



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par : Soufiane Bouazzi

**Implications de la Phosphatidylcholine phospholipase C,
des transporteurs de dipeptides et de la cobalamine dans le processus
inflammatoire. Application à l'étude de la mucoviscidose.**

Le 11 Décembre 2013

Membres du jury :

<u>Rapporteurs :</u>	Dr. Christelle CORAUX	Chargé de recherche, INSERM U903, Reims.
	Pr. Mario OLLERO	Professeur, INSERM U955, Paris.
<u>Examineurs :</u>	Dr. Aleksander EDELMAN	Directeur de recherche, INSERM U845, Paris.
	Dr. Jocelyne DERELLE	Pédiatre Pneumologue, Hôpital d'enfant, Nancy.
	Pr. Jean Louis GUEANT	Professeur à la Faculté de Médecine, Université de Lorraine (Directeur de laboratoire).
	Dr. Marc MERTEN	Maitre de conférences, Université de Lorraine (Directeur de thèse).
<u>Membre invité:</u>	Dr Catherine Figarella	Directeur de recherche, Marseille.

Remerciements

J'aimerais tous d'abord remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

*Le Docteur **Aleksander Edelman**, directeur de recherche à l'unité INSERM. J'ai toujours eu une profonde admiration pour le scientifique et la personne que vous êtes. Veuillez accepter mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.*

Les rapporteurs,

*Le docteur **Christelle Coraux**, chargée de recherche à l'Unité 903 et le Professeur **Mario Ollero** de l'Unité 955. Votre travail m'a beaucoup inspiré et je suis fier et heureux de vous compter dans le jury de ma thèse. Je tiens à vous remercier de m'avoir fait le plaisir d'évaluer mon travail et pour votre disponibilité. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude.*

Les examinateurs,

*Le Dr **Jocelyne Derelle**, Pédiatre Pneumologue à l'Hôpital d'enfant, Nancy. Je suis très honoré que vous ayez accepté d'être parmi les examinateurs de ce travail. Votre examen de cette thèse et des travaux qui y sont présentés sera un privilège. Veuillez agréer toute ma gratitude et mon plus profond respect.*

*Je remercie également le Professeur **Jean Louis Guéant** de m'avoir accueilli dans son unité pour effectuer mon master2 et de m'avoir offert l'occasion de poursuivre l'aventure au sein de son laboratoire pour des années supplémentaires ce qui m'a permis de vivre une expérience enrichissante.*

*Je ne peux oublier de remercier du fond du cœur Monsieur le docteur **Marc Merten**. Je suis ravi d'avoir été encadré par une personne aussi gentille et aussi compétente scientifiquement. Je tiens à vous saluer pour votre confiance et votre dévouement pour vos étudiants. Je vous remercie pour tous le temps que vous m'avez consacré à écrire des rapports ou à discuter des résultats et pour tous les colloques auxquels on*

a participé. J'ai beaucoup appris avec vous au niveau personnel comme au niveau professionnel.

*Toutes mes gratitudes à Madame **Catherine Figarella** pour son soutien, son intérêt pour mon travail et pour sa grande sympathie. Je suis plus qu'honoré que vous ayez accepté d'être présente à ma soutenance en tant que membre invité.*

*Je suis également reconnaissant au Professeur **Nadir Mrabet** et à madame **Carole Arnold** de m'avoir donné leur confiance dans l'enseignement et pour leurs précieux conseils. Je remercie aussi Madame **Brigitte Leninger-Muller** pour son aide et ses coups de pouces.*

Les mots ne sauraient exprimer toute ma considération à tous les membres de l'unité 954 pour leur sympathie et leur bonne humeur. A Dominique, Catherine, Thierry, Fereshteh et Justine.

A Jean Marc, Pierre et Déborah pour leur disponibilité et leur générosité. J'espère que vous continuerez toujours à garder le sourire. Vous êtes tellement bien comme ça !

Plus généralement je remercie, les doctorantes Rania, Rasha, Rose et Sarah, qui ont su apporté la douceur et la chaleur du Liban jusqu'à la Lorraine. Un grand grand merci aussi à Sonia : Σας ευχαριστούμε για όλα. A Véronique Marguerite-Heissat, d'avoir su m'encourager aux moments difficiles. Merci au stagiaires qui sont passés dans l'équipe et qui m'ont tous apporté quelque chose.

*Finalement, je remercie de tout mon coeur la personne à qui je dois beaucoup beaucoup de choses dans ma vie, et qui je ne peux remercier autant qu'il le mérite, mon frère **Bassem**..... sans oublier ma chère belle sœur, Dr **Bouazzi Marie** ainsi que **Loubna** d'être tous simplement là pour moi, Lamia et Nesrine pour leurs encouragements continus.*

A mes parents, à qui je dois tous, à mon frère Sabri, Rabbi yfadhelkom.

A la Tunisie, mon beau pays, dont je suis fier.

A tous mes amis en France et en Tunisie, dont je ne ferai pas la liste de peur d'oublier quelqu'un et qui attendent depuis des années l'aboutissement de ces longues années d'études.

A l'association Vaincre la mucoviscidose et le conseil général de Meurthe et Moselle pour leur soutien financier ainsi qu'à la Société de Pneumologie en Langue Française de m'avoir accordé un prix pour mon projet de thèse.

