



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

DANIEL ROCHEFORT

INDUCTION PAR LE LIPOPOLYSACCHARIDE ET MODULATION PAR LE  
N-FORMYL-MÉTHIONYL-LEUCYL-PHÉNYLALANINE DE L'EXPRESSION DE  
PROTO-ONCOGÈNES CHEZ LA LIGNÉE CELLULAIRE MACROPHAGIQUE  
RAW 264,7

DÉCEMBRE 1993

À mes parents,  
Hélène et Yves,  
pour leur présence et  
encouragement continus.

À Lyna,  
qui a su m'entourer de sa chaleureuse  
présence pour l'accomplissement de ce travail.



3. LE MACROPHAGE .....	33
3.1 Introduction.....	33
3.2 Origine des macrophages.....	36
3.3 Propriétés et fonctions des macrophages.....	37
3.4 Activation des macrophages.....	38
4. LES PROTO-ONCOGÈNES FOS ET JUN .....	43
4.1 Définitions .....	43
4.1.1 Oncogènes et proto-oncogènes .....	43
4.1.2 Gènes de compétence .....	44
4.1.3 Facteur de transcription .....	44
4.2 Caractéristiques de FOS et JUN.....	45
4.3 FOS, JUN et AP-1.....	46
4.4 Régulation de l'expression de c-fos et de c-jun .....	47
4.4.1 Promoteur de c-fos.....	48
4.4.2 Promoteur de c-jun .....	53
4.4.3 Promoteur de jund .....	53
4.5 Régulation du facteur de transcription AP-1 .....	54
4.5.1 Interaction protéine-protéine .....	55
4.5.2 Phosphorylation d'AP-1 .....	56
4.5.3 Régulation par le potentiel redox .....	56
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	60
1. MODÈLE EXPÉRIMENTAL .....	60
1.1 Culture cellulaire .....	60
1.2 Stimulation des cellules macrophagiques RAW 264,7 .....	61
1.3 Traitement des cellules avec les inhibiteurs de PKC.....	61
2. PRÉPARATION DE L'ARN .....	62
2.1 Préparation de la verrerie et des solutions .....	62
2.2 Isolement de l'ARN total .....	63
2.3 Mesure de la densité optique.....	64
2.4 Électrophorèse sur gel dénaturant agarose/formaldéhyde .....	65

2.5 Buvardage de type Northern .....	66
3. PRÉPARATION DES SONDÉS MOLÉCULAIRES .....	66
3.1 Choix des sondes pour c-fos, c-jun et jund .....	66
3.1.1 Mini-préparation de l'ADN plasmidique.....	70
3.1.2 Maxi-préparation de l'ADN plasmidique .....	70
3.1.3 Digestion enzymatique de l'ADN plasmidique .....	71
3.1.4 Analyse des digestions enzymatiques .....	71
3.2 Sonde glyceraldéhyde phosphate-3 dihydrogénase .....	71
3.2.1 Réaction PCR .....	72
4. HYBRIDATION DE L'ARN AVEC LES SONDÉS RADIOACTIVES ...	72
4.1 Marquage par amorce aléatoire.....	72
4.1.1 Comptage de la radioactivité incorporée dans l'ADN.....	73
4.2 Pré-hybridation et hybridation.....	73
RÉSULTATS .....	75
1. EXTRACTION DE L'ARN .....	75
2. CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES RAW 264,7.....	75
3. CINÉTIQUE DE L'EXPRESSION DES PROTO-ONCOGÈNES C-FOS, C-JUN ET JUND.....	81
4. ÉVALUATION DE L'EFFET DOSE-RÉPONSE DU SIGNAL LPS ET FMLP .....	85
4.1 Effet du FMLP seul.....	85
4.2 Effet du LPS seul.....	85
4.3 Effet combiné FMLP et LPS.....	89
5. CONDITIONNEMENT DES CELLULES AVEC LE FMLP .....	90
6. ACTION D'INHIBITEURS DE PROTÉINES KINASES C.....	93
DISCUSSION .....	97
1. INFLUENCE DU SÉRUM SUR L'EXPRESSION DE C-FOS .....	97

2. CINÉTIQUE D'EXPRESSION DES PROTO-ONCOGÈNES EN PRÉSENCE DE LPS.....	99
3. INFLUENCE DU FMLP .....	102
4. INFLUENCE DU LPS .....	103
5. EFFETS COMBINÉS DU LPS ET DU FMLP.....	104
6. EFFET DU PRÉTRAITEMENT DES CELLULES AVEC LE FMLP .....	107
7. ACTION DES INHIBITEURS DE PROTÉINES KINASES C .....	109
CONCLUSION .....	113
REMERCIEMENTS .....	115
BIBLIOGRAPHIE .....	116
ANNEXE 1.....	133
ANNEXE 2.....	139

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.:	Structure du n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine .....	4
FIGURE 2.:	Transduction de signaux par le récepteur des formyl-peptides .....	13
FIGURE 3.:	Structure du lipopolysaccharide .....	19
FIGURE 4.:	Récepteurs du lipopolysaccharide.....	25
FIGURE 5.:	Activation du macrophage .....	39
FIGURE 6.:	Structure des promoteurs de c-fos, c-jun et jund.....	49
FIGURE 7.:	Voies de transduction impliquées dans la modulation de c-fos et c-jun .....	57
FIGURE 8.:	Sondes utilisées pour l'hybridation avec l'ARN .....	68
FIGURE 9.:	Électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel d'agarose/formaldéhyde de l'ARN total extrait des cellules RAW 264,7 .....	76
FIGURE 10.:	Influence des conditions de culture des cellules RAW 264,7 sur l'expression de c-fos .....	79
FIGURE 11.:	Cinétiques de l'expression de c-fos, c-jun et jund.....	82

FIGURE 12.:	Effet dose réponse en présence de FMLP seul, LPS seul et en combinaison du FMLP et LPS .....	86
FIGURE 13.:	Conditionnement préalable des cellules RAW 264,7 avec le FMLP .....	91
FIGURE 14.:	Effets des inhibiteurs de la protéine kinase C .....	94
FIGURE 15.:	Analyse de la densité optique par vidéodensitomètre .....	140

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU	I:	Effets biologiques du LPS .....	22
TABLEAU	II:	Récepteurs du macrophage .....	34
TABLEAU	III:	Produits sécrétés par les phagocytes mononucléés .....	35

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	:	acide aminé
AA	:	Acide Arachidonique
ADCC	:	"Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity"
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ADP	:	Adénosine Diphosphate
Ag	:	Antigène
AMPc	:	Adénosine Monophosphate Cyclique
AP-1	:	"Activator Protein-1"
APC	:	"Antigen Presenting Cell"
ARN	:	Acide Ribonucléique
ARNm	:	Acide Ribonucléique messenger
c- (onc)	:	proto-oncogène ou oncogène cellulaire
CD	:	"Cluster Differentiation antigen"
cm	:	centimètre
CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
cpm	:	coup par minute
CRE	:	"cAMP Responsive Element"
CREB	:	"CRE Binding Protein"
CREM	:	"cAMP responsive element modulator"
CSF	:	"Colony stimulating factor"
dCTP	:	déoxycytosine triphosphate
D. O.	:	Densité Optique
DAG	:	Diacylglycérol
DEPC	:	Diéthylpyrocarbonate
DMEM	:	"Dulbelcco's Modified Eagle Medium"
DMSO	:	Diméthyl sulfoxyde
DSE	:	"Dyad Symmetry Element"
EBSS	:	"Earle's Buffered Saline Solution"
EDTA	:	acide éthylènediaminetétraacétate

FMLP	:	n-Formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine
FPR	:	récepteur des formyl-peptides
GAPDH	:	Glycéraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase
GDP	:	Guanosine Diphosphate
GM-CSF	:	"Granulocyte-Macrophage CSF"
GR	:	"Glucocorticoid receptor"
GTP	:	Guanosine Triphosphate
h	:	heure
IFN- $\gamma$	:	Interferon gamma
IL-(1,6,8)	:	Interleukine (1,6,8)
IP	:	Phosphatidylinositol
IP3	:	Inositol 1, 4, 5 triphosphate
kb	:	kilobase
LBP	:	"LPS Binding Protein"
LDL	:	"Low-Density Lipoprotein"
LPS	:	Lipopolysaccharide
LT-(B4, C4)	:	Leucotriène (B4, C4)
M	:	Molaire
MAP	:	"Microtubule Associated Kinase"
mg	:	milligramme
ml	:	millilitre
mM	:	millimolaire
mo	:	monocyte
mø	:	macrophage
NF	:	"Nuclear Factor"
ng	:	nanogramme
nm	:	nanomètre
nM	:	nanomolaire
NK	:	"Natural Killer"
PAF	:	"Platelet Activating Factor"
PBL	:	"Peripheral Blood Lymphocyte"
PBS	:	"Phosphate Buffered Saline"
PCR	:	"Polymerase Chain Reaction"
PDGF	:	"Platelet Derived Growth Factor"

PG (E1, E2)	:	Prostaglandine (E1, E2)
PIP2	:	Phosphatidylinositol 4, 5 diphosphate
PKA	:	Protéine Kinase dépendante de l'AMPc
PKC	:	Protéine Kinase dépendante du Calcium
PMA	:	"Phorbol Myristate Acetate" aussi connu sous le nom de "TPA"
PMN	:	Polymorphonucléaire
PT	:	"Pertussis Toxin"
p/v	:	poids/volume
rpm	:	révolutions par minute
SDS	:	"Sodium Dodecyl Sulfate"
SFB	:	Sérum Foetal Bovin
SRE	:	"Serum responsive element"
SRF	:	"Serum Response Factor"
TBq	:	Tétra-Becquerel
TGF	:	"Transforming Growth Factor"
TNF $\alpha$	:	"Tumor Necrosis Factor-alpha"
TPA	:	"12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate" aussi connu sous le nom de "PMA"
U	:	Unité
UV	:	Ultraviolet
v- (onc)	:	oncogène viral
v/v	:	volume/volume
$\mu\text{g}$	:	microgramme
$\mu\text{l}$	:	microlitre
$\mu\text{m}$	:	micron
$\mu\text{M}$	:	micromolaire

## SOMMAIRE

Le dérivé bactérien n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) est un inducteur et un modulateur des réponses cellulaires impliquées dans la défense de l'hôte. Ce peptide induit le chimiotactisme ainsi que l'activation des cellules. Son action sur la modulation des cellules activées à l'aide du lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine bactérienne, n'a pas encore été caractérisée. Nous avons évalué l'action du FMLP, seule ou combinée à celle du LPS, sur l'expression de gènes marqueurs de l'activation cellulaire.

Nous avons étudié l'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund chez la lignée macrophagique RAW 264,7. Des analyses de type Northern ont été utilisées pour caractériser l'expression de ces gènes.

La présence de sérum dans le milieu de culture influence l'expression constitutive du gène c-fos. En absence de sérum, le stimulus LPS induit l'expression de c-fos, mais requiert un temps de stimulation plus long. Lors des analyses de cinétique d'expression des trois proto-oncogènes, c-fos, c-jun et jund, le LPS a induit ces trois gènes selon des temps de cinétique différents. Les temps observés étaient de 45 minutes pour le gène c-fos, 60 minutes pour le gène c-jun et de 60 à 180 minutes pour jund, en absence de sérum.

Le FMLP seul n'a pas induit l'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund. À l'opposé, le LPS seul a provoqué l'augmentation de l'expression de ces gènes et ce, de manière dose dépendante. La combinaison FMLP-LPS a permis de

potentialiser l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun en comparaison avec les stimulations FMLP seul ou LPS seul. Par contre, aucune augmentation de l'expression du proto-oncogène jund n'a été observée lors de la stimulation simultanée FMLP-LPS. Le prétraitement des cellules avec le FMLP (250 µg/ml) suivi, deux heures plus tard, d'un stimulus LPS (50 ng/ml) a montré un effet marqué dans l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun.

Des inhibiteurs de la protéine kinase dépendante du calcium (PKC), la calphostine-C et la staurosporine, n'ont pas influencé l'induction de l'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund lorsque les cellules étaient stimulées par le LPS. Les signaux de transduction utilisés par le LPS semblent donc être associés à une voie différente de celle impliquant la PKC.

Les résultats de cette étude ont démontré que le FMLP en combinaison avec le LPS, donnés simultanément ou en différé, permet de moduler l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun. Cette modulation pourrait se traduire par des activités cytotytique et sécrétoire accrues des cellules phagocytaires lorsqu'en présence de ces deux stimuli bactériens.

## INTRODUCTION

Les cellules phagocytaires jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense de l'hôte contre les infections bactériennes. Ces cellules se déplacent dans un gradient de concentration généré par des facteurs de chimiotactisme, pour lesquels ils possèdent des récepteurs spécifiques sur leur membrane plasmique, jusqu'au site d'infection. Ces facteurs de chimiotactisme regroupent le fragment C5a du complément, l'interleukine-8 (IL-8) et des peptides d'origine bactérienne comme le n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP), qui représente le peptide le plus abondant et le plus efficace dans l'induction du chimiotactisme ainsi que de l'activation cellulaire. Administré *in vivo*, le FMLP provoque une accumulation de leucocytes, de l'oedème, une augmentation de la perméabilité vasculaire et autres manifestations d'inflammation et de choc. Un autre produit bactérien, le lipopolysaccharide (LPS), est aussi un puissant activateur des leucocytes et plus particulièrement des macrophages. Il est reconnu pour être capable, chez un hôte infecté, d'induire la sécrétion de plusieurs facteurs solubles tels que les cytokines, les eicosanoïdes, les dérivés oxygénés et azotés.

La production de facteurs solubles dépend du niveau d'activation des macrophages, qui peut être évalué par l'expression de gènes marqueurs de l'activation cellulaire. Plus précisément, ces gènes marqueurs sont des proto-oncogènes comme c-fos, c-jun et jund qui caractérisent l'activation des macrophages puisqu'ils sont impliqués dans l'induction de gènes effecteurs tels que l'IL-1 et l'IL-6.

À la lumière de ces considérations, nous avons voulu vérifier l'effet d'une stimulation simultanée ou en différé(e), de deux produits d'origine bactérienne, soit le FMLP et le LPS, sur l'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund, chez les cellules de la lignée macrophagique RAW 264,7. L'évaluation de l'accumulation de l'ARNm des proto-oncogènes a été effectuée à partir de l'hybridation de l'ARN total cellulaire en présence de sondes radiomarquées spécifiques aux proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund.

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. LE N-FORMYL-MÉTHIONYL-LEUCYL-PHÉNYLALANINE

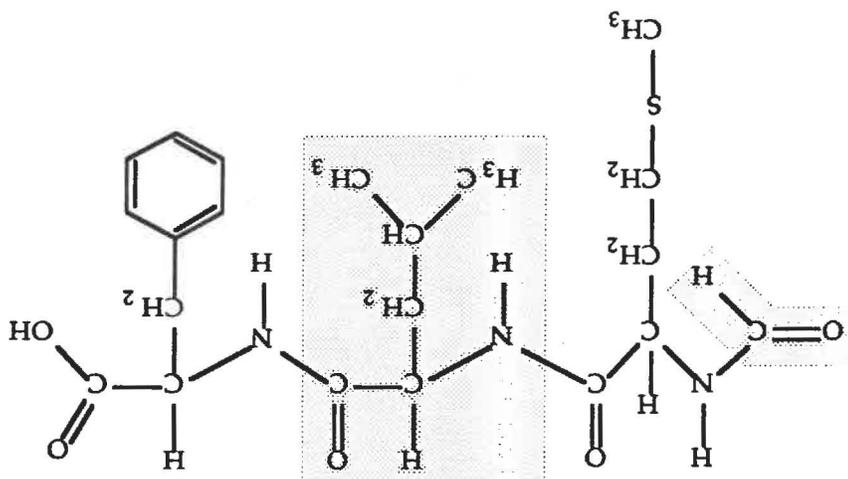
#### 1.1 Origine

Parmi les formyl-peptides libérés par la bactérie *Escherichia coli*, le n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP; Figure 1) est le résidu le plus abondant. Il dérive de la synthèse protéique bactérienne, plus spécifiquement de l'extrémité N-terminale d'une protéine impliquée dans le système de réparation de l'ADN bactérien (Broom *et al.*, 1993).

La synthèse protéique bactérienne débute en tout temps par la formylation (ajout d'un groupement CHO) de l'acide aminé (aa) méthionine; d'autres aa peuvent alors être additionnés. L'acquisition de l'activité biologique des protéines nécessite certaines modifications post-traductionnelles. Une de ces modifications consiste en l'hydrolyse de la portion N-terminale occupée par la méthionine formylée, générant ainsi des formyl-peptides de longueur et de composition en aa différentes (Schiffmann *et al.*, 1975). Une enzyme nommée déformylase permet le recyclage d'un certain pourcentage des groupements formyls (Adam, 1968), puis l'excès est largué dans le milieu extracellulaire. Les formyl-peptides se retrouvent dans les extraits bactériens (Marasco *et al.*, 1984; Miyake *et al.*, 1983) de même que dans les extraits mitochondriaux des cellules eukaryotes (Carp, 1982). Ainsi, au cours d'une invasion microbienne ou d'une destruction tissulaire, les formyl-peptides se retrouvent libérés dans l'organisme par les sécrétions bactériennes, les lyses bactériennes suite à l'action du complément (voies classique et alterne) ou les

**FIGURE 1. Structure du n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine**

Ce schéma représente la structure moléculaire détaillée du tri-peptide n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine.



n-formyl-methionyl - leucyl - phenylalanine

lyses cellulaires suite à l'oedème, dommages mécaniques ou réponse immune non-spécifique.

En effet, lors d'une infection bactérienne d'un organisme, les leucocytes produisent des dérivés oxygénés tels que le peroxyde d'hydrogène, ce qui endommage l'ADN bicaténaire des bactéries. Celles-ci, en revanche, augmentent la synthèse de la protéine impliquée dans le système de réparation de l'ADN bactérien, ce qui a pour résultat de quadrupler la libération de FMLP (Broom *et al.*, 1993).

## 1.2 Effets biologiques

### 1.2.1 Chimiotactisme

Les formyl-peptides induisent le déplacement orienté appelé chimiotactisme, de certains leucocytes. Ainsi, les cellules se polarisent lorsqu'elles détectent une différence de concentration entre les deux côtés opposés de leur membrane plasmique. Ce moment caractérise l'initiation du changement métabolique, par exemple dans la polymérisation de l'actine permettant à la cellule d'activer sa locomotion. De cette façon, les polymorphonucléaires (PMN), les monocytes (mo) et les macrophages (mø) se déplacent dans le gradient de concentration généré par les formyl-peptides. (Schiffmann et Gallin, 1979).

Le pouvoir de chimiotactisme des formyl-peptides nécessite la présence du résidu formyl-méthionyl. Les formyl-peptides les plus actifs contiennent au moins deux autres aa, et les plus efficaces contiennent des aa hydrophobes tels que la leucine, la phénylalanine et le tryptophane (Schiffmann *et al.*, 1975b). Le FMLP, qui consiste en une leucine et une phénylalanine ajoutées au radical formyl méthionyl, présente non seulement un chimiotactisme mais aussi un pouvoir d'activation

cellulaire très supérieurs aux autres formyl-peptides, ce qui fait du FMLP un modèle de choix pour étudier ces deux propriétés.

## **1.2.2 Activation cellulaire**

### **1.2.2.1 Le FMLP seul**

Au cours d'une infection bactérienne ou d'une inflammation, les cellules se déplacent jusqu'à la source selon l'augmentation du gradient de concentration formé par le FMLP (Snyderman et Uhing, 1992). Une concentration de FMLP de  $10^{-8}$  M suffit à induire le chimiotactisme des cellules et, lorsque celles-ci rencontrent le FMLP en concentration de dix à vingt fois supérieure, elles cessent leur mouvement et entament leur processus d'activation cytolitique. Celui-ci se caractérise d'abord par le largage de facteurs rapidement disponible tels que les dérivés oxygénés puis, par la libération d'enzymes lysosomiales, par une augmentation de la phagocytose et de l'agrégation des cellules induite par les éicoisanoïdes (prostaglandines, tromboxanes et leucotriènes).

### **1.2.2.2 Combinaison de l'action du FMLP à celle d'autres molécules**

Sur le site d'inflammation ou d'infection, en plus du FMLP, de nombreuses cytokines, dérivés bactériens, métabolites oxygénés et éicoisanoïdes sont susceptibles d'être présents. Le FMLP permet de potentialiser ou d'inhiber l'action de ces molécules. La synergie qu'exerce le FMLP sur les leucocytes devient alors d'importance considérable; cette synergie peut, dans certains cas, être bénéfique et dans d'autres néfaste.

Par exemple, Bauldry *et al.* (1991) ont observé qu'un pré-traitement des PMN humains avec le facteur nécrosant des tumeurs (TNF), suivi de la stimulation

avec le FMLP, augmente la production d'éicoisanoïdes, incluant le leucotriène B4 (LTB4) chimiotactique, et du facteur d'activation des plaquettes (PAF), par rapport aux témoins. Un pré-traitement des PMN humains avec le facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) potentialise leur agrégation lors de stimulation avec le FMLP (Conti *et al.*, 1992). Par contre, aucun effet potentialisateur n'a pu être observé lors des pré-traitements avec l'IL-1, l'IL-6 ou le TNF, ce qui va à l'encontre des résultats de Bauldry *et al.* (1991). Ni le GM-CSF ni l'IL-6 seuls n'induisent, chez les PMN, la production des dérivés de l'acide arachidonique (AA) responsables de l'agrégation des PMN, soient le LTB4 et le tromboxane A2 (TXA2). Takafuji *et al.* (1992) ont observé que le traitement simultané des éosinophiles avec le TNF et le FMLP augmente la production d'un éicoisanoïde impliqué dans les étapes précoces de l'inflammation, le leucotriène C4 (LTC4), sans toutefois modifier la production de LTC4 des basophiles. À l'opposé, l'action combinée du FMLP et d'un analogue du récepteur du TNF, le "nerve growth factor" (NGF) induit la synthèse de LTC4 chez les basophiles mais pas chez les éosinophiles.

D'autre part, le traitement de neutrophiles humains avec le FMLP et les prostaglandines-E1 (PGE1), l'histamine, les cathécolamines (Mueller *et al.*, 1992) ainsi que l'action du vaso-peptide intestinal (VIP) sur les lymphocytes du sang périphérique (PBL) humain (Kurosawa et Ishizuka, 1993), diminuent la production de superoxyde ( $O_2^-$ ) induite normalement par le FMLP. De même, l'action simultanée du FMLP et du fragment Fab d'un anticorps dirigé contre le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines diminue le chimiotactisme des neutrophiles (Kew *et al.*, 1992). Par ailleurs, la composante C5a du complément, administrée cinq minutes avant l'ajout de FMLP, diminue la polarisation de l'actine,

probablement impliquée dans la motilité cellulaire, mais augmente substantiellement la production de superoxyde chez les neutrophiles humains (Dobos *et al.*, 1992).

Dans d'autres cas, les effets biologiques du FMLP entrent en synergie avec les endotoxines bactériennes, telles que le lipopolysaccharide (LPS) contenu dans la paroi des bactéries Gram négatives. Chez le rat par exemple, l'administration combinée d'un formyl-peptide similaire au FMLP, le N-formyl-néoleucyl-leucyl-phénylalanine (FNLP), et du LPS, entraîne des dommages pulmonaires caractérisés par une infiltration anormale de l'albumine sanguine à l'intérieur des poumons (Anderson *et al.*, 1991). Chez la souris, le pré-traitement *in vivo* avec le FMLP (1-24 hres) suivi de la stimulation *in vitro* des mØ péritonéaux par le LPS amène l'inhibition de la bioactivité du TNF (Tremblay *et al.*, 1991). De même, des expériences *in vitro* utilisant des mØ péritonéaux murins induits par le thioglycollate ont permis d'observer une augmentation de la bioactivité du TNF, lorsque les cellules sont d'abord traitées avec le FMLP puis par le LPS. Lorsque les traitements de mØ induits avec ces deux dérivés bactériens sont donnés simultanément, la bioactivité du TNF est inhibée. Il en est de même lorsque la stimulation par le LPS est suivie par le signal FMLP (Tremblay *et al.*, en préparation).

### 1.3 Le récepteur cellulaire du FMLP

Les cellules reconnaissent spécifiquement le FMLP par l'intermédiaire d'un récepteur, le récepteur des formyl-peptides (FPR). La reconnaissance du peptide requiert la présence du groupement formyl. La méthionine formylée du FMLP s'adapte à la poche hydrophobe du récepteur cellulaire, ce qui permet la formation

d'un pont disulfure avec un acide aminé sulfuré localisé dans une région de la poche chargée positivement (Freer *et al.*, 1982).

### 1.3.1 Mise en évidence du récepteur

L'utilisation de FMLP radiomarqué (FML[<sup>3</sup>H]P) a permis de mettre en évidence la présence de FPR sur les PMN (Williams *et al.*, 1977), les cellules adhérentes (Weinberg *et al.*, 1981) et non-adhérentes du sang périphérique humain (Benyunes et Snyderman, 1984), les phagocytes mononucléés de cochon d'inde (Snyderman et Fudman, 1980) ainsi que sur les neutrophiles de rat (Walker *et al.*, 1991). Le nombre de récepteurs par cellule varie selon l'espèce et le type cellulaire.

La présence du récepteur des formyl-peptides a été mise en doute chez les *mø* provenant de rats et de souris. Walker *et al.* (1991) n'ont observé aucune production de superoxyde lorsque les *mø* recrutés et les *mø* alvéolaires de rat étaient stimulés par le FMLP. De plus, dans le cas des *mø* alvéolaires, aucune élévation dans les niveaux de calcium intracellulaire suivant une stimulation par le FMLP n'a été observée. L'identification des récepteurs par la liaison de FML[<sup>3</sup>H]P s'est également avérée infructueuse.

Par contre, Tremblay *et al.* (en préparation) ont récemment démontré la présence du récepteur pour le FMLP sur les *mø* péritonéaux de souris induits par le thioglycollate. La présence du récepteur a également été vérifiée pour la première fois chez les cellules de la lignée continue macrophagique de souris, RAW 264,7. L'identité de ce récepteur a été démontrée par la liaison d'un formyl-peptide fluorescent à la surface cellulaire. La spécificité de cette liaison a aussi été démontrée, et ce, par le déplacement du formyl-peptide fluorescent par une forte concentration de formyl-peptide non-fluorescent (Tremblay *et al.*, en préparation).

Le récepteur des formyl-peptides a partiellement été purifié (Allen *et al.*, 1990), et reconstitué de façon fonctionnelle *in vitro* (Coats et Navarro, 1990; Murphy *et al.*, 1990). Récemment, le récepteur des formyl-peptides des PMN humains (Boulay *et al.*, 1990a, 1990b) et des neutrophiles de lapins (Ye *et al.*, 1993) ont été clonés et séquencés. Ils présentent 78% d'homologie entre eux (Ye *et al.*, 1993) et leur profil hydrophatique suggère que le FPR comporte sept domaines transmembranaires. Un de ces domaines ressemble à celui que comprennent d'autres récepteurs pouvant se lier aux protéines G (Boulay *et al.*, 1990). Ces dernières transmettent, vers l'intérieur de la cellule, les signaux provenant des récepteurs membranaires. La caractérisation par Koo *et al.* (1983) ainsi que par Snyderman *et al.* (1984) du FPR, sous forme de complexe, a permis d'étudier son interaction avec une protéine G. On a de plus découvert qu'il comporte des sites potentiels de glycosylation et de phosphorylation. Sous sa forme glycosylée, le récepteur présente un poids moléculaire d'environ 50-70 kDa (Niedel *et al.*, 1980) et lorsque non-glycosylé, un poids moléculaire de 32 kDa (Boulay *et al.*, 1990). Sa conformation ressemble à celle des récepteurs de l'IL-8 et du C5a, molécules qui sont également pourvues de la propriété de chimiotactisme (Snyderman et Uhing, 1992).

Le FPR présente deux affinités: une forme de haute et une forme de faible affinité (Koo *et al.*, 1982). Le récepteur de haute affinité permet de capter le FMLP présent en faible concentration (Allen *et al.*, 1990). Une fois le FMLP capté, la liaison d'une protéine G localisée à la surface interne de la membrane plasmique vient interagir avec le FPR-FMLP. Cette interaction modifie l'affinité du récepteur ce qui permet l'activation de la protéine G. Par contre, la forme de haute affinité du FPR ne peut pas initier le signal de transduction généré par la liaison du FMLP.

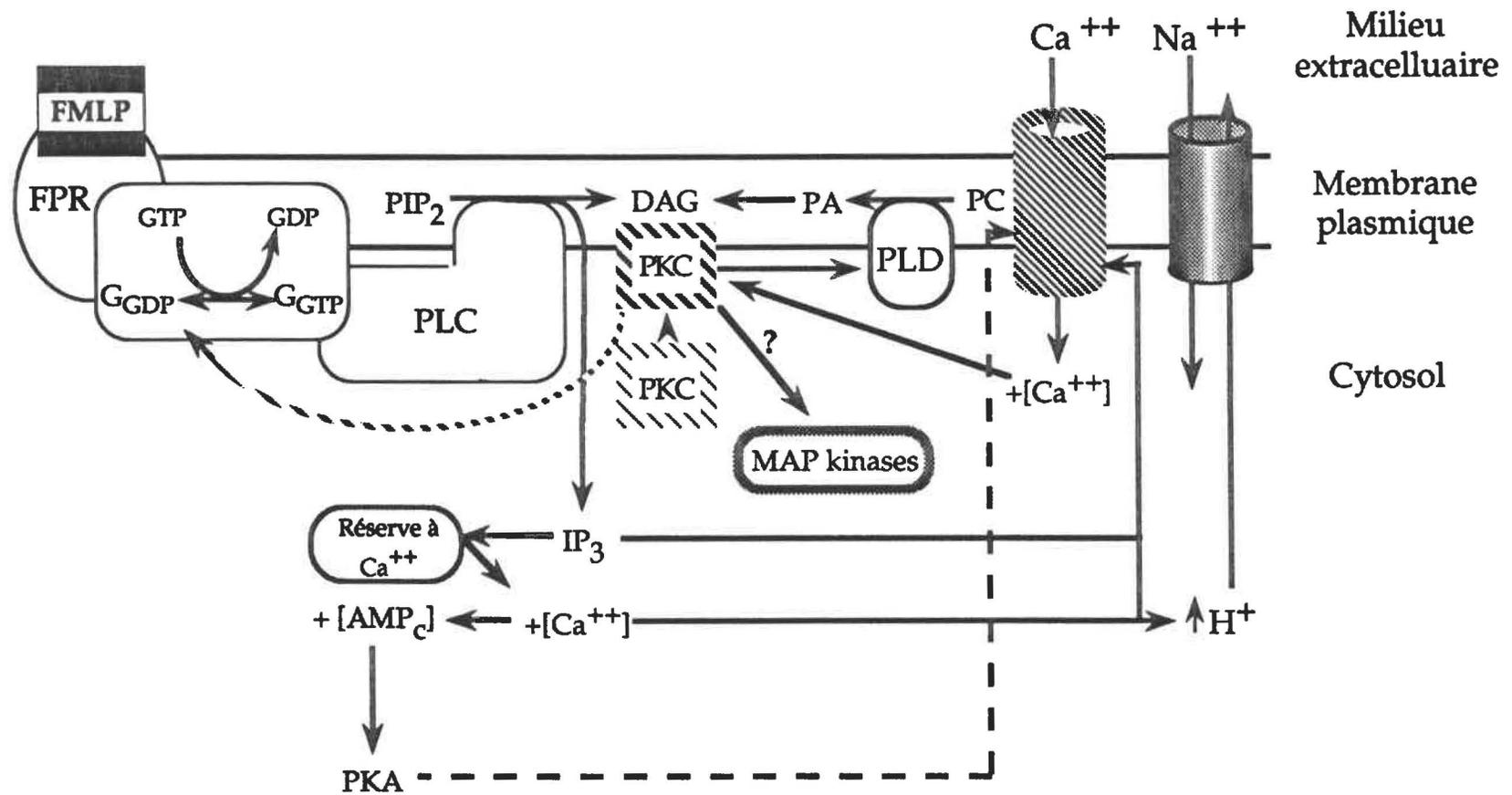
Ainsi, l'habileté des cellules à être activées est reliée au pourcentage de récepteurs présents sous la forme de faible affinité. L'affinité du FPR est donc sujette à la concentration environnante de formyl-peptide.

