N.A., H.G. BULL, J.R. CALAYCAY, K.T. CHAPMAN, A.D. HOWARD, M.J. KOSTURA, D.K. MILLER, S.M. MOLINEAUX, J.R. WEIDNER, J. AUNINS, K.O. ELLISTON, J.M. AYALA, F.J. CASANO, J. CHIN, G. J.-F. DING, L.A. EGGER, E.P. GAFFNEY, G. LIMJUCO, O.C. PALYHA, S.M. RAJU, A.M. ROLANDO, J.P. SALLEY, T.-T. YAMIN, T.D. LEE, J.E. SHIVELY, M. MACCROSS, R.A. MUMFORD, J.A. SCHMIDT et M. J. TOCCI 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* **356**:768-774.
- TOBIAS, P.S., K.P. McADAMS, K. SOLDAU et R.J. ULEVITCH 1985. Control of lipopolysaccharide-high-density lipoprotein interactions by an acute-phase reactant in human serum. *Infect.Immun.* **50**: 73-76.
- TOBIAS, P.S., K. SOLDAU et R.J. ULEVITCH 1989. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J.Biol.Chem.* **264**: 10867-10871.
- TREMBLAY, P., G. MERCIER, S. GAUTHIER, H.-M. THERIEN, G. SAUVÉ et D.OTH 1991. N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) modulates *ex vivo* lipopolysaccharide-induced cytokin production from elicited murin peritoneal macrophages. *Immunol.Infect.Dis.* **1**: 329-334.
- TRUETT, A.P. III, M.W. VERGHESE, S.B. DILLON et R. SNYDERMAN 1988. Calcium influx stimulates a second pathway for sustained diacylglycerol production in leukocytes activated by chemoattractants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**: 1549-1553.
- VAN DAMME, J., S. CAYPHAS, G. OPDENAKKER, A. BILLIAU et J. VAN SNICK 1987. Interleukin 1 and poly(rI).poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. *Eur.J.Immunol.* **17**: 1-7.



VAN DER POLL, T., H.R. BULLER, H. TEN CATE, C.H. WORTEL, K.A. BAUER, S.J.H. VAN DEVENTER, C.E. HACK, H.P. SAUERWEIN, R.D. ROSENBERG, J.W. TEN CATE 1990. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N.Engl.J.Med.* **322**: 1622-1627.

VAN DER POLL, T., S.J.H. VAN DEVENTER, H.R. BULLER, A. STURK et J.W. TEN CATE 1991. Comparison of the early dynamics of systemic prostacyclin release after administration of tumor necrosis factor and endotoxin to healthy humans. *J.Infect.Dis.* **164**: 599-601.

VAN EPPS, D.E., J.G. BENDER, S.J. SIMPSON et D.E. CHENOWETH 1990. Relationship of chemotactic receptors for formyl peptide and C5a to CR1, CR3, and Fc receptors on human neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* **47**: 519-527.

VAN EPPS, D.E., S.J. SIMPSON et D.E. CHENOWETH 1992. C5a and formyl peptide receptor regulation on human monocytes. *J.Leukoc.Biol.* **51**: 393-399.

VAN SNICK, J. 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu.Rev.Immunol.* **8**: 253-278.

VASSALI, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* **10**: 411-452.

VERGHESE, M.W., K. FOX, L.C. MCPHAIL et R. SNYDERMAN 1985. Chemoattractant-elicited alterations of cAMP levels in human polymorphonuclear leukocytes require a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism which is independent of transmembrane activation of adenylate cyclase. *J.Biol.Chem.* **260**: 6769-6775.

VERGHESE, M.W., C.D. SMITH, L.A. CHARLES, L. JAKOI et R. SNYDERMAN 1986. A guanine nucleotide regulatory protein controls polyphosphoinositide metabolism, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and cellular responses to chemoattractants in human monocytes. *J.Immunol.* **137**: 271-275.