### 1.3.2 Voies de transduction utilisées par le FMLP

La liaison du FMLP au FPR initie une cascade d'événements (Figure 2) qui mène aux changements métaboliques décrits à la section 1.2.2.1. La transduction du signal d'interaction FMLP-FPR fait intervenir plusieurs intermédiaires qui modulent l'activité et l'expression de protéines impliquées dans les modifications métaboliques cellulaires. D'abord, une protéine G, dépendante du nucléotide guanosine triphosphate (GTP), en s'associant au complexe FPR-FMLP, initie la cascade de transduction de signal, les protéines G étant impliquées dans plusieurs systèmes de transduction de signaux (Gilman, 1987). Une fois complexée à un récepteur activé, la protéine G échange un nucléotide guanosine diphosphate (GDP) pour un GTP. Cet événement marque la dissociation du transducteur (protéine G) du récepteur ainsi que la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine des autres sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Le GTP lié à la sous-unité  $\alpha$  active ensuite une protéine effectrice qui varie d'un système de transduction à l'autre. L'ajout du GTP et du GDP à des préparations membranaires de neutrophiles ont permis à Koo *et al.* (1983) ainsi qu'à Snyderman *et al.* (1984) d'observer que l'affinité du FPR pour le FMLP est modulée par l'interaction protéine G-complexe FPR-FMLP. De plus, la protéine G est sensible à l'action d'une toxine, la toxine de Pertussis (PT), qui effectue une ADP-ribosylation de la protéine G sur le site réservé au GDP, permettant ainsi son inhibition (Lad *et al.*, 1985). Par ailleurs, la purification chromatographique partielle des FPR a permis d'observer sa liaison avec deux types de protéines G de poids moléculaires distincts. Ces observations suggèrent

**FIGURE 2. Transduction de signaux par le récepteur des formyl-peptides**

Ce schéma illustre la cascade de signaux de transduction initiée par la liaison du n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) au récepteur des formyl-peptides (FPR). Le complexe FPR-FMLP permet la liaison d'une protéine G hydrolysant le GTP (guanosine triphosphate), qui amorce à son tour l'activation de la phospholipase C (PLC). Activée, la PLC transforme l'inositol diphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol 3-phosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> favorise l'augmentation de [Ca<sup>2+</sup>] intracellulaire par l'ouverture des réserves et des canaux à Ca<sup>2+</sup>. L'augmentation de [Ca<sup>2+</sup>] de même que l'accumulation de DAG favorise la translocation vers la membrane plasmique et l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'activation d'une phospholipase D (PLD) vient compléter l'apport de DAG en transformant le lipide membranaire phosphatidyl-choline (PC) en acide phosphatidique (PA) et en DAG. De plus, la PKC active, par un processus indéterminé, une autre famille de kinases, les "microtubule activated protein kinases" (MAP). L'augmentation de [Ca<sup>2+</sup>] entraîne une accumulation de l'AMPc et modifie le pH intracellulaire. La protéine kinase A (PKA) exerce une rétroaction sur l'apport de Ca<sup>2+</sup> en inhibant le canal à Ca<sup>2+</sup>. Une rétroaction est également exercée par la PKC, envers les protéines G. (D'après Snyderman *et al.*, 1986)



— Signaux d'activation  
 - - Signaux de rétroaction

que les différentes réponses transduites par le FPR, d'une part, le chimiotactisme et d'autre part, l'activation cytolytique, requièrent des séquences d'événements intracellulaires distinctes (Polakis *et al.*, 1989).

Une fois activée, la protéine G s'associe à la phospholipase-C, une enzyme intracellulaire capable de scinder le lien phosphodiester du phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) situé dans la membrane cellulaire. Cette réaction donne naissance à l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et au diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> induit la libération de calcium des réserves intracellulaires de calcium puis, la formation de DAG favorise la translocation d'une protéine kinase calcium-dépendante (PK-C) vers la membrane cytoplasmique, ce qui permet son activation. Activée, la PK-C active à son tour de nombreuses protéines cellulaires en effectuant la phosphorylation de leurs résidus sérines ou thréonines. Les substrats de la PK-C sont des enzymes ou bien des facteurs possédant la propriété de lier l'ADN, ce qui initie la synthèse de nouvelles protéines nécessaires à la modification du métabolisme cellulaire décrite à la section 1.2.2.1.

L'augmentation simultanée du calcium intracellulaire par IP<sub>3</sub>, accroît la formation d'AMP cyclique (AMP<sub>c</sub>) qui, à son tour induit l'activation de protéines kinases AMP<sub>c</sub> dépendantes (PK-A). Les PK-A activent, par phosphorylation de leurs résidus sérines et thréonines, des substrats autres que ceux activés par les PK-C (Snyderman et Uhing, 1992).

Le déclenchement des activités cytolytique et anti-microbienne des cellules par le FMLP nécessite une stimulation accrue des PK-C et l'apport de calcium du milieu extracellulaire par l'intermédiaire des canaux à calcium. Pour satisfaire à la demande de PK-C stimulées et à la grande concentration de calcium intracellulaire

requis, une seconde voie de formation de DAG est parallèlement empruntée. Les taux élevés de calcium favorisent l'activation d'une phospholipase-D, une enzyme qui catalyse la transformation d'un phospholipide membranaire, la phosphatidylcholine, en acide phosphatidique et en DAG. La hausse de DAG augmente alors la mobilisation des PK-C vers la membrane plasmique, ce qui accroît la quantité de PK-C activée (Snyderman et Uhing, 1992).

Des kinases autres que la PK-C interviennent également dans les voies de transduction initiées par le FMLP. Torres *et al.* (1993) ainsi que Thompson *et al.* (1993) ont observé que le FMLP active des protéines kinases associées aux microtubules (MAP) de manière dose dépendante. Ces "MAP kinases", de la famille des sérine et thréonine kinases, sont aussi connues sous le nom de ERK-1 (42 kDa) et ERK-2 (44 kDa) ("extracellular signal regulated kinase"). Les MAP kinases sont activées par la phosphorylation de leurs résidus sérines et thréonines. Ces phosphorylations sont induites par plusieurs stimuli tels les esters de phorbol (PMA), l'insuline, l'IL-1, et des facteurs de croissance. Les MAP kinases ont comme substrat, entre autres, le proto-oncogène c-jun (discuté au Chapitre 4). La distribution cellulaire des MAP kinases, leur capacité d'être stimulées par plus d'un stimulus, de même que leurs multiples effets, permettent de qualifier les MAP kinases "d'éléments d'intégration des voies de transduction" (Torres *et al.*, 1993).

### 1.3.3 Signaux de terminaison

L'activation cellulaire par le FMLP est un phénomène transitoire. Par exemple, la production rapide de superoxyde revient à son niveau basal dans les cinq minutes suivant la stimulation par le FMLP. Ces résultats indiquent qu'un ou plusieurs mécanismes de rétroaction existent pour éliminer le signal d'activation

du FMLP. La vitesse d'hydrolyse du FMLP, ainsi que le recyclage du FPR, influencent l'élimination du signal d'activation du FMLP. L'augmentation d'AMPc favorise l'activation de la PK-A, qui elle-même exerce une rétroaction sur l'apport de calcium et sur la formation de DAG. La rétroaction de la PK-C pourrait aussi s'exercer sur la liaison de la protéine G à la phospholipase-C. Le couplage de la protéine G au FPR peut être influencé par la phosphorylation de sites potentiels de phosphorylation découverts sur la séquence du FPR.

Le FMLP agit seul, ou de concert avec d'autres ligands, en potentialisant ou désensibilisant leurs actions (Snyderman et Uhing, 1992). Ces phénomènes s'expliquent en partie par l'utilisation de voies de transduction communes. De plus, l'action qu'exerce le FMLP varie selon le type et la différenciation cellulaire. Son pouvoir modulateur lui confère un rôle important dans le processus d'inflammation aiguë. Ainsi, il devient un candidat intéressant pour la modulation de l'inflammation chronique.

## 2. LE LIPOPOLYSACCHARIDE

Le lipopolysaccharide (LPS) est une composante structurale de la paroi externe de toutes les bactéries Gram-négatives. Ce composé, appelé aussi "endotoxine", est un puissant activateur des leucocytes. Il est reconnu pour être capable d'induire un état de septicémie chez un hôte infecté. Cet état de septicémie peut alors résulter en une réponse immunitaire orchestrée par les mo et les m $\phi$ , en réaction contre l'infection bactérienne.

Les mo et les m $\phi$  réagissent à des concentrations de LPS de l'ordre du picomolaire dans l'organisme et produisent une grande variété de médiateurs solubles en réponse à sa présence. Ces facteurs solubles sont divers et incluent les cytokines, les éicosanoïdes, les dérivés oxygénés et azotés.

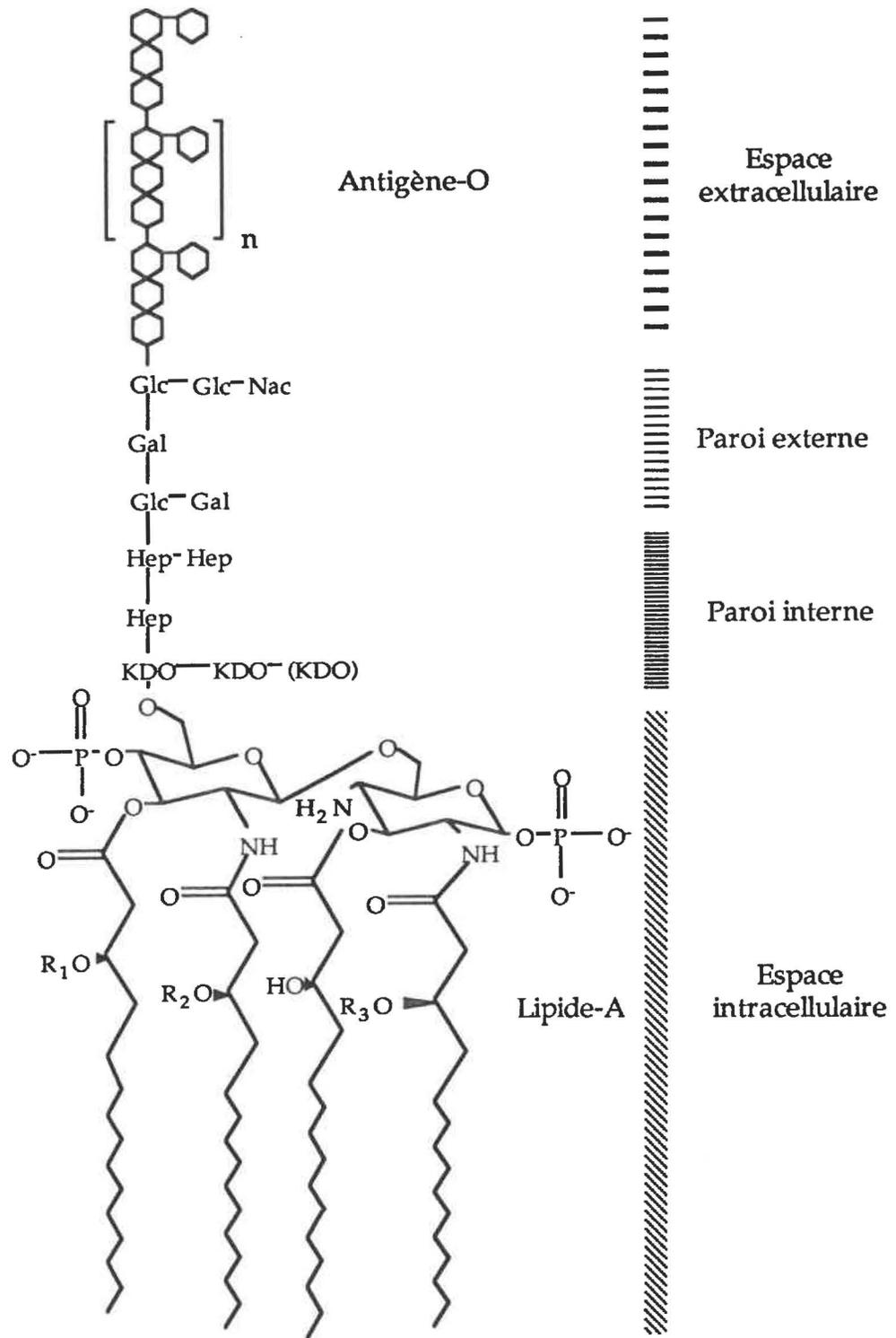
### 2.1 Structure des lipopolysaccharides

Le LPS est constitué de deux composantes morphologiquement distinctes (Figure 3). La composante hydrophile, d'une part, comporte une partie glycolipidique dénommée "antigène-O", dont la structure s'amorce dans la paroi interne de la bactérie pour se déployer dans l'espace extracellulaire. D'autre part, la composante hydrophobe, appelée "lipide-A", consiste en chaînes polysaccharidiques variables, reliées entre elles par des résidus glucosamines.

Une grande diversité structurale existe entre les antigènes-O de différentes espèces bactériennes Gram-négatives. Par contre, la portion lipide-A est relativement bien conservée entre les espèces bactériennes Gram-négatives. C'est cette partie qui confère au LPS ses propriétés activatrices, comme en témoignent

**FIGURE 3. Structure du lipopolysaccharide**

Ce schéma illustre la structure du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS se compose d'une portion polysaccharidique représentant l'antigène-O (d'après Cavaillon et Haeffer-Cavaillon, 1990). Une partie composée de résidus glucose (Glc), de galactose (Gal) et de n-acétyl-glucosamine (Nac) permet l'ancrage à la paroi bactérienne externe. La partie traversant la paroi interne est constituée de résidus Hep et d'acide 2-céto-3-déoxyoctonique (KDO), tandis que la partie active du LPS, le lipide-A, se retrouve orienté vers l'espace intracellulaire. Le lipide-A est formé de quatre chaînes lipidiques reliées par un groupement disaccharide diphosphate.



des études réalisées avec une composante lipide-A synthétique (Takada et Kotani, 1989).

## 2.2 Activités biologiques

La présence dans l'organisme d'une quantité abondante de bactéries Gram-négatives se manifeste par un état de septicémie qui est le résultat de l'action des endotoxines bactériennes, surtout le LPS. Ce dernier est responsable de l'activation des leucocytes, en particulier les  $m_0$  et les  $m_1$ , qui sécrètent de l'IL-1, du TNF- $\alpha$  et d'autres médiateurs de l'inflammation tels que les dérivés oxygénés et les éicosanoïdes. Par ailleurs, le LPS stimule les cellules épithéliales, active les plaquettes sanguines et les voies classique et alterne du complément. Ces différents effets possibles du LPS, sur l'organisme, sont exposés brièvement dans le Tableau I.

Le LPS induit des modifications importantes dans le métabolisme cellulaire. Par exemple, la stimulation du  $m_1$  par le LPS initie l'activation des gènes de compétence tels que JE et KC (Introna *et al.*, 1987), codant pour deux protéines de chimiotactisme spécifiques aux monocytes (Hanazawa *et al.*, 1992; Rollins, 1991), ainsi que les proto-oncogènes *c-fos*, *c-myc* (Introna *et al.*, 1986) et *c-jun* (Kaminska *et al.*, 1992). Ces gènes sont impliqués dans le processus d'acquisition de la compétence cellulaire tel que décrit dans le chapitre IV.

La stimulation des cellules de la lignée macrophagique RAW 264,7 par le LPS diminue la quantité d'ARNm du gène *c-fms*, gène dont le produit est le récepteur du CSF (rCSF) (Gusella *et al.*, 1990). L'expression de ce récepteur sur la membrane plasmique a également été étudiée par l'équipe de Baccharini *et al.* (1992),

TABLEAU I. Effets biologiques du LPS

Cibles biologiques	Réactions au LPS
Mo / mø	Sécrétion de cytokines: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CSF, TGF- $\beta$ Sécrétion de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 Intermédiaire de l'inflammation: prostanoïdes, leucotriènes, PAF Augmentation de l'adhérence à l'endothélium Production de facteurs tissulaires Augmente la flambée oxydative
Neutrophiles	Augmente l'expression et l'adhésion des intégrines Production de superoxyde Sécrétion de cytokines (ex. IL-1)
Cellules B	Favorise la prolifération des cellules B Sécrétion de CSF
Cellules épithéliales	Sécrétion de facteurs de chimiotactisme pour les PMN
Plaquettes sanguines	Induction de l'agrégation des plaquettes Sécrétion de sérotonine Activation des protéines kinases C
Complément	Activation directe du complément par la génération des produits C3a et C5a

qui a démontré qu'une activation des cellules RAW 264,7 par le LPS augmente la dégradation des rCSF exprimés à la surface cellulaire. De plus, l'action combinée du LPS avec l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), une cytokine, amplifie le processus de dégradation de ces récepteurs. En utilisant la lignée macrophagique BAC-1.2F5, dépendante du CSF, l'équipe de Baccarini a également démontré que la diminution du nombre de rCSF est un processus dépendant de la PKC. Cette équipe suggère que la modulation négative des récepteurs de croissance (rCSF) fait partie d'un processus de conservation d'énergie, dont le but serait de diminuer l'influence des signaux de croissance ou de chimiotactisme chez les  $m\phi$  activés, leur permettant ainsi d'optimiser l'expression de leur activité anti-bactérienne.

Par ailleurs, le LPS induit la mobilisation à la surface membranaire des récepteurs pour l'agent chimiotactique FMLP qui sont localisés dans les réserves du cytoplasme des neutrophiles humains (Norgauer *et al.*, 1991). Ce phénomène contribue à augmenter le nombre total de FPR disponibles à la surface cellulaire en présence de FMLP, augmentant ainsi le chimiotactisme des neutrophiles. Les résultats de Baccarini *et al.* (1992) et Norgauer *et al.* (1991) suggèrent que le LPS n'a pas le même effet sur la mobilisation des neutrophiles que sur la régulation des  $m\phi$  activés. Le LPS peut donc agir différemment, selon les types de cellules et selon les fonctions cellulaires.

Les  $m\phi$  stimulés de façon successive avec des faibles doses de LPS ne réussissent plus à produire de TNF (Virca *et al.*, 1989). Ce phénomène, appelé "désensibilisation", implique dans ce cas que le LPS induit une tolérance vis-à-vis son propre signal. Toutefois, il semble que l'acquisition de cette "tolérance" ne soit pas induite directement par le LPS, puisque des surnageants de  $m\phi$  péritonéaux

murins stimulés avec du LPS et ensuite privés de celui-ci, induisent cette même tolérance, qui s'avère être sélective: les *mø* sont en effet réfractaires à la production de TNF, mais gardent leur capacité de sécrétion d'IL-1 et d'IL-6 (Feist *et al.*, 1992).

### 2.3 Les récepteurs cellulaires du LPS

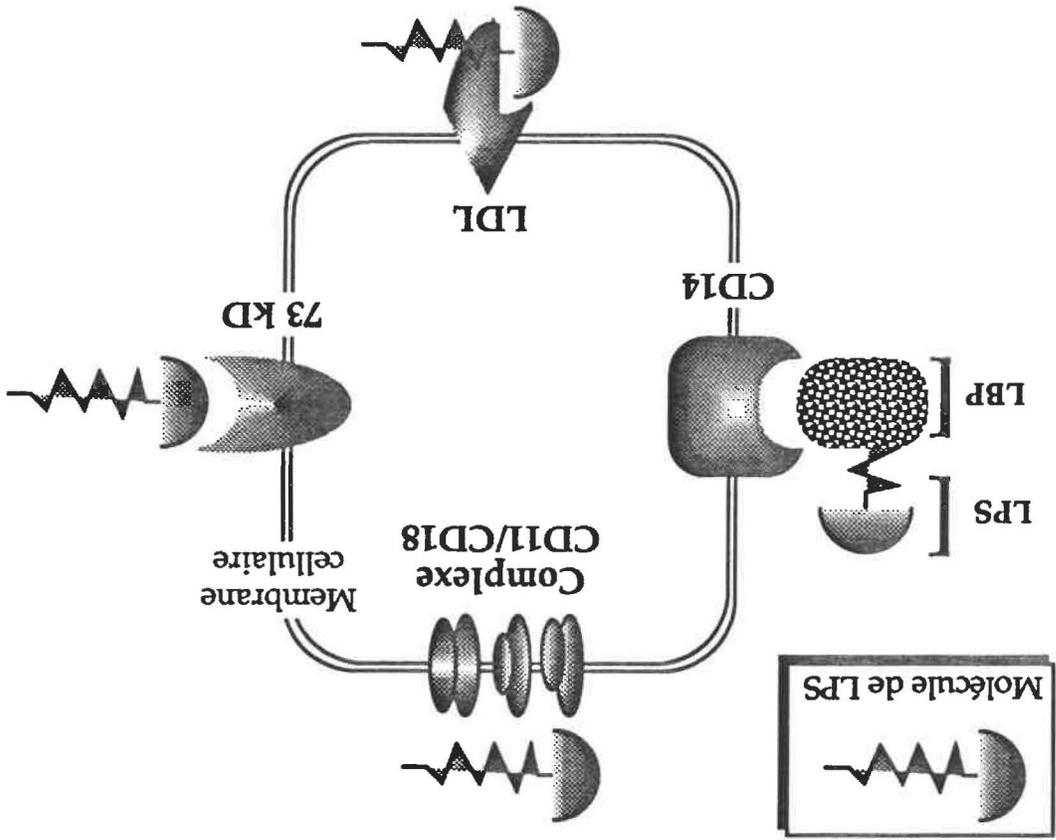
Plusieurs faits suggèrent que plus d'un type de récepteur cellulaire est impliqué dans la réponse spécifique du LPS (Figure 4). La liaison du LPS à certains récepteurs active la réponse cellulaire, tandis que d'autres récepteurs ont comme fonction de seulement lier ou encore de capter la bactérie Gram-négative par l'entremise de la portion polysaccharidique, favorisant ainsi la détoxification de l'organisme (Lynn et Golenbock, 1992).

#### 2.3.1 Le récepteur de 73 kDa

Le groupe de Lei et Morrison (1988a; 1988b) a identifié une protéine de 73 kDa capable de lier le LPS. Cette protéine a d'abord été identifiée sur les splénocytes et les *mø* de souris à l'aide d'une sonde LPS photo-activée. La liaison d'un anticorps monoclonal généré contre cette protéine de 73 kDa (Lei *et al.*, 1991) permet l'activation cellulaire similaire à celle induite par le LPS, ce qui suggère que cette protéine de 73 kDa peut être un récepteur pour le LPS. Cette protéine de 73 kDa, d'abord identifiée comme ayant un poids moléculaire de 80 kDa, est présente sur les cellules mononuclées de toutes les espèces animales sensibles aux effets du LPS (Roeder *et al.*, 1989). Des travaux utilisant la même sonde photo-activée, mais avec une stratégie légèrement différente, ont permis à Dziarski (1991a,1991b) de mettre en évidence une protéine de 70 kDa capable de lier le LPS ainsi qu'une autre composante de la paroi bactérienne, le peptidoglycane. Cependant, ce récepteur de 70 kDa s'est révélé être le même que le récepteur de 73 kDa identifié par Lei et

**FIGURE 4. Récepteurs du lipopolysaccharide**

Cette figure représente les différents récepteurs pour le lipopolysaccharide (LPS) présents sur la membrane cellulaire. Le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL), le complexe CD11/CD18, le récepteur de 73 kDa ainsi que le récepteur CD14 dont la liaison du LPS nécessite l'implication de la "LPS binding protein" (LBP) sont représentés.



Morrison (1988). Ces résultats indiquent que la possibilité de liaison du récepteur de 73 kDa n'est pas exclusive au LPS.

D'autre part, Hura-kuge *et al.* (1990) ont identifié et caractérisé un mutant de la lignée macrophagique murine J774, insensible au LPS. Ce mutant, nommé "LR-9", est incapable d'exprimer deux protéines présentes sur la lignée mère (J774), l'une de 65 kDa et l'autre de 55 kDa. Ces protéines de 65 et 55 kDa confèrent donc la capacité d'induction au LPS chez la lignée mère, J774. Toutefois, il est possible que les protéines de 55 et 65 kDa soient similaires à celle de 73 kDa puisque les groupes de Hura-kuge et de Lei et Morrison ont utilisé les mêmes sondes photo-activées. De plus, l'équipe de Hura-kuge n'a pas réussi à identifier la protéine de 73 kDa précédemment identifiée par le groupe de Lei et Morrison.

### 2.3.2 Le récepteur CD11/CD18

Le complexe CD11/CD18, de poids moléculaire de 95 kDa, est un récepteur de la famille moléculaire nommée "intégrine". Ce récepteur est formé par l'association du CD11a ou CD11b ou CD11c avec le CD18. Cette protéine de surface est impliquée dans la reconnaissance directe (reconnaissance sans l'opsonisation d'Ac ou d'élément du complément) des molécules de LPS, tant qu'elles restent intégrées à la paroi bactérienne. Les formes purifiées du LPS ne peuvent interagir avec le complexe CD11/CD18. Ce complexe hétérodimérique n'est pas impliqué dans l'initiation d'une réponse biologique caractéristique au LPS, il favorise seulement la dégradation du LPS dans les cellules (Wright *et al.*, 1989). En effet, Wright *et al.* (1990a), en utilisant des neutrophiles et des mØ de patients déficients pour le récepteur CD11/CD18, ont démontré que l'activation cellulaire induite par le LPS n'était pas affectée.

### 2.3.3 Le récepteur des lipoprotéines de faible densité

Le récepteur cellulaire des lipoprotéines de faible densité ("low-density-lipoprotein"; LDL) retrouvé à la surface des mo et des m $\phi$ , reconnaît la portion lipide-A du LPS, puisqu'un analogue ( $[^{32}\text{P}]$ -lipide IVa) lie spécifiquement ce récepteur. Par ailleurs, l'ajout de LDL déplace, par compétition, le lipide-A radiomarqué du récepteur des LDL, ce qui signifie que le récepteur des LDL est également utilisé par le LPS. De plus, le récepteur des LDL ne joue aucun rôle dans l'activation cellulaire, puisque l'addition de LDL qui permet de bloquer l'accès du récepteur au LPS, ne modifie pas la production de cytokines induites par le LPS (Hampton *et al.*, 1991). La liaison du LPS au récepteur des LDL facilite son entrée dans les cellules ce qui favorise sa dégradation et son élimination de l'organisme.

### 2.3.4 Le récepteur CD14

La liaison du LPS au marqueur de surface CD14 des monocytes, est un phénomène indirect qui nécessite l'intervention d'une glycoprotéine liant le LPS, la "LPS binding protein" (LBP), protéine de 60 kDa présente dans le sérum (Tobias *et al.*, 1986). La LBP lie le LPS libre, puis transfère ce dernier sur le récepteur CD14. Le transfert des molécules de LPS peut être bloqué par l'action d'anticorps monoclonaux anti-CD14. Ceux-ci empêchent la sécrétion de TNF induite par le LPS, tandis que des anticorps dirigés contre un autre récepteur du LPS, le CD18 n'ont aucun effet inhibiteur sur l'expression de TNF (Wright *et al.*, 1990b). Par ailleurs, des immunoprécipitations de la protéine LBP ont permis d'inhiber la sécrétion de TNF induite par le LPS (Schumann *et al.*, 1990). Ces deux résultats suggèrent l'importance du rôle du récepteur CD14 dans l'activation cellulaire du LPS. De plus, la présence de ce récepteur n'est pas essentielle pour l'activation

cellulaire par le LPS puisque plusieurs cellules sensibles à ce dernier n'expriment pas le CD14. En effet, des mo et des PMN peuvent quand même être activés par de fortes concentrations de LPS en absence de sérum et donc en absence de LBP (Lynn et Golenbock, 1992).

La lignée murine de lymphocytes pré-B 70Z/3 se caractérise par l'absence du récepteur CD14 sur la membrane plasmique des cellules. Les cellules de cette lignée expriment à leur surface cellulaire des immunoglobulines M (IgM), à la suite d'une stimulation par le LPS, ce qui montre que le LPS agit selon un processus d'activation cellulaire indépendant du CD14. À partir des cellules 70Z/3 dépourvues du récepteur CD14, Lee *et al.* (1992) ont développé un nouveau phénotype cellulaire, à l'aide de vecteurs d'expression contenant un ADN complémentaire (ADNc) du CD14 humain. Ces nouvelles cellules, nommées 70Z/3-hCD14, expriment le CD14 humain et sont activées par des concentrations de LPS très inférieures à celles requises pour stimuler les cellules 70Z/3. Les cellules 70Z/3-hCD14 en présence de la protéine LBP, ont la capacité de lier une plus grande proportion de LPS que les cellules de la lignée mère, 70Z/3. Cette augmentation de la liaison des molécules de LPS peut être bloquée par l'addition d'un antisérum anti-CD14. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'ajout de la phospholipase-C (PLC), enzyme qui dépend de la catalyse du phosphatidylinositol (IP) pour être activée. L'action de la PLC permet l'internalisation d'un plus grand nombre de récepteurs CD14, ce qui diminue la liaison du LPS. De plus, la stimulation des cellules 70Z3-hCD14 par le LPS est accompagnée de l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa-B (NF- $\kappa$ B)(Lee *et al.*, 1992).

## 2.4 Signaux de transduction du LPS

L'activation cellulaire par le LPS est un phénomène complexe, étant donné le nombre de récepteurs qui peuvent déclencher un signal. Les signaux de transduction véhiculés par le récepteur de 73 kDa sont mal caractérisés, mais ils sont considérés comme indépendants du CD14.

Les résultats de Lee *et al.* (1992) militent en faveur de l'hypothèse que le LPS active les cellules par des cascades de transduction pouvant être dépendantes ou indépendantes du CD14. Comme ces expériences le démontrent, la protéine CD14 est associée à la cascade de transduction du IP. Cette cascade de transduction fait intervenir la PLC qui scinde le IP en DAG et en IP<sub>3</sub>. Le DAG favorise la translocation vers la membrane plasmique des PKC, tandis que l'IP<sub>3</sub> permet une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. L'activation de la PKC influence la translocation, du cytoplasme vers le noyau, du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B dont le rôle est de lier l'ADN afin de moduler la transcription génique.

Les travaux de Jakway et De-Franco (1986) ainsi que de Daniel-Issakani *et al.* (1989) démontrent l'implication d'une protéine G sensible à la PT dans le processus d'activation cellulaire. Berridge (1987) a suggéré que cette protéine G sensible à la PT, module l'activation de la PLC plutôt que l'activation de l'adénylate cyclase, enzyme couplée aux protéines G et responsable de la génération de l'AMPc. Bien que cette protéine G est de la famille des protéines G liant l'adénylate cyclase, aucun résultat ne démontre une élévation du taux d'AMPc causée par l'activation cellulaire avec le LPS (Katakami *et al.*, 1988).

Cependant, les résultats obtenus par Chang *et al.* (1990) écartent la possibilité d'implication de la PLC dans le processus d'activation anti-tumorale des macrophages, puisqu'un inhibiteur de la PLC, la néomycine, n'empêche pas l'activation anti-tumorale déclenchée par le LPS. Pour expliquer ce phénomène, Grabarek *et al.* (1988) ont démontré que le LPS peut activer la PKC des plaquettes sanguines sans pour autant recourir à l'activation de la PLC comme processus intermédiaire. Ces résultats suggèrent que l'implication de la PLC dans l'activation cellulaire par le LPS est un processus facultatif.

Une autre voie utilise les protéine tyrosine kinases (PTK), enzymes qui activent plusieurs transducteurs de signaux par la phosphorylation de leurs résidus tyrosines. L'équipe de Weinstein *et al.* (1991) a observé l'implication des PTK dans l'activation des mØ par le LPS. Cette activation ne nécessite ni la translocation vers la membrane plasmique des PTK, ni la synthèse de nouvelles protéines et est également un processus indépendant de la PKC. De plus, la phosphorylation des résidus tyrosines ne s'effectue pas aussi rapidement que la phosphorylation des résidus tyrosines induite par d'autres ligands. Ces données suggèrent que l'activation par le LPS est un processus à étapes multiples dont plusieurs doivent être complétées avant la phosphorylation des tyrosines. Par exemple, l'activation cellulaire via le CD14 nécessite préalablement la liaison du LPS avec la LBP, ensuite le CD14 transduit le signal par l'entremise d'une protéine effectrice, qui dans ce cas pourrait être la PTK.