VOLLMER, K.L., J.S. ALBERTS, H.T. CARPER et G.L. MANDELL 1992. Tumor necrosis factor-alpha decreases neutrophil chemotaxis to N-formyl-1-methionyl-1-leucyl-1-phenylalanine: analysis of single cell movement. *J.Leukoc.Biol.* **52**: 630-636.

VOTH, R., S. ROSSOL, K. KLEIN, G. HESS, K.H. SCHUTT, H.C. SCHRODER, K.H. MEYER ZUM BUSCHENFELDE et W.E. MULLER 1990. Differential gene expression of IFN-alpha and tumor necrosis factor-alpha in peritoneal blood mononuclear cells from patients with AIDS related complex and AIDS. *J.Immunol.* **144**: 970-975.

WAGNER, C.R., R.M. VETTO et D.R. BURGER 1984. The mechanism of antigen presentation by endothelial cells. *Immunobiology* **168**: 453-469.

WALTHER, Z., L.T. MAY et P.B. SEHGAL 1988. Transcriptional regulation of the interferon- $\beta_2$  /B cell differentiation factor BSF-2/hepatocyte-stimulating factor gene in human fibroblasts by other cytokines. *J.Immunol.* **140**: 974-977.

WARD, P.A., I.H. LEPOW et L.J. NEWMAN 1968. Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. *Am.J.Pathol.* **52**: 725-736.

WEBB, A.C., K.L. COLLINS, P.E. AURON, R.L. EDDY, H. NAKAI, M.G. BYERS, L.L. HALEY, W.M. HENRY et T.B. SHOWS 1986. Interleukin-1 gene (IL-1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res.* **5**: 77-85.

WEINBERG, J.B., J.J. MUSCATO et J.E. NIEDEL 1981. Monocyte chemotactic peptide receptor. Functional characteristics and ligand-induced regulation. *J.Clin.Invest.* **68**:621-630.

WEISBART, R.H., D.W. GOLDE, S.C. CLARK, G.G. WONG et J.C. GASSON 1985. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* **314**: 361-363.

WEISBART, R.H., D.W. GOLDE et J.C. GASSON 1986. Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-met-leu-phe receptors. *J.Immunol.* **137**: 3584-3587.

WEST, C.M. 1986. Current ideas on the significance of protein glycosylation. *Mol.Cell. Biochem.* **72**: 3-20.

WEST, R.E. JR., J. MOSS, M. VAUGHAN, T. LIU et T.-Y. LIU 1985. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J.Biol.Chem.* **260**:14428-14430.

WIJDENES, J., C. CLEMENT, B. KLEIN, B. MOREL-FOURRIER, N. VITA, P. FERRARA et A. PETERS 1991. Human recombinant dimeric IL-6 binds to its receptor as detected by anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Mol.Immunol.* **28**:1183-1192.

WILLIAMS, L.T., R. SNYDERMAN, M.C. PIKE et R.J. LEFKOWITZ 1977. Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:1204-1208.

- WILLIAMSON, K., B.F. DICKEY, H.Y. PYUNG et J. NAVARRO 1988. Solubilization and reconstitution of the formylmethionylleucylphenylalanine receptor coupled to guanine nucleotide regulatory protein. *Biochemistry* **27**: 5371-5377.
- WIRTHMUELLER, U., A.L. DE WECK et C.A. DAHINDEN 1989. Platelet-activating factor production in human neutrophils by sequential stimulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and the chemotactic factors C5a or formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J.Immunol.* **142**: 3213-3218.
- WONG, G.H. et D.V. GOEDEL 1986. Tumour necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* **323**: 819-822.
- WRIGHT, S.D. et M.T. JONG 1986. Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* **164**: 1876-1888.
- WRIGHT, S.D., S.M. LEVIN, M.T.C. JONG, Z. CHAD et L.G. KABBASH 1989a. CR3 (CD11/CD18) expresses one binding site for arg-gly-asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. *J.Exp. Med.* **169**: 175-183.
- WRIGHT, S.D., P.S. TOBIAS, R.J. ULEVITCH et R.A. RAMOS 1989b. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J.Exp.Med.* **170**: 1231-1241.
- WRIGHT, S.D., R.A. RAMOS, P.S. TOBIAS, R.J. ULEVITCH et J.C. MATHISON 1990a. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431-1433.
- WRIGHT, S.D., P.A. DETMERS, Y. AIDA, R. ADAMOWSKI, D.C. ANDERSON, Z. CHAD, L.G. KABBASH et M.J. PABST 1990b. CD18-deficient cells responde to lipopolysaccharide *in vitro*. *J.Immunol.* **144**: 2566-2571.
- WRIGHT, S.D. 1991. Multiple receptors for endotoxin. *Curr.Opin.Immunol.* **3**: 83-90.
- YAMAGUCHI, E., A. ITOH, K. FURUYA, H. MIYAMOTO, S. ABE et Y. KAWAKAMI 1993. Release of tumor necrosis factor alpha from alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest* **103**: 479-483.
- YAMAUCHI, N., N. WATANABE, H. KURIYAMA, H. NEDA, M. MAEDA, T. HIMENO, Y. TSUJI et Y. NIITSU 1990. Suppressive effects of intracellular glutathione on hydroxyl radical production induced by tumor necrosis factor. *Int.J.Cancer* **46**: 884-888.