Le processus d'activation du LPS est complexe et utilise plus d'un récepteur membranaire, ce qui génère des événements cellulaires PKC-dépendants et PKC-indépendants. Le LPS possède un pouvoir activateur puissant au niveau du déclenchement de la réponse immune par l'entremise de l'activation cellulaire

des mo et des mØ. La neutralisation de l'activation du LPS peut être utile dans le contrôle de maladies induites par les endotoxines telles que les septicémies Gram-négatives. Ce contrôle serait maintenu au niveau de la régulation et de la modulation de la réponse immune.

### 3. LE MACROPHAGE

#### 3.1 Introduction

Les phagocytes mononucléaires constituent un système diversifié essentiel à l'homéostasie et à la protection de l'hôte contre les agents agresseurs et les cellules en croissance anarchique (Adams et Koerner, 1989). Plusieurs études soulignent l'importance des phagocytes mononucléés dans l'initiation et le développement de maladies telles que le cancer et de maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite (Adams et Koerner, 1989; Hahn *et al.*, 1993). Un de ces phagocytes mononucléés, le m $\phi$ , exerce un rôle central dans l'initiation, le maintien et la résorption de l'inflammation par l'entremise d'un vaste répertoire de récepteurs membranaires spécifiques (Tableau II) et de produits sécrétés (Tableau III). Les actions parfois excessives des m $\phi$  dans l'inflammation et dans la défense anti-tumorale, qui se manifestent par la sécrétion de monokines, d'enzymes lysosomiales ainsi que de dérivés oxygénés et azotés, ne sont pas sans causer d'effets secondaires à des tissus sains, parfois éloignés des lieux d'infection. C'est la très stricte régulation du métabolisme des m $\phi$  qui permet dans l'organisme sain, de potentialiser leurs actions bénéfiques, anti-microbienne et anti-tumorale tout en minimisant les effets néfastes tels que la destruction tissulaire et la pyrogénie (Hahn *et al.*, 1993). Leur localisation dans les tissus, ainsi que dans les voies d'entrée de l'organisme (Gordon *et al.*, 1988), fait des m $\phi$  des candidats de choix dans le contrôle et l'élimination des maladies dégénératives des tissus.

Tableau II. Récepteurs du macrophage

Récepteur du fragment Fc des immunoglobulines	IgG (FCRI et FcRII), IgE
Récepteurs du complément	C1q, C3a, CR1 (C3b), CR3 (C3bi), CR4 (C3d,g), C5a, H ( $\beta$ 1H)
Récepteurs de cytokines	Interféron ( $\alpha,\beta$ ), IFN $\gamma$ , IL-1 ( $\alpha,\beta$ ), IL-2, IL-3, IL-4, CSF-1, GM-CSF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$
Récepteurs de produits de l'inflammation et bactériens	Mannose, fucose, fibrine, transferrine, lactoferrine, fibronectine, formyl-peptides; endotoxine lipopolysaccharidique (LPS)
Récepteurs d'hormones	Insuline, glucagon, histamine, sérotonine, PGE <sub>2</sub> , glucocorticoïde, neuropeptides et autres
Récepteurs de lipoprotéines	apolipoprotéines B et E; lipoprotéine de faible poids moléculaire (LDL)

Adapté de Meltzer et Nancy, 1989

**TABLEAU III. Produits sécrétés par les phagocytes mononucléés**

Cytokines et hormones polypeptidiques	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , érythropoïétine, thymosine $\beta$ 4, TGF- $\beta$ , PDGF, CSF-1, G-CSF, GM-CSF, facteur chimiotactique des monocytes (MCP-1), $\beta$ -endorphine, facteur de l'angiogenèse et autres
Composants du complément	C1, C4, C2, C3, C5; properdine et facteurs B, D, H, ( $\beta$ 1H) et I (inhibiteur de C3b)
Facteurs de la coagulation	thromboplastine; facteurs V, VII, IX et X; prothrombine; prothrombinase; inhibiteurs de l'activateur du plasminogène
Enzymes	hydrolases lysosomiales acides (phosphatase, glycosidase); protéinases neutres (élastase, collagénase, stromélysine); lysozyme; arginase; lipoprotéine lipase; phospholipase A <sub>2</sub>
Lipides bioactifs	PGE <sub>2</sub> ; tromboxane B <sub>2</sub> ; leucotriènes B <sub>4</sub> , C, D, E; prostacycline; PAF et autres
Intermédiaires oxygénés et azotés	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , OH, acide hypohalique, NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

Adapté de Nathan, 1987

### 3.2 Origine des macrophages

Les mØ proviennent des cellules souches hématopoïétiques de la moëlle osseuse. Sous l'effet de facteurs de croissance, certaines cellules souches subissent plusieurs stades de division cellulaire et changent de phénotype pour devenir monoblastes, puis promonocytes. À ce stade, les cellules quittent la moëlle osseuse et passent dans la circulation sanguine, porteuses des marqueurs de monocyte. L'IL-3, le GM-CSF et le M-CSF interviennent à plusieurs niveaux dans la maturation et la différenciation des cellules souches en mØ. Les changements phénotypiques nécessitent la présence de tous ces facteurs de croissance. Les monocytes demeurent quelques temps dans la circulation sanguine pour finalement se distribuer dans les tissus où ils complètent leur maturation finale en mØ. En absence de stimulus externe, les mØ développent des propriétés spécifiques aux tissus qu'ils occupent: ils sont ainsi appelés "mØ résidants" (Unanue, 1989).

L'inflammation, les dommages et réparations tissulaires, les maladies métaboliques et néoplasiques amplifient l'entrée, l'accumulation et le renouvellement des mØ tissulaires (Leibovich et Ross, 1975). Ces mØ nouvellement migrés, nommés "mØ recrutés", sont davantage sensibles aux signaux de l'inflammation (ou encore à la présence de FMLP et de LPS) (Adams et Hamilton, 1984). À la rencontre de ces stimuli inflammatoires, les mØ deviennent activés et modifient considérablement leurs caractéristiques morphologiques et phénotypiques. Certaines propriétés des mØ peuvent ainsi être augmentées ou diminuées au cours du processus, et ces modifications varient selon les inducteurs ou suppresseurs se trouvant dans l'environnement local. Les mØ recrutés démontrent de nouvelles propriétés, distinctes de celles des mØ résidants qui

permettent aux mØ présents sur le site de faire face aux situations particulières que subissent les tissus (Adams et Koerner, 1989; Ezekowitz et Gordon, 1984).

### 3.3 Propriétés et fonctions des macrophages

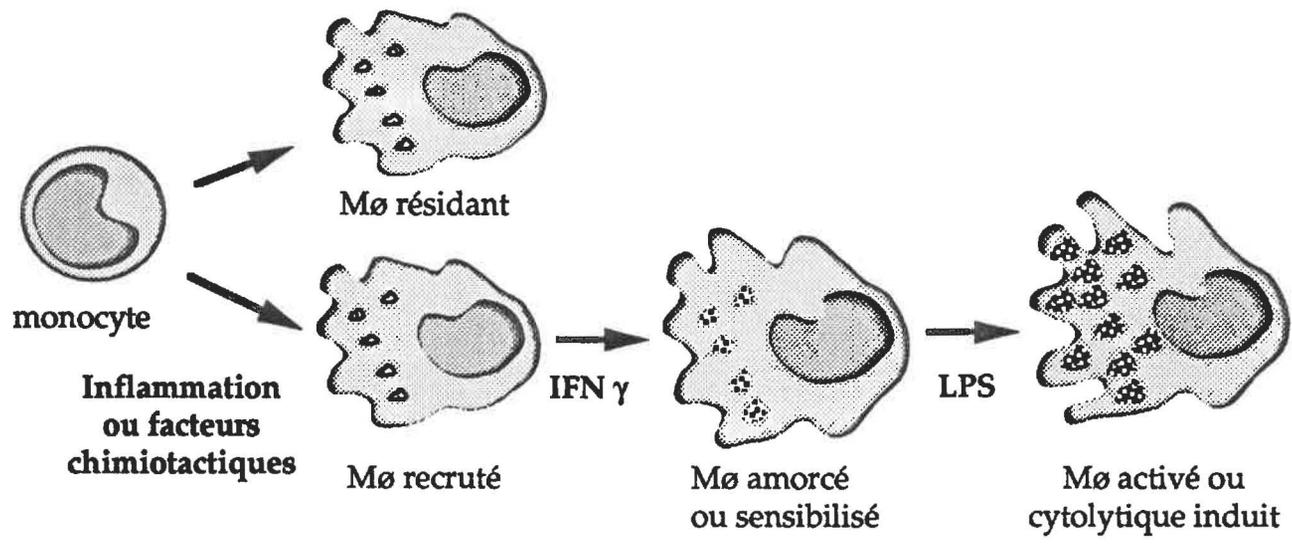
Les mØ sont des cellules polyvalentes. Ils tirent leur nom de leur propriété accrue de phagocyter protéines, débris cellulaires et microorganismes de toutes sortes. Ils sont impliqués dans l'immunité cellulaire et jouent un rôle majeur dans l'hypersensibilité de type retardé. Par ailleurs, les mØ ont la capacité de moduler l'activation des lymphocytes T et B et des cellules NK par la sécrétion de monokines. Ils sont aussi pourvus d'une grande motilité: des récepteurs spécifiques au fragment C5a du complément et aux formyl-peptides leur permettent de les reconnaître spécifiquement et de se déplacer dans un gradient de concentration formé par ces produits (chimiotactisme). Les mØ sont aussi stimulés par des dérivés bactériens tels que le zymosan, les endotoxines et les microorganismes. Une fois stimulés, ils produisent une variété de molécules parmi lesquelles se retrouvent dérivés oxygénés et azotés, enzymes et monokines, tous impliqués dans l'immunité cellulaire (Tableau III). Les mØ expriment à leur surface membranaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, leur permettant d'agir comme cellules présentatrices de l'antigène (Ag; APC), ce phénomène faisant suite à la dégradation enzymatique des protéines antigéniques. La présence de récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines leur permet également de participer activement dans l'ADCC ("antibody dependent cellular cytotoxicity"). (Unanue, 1989).

### 3.4 Activation des macrophages

Par opposition aux lymphocytes T et B, l'activation des mØ représente le résultat d'une modulation appropriée des capacités spécifiques favorisant l'accroissement ou l'acquisition de compétence fonctionnelle, qui se traduit par des modifications métaboliques pouvant aller jusqu'au développement de la cytotoxicité non-spécifique du mØ (Adams et Koerner, 1989). Les mØ activés sécrètent des monokines dont les actions autocrine et paracrine modifient le métabolisme d'autres mØ (par exemple le TNF- $\alpha$ ) ainsi que l'activation et la prolifération de certaines cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes T et B (entre autres par la sécrétion d'IL-1 et d'IL-6). Les rôles variés que jouent les mØ nécessitent la mise sur pied d'un mode de régulation raffiné. Le passage des mØ à l'état activé requiert l'intervention de trois types distincts de stimuli permettant de caractériser des niveaux intermédiaires d'activation (Figure 5). Les mØ immatures nouvellement recrutés par des produits de l'inflammation ou des facteurs de chimiotactisme tels que l'IL-8, la composante C5a du complément ou encore les formyl-peptides comme le FMLP, définissent le premier niveau d'activation. L'activation des mØ s'amorce par un second stimulus, soit des faibles concentrations d'IFN $\gamma$  (Pace *et al.*, 1983). Ces mØ nommés "mØ amorcés" (ou "sensibilisés") se caractérisent par l'augmentation de leur métabolisme cellulaire et le développement de l'activité anti-microbienne qui se traduit par la production de dérivés azotés (Nathan *et al.*, 1983). Finalement, d'autres stimuli sont requis afin de permettre aux mØ amorcés d'atteindre le niveau dit "mØ activés". Ces signaux sont donnés par la présence préalable de fortes doses d'IFN $\gamma$  puis par la présence d'IL-2 (Cox *et al.*, 1990, Belosevic *et al.*, 1990), d'IL-4 (Nacy et Meltzer, 1991) ou de GM-CSF (Grabstein *et al.*, 1986). Par ailleurs, la

**FIGURE 5. Activation du macrophage**

Ce schéma illustre les effets de trois signaux: le n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP), interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le lipopolysaccharide (LPS) sur la mobilisation, l'activation des macrophages ( $m\emptyset$ ) et plus particulièrement sur l'expression des gènes précoces c-fos, JE et KC ainsi que sur l'expression de certaines protéines telles que l'antigène Ia membranaire, le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- $\alpha$ ) et le facteur de croissance CSF-1 ("colony stimulating factor 1"). Certaines fonctions cellulaires telles que la présentation d'antigène (APC), l'activité anti-microbienne et anti-tumorale sont également représentées. (Adapté de Adams et Hamilton, 1984; Introna *et al.*, 1987; Radzioch et Varesio, 1991; Baccarini *et al.*, 1992)



Protéines

Ia membranaire	-	++++	++
TNF	-	+	++++
CSF-1 R	++++	++	-

Gènes

c-fos	++	+	++++
JE	-	-	++++
KC	-	-	++++

Fonctions cellulaires

APC	-	++++	++
Activité anti-microbienne	-	++	++++
Activité anti-tumorale	-	-	++++

présence de LPS, de TNF ou le contact avec des cellules tumorales permettent le développement de l'activité anti-tumorale caractéristique des m $\phi$  activés (Nacy et Meltzer, 1991).

L'état d'activation des m $\phi$  implique un accroissement général de l'endocytose et des sécrétions de facteurs solubles (Adams et Koerner, 1989). L'acquisition de cette compétence fonctionnelle par les m $\phi$  nécessite un changement dans le métabolisme et l'intervention de nouvelles protéines. Les changements métaboliques passent par l'activation de plusieurs gènes non-exprimés chez les m $\phi$  résidants. L'expression de ces gènes est essentielle à l'obtention de l'état de compétence supérieur; ainsi ces gènes sont nommés "gènes de compétence". Les gènes de compétence ont une action directe sur l'expression des marqueurs d'activation, ils préparent le terrain pour l'activation cellulaire et sont souvent induits très tôt après la stimulation cellulaire. Mentionnons que des gènes de compétence comme c-fos, JE, KC (Introna *et al.*, 1987; Tannenbaum *et al.*, 1988), c-jun et autres sont essentiels dans l'initiation de l'expression de protéines effectrices tels que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF.

Certaines substances telles que les glucocorticoïdes (Russomarie, 1992), le MDF ("macrophage desactivating factor"; Ding *et al.*, 1990), le TGF $\beta$  (Tsunawaki *et al.*, 1988; Forstermann *et al.*, 1992) et le PGE<sub>2</sub> inhibent l'activation des m $\phi$ . Ainsi selon la nature des stimuli et leurs chronologies, l'activité des m $\phi$  se voit modulée soit en hausse soit en baisse.

Les signaux provoquant l'activation des m $\phi$  initient plusieurs cascades de transduction pour produire leurs effets. Entre autres, l'activation de la PKC par l'entremise de la transformation du PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> et la formation de DAG,

accompagnées d'un influx rapide de calcium, permet au LPS et au FMLP d'induire l'activité cytolytique des  $m\phi$ . L'induction de l'activité cytolytique nécessite également la transduction d'un signal d'activation via les PTK (Dong *et al.*, 1993). Dans un second temps, l'activation des  $m\phi$  s'accompagne de l'expression des gènes de compétence tels que fos, JE, et KC (Yu *et al.*, 1990). D'autre part, l'élévation de la concentration en AMPc induite par le LPS, peut s'interpréter par l'initiation d'un phénomène de rétro-inhibition des  $m\phi$  puisque l'élévation du taux d'AMPc est observée en présence de PGE2, un désactivateur des  $m\phi$  (Knudsen *et al.*, 1987; Tannenbaum et Hamilton, 1989). Les agents stimulateurs de l'activation macrophagique qui exercent leurs effets par l'intermédiaire de la voie de la PKC, pourraient agir en synergie pour augmenter leur potentiel activateur. D'un autre côté, des agents utilisant des voies différentes de transduction pourraient interférer avec les effets d'un ou l'autre des agents.

## 4. LES PROTO-ONCOGÈNES FOS ET JUN

### 4.1 Définitions

#### 4.1.1 Oncogènes et proto-oncogènes

Plusieurs rétrovirus causant des tumeurs expriment des gènes possédant la capacité de transformer les cellules: les oncogènes. Les oncogènes viraux (v-onc) ont leur origine dans une recombinaison génétique entre le génome des rétrovirus et le génome de la cellule hôte. Les oncogènes viraux, contrairement à leurs homologues cellulaires, ont subi plusieurs altérations structurales qui leur confèrent le pouvoir d'induire des tumeurs. Chez la cellule non-transformée, ces gènes sont nommés proto-oncogènes (c-onc).

Les proto-oncogènes, tout comme les oncogènes, jouent un rôle majeur dans la transduction des signaux de la cellule normale. Leurs rôles s'exercent fréquemment sur des points stratégiques dans le processus d'intégration de signaux; conséquemment leur dérèglement peut entraîner l'anarchie cellulaire. Parmi ces gènes, les proto-oncogènes c-fos et c-jun ont retenu notre attention, leurs homologues viraux étant v-fos et v-jun. Le premier a été découvert chez deux isolats de rétrovirus qui provoquent un ostéosarcome chez la souris, le FBJ-MSV (*Finkel-Biskis-Jinkins* - murine sarcoma virus) et le FBR-MSV (*Finkel-Biskis-Reilley*) (Curran *et al*, 1983; Müller, 1986). Le second a été identifié chez un rétrovirus de volaille, l'ASV-17 (avian sarcoma virus sérotype 17) (Maki *et al.*, 1987).

### 4.1.2 Gènes de compétence

La modification métabolique que subit une cellule en réponse à un stimulus, nécessite la mise en oeuvre d'un processus d'activation, ainsi que d'une régulation contrôlée. Les gènes impliqués dans cette cascade sont appelés "gènes de compétence" (Introna *et al.*, 1987; Tannenbaum *et al.*, 1988). Leur expression est temporaire, et elle est marquée par une séquence d'événements dont certains sont précoces, d'autres plus tardifs, au cours des changements métaboliques. Les gènes de compétence "c-fos" et "c-jun" codent pour le "complexe protéique d'activation" ("activator protein-1"; AP-1), qui est un facteur de transcription localisé dans le noyau. De plus, ils appartiennent à la classe des gènes dits "de réponse précoce", puisqu'ils sont parmi les premiers gènes (lorsque la cellule est en phase G<sub>0</sub>) exprimés en réponse à certains facteurs de croissance, comme par exemple ceux que peut contenir le sérum (Müller, 1986; Curran, 1988). Cependant, tous les gènes de la réponse précoce ne sont pas nécessairement des gènes de compétence.

### 4.1.3 Facteur de transcription

On dénomme "facteur de transcription" une ou plusieurs protéines qui possèdent la propriété de se lier à des séquences bien définies de l'ADN. De telles séquences nucléotidiques ont été établies par plusieurs équipes, et sont définies comme des séquences (ou sites de liaison) "consensus". Ainsi, un facteur de transcription se lie presque exclusivement à la séquence consensus qui lui est propre mais à condition que cette dernière soit accessible. En effet, un facteur de transcription donné peut bloquer l'accès d'un site à un autre facteur. Les séquences consensus se trouvent à proximité des gènes, plus fréquemment à l'intérieur du promoteur. La liaison adéquate des facteurs de transcription sur leur séquence

consensus permet l'action de la polymérase, ce qui amorce la transcription du gène cible. Le facteur de transcription AP-1 est impliqué dans la différenciation et l'activation cellulaire. Son expression a été étudiée chez plusieurs types cellulaires tels: ostéosarcome, fibroblaste, lymphocyte T, neurone, PMN, mo et mØ (Curran, 1988).

#### 4.2 Caractéristiques de FOS et JUN

L'homologue cellulaire du produit de l'oncogène v-fos est une protéine de 55 kDa nommée FOS ou p55<sup>c-fos</sup>. Les produits de c-fos et v-fos ont une partie carboxy-terminale différente, ce qui confère à v-fos des propriétés distinctes de transformation de la croissance cellulaire. L'acquisition du pouvoir de transformation de c-fos requiert une expression constitutive ainsi que l'élimination d'une séquence de régulation contenue dans sa partie carboxy-terminale (Miller *et al.*, 1984). De plus, FOS est une phosphoprotéine nucléaire formant des complexes stables avec d'autres protéines cellulaires, impliquant FOS dans les processus de croissance et de différenciation cellulaire (Curran *et al.*, 1985).

Les protéines FOS et JUN contiennent une région nommée "leucine-zipper", caractérisée par une structure secondaire en hélice- $\alpha$  arborant un alignement de résidus leucines à tous les 7 acides aminés. L'agencement parallèle ("coiled coil") entre deux hélices- $\alpha$  riches en leucine permet la formation de dimères (McKnight, 1991). La dimérisation de JUN ou de FOS est essentielle à leur liaison à l'ADN (Curran, 1988). De plus, l'hétérodimère formé des protéines FOS et JUN lie le site consensus AP-1 avec une plus grande affinité que l'homodimère JUN/JUN, alors que la formation de l'homodimère FOS/FOS est stériquement impossible (Curran, 1988). FOS et JUN interagissent avec l'ADN par l'intermédiaire

d'une région basique localisée dans leur extrémité amino-terminale. Cette région s'insère dans la grande "gouttière" de l'ADN et y induit une torsion caractéristique à chaque dimère.

De par leur capacité de former des dimères et de lier l'ADN, FOS et JUN caractérisent deux nouvelles familles de protéines. Une douzaine de protéines cellulaires sont antigéniquement apparentées à FOS, tandis que trois le sont à JUN. Ces protéines cellulaires partagent 70 à 80% d'homologie avec FOS ou JUN et chacune contient une région "leucine-zipper" qui permet la formation de dimère entre les divers membres des deux familles.

#### 4.3 FOS, JUN et AP-1

Les complexes protéiques qui contiennent FOS interagissent spécifiquement avec l'ADN sur une séquence identique au site de liaison du complexe protéique d'activation AP-1 (Setoyama *et al.*, 1986; Franza *et al.*, 1988). Le site AP-1 est caractérisé par la séquence conservée "ATGA(G/C)TCAT" qui a été identifiée dans la région amplificatrice du virus simien SV-40. Cette séquence, retrouvée par plusieurs équipes se définit comme "séquence consensus AP-1". La liaison d'un complexe protéique non-identifié à cette séquence contribue à l'activation du virus (Curran, 1988). Cette séquence se retrouve également dans le promoteur du gène de différenciation des adipocytes (aP-2)(Franza *et al.*, 1988), dans celui de la collagénase (Setoyama *et al.*, 1986) et dans les séquences répétées du virus de l'immunodéficience acquise humaine (HIV-LTR)(Franza *et al.*, 1988). En 1988, Rauscher *et al.* ainsi que Chiu *et al.* ont découvert que FOS s'associe avec une protéine de 39 kD, identifiée comme étant le produit du proto-oncogène c-jun, la protéine JUN, et que ce dimère lie spécifiquement le site AP-1. Le complexe

protéique d'activation AP-1 est donc formé par l'association des protéines FOS et JUN. La séquence AP-1 se retrouve dans de nombreux gènes dont l'expression peut être induite par les esters de phorbol.

Les quantités d'ARNm de proto-oncogène retrouvées à l'intérieur des cellules varient en fonction du type cellulaire. Par exemple, les cellules en cours de différenciation, comme la peau, les cellules hématopoïétiques, les monocytes et les PMN, expriment fortement *c-fos* et *c-jun*, tandis que chez les *mø* le niveau basal d'expression est faible (Curran, 1988). Cette observation confirme l'implication de *c-fos* et *c-jun* dans le processus de différenciation cellulaire. Une fois la différenciation cellulaire complétée, l'expression de *c-fos* et *c-jun* tend à disparaître. Toutefois, la capacité d'induction de ces gènes par les esters de phorbol est conservée (Curran, 1988). Higuchi *et al.* (1988) ont également démontré qu'une expression accrue du proto-oncogène *c-fos* caractérise les *mø* activés. De même, l'association de JUN avec FOS permet de conclure que *c-jun* est lui aussi impliqué dans l'activation du *mø*.

#### 4.4 Régulation de l'expression de *c-fos* et de *c-jun*

La régulation de l'initiation de la transcription est régulée de façon très fine, dans le cas de *c-fos* et de *c-jun*. Cette finesse de la régulation s'explique partiellement par la présence de nombreuses séquences consensus à proximité de leur promoteur; elle varie selon le type cellulaire et le stimulus reçu. Des molécules intermédiaires, activées par des facteurs de croissance ou de différenciation cellulaire, reconnaissent spécifiquement ces séquences et interagissent avec l'ADN de manière à modifier le niveau de transcription des gènes. Les gènes *c-fos* et *c-jun* renferment à l'intérieur de leur promoteur des séquences cibles telles que les sites

CRE ("cAMP responsive element"), SRE ("serum responsive element") et AP-1 (Figure 6).

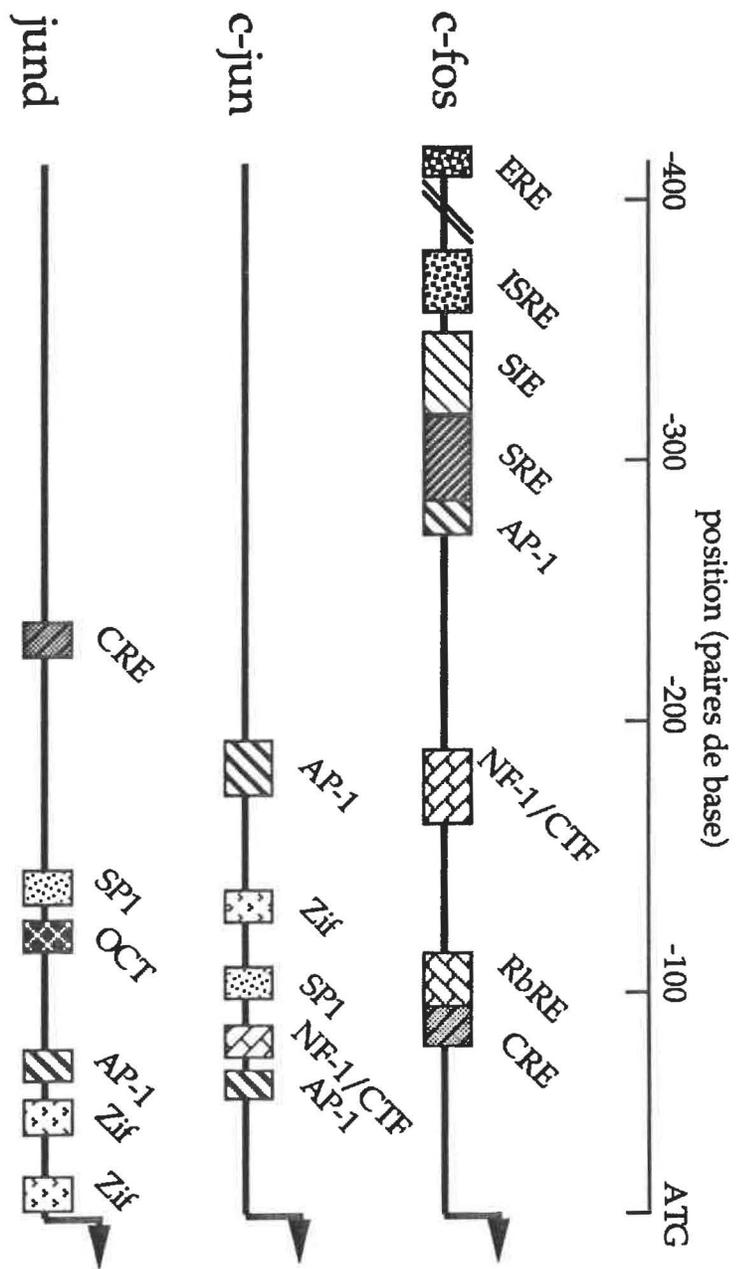
La connaissance de la séquence et de la structure du promoteur permet l'interprétation des mécanismes d'activation, de sa pertinence et ses conséquences biologiques sur l'orientation métabolique que suivra le mœ. La complexité de la régulation de l'expression et de l'activation des proto-oncogènes c-fos et c-jun permet de qualifier ces éléments de "commutateurs centraux", dans les processus d'activation cellulaire (Figure 6). Leur activation implique l'intégration de multiples signaux provenant de voies de transduction distinctes. Ces voies de transduction (Figure 7) utilisent des signaux provenant des PKA AMPc-dépendantes, des PKC, de la cascade moins bien définie impliquant les MAP kinases, sans oublier les autres signaux transduits par les protéines ras, raf (Bruder *et al.*, 1992), mos ainsi que ceux de la famille src (Schöntal *et al.*, 1988). Ainsi, les éléments AP-1/TRE et CRE sont communs aux promoteurs de c-fos, c-jun et jund. Cependant, chacun de ces promoteurs renferme des éléments de séquence distincts, ce qui confère une capacité d'induction suivant des modalités qui lui sont propres.

#### 4.4.1 Promoteur de c-fos

Le site SRE joue un rôle clé dans la régulation de c-fos. Il contient un élément de séquence palindromique nommé DSE ("dyad symmetry element") retrouvé chez la majorité des promoteurs de gènes induits par le sérum. La structure palindromique de DSE, CC(AT)<sub>6</sub>GG, permet la liaison d'un homodimère composé de la protéine p67<sup>SRF</sup> ou SRF ("serum response factor") (Lucibello *et al.*, 1991). Dans certains cas, une stimulation des PKC, des PKA, et des MAP kinases,

**FIGURE 6. Structure des promoteurs de c-fos, c-jun et jund**

Ce schéma illustre la structure et l'organisation des régions de modulation des promoteurs des gènes c-fos, c-jun et jund. Plus particulièrement, la position relative au codon d'initiation de la traduction (ATG) des éléments liant les séquences consensus telles que ERE ("estrogen responsive element"), ISRE ("interferon- $\gamma$  stimulated responsive element"), SIE ("sis inducible element"), SRE ("serum response element"), AP-1 ("activator protein-1"), NF-1/CTF ("nuclear factor-1 binding site"), RbRE ("retinoblastoma responsive element"), CRE ("cAMP responsive element"), Zif, SP1 et OCT (séquence octamérique). (Adapté de Lucibello *et al.*, 1991)



ou encore des transducteurs ras (protéine liant le GTP; Smeal *et al.*, 1992) et raf (protéine sérine kinase) suffisent à initier l'expression du gène via le site SRE (Bruder *et al.*, 1992). Les inductions par les PKC ou par les MAP kinases (Gille *et al.*, 1992) sont complétées seulement lorsqu'une seconde protéine, la p62<sup>TCF</sup>, vient former un complexe ternaire en interagissant avec SRF et le site SRE. La p62<sup>TCF</sup> devient facultative lors de la transduction des autres signaux. La protéine p62<sup>TCF</sup> partage une homologie avec la famille des proto-oncogènes *ets*, ce qui explique partiellement l'effet de synergie rencontré en présence des protéines apparentées à *ets* (Hipskind *et al.*, 1991).

De plus, la portion 3' du site SRE permet une liaison directe par le facteur nucléaire NF-IL-6. L'activation de la PK-A par l'élévation du taux d'AMPc favorise la phosphorylation de NF-IL-6, ce qui initie sa translocation du cytoplasme vers le noyau (Metz et Ziff, 1991a, 1991b).

Adjacent au site SRE, la région AP-1 permet la liaison du facteur de transcription AP-1, qui agit ici comme régulateur négatif de l'expression basale. Cependant, lors de l'activation cellulaire avec des facteurs liant CRE, le site AP-1 joue le rôle d'activateur (Chiu *et al.*, 1988). Ceci constitue un moyen de contrôler l'expression tout en demeurant un système de protection d'activation. De plus, la liaison des facteurs sur les sites SRE et AP-1 est mutuellement exclusive.