YULI, I. et R. SNYDERMAN 1986. Extensive hydrolysis of N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-[<sup>3</sup>H] phenylalanine by human polymorphonuclear leukocytes. A potential mechanism for modulation of the chemoattractant signal. *J.Biol.Chem.* **261**: 4902-4908.

ZHANG, Y. J.-X. LIN et J. VILCEK 1988. Synthesis of interleukin 6 (interferon- $\beta$ /B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J.Biol.Chem.* **263**: 6177-6182.

ZIMMERMAN, R.J., B.J. MARAFINO Jr, A. CHAN, P. LANDRE et J.L. WINKELHAKE 1989. The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor *in vivo* *J.Immunol.* **142**: 1405-1409.

## ANNEXE 1: SOLUTIONS DIVERSES UTILISEES

### A) EBSS

(Earle's Balanced Salt Solution) (Gibco) contenant 10mM d'hepes (Gibco)

### B) RPMI 1640 complet

RPMI 1640 avec glutamine (Gibco), hepes (10mM), pénicilline (50 U.I./mL) et streptomycine (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) contenant  $5 \times 10^{-5}\text{M}$  de mercaptoéthanol (Sigma), et 2,5 ou 5% du sérum décomplémenté et centrifugé du donneur

### C) PBS

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) sans phénol rouge, sans magnésium et sans calcium (Gibco),

### D) Milieu de culture des cellules B9

RMPI 1640 avec glutamine (Gibco)

comme source d'IL-6: 5% de surnageant de culture de cellules Raw 264.7 stimulées avec 100 ng/mL de LPS souche E.coli 0127:B8 (Sigma) dans du Dulbecco's Minimal Essential Medium (Gibco) contenant 5% de sérum de veau durant 18 heures, surnageant filtré sur 0,2  $\mu\text{m}$ .

10% de sérum de veau

$5 \times 10^{-5}\text{M}$  mercaptoéthanol fraîchement dilué

### E) Milieu pour dosage de l'IL-6

Hybridoma Serum Free Medium (Gibco) contenant  $5 \times 10^{-5}\text{M}$  mercaptoéthanol fraîchement dilué [H-SFM \*]

### F) Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT)

Le MTT (Sigma) a été dissous à une concentration de 5 mg/mL dans du PBS et entreposé à 4°C dans un contenant enveloppé de papier d'aluminium pour le protéger de la lumière. Le jour du test le MTT était dilué à une concentration de 0,5 mg/mL et 100  $\mu\text{L}$ /puits était ajouté aux cellules B9 pour les cinq dernières heures d'incubation.

G) Étant donné la présence d'ARNases sur les mains, durant les étapes d'extraction de l'ARN le port de gants a été scrupuleusement observé. La verrerie utilisée a été au préalable autoclavée durant quatre heures. Les embouts de pipette, les tubes de

centrifugation et les Eppendorf utilisés ont été siliconés en les exposant quelques heures à du diméthyl dichlorosilane (Sigma) dans une cloche sous vide et traités par la suite avec de l'eau contenant 0.2 % de diéthylpyrocarbonate (DEPC) (ICN) 18 heures et enfin autoclavés pour inactiver le DEPC.