La régulation de l'expression basale est contrôlée en majeure partie par la présence d'un site CRE sensible à la liaison de la protéine CREB ("cAMP responsive element binding protein"; Lucibello *et al.*, 1991). L'activation de la PKA par l'intermédiaire de l'AMPc influence l'activation par CREB. Toutefois, cette activation peut être contrecarrée par la formation d'un hétérodimère avec la

protéine CREM ("cAMP responsive element modulator"), qui agit donc ici à titre de régulateur négatif de la réponse à l'AMPc (Foulkes *et al.*, 1991). Une protéine similaire à CREB, la CRE-BP1, possède la capacité de se dimériser et de se lier au site CRE (Foulkes *et al.*, 1991). De plus, celle-ci peut former un hétérodimère avec JUN afin de générer un facteur dont l'affinité pour le site AP-1 est de dix fois supérieure à celle qui est manifestée pour le site CRE. CRE-BP1 permettrait le remplacement de FOS tout en modulant les interactions sur les sites AP-1 et CRE. Cependant, mentionnons que CRE-BP1 ne peut pas former d'hétérodimère avec CREB et que l'association entre CREM et FOS/JUN est impossible.

De surcroît, CREB a la capacité de lier et d'exercer une régulation négative sur la région DSE du site SRE. L'inhibition exercée par CREB est levée lors de la phosphorylation par la PKA sur la sérine 133 (Ofir *et al.*, 1991).

Le promoteur de fos comporte plusieurs autres éléments régulateurs. Localisé en amont du SRE, l'élément de réponse SIE ("sis inducible element") confère une capacité d'induction par les homologues de l'oncogène *v-sis* ("sis inducible factor") tel que le PDGF (Lucibello *et al.*, 1991). Une région en aval de SRE, la région NF-1, fournit la capacité d'induction à l'élément NF1/CTF qui répond à des signaux provenant de la protéine tyrosine kinase raf. De plus, une séquence répétitive RbRE ("retinoblastoma response element"), récemment identifiée comme étant le site de liaison de la famille de transcripteurs du rétinoblastome, exerce une répression sur l'induction de *c-fos* (Udvardia *et al.*, 1992). Des éléments de réponse moins bien définis tels que ERE ("estrogen response element"; Hyder *et al.*, 1991, 1992), l'élément de réponse à l'IFN- $\alpha$  ("interferon stimulated responsive element"; ISRE) (Hannigan et Williams, 1992) ainsi que la

séquence sensible à l'anti-oncogène p53 (Ginsberg *et al.*, 1991; Kley *et al.*, 1992), sont présents dans le promoteur de c-fos murin.

#### 4.4.2 Promoteur de c-jun

Outre les régions consensus d'initiation de la transcription, le promoteur de c-jun regroupe un faible nombre de régions d'activation. L'élément AP-1, proximal à l'ATG, est sans doute le plus important et confère la capacité d'induction aux esters de phorbol. Le deuxième site AP-1, en amont dans le promoteur n'a que peu d'influence lors de l'activation du gène par le PMA, mais son rôle prend de l'importance lors de l'activation par des signaux autres que la PKC (Stein *et al.*, 1992). Le site SP-1 ainsi que le NF-1/CTF, n'ont qu'une légère influence, ainsi que cela a été démontré lors d'expériences de délétion (Unlap *et al.*, 1992; de Groot *et al.*, 1991). Mentionnons que c-jun est induit par un facteur de croissance tel que le TGF ("transformation growth factor"), mais que la nature de cette induction n'est pas définie au niveau des éléments du promoteur (Han *et al.*, 1992).

#### 4.4.3 Promoteur de jund

Une des caractéristiques de jund est son absence de sensibilité à l'induction par les esters de phorbol. On tend à expliquer ce fait par la présence d'une région octamérique spécifique à jund, et localisée en amont de AP-1. En effet, une délétion de cette région interrompt l'expression constitutive de jund et rétablit du même coup sa capacité d'induction par les esters de phorbol (de Groot *et al.*, 1991). Le promoteur renferme aussi une région CRE, de même que des régions moins bien caractérisées (SP-1 et Zif 268) qui n'exercent, semble-t-il, que peu d'influence.

L'initiation de la transcription chez les proto-oncogènes *c-fos*, *c-jun* et *jund* est le stade le plus important de la régulation de leur expression. Toutefois, dans le cas de *c-fos*, l'équipe de Blanchard *et al.* (1992) a démontré qu'une région localisée dans le premier intron influence l'élongation du transcrit. Cette région, nommée FIRE, provoque, en absence de calcium, un décrochage prématuré de la polymérase, ce qui produit des transcrits incomplets (Collart *et al.*, 1991). Selon ces mêmes auteurs, la région FIRE serait particulièrement importante pour l'expression de *c-fos* chez le macrophage.

La présence de la séquence riche en adénine et en uridine (AU) dans la région 3' non codante de l'ARNm, est responsable de l'instabilité des ARN de *c-fos*, *c-jun* et *jund* (Jackson *et al.*, 1992; Ryder et Nathan, 1988; Ryder *et al.*, 1989). Cette séquence est reconnue comme un élément pouvant modifier les temps de demi-vie des ARNm. Elle se répète dans les cas de *c-fos* et de *c-jun*, tandis que nous ne la retrouvons qu'en copie unique chez *jund*, ce qui explique partiellement les différents temps de demi-vie observés. Ces temps de demi-vie varient d'ailleurs en fonction des conditions expérimentales et du type cellulaire. Entre autres, l'action du PDGF stabilise l'ARNm de *c-fos* et favorise du même coup la division cellulaire (Jackson *et al.*, 1992).

#### **4.5 Régulation du facteur de transcription AP-1**

La présence de la région AP-1 dans les promoteurs de *c-fos*, *c-jun* et *jund* permet aux produits de ces proto-oncogènes d'exercer une forme d'autorégulation. Le processus d'autorégulation est très complexe du fait que ces protéines forment des dimères avec d'autres membres de la même famille, contribuant à former plusieurs paires possédant chacune leurs propres caractéristiques d'activation ou

de répression. Par exemple, l'homodimère JUN active les gènes contenant dans leur promoteur, un site AP-1 unique; à l'opposé, l'homodimère JUNB inhibe les promoteurs à site AP-1 unique tandis qu'il active ceux à sites multiples (Chiu *et al.*, 1989).

#### 4.5.1 Interaction protéine-protéine

Les protéines FOS et JUN interagissent avec d'autres protéines contenant une région "leucine-zipper" (Bengal *et al.*, 1992; Chevray et Nathans, 1992). Un inhibiteur spécifique au facteur AP-1, la protéine inhibitrice-1 ("inhibitor protein-1"; IP-1), effectue la régulation de l'activation d'AP-1 (Auwerx et Sassonecorsi, 1992). La dissociation est promue par une phosphorylation d'IP-1 par la PKC, ce qui permet l'interaction d'AP-1 et de l'ADN. Une autre protéine encore non-identifiée empêcherait la translocation du facteur AP-1 vers le noyau tel que suggéré par Blanchard *et al.* (1992).

Plusieurs types de récepteurs interagissent avec le facteur AP-1. Ainsi, le récepteur des glucocorticoïdes (GR) se complexe soit à FOS soit à JUN pour inhiber leur liaison à l'ADN (Yang-Yen *et al.*, 1990; Touray *et al.*, 1991). Ce processus d'inactivation est réciproque et peut s'exercer grâce à une relation stoechiométrique entre les protéines FOS, JUN et GR libres. À l'opposé, le récepteur de l'hormone thyroïdienne encodé par le gène *c-erbA*, potentialise l'activité du facteur de transcription AP-1 en interagissant avec JUN (Desbois *et al.*, 1991; Sharif et Privalsky, 1992).

#### 4.5.2 Phosphorylation d'AP-1

Une régulation négative est exercée sur JUN par la phosphorylation de résidus situés près de la région carboxy-terminale responsable de la liaison à l'ADN (Boyle *et al.*, 1991). L'activation simultanée de la PKC et d'une phosphatase (Figure 7), la "phosphatase-2a" (Black *et al.*, 1991), permet la déphosphorylation de ces sites. De même, les MAP kinases exercent une régulation positive par la phosphorylation de résidus de la portion amino-terminale ce qui favorise la dissociation de la protéine inhibitrice IP-1 (Pulverer *et al.*, 1991,1993). Selon Chou *et al.* (1992), la MAP kinase p42 est responsable de la modulation négative de JUN par la phosphorylation de la sérine 243 de la partie carboxy-terminale.

Dans le cas de FOS, une régulation par la phosphorylation de régions régulatrices a également été mise en évidence. Ces phosphorylations impliquent les PKA-AMPC dépendantes, les PKC et probablement d'autres kinases (Abate *et al.*, 1991). Toutefois, les PKA jouent un rôle majeur dans la phosphorylation de FOS. Elles exercent une modulation négative, car l'inhibition de celles-ci augmente la capacité de transformation de FOS (Tratner *et al.*, 1992).

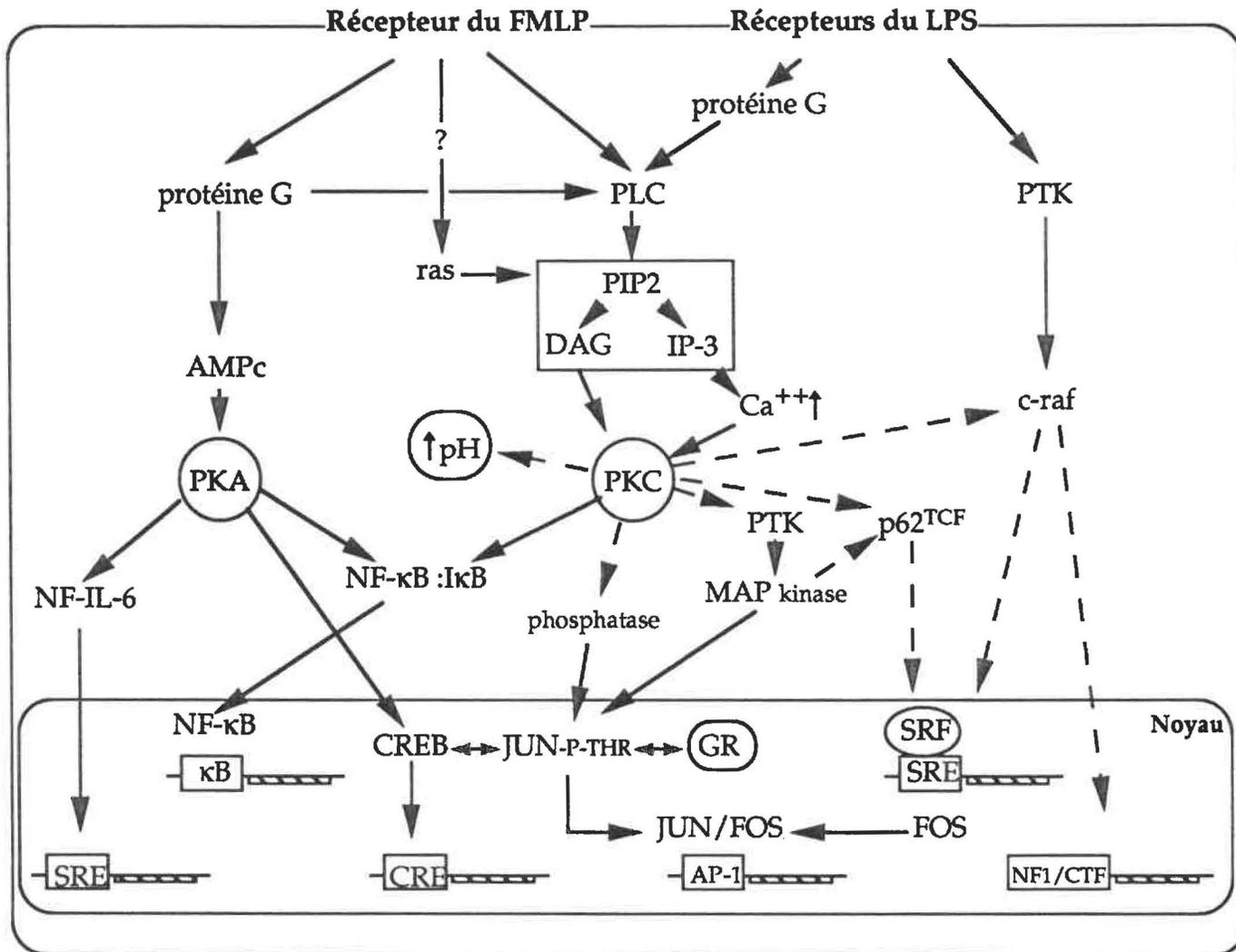
#### 4.5.3 Régulation par le potentiel redox

Dans des conditions non-réductrices, une modification d'un résidu cystéine dans la région basique de la protéine empêche la liaison du facteur AP-1 à l'ADN. Ce phénomène implique la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre deux cystéines conservées à l'intérieur d'un même dimère (Bannister *et al.*, 1991). L'implication *in vivo* de cette observation provient du fait qu'une protéine de 37 kD nommée ref-1 ("nuclear redox factor-1"), possédant des propriétés d'oxydo-

**FIGURE 7. Voies de transduction impliquées dans la modulation de c-fos et c-jun**

Cette représentation fait la synthèse des cascades de transduction initiées par les récepteurs du lipopolysaccharide (LPS) et du n-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP) impliquées dans les processus de modulation de l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun. (Adapté de Cantley *et al.*, 1991).

— Action directe  
 - - Action indirecte



réduction, influence directement le facteur AP-1 (Xanthoudakis et Curran, 1992; Xanthoudakis *et al.*, 1992; Okuno *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent que la régulation redox limite le nombre total de facteurs JUN/FOS *in vivo*.

Les proto-oncogènes représentent donc des éléments importants dans les cascades finales de transduction puisqu'ils peuvent intégrer plusieurs signaux d'activation. Notre hypothèse de travail se basant sur les pouvoirs de modulation de l'activité cellulaire par le LPS et le FMLP, nous avons voulu vérifier la possibilité de relation entre cette modulation et l'expression de marqueurs de l'activité cellulaire: les proto-oncogènes c-fos, c-jun ainsi que jund.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

La préparation, la composition des solutions et tampons ainsi que la provenance des produits sont présentées en Annexe I.

### 1. MODÈLE EXPÉRIMENTAL

La lignée murine RAW 264,7 provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC), qui a servi de modèle expérimental, a été obtenue suite à la transformation par le virus de la leucémie d'Alberson (Raschke *et al.*, 1978). Les cellules de cette lignée présentent plusieurs caractéristiques des *mø*, entre autres les propriétés de sécrétion du lysozyme, de phagocytose et de l'ADCC. L'expression de molécules de classe II du CMH, à la surface cellulaire, est toutefois absente. De plus, nous avons choisi cette lignée cellulaire puisqu'elle est utilisée abondamment dans les études d'interaction avec le LPS. La croissance de ces cellules est inhibée par de faibles concentrations de LPS. De fortes concentrations de LPS ont, chez cette lignée, un effet stimulateur comparable à l'effet obtenu avec des *mø* (Farber, 1992). De plus, les cellules RAW 264,7 expriment le récepteur pour les formyl-peptides tel que démontré pour la première fois dans notre laboratoire (Tremblay *et al.*, en préparation).

#### 1.1 Culture cellulaire

Les cellules RAW 264,7 ont été cultivées en milieu DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium; Gibco) enrichi de 5% de sérum foetal bovin (SFB; P.A. Biologicals), 25 mM d'acide N-2-hydroxyéthyl-piperazine-N-2-éthanesulfonique

(HEPES), 50 U/ml de pénicilline, et de 50 µg/ml de streptomycine. L'énumération cellulaire s'est effectuée par l'épreuve d'exclusion au bleu trypan 0,1% à l'aide d'un hématimètre (Scientific Instrument Division). La suspension cellulaire a été ajustée à  $2 \times 10^5$  cellules/ml avant la mise en culture dans un flacon de polystyrène de 85 cm<sup>2</sup> (Sarstedt). Les cellules adhérentes ont été détachées à tous les trois à quatre jours avec un grattoir ("cell scraper", Sarstedt), puis remises en culture à une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules/ml.

Lors de l'étude des productions d'ARN, les cellules ont été remises en culture à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, dans des pétris de 10 cm de diamètre (Corning) à raison de  $2,0 \times 10^6$  cellules/pétri et cultivées 24 h dans 10 ml de DMEM, 5% SFB, 25 mM HEPES, 50 U/ml de pénicilline, et de 50 µg/ml de streptomycine, puis les cellules ont été lavées avec du milieu EBSS (Earle's buffered saline solution), 25 mM HEPES, à 37°C. Les cellules ont été privées de SFB pour 24 h, et maintenues en culture dans du milieu DMEM, 25 mM HEPES, 50 U/ml de pénicilline, et de 50 µg/ml de streptomycine.

## 1.2 Stimulation des cellules macrophagiques RAW 264,7

Le FMLP (Sigma) utilisé a d'abord été dissout dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à une concentration de 125 µg/ml et conservé à -70°C jusqu'à son utilisation, où il a été dilué dans du DMEM, 25 mM HEPES, 50 U/ml de pénicilline, et 50 µg/ml de streptomycine.

Le LPS (souche *E. coli* 0127:B8; Sigma) quant à lui, a été dissout dans du EBSS à raison de 100 µg/ml et conservé à -4°C.

### 1.3 Traitement des cellules avec les inhibiteurs de PKC

La staurosporine (Tamaoki *et al.*, 1986) qui est un inhibiteur spécifique du site catalytique des PKC, a été dissoute dans du DMSO à une concentration de 100 nM et conservée à -20°C jusqu'à son utilisation, où elle a été diluée dans du DMEM, 25 mM HEPES, 50 U/ml de pénicilline, et 50 µg/ml de streptomycine. L'inhibition des PKC s'est effectuée en prétraitant les cellules RAW 264,7 à une concentration finale de 10 nM de staurosporine.

La calphostine C (Kobayashi *et al.*, 1989) est également un inhibiteur spécifique des PKC. Il agit de manière différente de la staurosporine en exerçant son action sur le domaine de régulation des PKC. La calphostine C dissoute dans du DMSO, à une concentration de 5 µM, a été conservée congelée à -20°C, jusqu'à son utilisation. Elle a été utilisée à une concentration finale de 0,5 µM et a été incubée avec les cellules 30 minutes avant la stimulation avec le LPS.

## 2. PRÉPARATION DE L'ARN

### 2.1 Préparation de la verrerie et des solutions

L'ARN est très sensible à la dégradation par les ribonucléases, celles-ci se retrouvant partout dans l'environnement. Quelques précautions se sont avérées absolument nécessaires afin d'éviter la dégradation de l'ARN. Les solutions et tout le matériel venant en contact direct avec l'ARN ont été traités au diéthylpyrocarbonate (DEPC) lorsque ceux-ci ne pouvaient être stériles ou neufs et jetables. Le DEPC inactive les ribonucléases en modifiant de façon irréversible leurs résidus tryptophanes et lysines (Rosén et Fedorcsak, 1966).

La verrerie et le matériel, tel que les embouts de pipette, les tubes à ultracentrifugation et les tubes coniques ont été immergés pendant 12 h dans une solution de DEPC 0,1% (v/v), puis autoclavés. Les diverses solutions et l'eau (H<sub>2</sub>O/DEPC) ont été ajustées à 0,1% (v/v) de DEPC, agitées vigoureusement puis autoclavées. L'autoclavage du matériel et des solutions a pour but de détruire les résidus de DEPC puisque celui-ci peut réagir avec les bases adénines de l'ARN.

## 2.2 Isolement de l'ARN total

Dans le but d'extraire l'ARNm des cellules de façon non-dégradante, les endonucléases ribonucléiques devaient d'abord être inhibées. L'ARN a ensuite été déprotéiné et finalement séparé des autres composantes de l'homogénat cellulaire (Chirgwin *et al.*, 1979).

Les endonucléases ribonucléiques cellulaires dégradent rapidement l'ARN. Pour les inactiver efficacement, les cellules ont été immergées dans un puissant inhibiteur: l'isothiocyanate de guanidium. La séparation de l'ARN des autres composantes cellulaires, telles que les protéines et l'ADN chromosomique, s'est effectuée par ultracentrifugation sur un gradient de chlorure de césium (CsCl). Cette méthode utilise le principe de sédimentation sélective basée sur la densité de flottaison des différents acides nucléiques.

L'extraction de l'ARN total a été effectuée selon la méthode de Chirgwin *et al.*, (1979). Les cellules, stimulées pendant les temps requis, ont été rincées une fois avec un tampon phosphate (PBS) refroidi à 4°C, puis 3,5 ml de la solution de guanidium a été ajouté. Après la lyse, un grattoir a été utilisé pour déloger les cellules adhérentes au plastique. La solution a été homogénéisée vigoureusement par cinq successions d'aspiration et d'expulsion, en utilisant une seringue

hypodermique de 5 ml (Becton-Dickinson) munie d'une aiguille #20 G 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> (Becton-Dickinson). Le lysat cellulaire a été déposé délicatement sur un coussin de CsCl 5,7 M. La préparation a été ultracentrifugée pendant 16 h à 130 000 x g (centrifugeuse Beckman) dans un rotor à godets pivotants de type SW-50 à 20°C. L'ADN en suspension a ensuite été disposé par aspiration délicate, les tubes ont été inversés puis leur paroi a été asséchée. Chaque culot a été resuspendu dans 360 µl de tampon TES, transféré dans un tube conique de 1,5 ml (Fisher), puis précipité en ajoutant 0,1 v/v d'acétate de sodium 3,0 M ainsi que deux volumes d'EtOH. Les échantillons ont été déposés à -70°C pour un minimum de 20 minutes puis centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 x g (Fisher) à température ambiante. Le surnageant a été vidé par inversion, les culots ont été resuspendus dans H<sub>2</sub>O/DEPC puis reprécipités à l'EtOH tel que décrit précédemment. Après centrifugation, l'ARN a été récolté, partiellement asséché et resuspendu dans 60 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC.

### 2.3 Mesure de la densité optique

La pureté et la qualité de l'ARN ont été évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre (Milton Roy Company, Spectronic 1201) aux densités optiques (D.O.) de 260 nm et 280 nm. Ces longueurs d'onde correspondent aux maxima d'absorption des acides nucléiques et des protéines respectivement. Le rapport (D.O. 260 nm/D.O. 280 nm) de ces deux valeurs doit s'approcher de 2: un ratio supérieur à 2 indique une dégradation des ARN, tandis qu'un ratio inférieur révèle la présence de protéines.

La valeur "zéro" des D.O. à 260 nm et 280 nm ont été établies en utilisant de l'eau pure. Un aliquot de l'échantillon d'ARN a été prélevé et dilué par un facteur

de 100 avec de l'eau puis ses absorbances à 260 nm et 280 nm ont été déterminées. La valeur de la D.O. à 260 nm permet d'évaluer la concentration en ARN de l'échantillon puisqu'à cette longueur d'onde, une valeur de D.O. de 1 équivaut à une concentration d'ARN de 40 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 2.4 Électrophorèse sur gel dénaturant agarose/formaldéhyde

Afin de s'assurer de la pureté, de l'intégrité des ARN, et également pour augmenter la spécificité d'identification des gènes recherchés, les échantillons d'ARN ont été résolus sur un gel d'agarose 1,2%, en conditions dénaturantes. La présence d'agents dénaturants (formaldéhyde et formamide) détruit les structures secondaires de l'ARN, ce qui permet de séparer les différents ARN selon leur poids moléculaire.

Entre 10 et 15 µg d'ARN par piste ont été résolus par électrophorèse (Biorad modèle: Wide Min-Sub Cell) sur gel d'agarose. Un aliquot du tampon d'échantillon 6X a été ajouté à la quantité appropriée d'ARN, vortexé, puis dénaturé pendant 10 minutes à 65°C. Les échantillons auxquels 1 µl de bromure d'éthidium (EtBr; 1 mg/ml) a été ajouté, ont été résolus sur gel d'agarose/formaldéhyde 1,2% contre un tampon d'électrophorèse (MOPS 1X) à raison de 10 volts/cm pour environ 3 à 4 h (source de tension: Biorad modèle 500/200). Les ARN totaux colorés au EtBr ont été visualisés aux rayons ultraviolets (UV) (Transilluminator, Fotodyne) puis le gel a été photographié afin d'assurer l'intégrité des ARN 28s et 18s qui est représentative de la qualité et de la quantité des ARN totaux déposés dans chaque piste.

## 2.5 Buvardage de type Northern

Un appareil Vacugene LKB (modèle: 2016) a été utilisé pour transférer l'ARN sur une membrane (10 cm x 15 cm) de nylon HYBOND-N (Amersham). La membrane de nylon a été déposée entre un support poreux et le gel d'électrophorèse. Une pellicule de plastique entourant la membrane, assurait l'étanchéité du montage. Une pression négative a été appliquée (50-60 cm x H<sub>2</sub>O) et le gel a d'abord été dénaturé 5 minutes en recouvrant sa surface avec la solution de dénaturation, puis la dénaturation a été arrêtée en traitant le gel de la même façon avec la solution de neutralisation. Le but de cette dénaturation était d'augmenter la porosité du gel, facilitant ainsi le transfert de l'ARN. Le buvardage a été effectué pour un temps de 2 à 3 h en appliquant une pression négative sous la membrane de nylon, ce qui permettait à la solution saline SSC 20X de traverser activement le gel et d'entraîner l'ARN vers la membrane de nylon par osmose inverse. L'ARN a par la suite, été fixé sur la membrane de nylon en exposant celle-ci à des rayons UV (Fotodyne, short wave UV) pour 2 à 3 minutes. La source d'UV a été calibrée périodiquement de sorte à maximiser la fixation de l'ARN. Ainsi immobilisé sur une matrice inerte, l'ARN ne pouvait se réassocier mais ses sites de liaison étaient disponibles pour hybridation avec une sonde de séquence complémentaire.

## 3. PRÉPARATION DES SONDÉS MOLÉCULAIRES

### 3.1 Choix des sondes pour c-fos, c-jun et jund

Les bactéries *Escherichia coli* MC1061 contenant le plasmide "pc-fos (mouse)-3" ont été obtenues de "l'American Type Culture Collection" (ATCC; Curran, 1982). Ce plasmide renferme un fragment d'ADN complémentaire de

7,1 kb contenant le gène *c-fos* complet. Le plasmide digéré à l'aide des enzymes de restriction *Sal* 1 et *Xho* 1 a généré un fragment de 2,2 kb correspondant aux exons 2 et 3 du proto-oncogène *c-fos* (Figure 8).

Les bactéries *Escherichia coli* HB101 contenant les plasmides JAC.1 (*c-jun*) et KHJ-12.4 (*jund*) ont également été obtenues de l'ATCC. Une digestion enzymatique effectuée avec l'enzyme *Eco* RI du plasmide JAC-1 a permis d'isoler un fragment de 2,6 kb correspondant au gène *c-jun*, tandis qu'une même digestion du plasmide KHJ-12.4 (*jund*) a généré un fragment de 1,67 kb codant pour *jund* (Nathans, 1986).

Le fragment utilisé pour la sonde *c-fos*, nous a donné des rendements variables. À quelques reprises, cette sonde générait un signal d'hybridation très faible. Nous expliquons ces variations de rendement par la présence d'un intron (portion non-codante) contenu dans le fragment *Xho* 1/*Sal* 1 (Figure 8). Cette hypothèse a été vérifiée seulement qu'à la fin de notre travail en utilisant un court fragment *Xho* 1/*Sal* 1/*Stu* 1 de 650 paires de base, qui permettait d'obtenir un signal d'hybridation de meilleure qualité. Il aurait cependant été intéressant d'utiliser cette sonde pour accomplir toutes les hybridations.

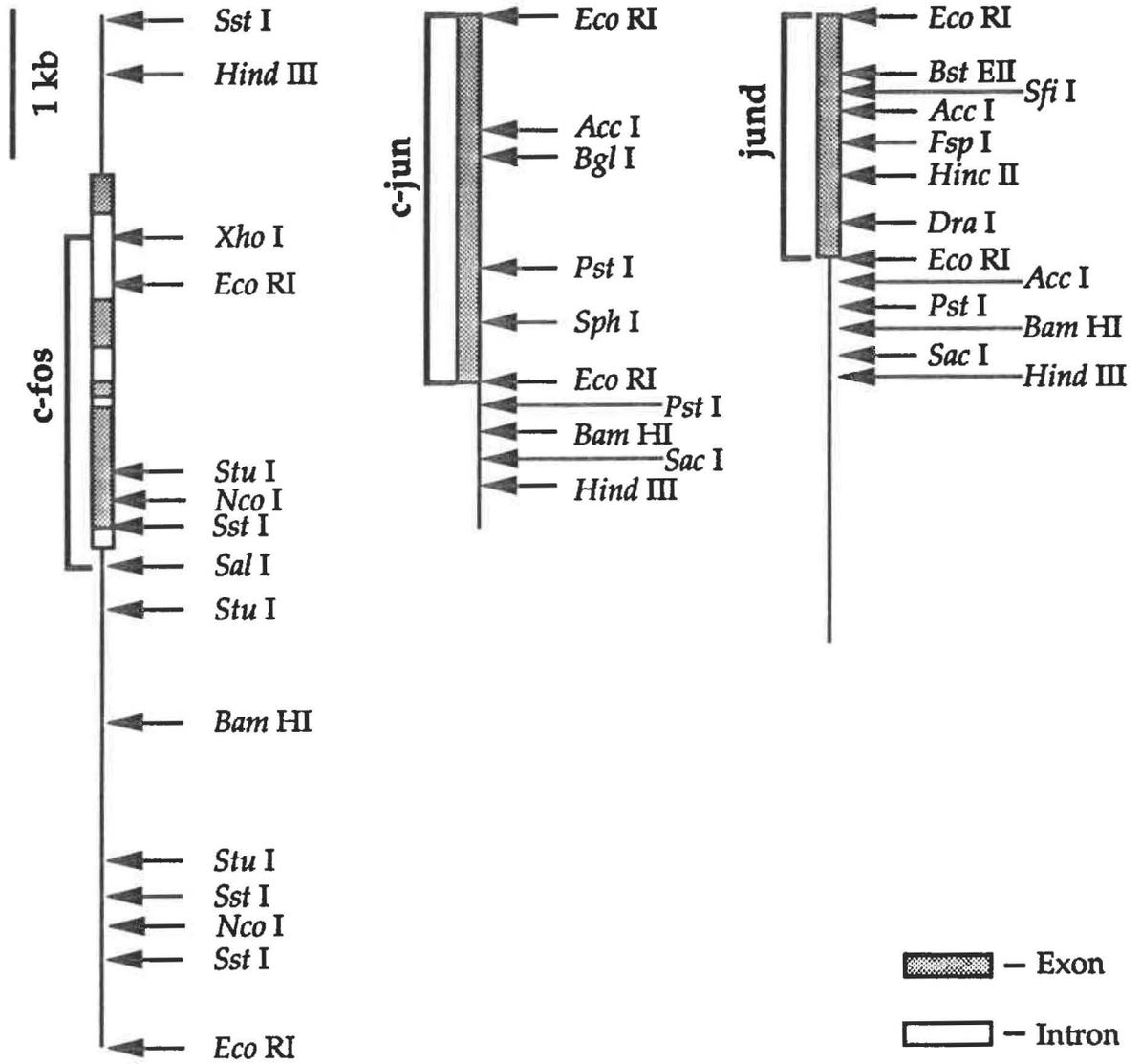
La sonde *c-jun* nous permettait dans certains cas de détecter deux populations distinctes d'ARNm, 3,2 kb et 2,7 kb. Aucune hypothèse n'est cependant disponible pour expliquer l'origine des deux bandes, elles sont tout simplement observées (Ryder et Nathans, 1988). L'hybridation de *c-jun* était spécifique et le signal de chacune des bandes variait de la même manière dans tous les cas.

FIGURE 8. Sondes utilisées pour l'hybridation avec l'ARN

pc-fos (mouse)-3

JAC.1

XHJ-12.4



### 3.1.1 Mini-préparation de l'ADN plasmidique

Cette méthode de préparation consistait à effectuer la lyse des bactéries à l'aide d'une solution alcaline contenant du SDS. Le détergent SDS permet la dénaturation des protéines, tandis que le NaOH permet la dénaturation des ADN chromosomique et plasmidique. La solution a ensuite été neutralisée en ajoutant de l'acétate de potassium, ce qui entraînait le réappariement rapide de l'ADN plasmidique, tandis que l'ADN chromosomique et les protéines précipitaient au culot après centrifugation. Le surnageant a été récupéré et concentré par une précipitation à l'EtOH.