#### H) Guanidinium 4M

4M guanidinium  
20 mM acétate de sodium à pH 5.2  
0.1 mM dithiothreitol (DTT)  
0.5% N-lauroylsarcosine (Sarkosyl)  
le pH final est ajusté à 5.5  
la solution est filtrée sur un filtre de nylon 0,45 $\mu$

#### I) Chlorure de césium

5.7 M de chlorure de césium dissous dans une solution contenant 0.1M EDTA à pH 8.0 et 0.2% de DEPC  
agité et autoclavé en ajustant le volume d'après l'autoclave avec le volume précédent pour s'assurer d'une molarité de 5.7M de chlorure de césium

#### J) Tampon TES

10 mM Tris-HCl pH 7.4  
5 mM EDTA  
1% sodium dodecyl sulfate (SDS)

#### K) Gel d'agarose à 1.2 %

1.2 g d'agarose (BRL) a été ajouté à 10 mL de MOPS [3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid] 10X (0.2M MOPS, 0.5M acétate de sodium pH 7.0, 10mM EDTA disodique) 95 mL d'eau traitée au DEPC. Cette solution a été chauffée au four micro-onde jusqu'à ébullition et solubilisation de l'agarose. Lorsque la solution a atteint environ 45°C, 5 mL de formaldéhyde 37% (Sigma) a été ajouté pour atteindre un volume final de 100 mL.

#### L) Tampon d'échantillon

MOPS 1X  
22% formaldéhyde  
0,1% bleu de bromophénol  
65% formamide déionisée

## M) Solution dénaturante

1.5M NaCl  
0.1M NaOH

## N) Solution neutralisante

1.5M NaCl  
0.5M Tris-HCl pH 7.2  
1mM EDTA

## O) 20 X SSC

3M NaCl  
0.3M citrate de sodium

## P) Solution de préhybridation

25 mM phosphate de potassium  
50% formamide  
5X Denhart's (1X correspond à 0.02% p/v albumine bovine sérique, 0.02% p/v Ficoll et 0,02% p/v polyvinylpyrrolidone)  
50 µg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé  
5X SSC

## Q) Solution d'hybridation

35% formamide (traitée 20 minutes avec de la résine Amberlite MB-3 (Sigma) et filtré)  
4.3X SSC,  
3,5X Denhart's  
0.36% SDS  
0.014mM EDTA  
0.03mM Tris-HCl

## R) Radiomarquage de sondes oligonucléotidiques

Un volume contenant 1.5 µg de l'oligo à marquer a été mis en présence de 0.05M Tris-HCl pH 7.5, 0.01M MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 0,05mg/mL BSA, 6 unités de kinase T4 polynucléotidique (BIO/CAN Scientific) et 0.33mCi de l'ATP radiomarqué [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]. L'enzyme kinase au cours d'une réaction de 45 à 60 minutes à 37°C effectue une phosphorylation avec l'ATP radioactif disponible. La réaction était arrêtée en dénaturant l'enzyme par une incubation de 5 minutes à 65°C. La radioactivité non-incorporée par la

réaction était retirée de la solution, en filtrant celle-ci sur une petite colonne de Sephadex G-50 (Amersham NICK-Spin Column) pré-équilibrée avec du tampon TE (0,1mM Tris-HCl, 0,05mM EDTA). La colonne pré-équilibrée était centrifugée quatre minutes à 1600 RPM pour enlever le surplus de tampon, puis la solution de radiomarquage était ajoutée sur la colonne et une seconde centrifugation permettait de récupérer la sonde marquée. Celle-ci était soit congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$ , soit utilisée tout de suite dans le tampon d'hybridation mentionné précédemment.

#### S) Tampon de déhybridation

0,1X Denhart's  
2mM EDTA  
5mM Tris-HCl pH 8.0  
0,1% SDS