Les bactéries lyophilisées contenant les différents plasmides ont été reconstituées stérilement dans 1 ml de milieu LB, puis étalées stérilement sur des géloses LB-agar contenant l'agent de sélection et incubées à 37°C. Le lendemain, 5 ml de milieu LB, contenant l'agent de sélection approprié, ont été inoculés avec une colonie isolée, puis incubés à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant 20 h (Birnboim, 1983).

### 3.1.2 Maxi-préparation de l'ADN plasmidique

L'isolement de l'ADN plasmidique à grande échelle a été effectué à partir d'une culture bactérienne de 600 ml. Le principe d'extraction est le même que celui des petites préparations d'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline. L'ADN extrait a ensuite été purifié sur gradient de CsCl (Sambrook *et al.*, 1989) en utilisant une centrifugeuse Beckman TL-100 avec un rotor TLA-100,2 à 100 000 rpm pendant 3 h à 20°C.

### 3.1.3 Digestion enzymatique de l'ADN plasmidique

Afin de vérifier la présence et l'intégrité des fragments d'ADN recherchés, nous avons procédé à la digestion de l'ADN plasmidique isolé, à l'aide d'enzymes de restriction. En général, un volume de 5 µl d'ADN plasmidique (environ 1 µg) a été digéré dans un volume de 20 µl selon les conditions de tampon et de température indiquées pour chaque enzyme.

### 3.1.4 Analyse des digestions enzymatiques

Les fragments générés par les digestions enzymatiques ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8%) 1 h à 8 volts/cm contre un tampon TAE. Le gel a ensuite été visualisé à l'aide de rayons UV puis photographié. La taille des ADN a été évaluée par comparaison aux marqueurs de poids moléculaires ( $\phi$ X 174/  $\lambda$  Hind III; Pharmacia). Les fragments de la taille recherchée ont ensuite été extraits du gel en utilisant la trousse d'extraction "GeneClean" (Bio 101).

### 3.2 Sonde glycéraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase

La sonde glycéraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase (GAPDH) a été obtenue à partir d'ARN total purifié de cellules RAW 264,7, lequel a été transcrit en ADN complémentaire par la transcriptase inverse MMLTV ("Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase"). Cet ADN a été amplifié par la technique de la polymérase en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces spécifiques à la GAPDH.

### 3.2.1 Réaction PCR

L'ensemble d'amplification d'ARN "GeneAmp" (Perkin Elmer, Cetus Corporation) a été utilisé pour effectuer les réactions de transcription inverse et d'amplification par PCR. Un aliquot contenant 0,5 µg d'ARN a été mélangé avec le tampon réactionnel, les nucléotides triphosphates, une solution inhibitrice de ribonucléase (RNasine), un oligo dT, complété à 20 µl avec H<sub>2</sub>O/DEPC, puis l'enzyme MMLTV a été ajoutée. Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 42°C.

Le mélange a été dénaturé pendant 5 minutes à 100°C et transféré dans un tube contenant le tampon de réaction, les amorces 5' et 3' spécifiques à la GAPDH (CLONTECH), l'ADN polymérase "AmpliTaq" et complété à 100 µl avec de l'eau. Les conditions réactionnelles consistaient en la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 1 minute, l'étape d'appariement de l'amorce d'ADN à 58°C pendant 2 minutes suivie de l'élongation de l'amorce d'ADN à 72°C pendant 3 minutes. Ces réactions ont été répétées pendant 30 cycles avec une étape finale d'élongation de 7 minutes au 30<sup>e</sup> cycle. Un fragment de 980 paires de base, correspondant à la GAPDH, a été obtenu de cette amplification à la suite de sa résolution sur gel d'agarose et extraction à l'aide de la trousse GeneClean (Bio 101)

## 4. HYBRIDATION DE L'ARN AVEC LES SONDÉS RADIOACTIVES

### 4.1 Marquage par amorce aléatoire.

Le procédé de marquage par amorce aléatoire ("random priming") utilise la propriété que des petits fragments aléatoires d'ADN (5 à 6 nucléotides) s'hybrident à l'ADN monocaténaire. L'hybridation de ces fragments sert d'amorces pour la

synthèse d'un nouveau brin d'ADN par le fragment "Klenow" de la polymérase. Cette synthèse permet d'incorporer les déoxyribonucléotides contenant un élément radioactif.

L'ensemble de marquage par amorce aléatoire "Oligolabelling". (Pharmacia) a été utilisé. D'abord, un aliquot contenant 50 ng d'ADN a été complété à 34  $\mu$ l avec H<sub>2</sub>O, dénaturé à 95°C pendant 3 minutes, puis placé sur glace 2 minutes. Il a ensuite été mélangé à 10  $\mu$ l de la solution "Reagent Mix" (dATP, dTTP, dGTP), 5  $\mu$ l de dCTP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] (111 TBq/mM; ICN) et 1  $\mu$ l du fragment "Klenow" de la polymérase. La préparation a été incubée à 37°C pendant 1 h. Les déoxynucléotides radioactifs non-incorporés ont été éliminés par précipitation à l'EtOH en ajoutant 5  $\mu$ g de la solution "Carrier DNA" fournie avec l'ensemble. Cet ADN a permis une meilleure précipitation et récupération de l'ADN radiomarqué. Les culots d'ADN radio-marqué ont été resuspendus dans 200  $\mu$ l de tampon TE.

#### **4.1.1 Comptage de la radioactivité incorporée dans l'ADN**

Un aliquot de 2  $\mu$ l de la solution d'ADN radio-marqué a été déposé sur filtre GC/FA (Fisher), séché, puis mélangé à 7 ml de liquide à scintillation (Fisher) afin de compter l'émission de particules  $\beta$ . Le nombre de cpm a été calculé par  $\mu$ l de sonde marquée.

#### **4.2 Pré-hybridation et hybridation**

La membrane de nylon sur laquelle a été fixé l'ARN (section 2.4) a été préhybridée (Hybridization Incubator, Robbins Scientific modèle: 316) pour un minimum de 4 h, à 42°C, dans 7 ml de solution de préhybridation, ce qui a permis

de bloquer les sites non-spécifiques d'attachement et a contribué à diminuer le bruit de fond. L'hybridation, d'une durée de 16 à 24 h, s'est effectuée dans 5 ml de solution d'hybridation à laquelle a été ajoutée un équivalent de  $5 \times 10^5$  cpm/ml de sonde radio-marquée, dénaturée pendant 5 minutes à 100°C, puis placée 5 minutes sur glace (Wahl *et al.*, 1979).

Les membranes ont ensuite été lavées pour enlever l'excédent de sonde non-hybridée à l'ARN. Les deux premiers lavages ont été effectués à 42°C, pendant 20 minutes, dans 20 ml de solution SSC 2 X, SDS 0,1% (p/v). Deux autres lavages ont été effectués à 60°C, pendant 20 minutes, avec 20 ml de SSC 0,2 X, SDS 0,2% (p/v). Les membranes ont été exposées contre un film à rayon X (Kodak, X-OMAR) en présence d'un écran intensificateur (Sigma) à -70°C. Les membranes ont successivement été hybridées avec les différentes sondes. Pour ce faire, la sonde radioactive a été éluée de la membrane en conditions astringentes par trois lavages de 30 minutes à 70°C dans la solution de déshybridation.

L'intensité des bandes a été évaluée à l'aide d'un vidéodensitomètre (Biorad Videodensitometer modèle: 620) par densitométrie (Biorad Photo Densitometer). Nous avons utilisé pour l'analyse mathématique le logiciel 1DPACK (Biorad) qui permet de calculer la surface sous la courbe des pics de densité optique générés par le vidéodensitomètre (Annexe 2). Le signal enregistré sur les autoradiogrammes était linéaire pour des valeurs de densité optique comprises entre 0,2 et 1,4.

## RÉSULTATS

### 1. EXTRACTION DE L'ARN

L'ARN total des cellules de la lignée RAW 264,7 a été obtenu par la méthode d'extraction à l'isothiocyanate de guanidium, puis purifié par ultracentrifugation sur gradient de CsCl. L'ARN, ainsi purifié, a ensuite été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose en condition dénaturante afin de distinguer les diverses populations d'ARN selon leur taille moléculaire.

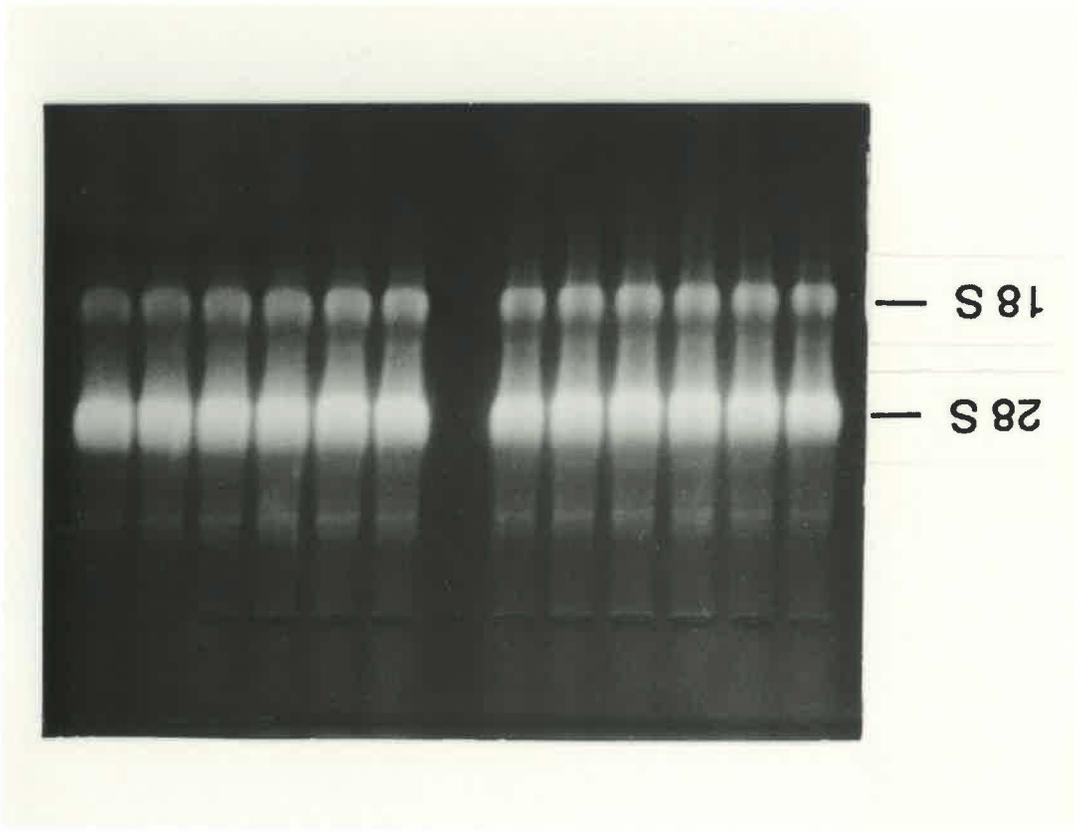
La Figure 9 représente une séparation typique sur gel d'agarose/formaldéhyde des ARN totaux extraits des cellules de la lignée RAW 264,7. Une quantité équivalente à 15 µg d'ARN total a été déposée dans chaque puits, comme en témoigne l'uniformité de l'intensité des pistes. Par ailleurs, les deux bandes majeures observées sur le gel correspondent aux ARN ribosomiaux 28 S (bande supérieure) et 18 S (bande inférieure). La résolution précise ainsi qu'une nette définition de ces bandes a permis d'évaluer l'ARN de façon qualitative. À l'opposé, des bandes diffuses sont le signe d'une dégradation avancée. La qualité du matériel de départ était d'une importance capitale afin de bien évaluer et quantifier l'expression génique.

### 2. CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES RAW 264,7

Les conditions de culture influencent l'expression des divers ARNm; il était donc important de vérifier l'effet du milieu de culture sur l'expression des proto-oncogènes. Plus particulièrement, nous avons cherché à déterminer si la

**FIGURE 9. Électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel d'agarose-formaldéhyde de l'ARN total extrait des cellules RAW 264,7.**

Cette photographie représente une séparation électrophorétique typique des différentes expériences effectuées. Chaque puits contient 15 µg d'ARN cellulaire total provenant de cellules ayant subi différentes stimulations avec le FMLP, le LPS ou en combinaison.



présence de SFB influençait l'expression du proto-oncogène *c-fos* chez les cellules de la lignée macrophagique RAW 264,7. Nous avons testé la capacité de ces cellules d'initier la transcription de l'ARNm de *c-fos*, lorsque ces dernières étaient maintenues en culture 24 h précédant la stimulation dans le milieu DMEM, en absence et présence de 5% SFB. Les cellules ont ensuite été stimulées en utilisant une forte dose de LPS (500 ng/ml) pour des temps de 30 et 60 minutes, correspondant à l'initiation de la transcription du proto-oncogène *c-fos*. Ces résultats sont présentés à la Figure 10. Par ailleurs, l'hybridation avec un gène de référence interne dont l'expression ne dépend pas de l'activité métabolique, codant pour le GAPDH, a permis de s'assurer de la quantité relative d'ARN déposée dans chaque piste (Figure 10).

La présence de SFB favorisait une forte expression constitutive de *c-fos*, tel qu'observé dans la piste 1. Cette expression continue était réprimée par la déplétion de SFB pendant 24 h (piste 4). Les pistes 2, 3, 5 et 6 représentent l'induction de la transcription de *c-fos* par le LPS, qui était possible en absence aussi bien qu'en présence de SFB. Le niveau maximal d'ARNm de *c-fos* était inférieur en absence de SFB, et, il était atteint plus lentement qu'en présence de SFB. Ainsi, nous avons choisi de priver les cultures cellulaires de SFB, 24h avant les stimulations LPS, de manière à empêcher l'expression spontanée de *c-fos*, cette dernière conservant sa capacité d'induction par le LPS. L'influence du SFB sur l'expression des proto-oncogènes *c-jun* et *jund* n'a pas été évaluée.

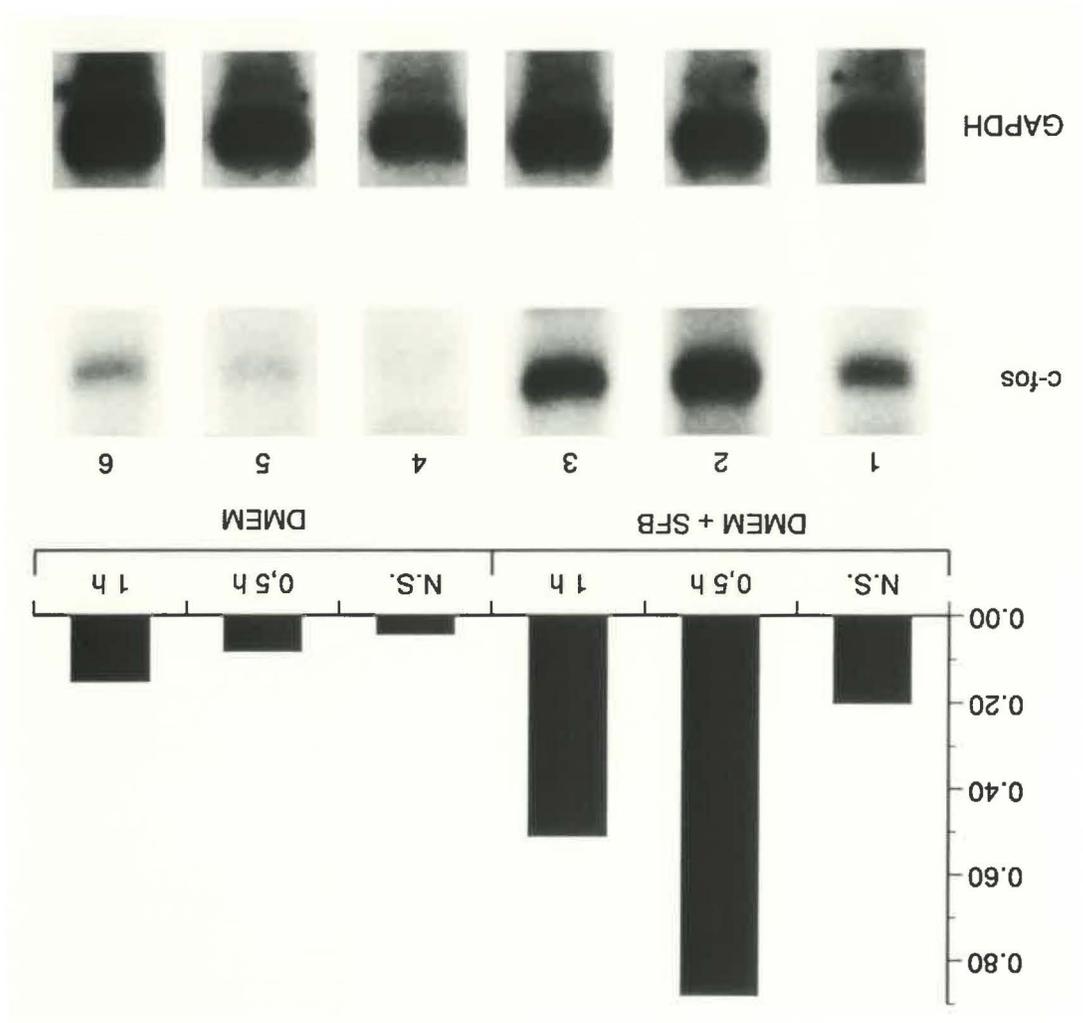
**FIGURE 10. Influence des conditions de culture des cellules RAW 264,7 sur l'expression de c-fos**

La représentation graphique démontre l'influence du SFB à différents temps de stimulation (en heures; présentée en abscisse) en fonction du rapport de la densité optique de l'expression du gène c-fos versus celle de l'expression constitutive du gène de référence glycéraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase (GAPDH) (en ordonnée) suivant une stimulation avec 500 ng/ml de LPS.

Pistes 1 à 3: cellules maintenues en culture en présence de SFB

Pistes 4 à 6: cellules privées de SFB 24 heures avant la stimulation LPS

N.S.: témoin non-stimulé



### 3. CINÉTIQUE DE L'EXPRESSION DES PROTO-ONCOGÈNES C-FOS, C-JUN ET JUND

La cinétique de l'expression de l'ARNm des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund, en absence de SFB, a été entreprise dans le but de mesurer les temps optimum de stimulation nécessaires, dans le cas du LPS. Une quantité suffisante de LPS (50 ng/ml; sélectionnée selon les résultats présentés à la section 4.2) a été utilisée pour les stimulations s'échelonnant de 15 minutes à 4 h (Figure 11).

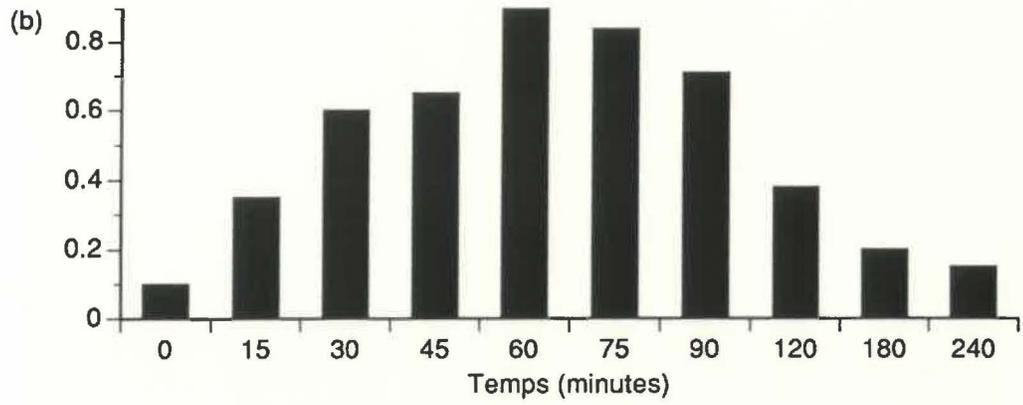
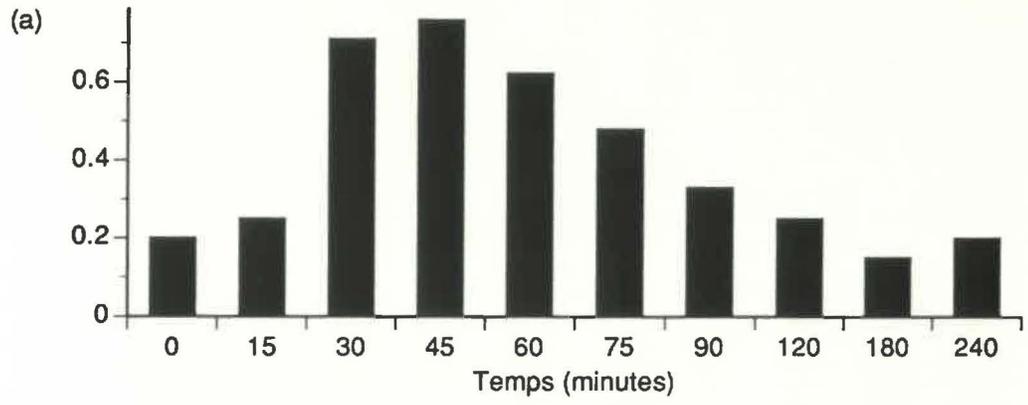
L'expression de l'ARNm de c-fos était transitoire et atteignait un maximum d'accumulation entre 30 et 45 minutes (Figure 11a). Cette expression revenait à un niveau basal équivalent à celui de l'échantillon non-stimulé (au temps 0), approximativement 120 minutes après le signal fourni par le LPS.

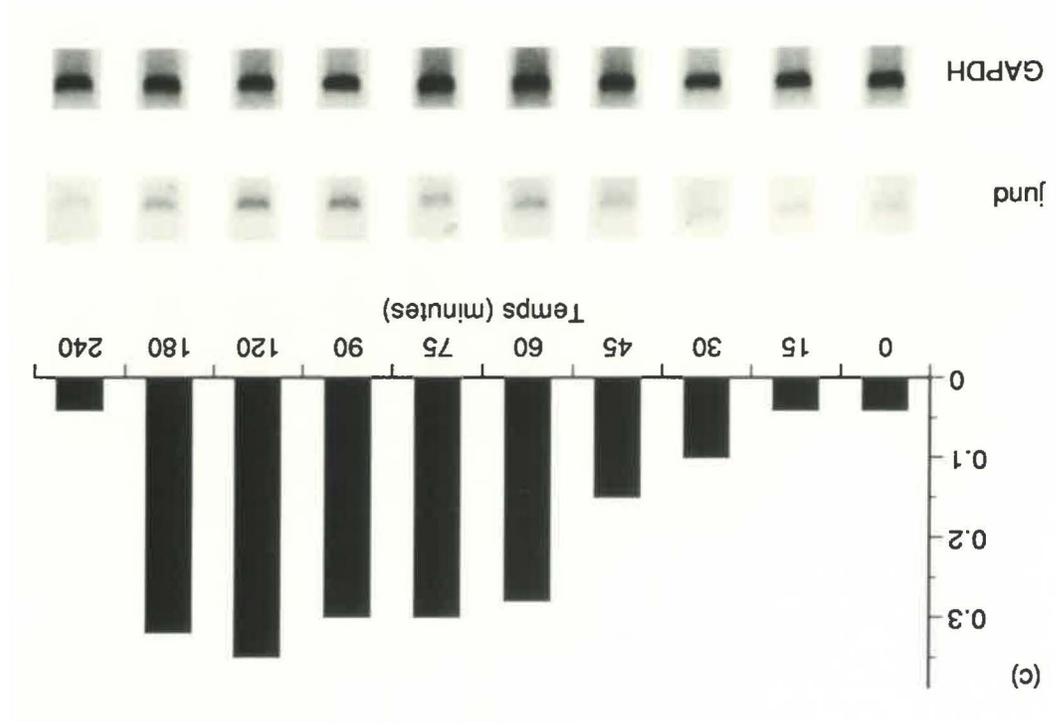
La cinétique d'accumulation du proto-oncogène c-jun était également un phénomène transitoire passant par un maximum entre 60 et 75 minutes suivant la stimulation avec le LPS (Figure 11b). Nous avons observé une légère expression spontanée dans l'échantillon non-stimulé (temps = 0). L'accumulation de l'ARNm tendait à revenir au niveau basal 180 minutes suivant le contact des cellules avec le LPS.

L'accumulation de l'ARNm codant pour le proto-oncogène jund était plus lente à réagir à l'effet du LPS, et atteignait un maximum entre 60 et 180 minutes après stimulation par le LPS (Figure 11c). Une forte expression spontanée caractérisait ce proto-oncogène et, suivant la stimulation avec le LPS, le niveau basal ne revenait qu'au bout de 240 minutes post-stimulation.

**FIGURE 11. Cinétiques de l'expression de c-fos, c-jun et jund**

La représentation graphique correspond au rapport de la densité optique de l'expression des gènes (a) c-fos; (b) c-jun; (c) jund, versus celle de l'expression constitutive du gène de référence glycéraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase (GAPDH) suivant la stimulation avec 50 ng/ml de LPS (présenté en ordonnée) à des temps variant de 0 à 240 minutes (en abscisse). Les résultats présentés représentent une seule expérience, mais ont été reproduits de façon indépendante, dans au moins une autre expérience.





(c)

Les niveaux d'expression de ces trois proto-oncogènes ont été évalués par densitométrie en comparant l'absorbance de chaque signal de l'autoradiogramme à celle générée par le gène de contrôle, GAPDH, exprimé de manière constitutive et constante par les cellules RAW 264,7. L'évaluation des absorbances pondérées par celle du signal du gène GAPDH, nous a permis d'établir le temps auquel l'expression de chaque proto-oncogène était maximale: c-fos, au temps 45 minutes; jund, au temps 75 minutes; et c-jun, entre ces deux temps.

#### **4. ÉVALUATION DE L'EFFET DOSE-RÉPONSE DU SIGNAL LPS ET FMLP**

Ce travail consistait à vérifier l'effet du FMLP sur l'activation des cellules RAW 264,7, en utilisant comme marqueurs d'activation cellulaire, les gènes de compétence précoce c-fos, c-jun et jund.

##### **4.1 Effet du FMLP seul**

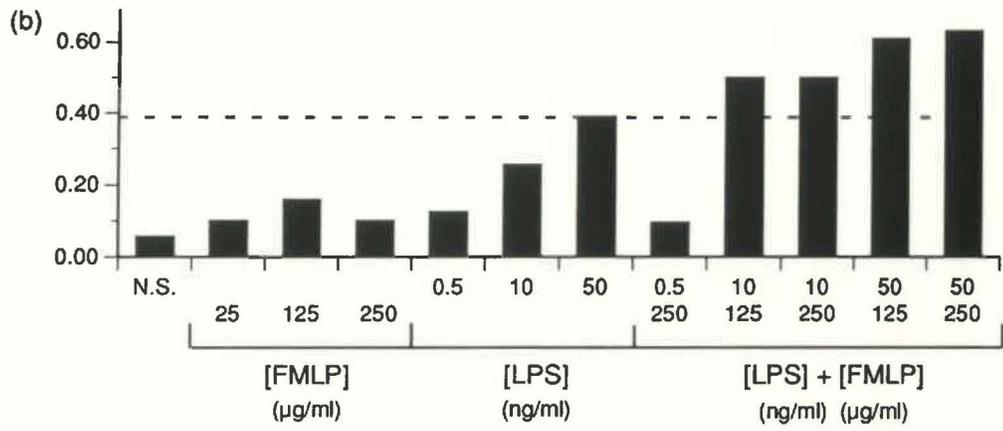
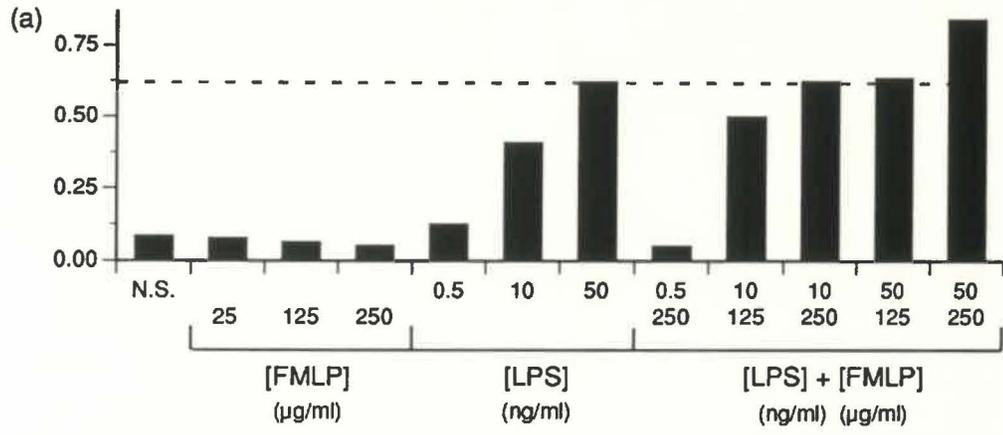
Nous avons d'abord procédé à la vérification de l'influence qu'exerce le FMLP seul sur ces trois gènes. Comme nous pouvons le constater sur les Figures 12a, 12b et 12c, l'effet du FMLP sur les m $\phi$  non-stimulés était négligeable, et ce, quelle que soit la dose utilisée.

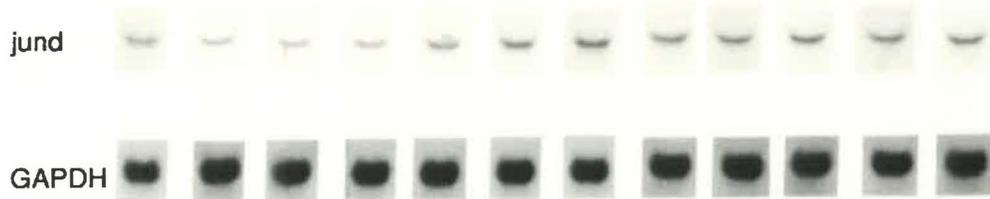
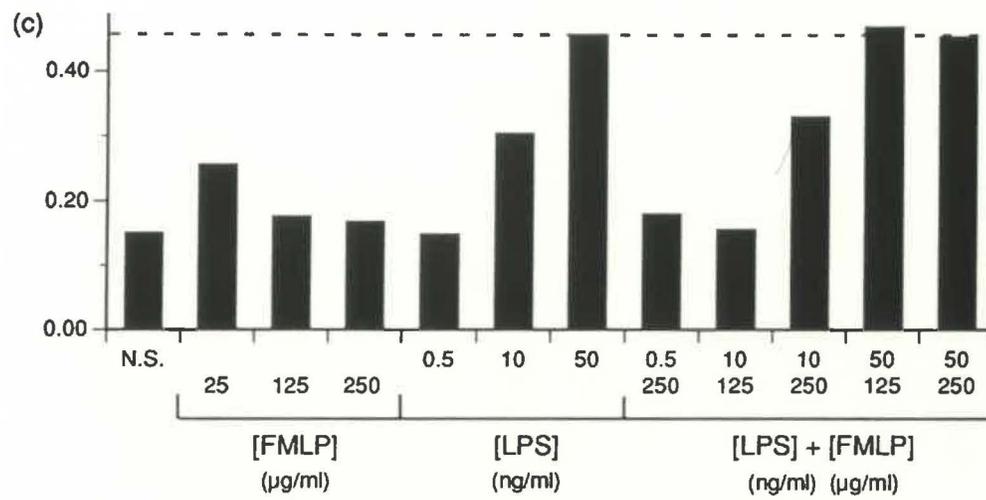
##### **4.2 Effet du LPS seul**

Cependant, en présence de LPS seulement, l'effet dose-réponse donne des résultats différents (Figures 12a, 12b, 12c). Une concentration de 0,5 ng de LPS était insuffisante pour induire l'activation des gènes c-fos, c-jun ainsi que jund. Toutefois, dès que la concentration de LPS atteignait 10 ng/ml ou plus, les cellules pouvaient être stimulées et il semble que le début leurs changements métaboliques

**FIGURE 12. Effet dose réponse en présence de FMLP seul, LPS seul et en combinaison du FMLP et LPS**

La représentation graphique correspond au rapport de la densité optique de l'expression des gènes (a) c-fos; (b) c-jun; (c) jund, versus celle de l'expression constitutive du gène de référence glyceraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase (GAPDH) (présenté en ordonnée) suivant la stimulation avec des doses variables de FMLP seul (25 à 250  $\mu\text{g/ml}$ ), des doses variables de LPS seul (0,5 à 50  $\text{ng/ml}$ ) ainsi que des doses combinées de FMLP (125 et 250  $\mu\text{g/ml}$ ) et de LPS (0,5 à 50  $\text{ng/ml}$ ) (en abscisse). L'expression de c-fos et c-jun est évaluée à un temps optimum de 45 minutes, tandis que celle de jund est évaluée à 75 minutes. Les résultats présentés représentent une seule expérience, mais ont été reproduits de façon indépendante, dans au moins deux autres expériences.





se traduisait par l'expression de c-fos et de c-jun, puis de jund. La concentration de 10 ng/ml de LPS peut donc être qualifiée de "valeur seuil" (de sensibilité) pour l'expression de ces trois gènes.

#### **4.3 Effet combiné FMLP et LPS**

Dans un troisième temps, nous avons voulu évaluer l'effet combiné de ces deux substances (FMLP et LPS) sur les cellules RAW 264,7 (Figures 12a, 12b, 12c). Dans ce cas, les deux stimuli ont été administrés simultanément. Différentes doses de FMLP combinées à différentes doses de LPS ont été utilisées. L'effet combiné FMLP-LPS a été comparé respectivement à l'expression maximale atteinte par le gène donné et ce, à la même concentration de LPS. Dans l'ordre, en débutant par les concentrations de LPS croissantes, nous avons constaté qu'une addition de FMLP, 250 µg/ml, à 0,5 ng/ml de LPS, n'était pas suffisante pour induire l'expression des gènes c-fos, c-jun et jund, qui ne s'élevait pas plus que les niveaux basaux des échantillons non-stimulés ou ayant été soumis au stimulus du FMLP seul. Lorsque la concentration de LPS atteignait 10 ng/ml, le FMLP présentait une action plus importante. Les stimuli du LPS et de concentration croissante de FMLP, donnés simultanément, semblaient augmenter l'activation de certains proto-oncogènes chez les cellules RAW 264,7, en comparaison avec le stimulus LPS seul. Le phénomène observé ne découle pas d'une action additive du FMLP, puisque ce dernier, seul, n'influence pas l'induction des gènes c-fos, c-jun et jund. L'ajout de FMLP en concentration croissante, augmentait de 15 à 25% l'action du LPS à 10 ng/ml. Une concentration de FMLP de 125 et 250 ng/ml favorisait l'augmentation de l'induction de l'expression des gènes c-fos (Figure 12a) et c-jun (Figure 12b) de manière dose-dépendante, tandis que l'accumulation d'ARNm de

jund (Figure 12c) ne semblait pas affectée par la présence de FMLP. En présence de LPS à une concentration de 50 ng/ml, nous avons observé le même phénomène. Cette concentration de LPS a permis d'atteindre des niveaux d'activation maximum pour les trois proto-oncogènes. De plus, à cette concentration de LPS, nous avons aussi observé une élévation des quantités d'ARNm détectées dans les cas de c-fos et c-jun, tandis que pour jund, ces niveaux demeuraient inchangés.

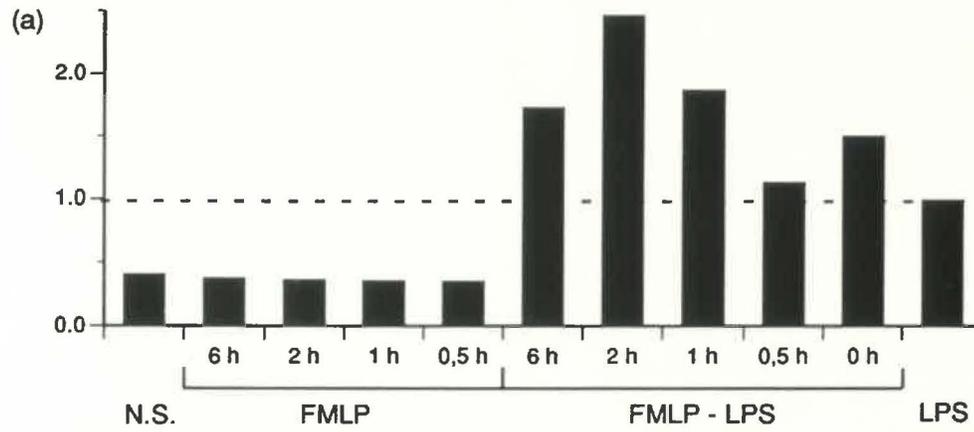
## 5. CONDITIONNEMENT DES CELLULES AVEC LE FMLP

Le mode d'activation du FMLP est un phénomène très rapide. Cependant, les cellules peuvent rencontrer le LPS et le FMLP de façon successive. Ainsi, nous avons voulu savoir ce qui se passe lorsque le FMLP est administré assez longtemps avant la stimulation avec le LPS, en somme connaître les conséquences d'un "conditionnement" des cellules RAW 264,7 avec le FMLP, sur une période de 6 h précédant la stimulation avec le LPS (Figures 13a et 13b). Ce dernier a été ajouté directement aux cellules sans rinçage préalable. Celui-ci avait pour résultat l'augmentation d'ARNm de c-fos (Figure 13a). Les augmentations dans l'abondance d'ARNm de c-fos variaient entre 20% et 250%, par rapport au témoin LPS, et atteignaient leur maximum lorsque les cellules ont été conditionnées avec le FMLP pendant les 2 h précédant la stimulation avec le LPS.

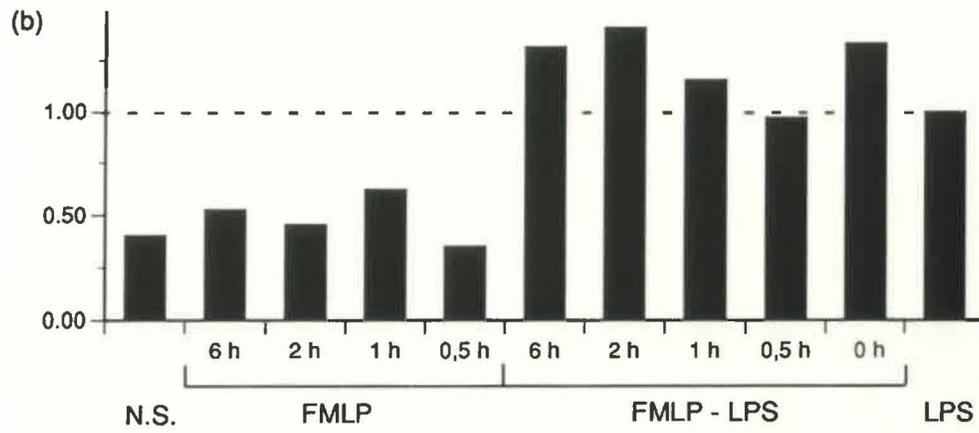
Le conditionnement des cellules avec le FMLP suivi de la stimulation avec le LPS avait moins d'influence sur l'expression de c-jun (Figure 13b). Nous avons observé peu de variation lors des prétraitements de 6 h, 2 h, 1 h et 0,5 h. En général, la présence de FMLP a permis d'accroître légèrement l'induction de l'expression de c-jun par le LPS. Les expériences effectuées avec le gène jund, ne sont pas présentées à cause de contretemps techniques.

**FIGURE 13. Conditionnement préalable des cellules RAW 264,7 avec le FMLP**

La représentation graphique correspond au ratio normalisé par rapport au LPS (valeur relative de 1,0) de la densité optique de l'expression des gènes (a) c-fos; (b) c-jun, versus celle de l'expression constitutive du gène de référence glycéraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase (GAPDH) (présenté en ordonnée) suivant la stimulation avec une dose de 250 µg/ml de FMLP seul administré à des temps variables avant la stimulation avec 50 ng/ml de LPS (en abscisse). L'expression de c-fos et c-jun est évaluée à un temps optimum de 45 minutes suivant l'ajout de LPS. Les résultats présentés représentent une seule expérience, mais ont été reproduits de façon indépendante, dans au moins une autre expérience. Les expériences effectuées avec le gène jund, ne sont pas présentées à cause de contretemps techniques.



c-fos



c-jun



GAPDH



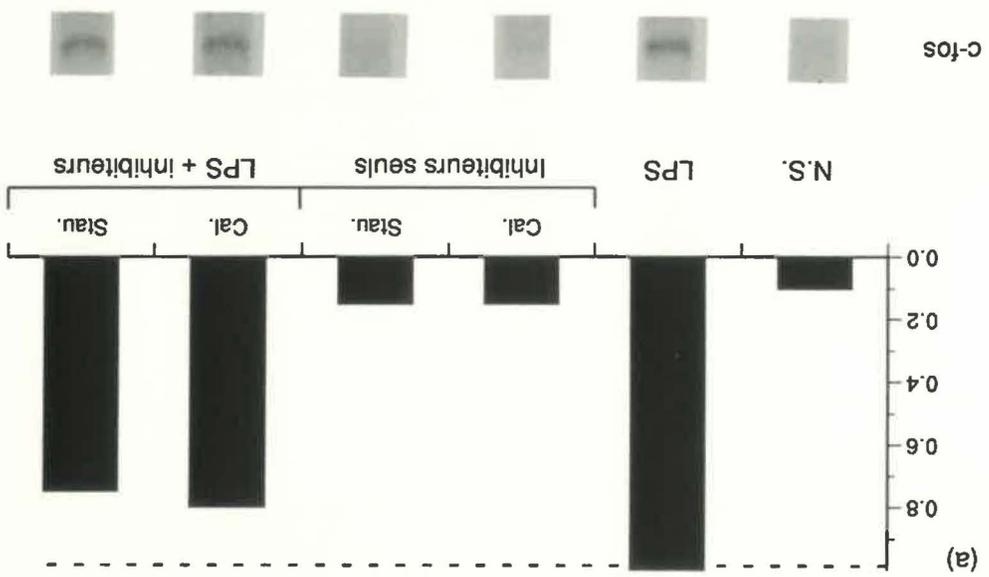
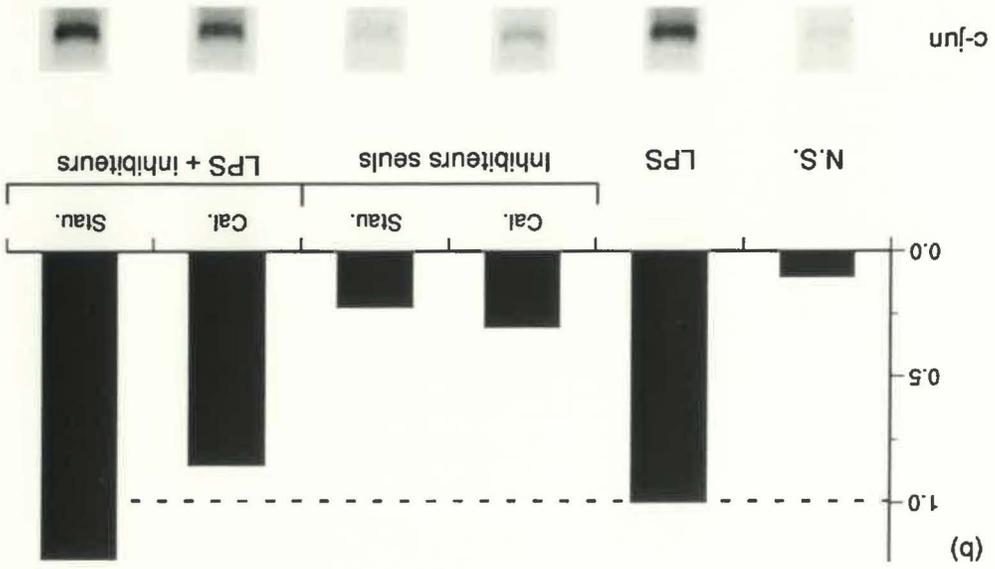
## 6. ACTION D'INHIBITEURS DE PROTÉINES KINASES C

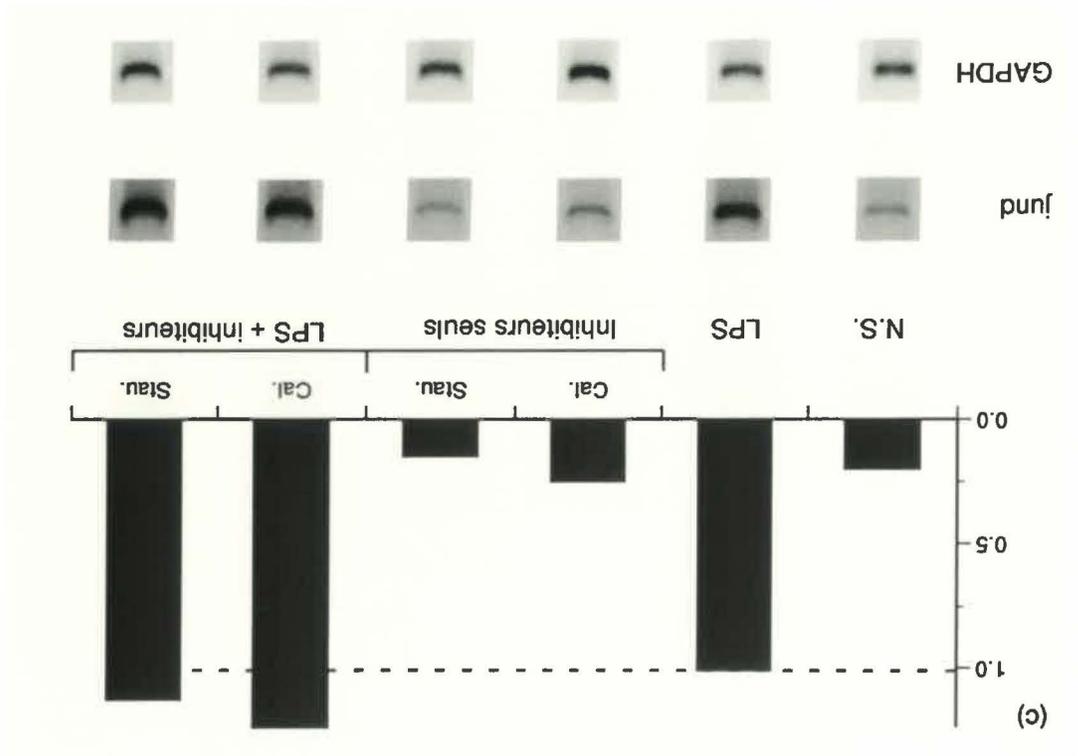
Dans le but de distinguer l'influence du substrat sur la régulation ou les signaux provenant des voies de transduction, nous avons vérifié l'action des inhibiteurs calphostin C et staurosporine sur l'expression de c-fos, c-jun et jund lors d'une stimulation par le LPS (Figures 14a, 14b et 14c).

Les cellules ont d'abord subi un pré-traitement avec les inhibiteurs calphostine C et staurosporine pendant 30 minutes avant l'addition de LPS. Les inhibiteurs seuls n'influençaient pas les niveaux d'expression spontanée de c-fos, c-jun et jund. Nous avons observé très peu d'effet lorsque les cellules étaient d'abord mises en présence d'inhibiteurs, puis stimulées avec le LPS et ce, pour les trois gènes. Les variations observées n'étaient pas significatives.

**FIGURE 14. Effets des inhibiteurs de la protéine kinase C**

La représentation graphique correspond au ratio normalisé par rapport au LPS (valeur relative de 1,0) de la densité optique de l'expression des gènes (a) c-fos; (b) c-jun; (c) jund, versus celle de l'expression constitutive du gène de référence glycéraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase (GAPDH) 60 minutes suivant la stimulation avec 50 ng/ml de LPS. Les cellules RAW 264,7 ont été pré-traitées 30 minutes avant les stimulations au LPS, avec 0,5  $\mu$ M de calphostine C (Cal.) ou 10 nM de staurosporine (Stau.). Les résultats présentés représentent une seule expérience, mais ont été reproduits de façon indépendante, dans au moins une autre expérience.





## DISCUSSION

Les cellules phagocytaires jouent un rôle central dans les mécanismes de défense de l'hôte contre les infections bactériennes. Deux dérivés bactériens retrouvés sur le site d'infection ont un grand pouvoir activateur sur les macrophages. D'une part, le FMLP qui induit le chimiotactisme ainsi que l'activation cellulaire et d'autre part, le LPS qui est reconnu pour provoquer de nombreuses sécrétions et notamment celles de cytokines. Comme d'autres molécules, le FMLP seul ou en combinaison avec d'autres stimuli module l'activation cellulaire. Afin de caractériser cette activation chez les macrophages, cellules qui jouent un rôle primordial dans les mécanismes de défense, nous avons voulu étudier l'expression de marqueurs cellulaires apparaissant très tôt après une stimulation avec le FMLP seul ou en combinaison avec le LPS. Notre choix s'est arrêté sur l'étude de l'expression des proto-oncogènes *c-fos*, *c-jun* et *jund* puisque ceux-ci sont exprimés de manière très précoce et participent à la transduction des signaux d'activation des cellules. L'expression des proto-oncogènes a été évaluée par des analyses de type Northern.

### 1. INFLUENCE DU SÉRUM SUR L'EXPRESSION DE C-FOS

Le sérum est bien connu pour induire l'expression de *c-fos* chez la majorité des types cellulaires (Bruder *et al.*, 1992). Cette expression est due à la présence d'un site SRE qui est présent à l'intérieur du promoteur de *c-fos* (voir Figure 6). En absence de stimulus mais en présence de SFB, nous aussi, avons observé une forte expression constitutive du gène *c-fos* des cellules macrophagiques RAW 264,7

(Figure 10). Afin de vérifier l'influence du sérum sur l'expression constitutive de *c-fos*, les cellules macrophagiques RAW 264,7 ont été privées de SFB pendant 24 h, puis stimulées avec 500 ng/ml de LPS. Nous avons observé que ce traitement contribue à diminuer le niveau basal d'expression de l'ARNm du proto-oncogène *c-fos* (Figure 10). De plus, la déplétion de SFB du milieu de culture influence la cinétique d'induction du gène *c-fos* vers des temps plus longs (60 minutes versus 30 minutes lorsqu'en présence de sérum), de même que le niveau maximum de l'ARN transcrit détecté lors de l'hybridation.

Des traitements similaires ont aussi été utilisés pour diminuer l'expression constitutive de *c-fos*, dans son évaluation d'expression avec des mœ péritonéaux ainsi qu'avec certaines lignées cellulaires tant fibroblastiques que monocytaires (Fort *et al.*, 1987; Schönthal *et al.*, 1991).

La diminution de l'expression du gène *c-fos* en absence de SFB pourrait être liée au mode de stimulation cellulaire utilisé par le LPS. Ce dernier peut interagir avec les cellules par l'entremise de quatre récepteurs distincts dont seulement deux sont impliqués dans l'activation cellulaire. Parmi ces deux récepteurs, le récepteur cellulaire CD14 n'interagit avec la molécule de LPS que lorsque celle-ci est complexée à une glycoprotéine sérique de 60 kD, la LBP ("LPS binding protein"; Tobias *et al.*, 1986). La LBP lie le LPS libre, puis transfère ce dernier sur le récepteur CD14. D'une part, Wright *et al.* (1990b) ont démontré l'importance du récepteur CD14 au niveau de l'activation cellulaire induite par le LPS en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CD14: la sécrétion de cytokines était alors inhibée. D'autre part, Lee *et al.* (1992) ont démontré, avec des cellules dépourvues de CD14, que le LPS pouvait aussi agir selon un processus d'activation cellulaire indépendant de ce récepteur cellulaire. Par contre, lorsque les cellules

dépourvues de CD14 sont transfectées avec un vecteur d'expression exprimant le récepteur cellulaire CD14 humain, elles peuvent être activées par des concentrations de LPS très inférieures à celles requises pour les cellules CD14<sup>+</sup>. Le processus d'activation cellulaire indépendant du récepteur CD14 serait lié à la présence du récepteur pour le LPS de 73 kD (Lei et Morrison; 1988a, 1998b). En effet, des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de 73 kD ont permis l'observation d'une activation cellulaire similaire à celle induite par le LPS (Lei *et al.*, 1991).

Le sérum semble donc influencer le niveau d'expression basal du gène *c-fos* en agissant sur le site SRE présent dans le promoteur de *c-fos*, ce qui rendrait son expression sensible à la présence des facteurs du sérum. L'expression plus faible du proto-oncogène *c-fos* en absence de SFB nous permettrait de mieux évaluer l'expression induite uniquement par les stimuli administrés. Le SFB pourrait influencer la réponse au stimulus engendré par le LPS, puisque la glycoprotéine LBP est importante dans l'interaction du LPS avec le CD14. L'absence de signal transduit par le CD14 pourrait, en effet diminuer l'intensité de l'activation cellulaire mesurée par l'expression de *c-fos*, induite par le LPS, puisque ce dernier n'agirait que par l'entremise du récepteur de 73 kD (Lee *et al.*, 1992; Lei *et al.*, 1991).

## **2. CINÉTIQUE D'EXPRESSION DES PROTO-ONCOGÈNES EN PRÉSENCE DE LPS**

Nous avons ensuite évalué les cinétiques d'expression des proto-oncogènes *c-fos*, *c-jun* et *jund* des cellules RAW 264,7, en absence de SFB. Les cinétiques

d'expression nous ont permis de déterminer les temps optimum pour détecter l'expression de ces trois proto-oncogènes.

Dans nos conditions expérimentales, en absence de SFB, le maximum d'accumulation d'ARNm, pour le proto-oncogène *c-fos*, est observé 45 minutes suivant la stimulation avec 50 ng/ml de LPS, et atteint 4 fois la valeur du témoin non-stimulé (Figure 11a). Nous avons observé que l'expression de ce gène est transitoire, puisqu'elle revient à un niveau de base comparable à celui du témoin non-stimulé 120 minutes après le stimulus LPS. L'expression de l'ARNm du proto-oncogène *c-jun* présente une cinétique similaire à celle du proto-oncogène *c-fos* et atteint un maximum 60 minutes après la stimulation avec 50 ng/ml de LPS (Figure 11b). Le retour au niveau du témoin non-stimulé est observé 180 minutes suivant la stimulation avec le LPS. Le proto-oncogène *jund* présente une cinétique d'expression d'ARNm qui diffère de celles de *c-fos* et de *c-jun*: elle démontre un maximum d'expression entre 60 et 180 minutes (Figure 11c) puis son retour au niveau basal s'observe 240 minutes après le stimulus LPS.

Ces résultats diffèrent légèrement des cinétiques observées avec des *mø* péritonéaux murins, où l'apparition du proto-oncogène *c-fos* est éphémère et atteint un maximum d'accumulation de quatre à huit fois supérieur au niveau basal d'expression, seulement 30 minutes après le stimulus, pour ensuite revenir à son niveau basal à 90 minutes post-stimulus (Radzioch et Varesio, 1991). Les cinétiques de *c-jun* et *jund* que nous avons obtenues, aussi étudiées chez la lignée fibroblastique murine 3T3 par Schöntal *et al.* (1991) et Ryder *et al.* (1989) respectivement, suivent la même tendance d'apparition tardive que celle observée pour *c-fos*. Cependant, les maxima d'accumulation de *c-fos*, *c-jun* et *jund* semblent

étendus sur une plus longue période de temps, comparativement aux cinétiques obtenues avec les mœ péritonéaux murins et les fibroblastes murins.

Les divergences observées entre nos résultats et ceux des équipes citées ci-haut pourraient être liées aux conditions expérimentales utilisées. D'une part, l'étude de l'expression de ces proto-oncogènes a été évaluée chez la lignée macrophagique RAW 264,7 pour la première fois dans notre laboratoire. Toutes les données disponibles ont été obtenues soit avec des macrophages péritonéaux murins soit avec des lignées fibroblastiques murines. D'autre part, notre protocole expérimental privait les cellules RAW 264,7 de SFB 24 h avant la stimulation avec le LPS, tandis que nos collègues effectuaient des stimulations avec le LPS en absence de SFB tout simplement.

L'expression tardive de ces trois proto-oncogènes des cellules RAW 264,7 ainsi que son délai de disparition peuvent également être dus à l'absence de phase de réplication simultanée, qui caractérise les lignées cellulaires maintenues *in vitro*. En effet, la réplication continue des cellules immortalisées n'est pas un phénomène synchronisé: toutes les cellules n'atteignent pas leur phase de réplication G<sub>0</sub> au même moment. De plus, les proto-oncogènes, exprimés de façon précoce, sont exprimés à un moment très précis, soit au début de cette phase G<sub>0</sub> (Blanchard, 1992; Reuse *et al.*, 1991). L'expression des proto-oncogènes à un temps différent pour chaque cellule, serait sans doute le résultat d'un décalage entre ces expressions, dans toutes les cellules de la population. Ainsi, les niveaux d'accumulation d'ARNm observés représenteraient la moyenne du niveau d'expression selon la phase initiale de réplication.

L'absence de SFB dans le milieu de culture pourrait modifier la cinétique d'expression des proto-oncogènes *c-fos*, *c-jun* et *jund* lorsque les cellules RAW 264,7 sont stimulées avec le LPS. Un facteur présent dans le sérum pourrait être impliqué dans les mécanismes d'activation cellulaire induits par le LPS. Ce facteur semble important pour augmenter la vitesse d'induction par le LPS et pourrait être relié à la protéine sérique LBP nécessaire à la liaison du LPS au récepteur cellulaire CD14. D'autre part, l'induction des proto-oncogènes cellulaires par le LPS en absence de sérum, pourrait confirmer l'existence d'une voie de stimulation CD14 indépendante.

Lors de la stimulation en absence de SFB, nous avons observé un faible niveau basal de transcription pour les gènes *c-fos*, *c-jun* et *jund*, ce qui représenterait un certain niveau d'expression essentiel à la viabilité cellulaire (Castellazzi *et al.*, 1991). La régulation du niveau d'expression basale pourrait être due à la région CRE localisée à l'intérieur du promoteur de *c-fos* (voir Figure 6), ainsi qu'à la région octamérique présente dans le promoteur de *jund* (voir Figure 6).

### 3. INFLUENCE DU FMLP

Le FMLP peut influencer le métabolisme des cellules phagocytaires selon deux modalités (Snyderman et Uhing, 1992). Premièrement, à une concentration de  $10^{-8}$  M, il induit un chimiotactisme des cellules, orienté vers les plus hautes concentrations de FMLP. Deuxièmement, en présence de concentrations de FMLP très supérieures, soit  $10^{-6}$  M ou plus, ces cellules deviennent "activées". Ceci se traduit par une augmentation de la phagocytose ainsi que des sécrétions de dérivés oxygénés et d'enzymes lysosomiales.

Lors de la stimulation des cellules RAW 264,7 avec des doses entraînant l'activation cellulaire ( $10^{-5}$  à  $10^{-4}$  M), nous avons trouvé que le FMLP n'induit pas l'expression de c-fos, c-jun et jund (Figure 12). À toutes les doses utilisées ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$ ), les niveaux d'expression restaient comparables au niveau du témoin non-stimulé. Nos résultats vont à l'encontre de ceux obtenus par Ho *et al.*(1987), qui montrent que des concentrations de  $10^{-6}$  M de FMLP entraînent une élévation de l'expression du gène c-fos. Il est important de noter par contre, que les résultats de Ho *et al.* ont été obtenus avec des mo du sang périphérique humain, alors que les nôtres le furent avec une lignée d'origine murine RAW 264,7.

Des résultats récents (Tremblay *et al.*, en préparation) montrent que les cellules RAW 264,7 expriment relativement peu de récepteurs pour le FMLP. Cette observation pourrait donc expliquer la divergence de nos résultats avec ceux obtenus par Ho *et al.* (1987): le nombre de récepteurs cellulaires étant moindre, l'expression de c-fos induite par le FMLP pourrait elle aussi, être moindre.

#### 4. INFLUENCE DU LPS

La structure et l'efficacité d'activation de la partie "lipide A" du LPS diffère d'une souche bactérienne à l'autre (Lynn et Golenbock, 1992). La dose de LPS nécessaire pour activer les mØ dépend de son origine bactérienne. Nous avons utilisé du LPS extrait de la souche *E. coli* sérotype 0127:B8 et nous avons observé que des doses supérieures à 10 ng/ml permettent d'induire l'expression de c-fos, c-jun et jund de manière dose dépendante (Figure 12). Un tel effet dose-réponse a également été rapporté par Introna *et al.* (1986). Cette équipe rapporte par contre l'induction de l'expression de c-fos avec une dose aussi faible que 0,1 ng/ml de LPS, mais leurs conditions expérimentales différaient des nôtres. Premièrement, les

sérotypes de LPS utilisés étaient différents. Deuxièmement, nous avons effectué les stimulations cellulaires sans la présence de SFB. Cette observation corrobore les résultats obtenus par Lee *et al.* (1992) qui suggèrent que l'absence de sérum, ce qui impliquerait l'absence de LBP, empêcherait les signaux d'activation cellulaire provenant du CD14. Dans notre modèle, la concentration de 10 ng/ml de LPS pourrait donc être qualifiée de "valeur seuil" (de sensibilité) pour l'expression des trois proto-oncogènes. L'expression maximale de ces trois gènes est atteinte en utilisant une dose de 50 ng/ml de LPS.

## 5. EFFETS COMBINÉS DU LPS ET DU FMLP

Les *m*ø sollicités lors d'une infection bactérienne reçoivent des signaux variés seuls ou en combinaison, pouvant résulter en des types de réponses adaptées et variées. Il existe par exemple, plusieurs combinaisons de stimuli bactériens et de cytokines. Le stimulus FMLP en combinaison avec le GM-CSF (Conti *et al.*, 1992), l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$  (Bauldry *et al.*, 1991; Takafuji *et al.*, 1992) ou le PGE2 (Mueller *et al.*, 1992) ont récemment fait l'objet d'études sur l'activation des *mo* ou *m*ø. La combinaison des stimuli de formyl peptides et de LPS sur la modulation de l'activation des *m*ø, a également été évaluée par la production de TNF (Tremblay *et al.*, 1991; Tremblay *et al.*, en préparation), ainsi que par la capacité des *m*ø à endommager des cellules cibles (Anderson *et al.*, 1991).

Nous avons évalué l'effet de la combinaison de deux de ces signaux, FMLP et LPS. L'expression des proto-oncogènes *c-fos*, *c-jun* et *jund* permet une évaluation précoce des modifications métaboliques nécessitant l'action de nouvelles protéines, et constitue probablement une des façons les plus directes d'évaluer les effets à court terme de la combinaison de deux stimuli.

Les mØ qui rencontrent le FMLP et le LPS simultanément, semblent réagir différemment des mØ en présence de LPS seul. Cette réaction se traduit par une tendance à l'augmentation de l'expression de certains marqueurs d'activation, comme nous l'avons observée dans le cas des gènes de compétence cellulaires *c-fos* et *c-jun* (Figures 12a et 12b). Cette augmentation des niveaux d'ARNm de ces gènes ne découle pas d'une réponse additive des deux stimuli, puisque le FMLP donné seul, n'influence pas leur induction. La tendance de l'accroissement de l'expression de *c-fos* et *c-jun* semble augmenter parallèlement à la dose de LPS ajoutée au FMLP. Lorsqu'on emploie une dose sub-optimale (10 ng/ml) de LPS, la différence entre les échantillons traités avec le LPS seul d'une part, et ceux traités avec le FMLP et le LPS simultanément d'autre part, se révèle à son maximum. L'utilisation de cette dose sub-optimale entraîne un niveau d'expression génétique inférieur à celui que permettrait le LPS seul à une dose optimale, laissant ainsi plus de latitude pour la contribution au signal apporté par le FMLP. Par ailleurs, les résultats obtenus avec l'utilisation de doses sub-optimales pourraient indiquer que le FMLP coopère avec le LPS pour potentialiser l'activation cellulaire induit par le LPS. Cependant, la nature de cette coopération demeure inconnue. Le résultat observé pourrait provenir soit d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm, soit d'une augmentation de l'efficacité de transcription. Lors de la stimulation de PBL humains en présence de FMLP, Ho *et al.* (1987) n'ont observé aucune modification de la stabilité des ARNm codant pour *c-fos*. Ils ont tenté d'évaluer l'efficacité de transcription de l'ARNm de *c-fos* par la technique du "Nuclear run-off", mais leur tentative a été infructueuse, leur technique n'étant pas mise au point.

Puisque l'expression des proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun* est un évènement des plus précoces ne nécessitant pas la synthèse de nouvelles protéines, et que la

stimulation FMLP-LPS est simultanée, la nature de la synergie pourrait donc provenir d'une interaction au niveau des cascades de transduction de signaux. Le LPS et le FMLP utilisent conjointement certaines cascades de signaux de transduction (voir Figure 7). Entre autres, ils augmentent tous les deux l'apport de calcium (Snyderman et Uhing, 1992), activent les protéines G (Berridge, 1987; Daniel-Issakani *et al.*, 1989; Jakway et De-Franco, 1986) et les PKC (Baccarini *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992). Une potentialisation à un niveau ou à un autre dans ces cascades de transduction pourrait expliquer partiellement les augmentations observées lors des stimuli combinés. La synergie par les voies de transduction communes est complexe à analyser puisque les voies de transduction du LPS sont nombreuses et ses récepteurs faiblement caractérisés.

En examinant la structure des promoteurs des gènes *c-fos* et *c-jun*, nous constatons qu'ils partagent deux régions du promoteur correspondant respectivement à la région de liaison des facteurs de transcription AP-1 et NF1/CTF (voir Figure 6). Ces deux régions ne se retrouvent pas à l'intérieur du promoteur de *jund*, lequel n'est pas influencé par la combinaison des stimuli LPS et FMLP. L'implication des régions AP-1 et NF1/CTF pourrait être déterminée par des expériences de déplacement de mobilité (Mobility shift assay; Radzioch et Varesio, 1991). Cette technique consiste à mettre en contact des noyaux cellulaires avec un oligomère radiomarqué correspondant à la séquence consensus AP-1 ou NF1/CTF. Après la séparation électrophorétique et l'autoradiographie, deux bandes de mobilités différentes peuvent être observées, l'une représentant l'oligomère radiomarqué seul et l'autre, l'oligomère associé avec le complexe dimérique AP-1 ou NF1/CTF.

Contrairement à *c-fos* et *c-jun*, l'effet de la combinaison FMLP-LPS ne semble produire que peu d'effet sur *jund*. Cet effet négligeable est également rapportée par Reuse *et al.* (1991) ainsi que par Ryder *et al.* (1989). Ces auteurs suggèrent une stabilité élevée de l'ARNm du proto-oncogène *jund* ainsi qu'une action particulière de ce proto-oncogène dans le contrôle d'éléments qui gouvernent les réponses aux signaux intra- et extracellulaires spécifiques, pour expliquer la différence dans l'expression des proto-oncogènes *c-fos*, *c-jun* et, *jund*.

La combinaison des signaux LPS-FMLP semble potentialiser l'expression des proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun* en comparaison avec les stimuli donnés seuls. Cette potentialisation pourrait provenir de l'addition d'effets exercés soit sur les intermédiaires communs dans les voies de transduction de signaux soit sur les facteurs de transcription AP-1 ou NC1/CTF. L'expression de *jund* ne semble pas être modifiée par la combinaison de LPS-FMLP, ce qui pourrait dépendre de la stabilité de son ARNm ou de sa régulation qui n'implique pas les sites AP-1 ou NC1/CTF.

## 6. EFFET DU PRÉTRAITEMENT DES CELLULES AVEC LE FMLP

Lors d'une infection bactérienne, il est vraisemblable que les *mø* soient confrontés à la présence du FMLP avant celle du LPS, puisque le FMLP est largué dans le milieu extracellulaire par les bactéries et peut facilement diffuser hors du site de l'infection. Ainsi, nous avons évalué l'effet d'un "conditionnement" des cellules RAW 264,7 avec le FMLP, précédant l'exposition au LPS. Le temps de prétraitement avec 250 µg/ml de FMLP ayant l'effet le plus marqué se situe à deux heures avant la stimulation avec 50 ng/ml de LPS. Une augmentation par un facteur de 2,5 par rapport au niveau d'expression en présence de LPS seul, a été

observée dans le cas du gène *c-fos* (Figure 13a). Par contre, un prétraitement similaire au niveau du gène *c-jun* ne démontre pas autant de variation (Figure 13b).

Dans le cas du prétraitement de deux heures avec le FMLP, l'augmentation observée pourrait être due à plusieurs causes distinctes. D'une part, un récepteur spécifique (FMLP) à la surface des *mø*, détectant la présence de bactéries (phénomène acquis au cours de l'évolution des cellules immunitaires) pourrait participer à la mobilisation de cellules effectrices immunitaires tout en les prédisposant à l'activation cellulaire qu'elles devront manifester sur les lieux d'infection. De cette façon, une fois rendues sur place, ces cellules pourraient entrer en action en un temps plus court et/ou avec une activité accrue.

D'autre part, la modification des *mø* induite par le FMLP, par l'entremise des cascades de transduction, pourrait provoquer un déséquilibre par épuisement d'un intermédiaire métabolique. Par exemple, le FMLP qui module positivement les taux d'AMPc (Snyderman et Uhing, 1992), défavorise l'activation du facteur de transcription AP-1 (Abate, *et al.*, 1991; Tratner *et al.*, 1992), qui lui-même est en relation directe avec l'expression de *c-fos*. Par contre, après deux heures de stimulation avec le FMLP, il est possible que l'AMPc ou un des ses précurseurs soit épuisé, ce qui aurait pour résultat l'expression accrue de *c-fos*. Ceci pourrait aussi expliquer la différence entre les résultats obtenus lors de l'administration simultanée de FMLP et de LPS et ceux obtenus lors du prétraitement FMLP donné 30 minutes avant le LPS (Figure 13). Lors de l'administration simultanée, aucune accumulation d'AMPc ne pourrait avoir lieu, ce qui favoriserait l'expression de *c-fos*. Cependant, lors du prétraitement de 30 minutes avec le FMLP, ce prétraitement permettrait une certaine accumulation d'AMPc, inhibant l'expression

de c-fos. Cette hypothèse pourrait aussi s'appliquer au cas du proto-oncogène c-jun, qui présente un patron d'expression similaire à celui de c-fos. De plus, il est connu que le FMLP induit l'activation des MAP kinases (Thompson *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1993), qui, à leur tour, influencent négativement l'expression de c-jun (Chou *et al.* 1992). Ceci pourrait également expliquer la diminution de l'expression de c-jun lors du prétraitement de 30 minutes avec le FMLP.

Le prétraitement-FMLP des cellules RAW 264,7 s'avère le facteur ayant influencé le plus l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun deux heures avant la stimulation-LPS. Ce prétraitement pourrait en effet préparer les cellules pour qu'elles soient plus efficaces dans leurs fonctions anti-microbienne et anti-tumorale lors de la réception subséquente de signaux. La relation inversement proportionnelle entre certains intermédiaires métaboliques et l'expression de c-fos et c-jun pourrait aussi expliquer les augmentations notées.

## 7. ACTION DES INHIBITEURS DE PROTÉINES KINASES C

La calphostine C et la staurosporine sont deux puissants inhibiteurs des PKC et agissent sur celles-ci de manières différentes. Les PKC sont composées d'un domaine catalytique qui permet la phosphorylation des résidus sérine et thréonine, et d'un second domaine, nommé "régulateur", qui modifie la conformation du domaine catalytique permettant ainsi l'activation ou l'inhibition de la PKC. La staurosporine est un inhibiteur spécifique du site catalytique de la PKC (Tamaoki *et al.*, 1986), tandis que la calphostine C exerce son action inhibitrice sur le domaine régulateur de la PKC (Kobayashi *et al.*, 1989). Dans le but de distinguer l'influence du substrat sur la régulation des signaux provenant des voies de transduction, nous avons vérifié l'action des inhibiteurs calphostine C et staurosporine sur

l'expression de c-fos, c-jun et jund lors d'une stimulation par le LPS (Figures 14a, 14b et 14c). L'expression des trois proto-oncogènes, en présence de 50 ng/ml de LPS, ne semble pas être affecté par l'action des inhibiteurs utilisés.

Les divergences entre les résultats attendus basés sur les travaux de Andrejauskas-Buchdunger et Regenass (1992), Baranes et Razin (1991) ainsi que Wang et Scott (1992) et ceux que nous avons obtenus, peuvent être reliées à nos conditions expérimentales. En effet, ces équipes effectuaient leurs stimulations avec le PMA tandis que nos stimulations ont été effectuées avec le LPS. Par ailleurs, Maki *et al.* (1992) ont observé une inhibition partielle du proto-oncogène c-fos lorsque les cellules stimulées avec un stresser oxydatif étaient en présence de staurosporine. Ces résultats ainsi que les nôtres suggèrent l'existence d'une régulation du gène c-fos par une voie de transduction PKC-indépendante.

L'induction de l'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund semble être un processus PKC-dépendant, puisque le PMA qui stimule directement les PKC, possède aussi la capacité d'activer ces proto-oncogènes (Ho *et al.*, 1987; Radzioch et Varesio, 1991). Cependant, l'implication des PKC, lors de l'induction par le LPS, n'a peut-être pas l'importance à laquelle nous nous attendions. Nous pouvons expliquer les résultats obtenus de deux façons. Premièrement, les inhibiteurs n'ont pas eu l'effet attendu parce qu'ils n'auraient pas inhibé les PKC: les doses utilisées, déterminées pour l'inhibition du TNF (Tremblay *et al.*, en préparation), n'auraient pas été optimales pour inhiber les proto-oncogènes. De plus, un dosage de l'activité de la PKC, en présence et en absence des inhibiteurs utilisés, nous aurait permis de confirmer les effets des inhibiteurs. Alternativement, le temps de prétraitement aurait été incorrect. Cette hypothèse aurait pu être vérifiée en utilisant un échantillon traité avec les inhibiteurs et

stimulé avec le PMA (témoin positif) au lieu du LPS (Andrejauskas-Buchdunger et Regenass, 1992). Deuxièmement, les inhibiteurs ont bien eu l'effet désiré, mais dans le cas de ces cellules, le LPS pourrait activer les proto-oncogènes par une autre voie de transduction. Cette hypothèse fait appel à la régulation du facteur de transcription AP-1 (voir Figure 7), qui module l'expression des trois proto-oncogènes (Chiu *et al.*, 1988; de Groot *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1992). L'activation d'AP-1 requiert la phosphorylation de la protéine inhibitrice IP-1 et cette phosphorylation, qui est nécessaire à la translocation d'AP-1 vers le noyau, est effectuée par l'action des PK-C (Auwerx et Sassonecorsi, 1992) et des MAP kinases (Pulverer *et al.*, 1991, 1993). De plus, l'activation d'AP-1 requiert l'intervention d'une phosphatase qui exécute une déphosphorylation au niveau de la portion liant l'ADN (Black *et al.* 1991; Boyle *et al.* 1991). L'utilisation d'autres voies de transduction aurait pu être vérifiée par l'emploi d'autres inhibiteurs tels que la néomycine (inhibiteur de la PKA) ou la genistéine (inhibiteur de la PTK). Les résultats négatifs que nous avons obtenus pourraient suggérer la présence d'une voie PKC-indépendante, telle qu'une voie dépendante de la PKA ou encore de la PTK, lors des stimulations effectuées avec le LPS. Des expériences portant sur le dosage de l'activité de la PKC suivant l'action des inhibiteurs calphostine C et staurosporine sont présentement en cours dans notre laboratoire.

Les résultats obtenus des analyses de type Northern permettent de mesurer l'accumulation relative d'ARNm pour les trois proto-oncogènes. Il nous est cependant difficile d'expliquer cette accumulation d'ARNm. Celle-ci peut provenir soit d'une augmentation de la vitesse de transcription soit d'une augmentation du temps de demi-vie de l'ARNm de ces proto-oncogènes. Des

expériences de "Nuclear run-off" et de stabilité de l'ARNm nous permettraient de vérifier l'implication de ces hypothèses dans les accumulations d'ARNm observées.

La combinaison du FMLP et du LPS nous a permis d'observer la modulation de l'activité cellulaire du macrophage par l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun. La présence simultanée de ces deux dérivés bactériens sur le site d'infection induirait une augmentation de l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun qui caractérisent l'activation des mØ. Ceci pourrait se traduire par une réponse plus efficace au niveau des mécanismes de défense de l'hôte.

## CONCLUSION

Il est bien connu que les dérivés bactériens peuvent induire et moduler les réponses impliquées dans les mécanismes de défense de l'organisme. Par ce travail, nous avons voulu étudier l'expression de marqueurs cellulaires apparaissant très tôt après une stimulation avec le FMLP seul ou en combinaison avec le LPS. Nous avons étudié l'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund chez les cellules de la lignée macrophagique RAW 264,7.

L'expression constitutive du proto-oncogène c-fos semble être modulée par la présence de sérum foetal bovin (SFB). L'absence de sérum a diminué la forte expression constitutive de c-fos, ce qui nous a permis de mieux évaluer l'expression induite par le stimulus LPS seul. Par contre, en absence de sérum, les cinétiques d'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund ont présenté des temps optimum plus longs que ceux observés dans la littérature. L'expression maximale des proto-oncogènes c-fos, c-jun et jund a été observée à 45 minutes, 60 minutes et entre 60 et 180 minutes respectivement. L'expression transitoire des proto-oncogènes a également été observée sur une période de temps plus longue, sa présence étant soutenue plus longtemps.

Le FMLP seul n'a pas induit l'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun ou jund. Le LPS seul par contre a permis d'induire l'expression des trois proto-oncogènes d'une manière dose dépendante avec une valeur seuil de 10 ng/ml. La combinaison des stimuli FMLP et LPS a provoqué une expression accrue de l'ARNm de c-fos et c-jun, mais celle de jund n'a pas été influencée. Ces

observations suggèrent que l'expression de ces trois proto-oncogènes est possiblement régulée de façon différente. En effet, des sites de liaison pour les facteurs de transcription AP-1 et NF1/CTF sont présents à l'intérieur des promoteurs de c-fos et c-jun, mais absents chez *jund*. Les stimuli FMLP et LPS pourraient être transduits par l'un de ces facteurs de transcription, ce qui permettrait l'augmentation de l'expression de c-fos et c-jun.

C'est lorsqu'il est administré deux heures avant la stimulation par le LPS que le prétraitement avec le FMLP présente un effet maximum sur l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun. Ce prétraitement pourrait préparer les cellules pour optimiser leur efficacité dans leurs fonctions anti-microbienne et anti-tumorale lors de la réception subséquente de signaux LPS.

Dans notre système, les inhibiteurs de PKC ne semblent pas influencer l'expression des proto-oncogènes c-fos, c-jun et *jund*. Ceci suggère la présence d'une voie PKC-indépendante, telle que la voie dépendante de la PKA ou de la PTK, lors des stimulations effectuées avec le LPS.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier tout particulièrement mon directeur de maîtrise, le docteur Daniel Oth. J'ai beaucoup apprécié le sérieux, la disponibilité et la patience qu'il a su démontrer tout au long de mon travail. Je lui serai toujours reconnaissant pour la formation acquise à ses côtés.

J'aimerais également souligner l'aimable collaboration de mes co-directeurs de recherche, les docteur Hélène-Marie Thérien et docteur Pravin Patel pour l'apprentissage de certaines techniques ainsi que leurs précieux conseils.

Mon confrère et mes consœurs de laboratoire, Pierre Tremblay, Nathalie Arbour, Ginette Mercier et Mireille Varin, ont toujours été présents pour animer le climat d'amitié, de confiance et d'entraide qui régnait dans le laboratoire. J'aimerais les remercier pour leur compétence et leur enthousiasme.

Et terminant, j'aimerais exprimer ma reconnaissance à Lyna, pour son amour, sa patience et sa persévérance qui m'ont conduit à l'accomplissement de ce travail.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABATE, C., D. R. MARSHAK et T. CURRAN. 1991. Fos is phosphorylated by p34cdc2, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase-C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene* 6: 2179-2185.
- ADAM, 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. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 283-318.
- ADAMS, D. O. et T. J. KOERNER. 1989. Gene regulation in macrophage development and activation. *Year Immunol.* 4: 159-180.
- ALLEN, R. A., J. JESAITIS et C. G. COCHRANE. 1990. "N-formyl peptide receptor structure-function relationships" dans Cochrane, C. G. et M. A. Gimbrone (eds): *Cellular and Molecular Mechanisms of Inflammation, Vol. 1: Receptors of Inflammatory Cells: Structure-Function Relationships*. New York. Academic Press, Inc. 83-112.
- ANDERSON, B. O., D. D. BENSARD, J. M. BROWN, J. E. REPINE, P. F. SHANLEY, J. A. LEFF, L. S. TERADA, A. BANERJEE et A. H. HARKEN. 1991. FNLP injures endotoxin-primed rat lung by neutrophil-dependent and -independent mechanisms. *Am. J. Physiol.* 260:R413-420.
- ANDREJAUSKAS-BUCHDUNGER, E. et U. REGENASS. 1992. Differential inhibition of the epidermal growth factor-mediated, platelet-derived growth factor-mediated, and protein kinase-C-mediated signal transduction pathways by the staurosporine derivative CGP-41251. *Cancer Res.* 52: 5353-5358.
- AUWERX, J. et P. SASSONECORSI. 1992. AP-1 (Fos-Jun) regulation by IP-1 - effect of signal transduction pathways and cell growth. *Oncogene* 7: 2271-2280.
- BACCARINI, M., P. DELLOSBARBA, D. BUSCHER, A. BARTOCCI et E. R. STANLEY. 1992. IFN-gamma/lipopolysaccharide activation of macrophages is associated with protein kinase-C-dependent down-modulation of the colony-stimulating factor-1 receptor. *J. Immunol.* 149: 2656-2661.

- BANNISTER, A. J., A. COOK et T. KOUZARIDES. 1991. *In vitro* DNA binding activity of Fos/Jun and BZLF1 but not C/EBP is affected by redox changes. *Oncogene* 6: 1243-1250.
- BARANES, D. et E. RAZIN. 1991. Protein kinase C regulates proliferation of mast cells and the expression of the mRNAs of fos and jun proto-oncogenes during activation by IgE-Ag of calcium ionophore A23187. *Blood* 78: 2354-2364.
- BAULDRY, S. A., C. E. McCALL, S. L. COUSART et D. A. BASS. 1991. Tumor necrosis factor-alpha priming of phospholipase A2 activation in human neutrophils. An alternative mechanism of priming. *J. Immunol.* 146: 1277-1285.
- BELOSEVIC, M., D. S. FINBLOOM, M. S. MELTZER et C. A. NACY. 1990. Interleukin-2: a cofactor for induction of macrophage resistance to infection. *J. Immunol.* 145: 831-839.
- BENGAL, E., L. RANSONE, R. SCHARFMANN, V. J. DWARKI, S. J. TAPSCOTT, H. WEINTRAUB et I. M. VERMA. 1992. Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins - A direct physical association. *Cell* 68: 507-519.
- BENYUNES, M. C. et R. SNYDERMAN. 1984. Characterization of an oligopeptide chemoattractant receptor on human blood monocytes using a new radioligand. *Blood* 63: 588-592.
- BERRIDGE, M. J. 1987. Inositol triphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 159-193.
- BIRNBOIM, H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 100: 243-255.
- BLACK, E. J., A. J. STREET et D. A. F. GILLESPIE. 1991. Protein phosphatase 2A reverses phosphorylation of c-Jun specified by the delta domain *in vitro* - correlation with oncogenic activation and deregulated transactivation activity of v-Jun. *Oncogene* 6: 1949-1958.
- BLANCHARD, J.-M. 1992. Le proto-oncogène c-fos: un "entremetteur" moléculaire. *Méd. Sci.* 8: 455-470.
- BOULAY, F., M. TARDIF, L. BROUCHON et P. VIGNAIS. 1990a. Synthesis and use of a novel n-formyl peptide derivatide to isolate a human n-formyl peptide receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168: 1103-1109.
- BOULAY, F., M. TARDIF, L. BROUCHON et P. VIGNAIS. 1990b. The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence

- for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochem.* 29: 11123-11133.
- BOYLE, J. W., T. SMEAL, L. H. K. DEFIZE, P. ANGEL, J. R. WOODGETT, M. KARIN et T. HUNTER. 1991. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64: 573-584.
- 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.
- BRUDER, J. T., G. HEIDECKER et U. R. RAPP. 1992. Serum-induced, TPA-induced, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes & Development* 6: 545-556.
- CANTLEY, L. C., K. R. AUGER, C. CARPENTER, B. DUCKWORTH, A. GRAZIANI, R. KAPPELLER et S. SOLTOFF. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64: 281-302.
- CARP, H. 1982. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med.* 155: 264-275.
- CASTELLAZZI, M., G. SPYROU, N. LAVISTA, J. P. DANGY, F. PIU, M. YANIV et G. BRUN. 1991. Overexpression of c-jun, junB, or junD affects cell growth differently. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 8890-8894.
- 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.
- CHANG, Z. L., M. NOVOTNEY et T. SUZUKI. 1990. Phospholipase C and A2 in tumoricidal activation of murine macrophage-like cell line. *FASEB J.* 4: A1753.
- CHEVRAY, P. M. et D. NATHANS. 1992. Protein interaction cloning in yeast-identification of mammalian proteins that react with the leucine-zipper of Jun. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 5789-5793.
- CHIRGWIN, J. M., A. E. PRZYBYLA, R. J. McDONALD et W. J. RUTTER. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- CHIU, R., P. ANGEL et M. KARIN. 1989. Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of c-Jun. *Cell* 59: 979-986.

- CHIU, R., W. J. BOYLE, J. MEEK, T. SMEAL, T. HUNTER et M. KARIN. 1988. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54: 541-552.
- CHOU, S. Y., V. BAICHWAL et J. E. FERRELL. 1992. Inhibition of c-jun DNA binding by mitogen-activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell* 3: 1117-1130.
- COATS, W. D. et J. NAVARRO. 1990. Functionnal reconstitution of fMet-Leu-Phe receptor in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 5964-5966.
- COLLART, M. A., N. TOURKINE, D. BELIN, P. VASSALLI, P. JEANTEUR et J. M. BLANCHARD. 1991. c-fos gene transcription in murine macrophages is modulated by a calcium-dependent block to elongation in intron 1. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2826-2831.
- 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.
- COX, G. W., B. J. MATHIESON, S. L. GIARDINA et L. VAREGIO. 1990. Characterization of IL-2 receptor expression and function on murine macrophages. *J. Immunol.* 145: 1710-1724.
- CURRAN, T. 1988. "The fos oncogene" dans: Reddy, E. P., A. M. Shalka et T. Curran (eds.): *The Oncogene Handbook*. Amsterdam. Elsevier Science Publishers BV. 307-554.
- CURRAN, T., C. VAN BEVEREN, N. LING et I. M. VERMA. 1985. Viral and cellular fos proteins are complexed with a 39 000 dalton cellular protein. *Mol. Cell. Biol.* 5:167-172.
- CURRAN, T., W. MACCONNELL, F. VAN STRAATEN et I. M. VERMA. 1983. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: Molecular cloning of its associated helper virus and cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.* 3: 914-921.
- DANIEL-ISSAKANI, S., A. M. SPIEGEL et B. STRULOVICI. 1989. Lipopolysaccharide response is linked to the GTP binding protein, Gi2 in the promonocytic cell line U937. *J. Biol. Chem.* 264: 20240-20247.
- DE GROOT, R. P., M. KARPERIEN, C. PALS et W. KRUIJER. 1991. Characterization of the mouse junD promoter; high basal level activity due to an octamer motif. *EMBO J.* 10: 2523-2532.

- DESBOIS, C., D. AUBERT, C. LEGRAND, B. PAIN et J. A. SAMARUT. 1991. Novel mechanism of action for v-ErbA - abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Cell* 67: 731-740.
- DING, A., C. F. NATHAN, J. K. GRACAR, R. DERYNCK, D. J. STUEHR et S. SRIMAL. 1990. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-b1, -b2, -b3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN $\gamma$ . *J. Immunol.* 145: 940-945.
- DOBOS, G. J., J. NORGAUER, M. EBERLE, P. J. SCHOLLMAYER et A. E. TRAYNORKAPLAN. 1992. C5a reduces formyl peptide-induced actin polymerization and phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate formation, but not phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate hydrolysis and superoxide production, in human neutrophils. *J. Immunol.* 149: 609-614.
- DONG, Z. Y., C. A. O'BRIAN et I. J. FIDLER. 1993. Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein-tyrosine kinase activity. *J. Leu. Biol.* 53: 53-60.
- DOWNING, R., M. F. ROUSSEL et C. J. SHERR. 1989. Ligand and protein kinase C downmodulate the colony stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 9: 2890-2896.
- DZIARSKI, R. 1991a. Demonstration of peptidoglycan-binding sites on lymphocytes and macrophages by photoaffinity cross-linking. *J. Biol. Chem.* 266: 4713-4718.
- DZIARSKI, R. 1991b. Peptidoglycan and lipopolysaccharide bind to the same binding site on lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 4719-4725.
- EZEKOWITZ, R. A. B. et S. GORDON. 1984. Alterations of surface properties by macrophage activation. Expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. *Contemp. Top. Immunobiol.* 18: 33-56.
- FARBER, J. A. 1992. A collection of mRNA species that are inducible in the RAW 264,7 mouse macrophage cell line by gamma interferon and other agents. *Mol Cell. Biol.* 12: 1535-1545.
- FEIST, W., A. J. ULMER, M. H. WANG, J. MUSEHOLD, C. SCHLUTER, J. GERDES, H. HERZBECK, H. BRADE, S. KUSUMOTO, T. DIAMANTSTEIN, E. T. RIETSCHHEL et H. D. FLAD. 1992. Modulation of lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 by synthetic precursor-Ia of lipid-A. *FEMS Microbiol. Immunol.* 89: 73-89.

- FORSTERMANN, U., H. H. H. W. SCHMIDT, K. L. KOHLHAAS et F. MURAD. 1992. Induced RAW-264,7 macrophages express soluble and particulate nitric oxide synthase-inhibition by transforming growth factor-beta. *Eur. J. Pharmacol., Mol. Pharmacol. Sect.* 225: 161-165.
- FORT, P., J. RECH, A. VIE, M. PIECHACZYK, A. BONNIEU, P. JEANTEUR et J.-M. BLANCHARD. 1987. Regulation of c-fos gene expression in hamster fibroblasts: initiation and elongation of transcription and mRNA degradation. *Nuc. Acids Res.* 15: 5657-5666.
- FOULKES, N. S., E. BORRELLI et P. SASSONE-CORSI. 1991. CREM gene: Use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64: 739-749.
- FRANZA, R. B. JR., F. J. RAUSCHER III, S. F. JOSEPHS et T. CURRAN. 1988. The fos complex and fos related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* 239: 1150-1153.
- FREER, R. J., A. R. DAY, N. MUTHUKUMARASWAMY, D. PINON, A. WU, H. J. SHOWELL et E. L. BECKER. 1982. Formyl peptide chemoattractants: a model of the receptor on rabbit neutrophils. *Biochem.* 21: 257-263.
- GILLE, H., A. D. SHARROCKS et P. E. SHAW. 1992. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358: 414-417.
- GILMAN A., G. 1987. G protein: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
- GINSBERG, D., F. MECHTA, M. YANIV et M. OREN. 1991. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 9979-9983.
- GORDON, S., S. KESHAV et L. P. CHUNG. 1988. Mononuclear phagocytes: tissue distribution and functional heterogeneity. *Cur. Opin. Immunol.* 1: 26-35.
- GRABAREK, J., S. TIMONS et J. HAWIGER. 1988. Modulation of human platelet protein kinase C by endotoxic lipid A. *J. Clin. Invest.* 82: 954-971.
- GRABSTEIN, K. H., D. L. URDAL, R. J. TUSHINSKI, D. Y. MOCHIZUKI, V. L. PRICE, M. A. CANTRELL, S. GILLIS et P. J. CONLON. 1986. Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Science* 232: 506-508.

- GUSELLA, G. L., E. AYROLDI, I. ESPINOZA-DELGADO et L. VARESIO. 1990. Lipopolysaccharides, but not IFN $\gamma$ , down regulates c-fms mRNA proto-oncogene expression in murine macrophages. *J. Immunol.* 144: 3574-3580.
- HAHN, G., B. STUHLMULLER, N. HAIN, J. R. KALDEN, K. PFIZENMAIER et G. R. BURMESTER. 1993. Modulation of monocyte activation in patients with rheumatoid arthritis by leukapheresis therapy. *J. Clin. Invest.* 91: 862-870.
- HAMPTON, R. Y., D. T. GOLENBOCK, M. PENMAN, M. KRIEGER et C. R. H. RAETZ. 1991. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* 352: 342-344.
- HAN, T. H., W. W. LAMPH et R. PRYWES. 1992. Mapping of epidermal growth factor-responsive, serum-responsive, and phorbol ester-responsive sequence elements in the c-jun promoter. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4472-4477.
- HANAZAWA, S., Y. MURAKAMI, A. TAKESHITA, H. KITAMI, K. OHTA, S. AMANO et S. KITANO. 1992. *Porphyromonas-gingivalis fimbriae* induce expression of the neutrophil chemotactic factor KC-gene of mouse peritoneal macrophages - Role of protein kinase-C. *Infection and Immunity* 60: 1544-1549.
- HANNIGAN, G. E. et B. R. G. WILLIAMS. 1992. Interferon-alpha activates binding of nuclear factors to a sequence element in the c-fos proto-oncogene 5'-flanking region. *J. Interferon Res.* 12: 355-361.
- HARA-KUGE, S., F. AMANO, M. NISHIJIMA et Y. AKAMATSU. 1990. Isolation of a LPS-resistant mutant with defective LPS binding of cultured macrophage-lyse cells. *J. Biol. Chem.* 265: 6606-6610
- HIGUCHI, Y., M. SETOGUCHI, S. YOSHIDA, S. AKIZUKI et S. YAMAMOTO. 1988. Enhancement of c-fos expression is associated with activated macrophages. *Oncogene* 2: 515-521.
- HIPSKIND, R. A., V. N. RAO, C. G. MUELLER, E. S. REDDY et A. NORDHEIM. 1991. Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* 354: 531-534.
- HO, Y.-S., W. M. F. LEE et R. SNYDERMAN. 1987. Chemoattractant-induced activation of c-fos gene expression in human monocytes. *J. Exp. Med.* 165: 1524-1538.
- HYDER, S. M., G. M. STANCEL, Z. NAWAZ, D. P. McDONNELL et D. S. LOOSEMITCHELL. 1992. Identification of an estrogen response element in the 3'-

- flanking region of the murine c-fos proto-oncogene. *J. Biol. Chem.* 267: 18047-18054.
- HYDER, S. M., L. F. CRAM et D. S. LOOSE-MITCHELL. 1991. Sequence of a 1.4-kb region in the 3'-flanking region of the murine c-fos proto-oncogene which contains an estrogen-response element. *Gene* 105: 281-282.
- INTRONA, M., R. B. BAST, C. S. TANNENBAUM, T. A. HAMILTON et D. O. ADAM. 1987. The effect of LPS on expression of the early "competence" genes JE and KC in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 138: 3891-3896.
- INTRONA, M., T. A. HAMILTON, R. E. KAUFMAN, D. O. ADAMS et R. C. BAST. 1986. Treatment of murine peritoneal macrophages with bacterial lipopolysaccharide alters expression of c-fos and c-myc oncogenes. *J. Immunol.* 137: 2711-2715.
- JACKSON, J. A., J. T. HOLT et W. J. PLEDGER. 1992. Platelet-derived growth factor regulation of Fos stability correlates with growth induction. *J. Biol. Chem.* 267: 17444-17448.
- JACWAY, J. P. et A. L. DE-FRANCO. 1986. Pertussis toxin inhibition of B cell and macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide. *Science* 234: 734-746.
- KAMINSKA, B., L. KACZMAREK, L. MALAGUARNERA, A. ARCIDIACONO, L. MESSINA, G. SPAMPINATO et A. MESSINA. 1992. Transcription factor activation and functional stimulation of human monocytes. *Cell Biol. Intl Reports* 16: 37-45.
- KATAKAMI, Y., Y. NAKAO, T. KOIZUMI, N. KATAKAMI, R. OGAWA et T. FUJITA. 1988. Regulation of tumour necrosis factor production by mouse peritoneal macrophages: the role of cellular cyclic AMP. *Immunol* 64: 719-724.
- KEW, R. R., C. M. GRIMALDI, M. B. FURIE et H. B. FLEIT. 1992. Human neutrophil FcγRIIIb and formyl peptide receptors are functionally linked during formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced chemotaxis. *J. Immunol.* 149: 989-997.
- KLEY, N., R. Y. CHUNG, S. FAY, J. P. LOEFFLER et B. R. SEIZINGER. 1992. Repression of the basal c-fos promoter by wild-type p53. *Nucleic Acids Res.* 20: 4083-4087.
- KNUDSEN, P. J., C. A. DINARELLO et T. B. STROM. 1987. Prostaglandins post-transcriptionally inhibit monocyte expression of interleukin-1 activity by

- increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.* **137**: 3189-3194.
- KOBAYASHI, E., H. NAKANO, M. MORIMOTO et T. TAMAOKI. 1989. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**: 548-553.
- 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.
- KOO, C., R. LEFKOWITZ et R. SNYDERMAN. 1982. The oligopeptide factor receptor on human polymorphonuclear leukocyte exists in two affinities. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **106**: 442-449.
- KUROSAWA, M. et T. ISHIZUKA. 1993. Inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide on superoxide anion formation by n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated inflammatory cells *in vitro*. *Intl Arch. of Allergy and Immunol.* **100**: 28-34.
- LAD, P. M., C. V. OLSON et P. A. SMILEY. 1985. Association of the N-formyl-met-leu-phe receptor in neutrophils with a GTP-binding protein sensitive to Pertussis toxin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**: 869-873.
- LEE, J. D., K. KATO, P. S. TOBIAS, T. N. KIRKLAND et R. J. ULEVITCH. 1992. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J. Exp. Med.* **175**: 1697-1705.
- LEI, M.-G., S. A. STIMPSON et D. C. MORRISON. 1991. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. III. Binding specificity and characterization. *J. Immunol.* **147**: 1925-1932.
- LEI, M.-G. et D. C. MORRISON. 1988a. 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. 1988b. Specific endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. I. Detection of lipopolysaccharide-binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulations. *J. Immunol.* **141**: 996-1005.

- LEIBOVICH, S. J. et R. ROSS. 1975. The role of macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol.* **78**: 71-100.
- LUCIBELLO, F. C., F. EHLERT et R. MÜLLER. 1991. Multiple interdependent regulatory sites in the mouse c-fos promoter determine basal level transcription: cell type-specific effects. *Nucleic Acid Res.* **19**: 3583-3591.
- LYNN, W. A., et D. T. GOLENBOCK. 1992. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol. Today* **13**: 271-276.
- MAKI, Y., T. J. BOS, C. DAVIS, M. STARBUCK et P. K. VOGT. 1987. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**: 2848-2852.
- MAKI, A., I. K. BEREZESKY, J. FARGNOLI, N. J. HOLBROOK et B. F. TRUMP. 1992. Role of  $[Ca^{2+}]_i$  in induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PTE after oxidative stress. *Faseb J.* **6**: 919-924.
- 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.
- McKNIGHT, S. L. 1991. Molecular zippers in gene regulation. *Sci. Am.* April: 54-64.
- MELTZER, M. S. et C. A. NACY. 1989. "Delayed-type hypersensitivity and the induction of activated, cytotoxic macrophages" dans Paul, W. E. (ed.): *Fundamental Immunology*. New York. Raven Press Ltd. 765-777.
- METZ, R. et E. ZIFF. 1991a. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes & Development* **5**: 1754-1766.
- METZ, R. et E. ZIFF. 1991b. The helix-loop helix protein-rE12 and the C/EBP-related factor-rNFIL-6 bind to neighboring sites within the c-fos serum response element. *Oncogene* **6**: 2165-2178.
- MILLER, A. D., T. CURRAN et I. M. VERMA. 1984. c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* **36**: 51-60.

- MIYAKE, Y., T. YASUHARA, K. FUKUI, H. SUGINAKA, T. NAKAJIMA et T. MORIYAMA. 1983. Purification et characterization of neutrophil chemotactic factors of *Streptococcus sanguis*. *Biochem. Biophys. Acta* 758: 181-186.
- MUELLER, H., B. MONTOYA et L. A. SKLAR. 1992. Reversal of inhibitory pathways in neutrophils by protein kinase antagonists- a rational approach to the restoration of depressed cell function. *J. Leu. Biol.* 52: 400-406.
- MÜLLER, R. 1986. Cellular and viral fos genes: structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. *Biochim. Biophys. Acta* 823: 207-225.
- MURPHY, P. M., E. K. GALLIN, H. L. TIFFANY et H. L. MALECH. 1990. The formyl peptide chemoattractant receptor is encoded by a 2 kilobase messenger RNA. Expression in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 261: 353-357.
- NACY, A. C. et M. S. MELTZER. 1991. T-cell-mediated activation of macrophages. *Cur. Opin. Immunol.* 3: 330-335.
- NATHAN, C. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326.
- NATHAN, C. F., H. W. MURRAY, M. E. WIEBE et B. Y. RUBIN. 1983. Identification of IFN-g as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158: 670-689.
- NIEDEL, J. E., J. DAVIS et P. CUATRECASAS. 1980. Covalent affinity labeling of the formyl peptide chemotactic receptor. *J. Biol. Chem.* 255: 7063-7066.
- NORGAUER, J., M. EBERLE, S. P. FAY, H. D. LEMKE et L. A. SKLAR. 1991. Kinetics of N-formyl peptide receptor up-regulation during stimulation in human neutrophils. *J. Immunol.* 146: 975-980.
- OFIR, R., J. DWARKI, D. RASHID et I. M. VERMA. 1991. CREB represses transcription of fos promoter: role of phosphorylation. *Gene Expression* 1: 55-60.
- OKUNO, H., A. AKAHORI, H. SATO, S. XANTHOUDAKIS, T. CURRAN et H. IBA. 1993. Escape from redox regulation enhances the transforming activity of fos. *Oncogene* 8: 695-701.
- PACE, J. L., S. W. RUSSELL, B. A. TORRES, H. M. JOHNSON et P. W. GRAY. 1983. Recombinant mouse gamma interferon induces the priming step in macrophage activation for tumour killing. *J. Immunol.* 130: 2011-2013.

- 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.
- PULVERER, B. J., J. M. KYRIAKIS, J. AVRUCH, E. NIKOLAKAKI et J. R. WOODGETT. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353: 670-674.
- PULVERER, B. J., K. HUGHES, C. C. FRANKLIN, A. S. KRAFT, S. J. LEEVERS et J. R. WOODGETT. 1993. Co-purification of mitogen-activated protein kinases with phorbol ester-induced c-Jun kinase activity in U937 leukaemic cells. *Oncogene* 8: 407-415.
- RADLOFF, R., W. BAUER et J. VINOGRAD. 1967. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in HELA cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 57: 1514-1521.
- RADZIOCH, D. et L. VARESIO. 1991. c-fos mRNA expression in macrophages is downregulated by interferon-gamma at the posttranscriptional level. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2718-2722.
- RASCHKE, W. C., S. BAIRD, P. RALPH et I. NAKOINZ. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15: 261-267.
- RAUSCHER, F. J., D. R. COHEN, T. CURRAN, T. J. BOS, P. K. VOGT, D. BOHMANN, R. TIJAN et R. FRANZA. 1988. Fos-associated protein p39 is the product of the *jun* proto-oncogene. *Science* 240: 1010-1016.
- REUSE, S., I. PIRSON et J. E. DUMONT. 1991. Differential regulation of protooncogenes c-jun and jun D expressions by protein tyrosine kinase, protein kinase C, and cyclic-AMP mitogenic pathways in dog primary thymocytes: TSH and cyclic-AMP induce proliferation but downregulate c-jun expression. *Exp. Cell Res.* 196: 210-215.
- ROEDER, D. J., M.-G. LEI et D. C. MORRISON. 1989. Endotoxic-lipopolysaccharide-specific binding proteins of lymphoid cells of various animals species: association with endotoxin susceptibility. *Infect. Immun.* 57: 1054-1058.
- ROLLINS, J. R. 1991. JE/MCP-1: An early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells* 3: 517-523.
- ROSÉN, C. G. et I. FEDORCSAK. 1966. Studies on the action of diethyl pyrocarbonate on proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 130: 401-405.

- RUSSOMARIE, F. 1992. Macrophages and the glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.* 40: 281-286.
- RYDER, K. et D. NATHANS. 1988. Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85: 8464-8467.
- RYDER, K., A. LANAHAN, E. PEREZ-ALBUERNE et D. NATHANS. 1989. Jun-D: A third member of the Jun gene family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 1500-1503.
- SAMBROOK, J., E.-F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. "Commonly used techniques in molecular cloning" dans *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2<sup>e</sup> édition). Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. E1-E39.
- SCHIFFMANN, E. et J. I. GALLIN. 1979. Biochemistry of phagocyte chemotaxis. *Current Topics Cell Reg.* 15: 203-261.
- SCHIFFMANN, E., B. A. CORCORAN et S. M. WAHL. 1975b. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 72: 1059-1062.
- SCHIFFMANN, E., H. J. SHOWELL, B. A. CORCORAN, P. A. WARD, E. SMITH et E. L. BECKER. 1975. The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 114: 1831-1837.
- SCHÖNTAL, A., J. SUGARMAN, J. H. BROWN, M. R. HANLEY et J. R. FERAMISCO. 1991. Regulation of c-fos and c-jun protooncogene expression by the Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor thapsigargin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 7096-7100.
- SCHÖNTAL, A., P. HERRLICH, H. J. RAHMSDORF et H. PONTA. 1988. Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 54: 325-334.
- SCHUMANN, R. R., S. R. LEONG, G. W. FLAGGS, P. W. GRAY, S. D. WRIGTH, J. C. MATHISON, P. S. TOBIAS et R. J. ULEVITCH. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding proteins. *Science* 249: 1429-1431.
- SETOYAMA, C., R. FRUNZIO, G. LIAU, J. M. MUDRY et B. De CROMBRUGGHE. 1986. The transcriptional activation encoded by the v-fos gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83: 3213-3217.
- SHARIF, M. et M. L. PRIVALSKY. 1992. V-erbA and c-erbA proteins enhance transcriptional activation by c-jun. *Oncogene* 7: 953-960.

- SMEAL, T., B. BINETRUY, D. MERCOLA, A. GROVERBARDWICK, G. HEIDECKER, U. R. RAPP et M. KARIN. 1992. Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serine-63 and serine-73. *Mol. Cell. Biol.* 12: 3507-3513.
- SNYDERMAN, R. et E. J. FUDMAN. 1980. Demonstration of a chemotactic factor receptor on macrophage. *J. Immunol.* 124: 2754-2757.
- SNYDERMAN, R. et R. J. UHING. 1992. "Chemoattractant stimulus-response coupling" dans Gallin, J. I., I. M. Goldstein et R. Snyderman (eds): *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press Ltd. New York. 421-439.
- SNYDERMAN, R., C. D. SMITH et M. W. VERGHESE. 1986. Model for leukocyte regulation by chemoattractant receptors: roles of a guanine nucleotide regulatory protein and polyphosphoinositide metabolism. *J. Leu. Biol.* 40: 785-800.
- STEIN, B., P. ANGEL, H. VAN DAM, H. PONTA, P. HERRLICH, A. VAN DER EB et H. J. RAHMSDORF. 1992. Ultraviolet-radiation induced c-jun gene transcription: two AP-1 like binding sites mediate the response. *Photochem. Photobiol.* 55: 409-415.
- TAKADA, H. et S. KOTANI. 1989. Structural requirements of lipid-A for endotoxicity and other biological activities. *Crit. Rev. Microbiol.* 16: 477-523.
- TAKAFUJI, S., S. C. BISCHOFF, A. L. DEWECK et C. A. DAHINDEN. 1992. Opposing effects of tumor necrosis factor-alpha and nerve growth factor upon leukotriene C4 production by human eosinophils triggered with n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Eur. J. Immunol.* 22: 969-974.
- TAMAOKI, T., H. NOMOTO, I. TAKAHASHI, Y. KATO, M. MORIMOTO et F. TOMITA. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 135: 397-402.
- TANNENBAUM, C. S. et T. A. HAMILTON. 1989. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophage is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. *J. Immunol.* 142: 1274-1280.
- TANNENBAUM, C. S., T. J. KOERNER, M. M. JANSEN et T. A. HAMILTON. 1988. Characterization of lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression. *J. Immunol.* 140: 3640-3645.
- THOMAS, K. M., H. Y. PYUN et J. NAVARRO. 1990. Molecular cloning of the fmet-leu-phe receptor from neutrophils. *J. Biol. Chem.* 265: 20061-20064.

- THOMPSON, H. L., M. SHIROO et J. SAKLATVALA. 1993. The chemotactic factor N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine activates microtubule-associated protein 2 (MAP) kinase and a MAP kinase kinase in polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. J.* 290: 483-488.
- TOBIAS, P. S., K. SOLDAU et R. J. ULEVITCH. 1986. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164: 777-793.
- TORRES, M., F. L. HALL et K. O'NEILL. 1993. Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein kinases. *J. Immunol.* 150: 1563-1578.
- TOURAY, M., F. RYAN, R. JAGGI et F. MARTIN. 1991. Characterization of functional inhibition of the glucocorticoid receptor by Fos/Jun. *Oncogene* 6: 1227-1234.
- TRATNER, I., R. OFIR et I. M. VERMA. 1992. Alteration of a cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the c-Fos protein augments its transforming potential. *Mol. Cell. Biol.* 12: 998-1006.
- TREMBLAY, P., G. MERCIER, S. GAUTHIER, H. M. THÉRIEN, G. SAUVÉ et D. OTH. 1991. N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) modulates *ex vivo* lipopolysaccharide-induced cytokine production from elicited murine macrophages. *Imm. Infect. Diseases* 1: 329-334.
- TREMBLAY, P., M. HOUDE, N. ARBOUR, D. ROCHEFORT, S. MASURE, R. MANDEVILLE, G. OPDENAKKER et D. OTH. En préparation. Differential effects of PKC inhibitors on gelatinase B, cytokines and NO production in RAW 264,7 macrophage cell line.
- TSUNAWAKI, S., M. SPORN, A. DING et C. NATHAN. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- $\beta$ . *Nature* 334: 260-262.
- UDVADIA, A. J., K. T. ROGERS et J. M. HOROWITZ. 1992. A common set of nuclear factors bind to promoter elements regulated by the retinoblastoma protein. *Cell Growth & Differentiation* 3: 597-608.
- UNANUE, E. R. 1989. "Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation" dans Paul, W. E. (ed.): *Fundamental Immunology*. New York. Raven Press Ltd. 95-115.

- UNLAP, T., C. C. FRANKLIN, F. WAGNER et A. S. KRAFT. 1992. Upstream regions of the c-jun promoter regulate phorbol ester-induced transcription in U937 leukemic cells. *Nucleic Acids Res.* 20: 897-902.
- VIRCA, D. C., S. Y. KIM, K. B. GLASER et R. J. ULEVITCH. 1989. Lipopolysaccharide induces hyporesponsiveness to its own action in RAW 264,7 cells. *J. Biol Chem.* 264: 21951-21956.
- WAHL, G. M., M. STERN et G. R. STARK. 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenloxymethal-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl Sci. Acad. USA* 76: 3683-3687.
- WALKER, B. A. M., A. J. SEILER, C. A. OWENS, B. E. HAGENLOCKER et P. A. WARD. 1991. Absence of FMLP receptors on rat macrophages. *J. Leu. Biol.* 50: 600-606.
- WANG, H. et R. E. SCOTT. 1992. Induction of c-jun independent of PKC, pertussis toxin-sensitive G protein, and polyamines in quiescent SV40-transformed 3T3 T cells. *Exp. Cell Res.* 203: 47-55.
- WEINBERG, J. B., J. J. MUSCATO et J. NIEDEL. 1981. Monocyte chemotactic peptide receptor. Functional characteristics and ligand-induced regulation. *J. Clin. Invest.* 68: 621-630.
- WEINSTEIN, S. L., M. R. GOLD et A. L. DEFRANCO. 1991. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 4148-4152.
- 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.
- WRIGHT, S. D., P. DETMERS, Y. AIDA, R. ADAMOWSKI, D. C. ANDERSON, Z. CHAD, L. G. KABBASH et M. J. PABST. 1990a. CD18-deficient cells respond to lipopolysaccharide *in vitro*. *J. Immunol.* 144: 2566-2571.
- WRIGHT, S. D., R. A. RAMOS, P. S. TOBIAS, R. J. ULEVITCH et J. C. MATHISON. 1990b. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433.
- WRIGHT, S. D., S. M. LEVIN, M. T. JONG, Z. CHAD et L. G. KABBASH. 1989. CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 169: 175-183.

- XANTHOUDAKIS, S. et T. CURRAN. 1992. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* 11: 653-665.
- XANTHOUDAKIS, S., G. MIAO, F. WANG, Y. C. E. PAN et T. CURRAN. 1992. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* 11: 3323-3335.
- YANG-YEN, H. F., J. C. CHAMBARD, Y. L. SUN, T. J. SCHMIDT, J. DROUIN et M. KARIN. 1990. Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: Mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62:1205-1215.
- YE, R. D., O. QUEHENBERGER, K. M. THOMAS, J. NAVARRO, S. L. CAVANAGH, E. R. PROSSNITZ et C. G. COCHRANE. 1993. The rabbit neutrophil n-formyl peptide receptor. *J. Immunol.* 150: 1383-1394.
- YU, S. F., T. J. KOERNER et D. O. ADAMS. 1990. Gene regulation in macrophage activation: Differential regulation of genes encoding for tumor necrosis factor, interleukin-1, JE, KC, by interferon-g and lipopolysaccharide. *J. Leu. Biol.* 48: 412-419.

## ANNEXE I

### PRÉPARATION DES TAMPONS ET MILIEUX

#### 1. EAU TRAITÉE AVEC LE DIÉTHYL PYROCARBONATE

Le traitement de l'eau avec le diéthyl pyrocarbonate (DEPC) se fait avec 1 mL de DEPC ajouté à 1 litre d'eau distillée et déionisée. La solution est vigoureusement agitée, puis autoclavée.

#### 2. CHLORURE DE CÉSIUM 5,7 M

Cette solution est préparée en dissolvant 5,7 M de CsCl dans 0,1M EDTA, pH 8,0. Un volume correspondant à 0,2% de DEPC est ajouté, puis la solution est agitée et autoclavée. Le récipient contenant la solution est pesé avant et après l'autoclavage, la différence de poids due à l'évaporation est compensée en ajoutant l'équivalent d'eau traitée au DEPC.

#### 3. SOLUTION DE GUANIDIUM

Cette solution est constituée de 4 M guanidium isothiocyanate dissout dans H<sub>2</sub>O et d'une solution de 20 mM d'acétate de sodium, pH 5,2. La solution est chauffée à 65°C jusqu'à la dissolution complète du guanidium isothiocyanate, puis 0,1 mM de dithiothréitol (DTT) et 0,5% de N-lauroylsarcosine (Sarkosyl) sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 5,5 avec de l'acide acétique glacial, le volume est complété à 500 ml avec H<sub>2</sub>O puis la solution est filtrée sur filtre Nalgene 40 µm (Fisher).

#### 4. SOLUTION-STOCK D'ACÉTATE DE SODIUM 3 M

La solution-stock d'acétate de sodium est préparée en ajoutant 24,6 g d'acétate de sodium à 40 ml de H<sub>2</sub>O/DEPC et à 35 ml d'acide acétique glacial. Le pH est ajusté à 4,0 avec de l'acide acétique glacial, puis le volume est complété à 100 ml avec H<sub>2</sub>O/DEPC.

## 5. SOLUTION TES

Cette solution contient 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM d'EDTA et 1% de SDS dans un litre de H<sub>2</sub>O/DEPC.

## 6. SOLUTION TE

Cette solution contient 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4 et 5 mM d'EDTA dans un litre de H<sub>2</sub>O/DEPC.

## 7. TAMPON D'ÉLECTROPHORÈSE 10X MOPS

Cette solution est préparée à partir de 41,8 g de [3-(N-morpholino)-propanesulfonique acide] (MOPS) dissout dans 800 ml de H<sub>2</sub>O/DEPC. Le pH est ajusté à 7,0 avec du NaOH ou de l'acide acétique glacial, puis 16,6 ml de 3 M d'acétate de sodium, pH 4,0 et 20,0 ml de 0,5 M EDTA, pH 8,0 sont ajoutés. Le volume est complété à un litre avec H<sub>2</sub>O/DEPC, puis la solution est filtrée sur filtre Nalgene 40 µm (Fisher).

## 8. GEL DÉNATURANT D'AGAROSE/FORMALDÉHYDE

Ce gel se fait en ajoutant 1,2 g d'agarose et 10 ml de MOPS 10X à 95 ml d'H<sub>2</sub>O/DEPC. Cette solution est chauffée au four micro-ondes jusqu'à dissolution complète de l'agarose. La solution est ensuite refroidie à 50°C et 5 ml de formaldéhyde est ajouté pour atteindre un volume final de 100 ml.

## 9. TAMPON D'ÉCHANTILLON (6 X) POUR ARN

Ce tampon 6 X se compose de MOPS 1 X, de 22% (v/v) formaldéhyde, de 65% (v/v) formamide, de 0,5% (p/v) glycérol et de 0,1% (v/v) de bleu de bromophénol dans H<sub>2</sub>O/DEPC.

## 10. CITRATE DE SODIUM 20 X SSC

Cette solution est composée de 3 M NaCl et de 0,3 M de citrate de sodium dans H<sub>2</sub>O/DEPC.

**11. SOLUTION DÉNATURANTE**

Cette solution est composée de 1,5 M NaCl et de 0,05 M NaOH dans H<sub>2</sub>O/DEPC.

**12. SOLUTION NEUTRALISANTE**

Cette solution est composée de 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,2) et de 1 mM EDTA dans H<sub>2</sub>O/DEPC.

**13. SOLUTION DE DENHARDT (100 X)**

Cette solution est composée de 0,02% (p/v) d'albumine bovine sérique, de 0,02% (p/v) de Ficoll et de 0,02% (p/v) de polyvinylpyrrolidone dans H<sub>2</sub>O/DEPC.

**14. SOLUTION DE PRÉHYBRIDATION**

Cette solution est composée de 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 5X SSC, et de 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dans H<sub>2</sub>O.

**15. SOLUTION D'HYBRIDATION**

Cette solution est composée de 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 5X SSC, de la solution de Denhardt 5 X, de 50 µg/ml d'ADN de sperme de saumon, de 50% formamide anhydre et de 10% (p/v) de sulfate de dextran. Cette solution est conservée à -20°C.

**16. SOLUTION DE DÉSHYBRIDATION**

Cette solution est composée de 5 mM Tris-HCl, pH 8,0, de 2 mM EDTA, de la solution de Denhardt 0,1 X et de 0,1% de SDS.

**17. MILIEU DE CULTURE SOLIDE POUR BACTÉRIES**

Ce milieu de culture solide pour bactéries se compose de 1% bactotryptone, de 0,5% d'extrait de levure, de 0,5% NaCl, de 1 mM NaOH et de 1,5% d'agar.

**18. MILIEU LB**

Ce milieu de culture bactérienne se compose de 1% bactotryptone, de 0,5% d'extrait de levure, de 0,5% NaCl. Le pH est ajusté à 7,0 avec du NaOH et le milieu est autoclavé.

**19. SOLUTION DE GLUCOSE/TRIS/EDTA**

Cette solution est composée de 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, et de 10 mM EDTA dans H<sub>2</sub>O.

**20. SOLUTION DE LYSE NaOH/SDS**

Cette solution est composée de 0,2 N NaOH et de 1% SDS dans H<sub>2</sub>O. Elle est préparée immédiatement avant usage à partir de 10 N NaOH et de 10% SDS.

**21. SOLUTION D'ACÉTATE DE 3M POTASSIUM pH 4,8 ET pH 5,5**

**Mini-préparation.** Cette solution est préparée à partir de 2,96 g d'acétate de potassium et de 11,5 ml d'acide acétique glacial dans H<sub>2</sub>O. Le pH est ajusté à 4,8 puis le volume est complété à 100 ml avec H<sub>2</sub>O.

**Maxi-préparation.** Cette solution est préparée à partir de 2,94 g d'acétate de potassium et de 50 ml d'acide formique afin d'obtenir un pH de 5,5, puis le volume est complété à 100 ml avec H<sub>2</sub>O.

**22. TAMPON D'ÉLECTROPHORÈSE TAE (50 X)**

Ce tampon d'électrophorèse est composé de 0,04M Tris-acétate et 1 mM EDTA, pH 8,0, dans H<sub>2</sub>O.

**23. GEL D'ÉLECTROPHORÈSE POUR LES ANALYSES D'ADN**

Ce gel est composé de 1X TAE, 0,8% (p/v) d'agarose et de 0,5 µg/ml d'EtBr dans H<sub>2</sub>O.

**24. TAMPON D'ÉCHANTILLON (6X) POUR LES ANALYSES D'ADN**

Ce tampon est composé de 20% Ficoll, 0,1 M EDTA pH 8,0, 1% SDS et 0,25% bleu de bromophénol dans H<sub>2</sub>O.

**PROVENANCE DES PRODUITS**

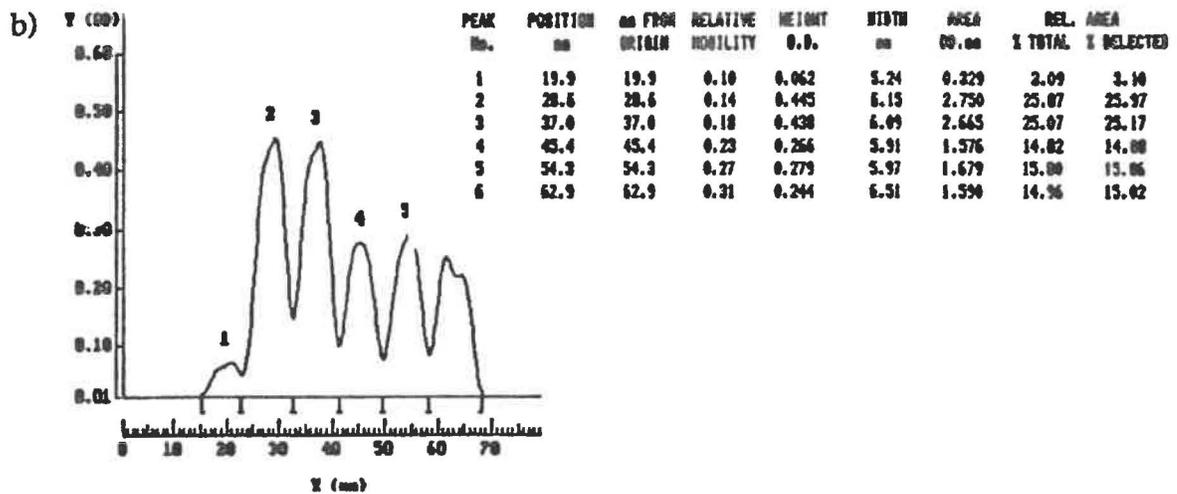
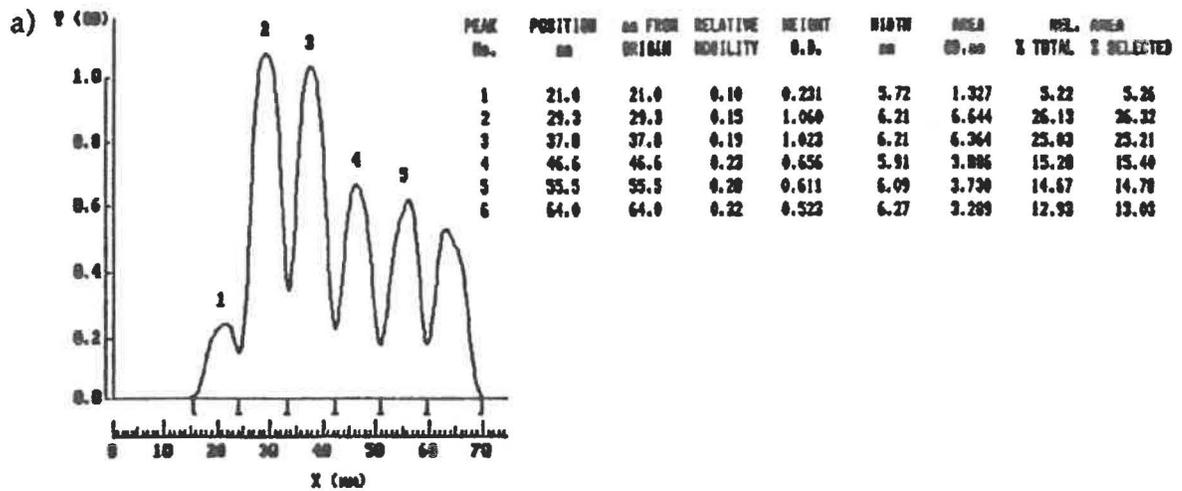
Acétate de potassium (ICN)  
Acétate de sodium (ICN)  
Acide acétique glacial (Fisher)  
Acide citrique (Sigma)  
ADN de sperme de saumon (Pharmacia)  
Agar (Difco)  
Agarose (BRL)  
Albumine sérique bovine (BSA) (Sigma)  
Bactotryptone (Difco)  
Bleu de bromophénol. (Sigma)  
Bleu trypan 0,1% (Gibco)  
Bromure d'éthidium (Sigma)  
Chlorure de césium (ICN)  
Diéthyl pyrocarbonate (DEPC) (ICN)  
Dithiothréitol (DTT) (Sigma)  
DMEM (Gibco )  
EBSS (Gibco)  
EDTA (Sigma)  
Extrait de levure (Difco)  
Ficoll (Sigma)  
Formaldéhyde (ICN)  
Formamide anhydre (ICN)  
Glucose (Sigma)  
Glycérol (Sigma)  
Guanidium isothiocyanate (ICN)  
HCl (Fisher)  
HEPES (Gibco)  
KPO<sub>4</sub> (ICN)  
MOPS (ICN)  
N-lauroylsarcosine (Sarkosyl) (ICN)  
NaCl (ICN)  
NaOH (ICN)

Pénicilline (Gibco)  
Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Sigma)  
SFB (P.A. Biologicals)  
Sodium dodécyl sulfate (SDS) (ICN)  
Streptomycine (Gibco).  
Sulfate de dextran (Sigma)  
Tampon phosphate (PBS) (Gibco)  
Tris base (ICN)

**ANNEXE II**

**FIGURE 15. Analyse de la densité optique par vidéodensitomètre**

Le vidéodensitomètre permet l'évaluation de la densité optique (D.O.) relative à chaque signal d'hybridation enregistré sur l'autoradiogramme. La représentation graphique démontre la distance par rapport à l'origine pour identifier chaque signal sur l'autoradiogramme (en abscisse) en fonction de la D.O. (en ordonnée). Deux graphiques typiques sont présentés: (a) représente un signal de c-fos tandis que le graphique (b) représente celui du gène de référence, la glycéraldéhyde phosphate-3 déshydrogénase (GAPDH). Chaque pic de D.O. est identifié manuellement. L'identification de ces pics est fourni en haut de chacun et est également représenté dans la première colonne (PEAK No.). La position de chacun se trouve dans la colonne 2 et 3, la valeur maximale de D.O. dans la colonne 4 (HEIGHT O.D.), la largeur du pic dans la colonne 5 (WIDTH mm) et la surface sous la courbe dans la colonne 6 (AREA mm<sup>2</sup>).



Calcul du ratio des densités optiques pour un pic donné:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Aire sous la courbe (D.O.} \times \text{mm}^2) \text{ du proto-oncogène (a)}}{\text{Aire sous la courbe (D.O.} \times \text{mm}^2) \text{ du gène de référence (b)}}$$