« Cherchons comme cherchent ceux qui doivent trouver et trouvons comme trouvent ceux qui doivent chercher encore. Car il est écrit : celui qui est arrivé au terme ne fait que commencer ».

St. AUGUSTIN

Implications de la Phosphatidylcholine phospholipase C, des transporteurs de dipeptides et de la cobalamine dans le processus inflammatoire. Application à l'étude de la mucoviscidose

Contexte : Les maladies pulmonaires comme l'asthme ou la mucoviscidose représentent des problèmes majeurs de santé publique. Elles se manifestent par une inflammation chronique avec une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et à terme une dégradation de la fonction respiratoire. Les efforts thérapeutiques tentent, d'un côté, de contrôler la réaction inflammatoire et aussi d'améliorer la biodisponibilité médicamenteuse.

Objectif : Notre objectif est d'explorer l'implication des phospholipases dans l'inflammation et le rôle des transporteurs peptidiques dans le transport des antibiotiques dans la mucoviscidose. Nous avons aussi cherché à comprendre l'effet d'une supplémentation en cobalamine sur l'efficacité de la dexaméthasone dans un contexte inflammatoire.

Méthodes : Des techniques immunologiques, électrophorétiques, de culture cellulaire, d'immunoprécipitation et d'expression génique sont utilisées sur des lignées bronchiques humaines normales ou mucoviscidosiques.

Résultats : **1)** La PC-PLC est constitutivement suractivée dans les cellules mucoviscidosiques et conduit à une surproduction d'arachidonate, à une surexpression de Cox-2, une surproduction de PGE₂, une surexpression d'interleukine-8, et au défaut de régulation beta-adrénergique de la sécrétion. L'inhibition de cette enzyme par le D609 permet de corriger tous ces défauts. **2)** L'activité du transporteur peptidique, impliquée dans le transport d'antibiotiques, PEPT₂, a été caractérisée dans les cellules bronchiques normales ($V_m = 115 \text{ pmol}/10^6 \text{ cellules/min}$; $K_m = 15 \mu\text{M}$). Ce transporteur n'est pas influencé par un contexte inflammatoire. Ce transporteur est inactif dans les cellules CF. **3)** La cobalamine potentialise l'effet de la dexaméthasone sur la sécrétion et l'expression des cytokines pro-inflammatoires induite par le TNF α et l'histamine.

Conclusions/perspectives :

Cette étude devrait permettre **1)** de mettre en lumière l'importance de la PC-PLC comme cible pharmacologique potentielle dans la mucoviscidose. **2)** de comprendre la relative faible efficacité de l'antibiothérapie dans cette maladie et **3)** de mettre en évidence une possible participation du cycle de la méthionine dans le processus inflammatoire.

Mots clés: Inflammation, PC-PLC, mucoviscidose, PEPT, Interleukine-8, cobalamine.

Abstract

Background: Lung diseases such as asthma or cystic fibrosis are major public health problems. They are manifested by chronic inflammation with increased production of proinflammatory cytokines leading to respiratory failure. Current therapeutic is aimed at controlling the inflammatory response and also at improving drug bioavailability.

Objective: The objective is to explore the involvement of phospholipases in inflammation and the role of peptide transporters in the transport of antibiotics in cystic fibrosis. We also sought to understand the effect of cobalamin supplementation on the effectiveness of dexamethasone in an inflammatory context. **Methods:** immunological techniques, electrophoresis, cell culture, immunoprecipitation and gene expression are used on normal or cystic fibrosis human bronchial cell lines.

Results :1) PC-PLC is constitutively overactivated in cystic fibrosis cells and leads to overproduction of arachidonate, to overexpression of *Cox-2* , an overproduction of PGE2 , an *interleukin -8* overexpression , and to alteration of beta-adrenergic secretion. Inhibition of this enzyme by D609 corrects these defects. 2) The activity of the dipeptide carrier involved in the transport of antibiotics, PEPT2, was characterized in normal bronchial cells ($V_m = 115$ pmol/106 cells / min, $K_m = 15\mu M$). This transporter is not affected by an inflammatory context. However, it was shown to be inactive in CF cells. 3) Cobalamin potentiates the effect of dexamethasone on the expression and secretion of pro-inflammatory cytokines induced by $TNF\alpha$ and histamine.

Conclusions :

This study should help 1) to highlight the importance of PC-PLC as a potential pharmacological target in cystic fibrosis. 2) to understand the relative ineffectiveness of antibiotics in this disease , and 3) to highlight a possible involvement of methionine cycle in the inflammatory process.

Keywords : Inflammation, PC-PLC, Cystic fibrosis, PEPT, Interleukin-8, cobalamin.

Sommaire

AVANT PROPOS.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	15
I. INTRODUCTION GENERALE.....	16
I.1 GENERALITE.....	17
I.2 ARCHITECTURE DE L'ARBRE TRACHEO-BRONCHIQUE	17
I.2.1 L'épithélium respiratoire de surface bronchique	18
I.2.1.1 Les cellules ciliées	18
I.2.1.2 Les cellules caliciformes	19
I.2.1.3 Les cellules basales	19
I.2.1.4 Les cellules intermédiaires.	20
I.2.2 L'épithélium respiratoire bronchique glandulaire.....	20
I.2.2.2 Les cellules muqueuses	20
I.2.2.3 Les cellules séreuses.....	21
I.2.2.4 Les cellules myoépithéliales	21
I.2.3 L'épithélium respiratoire bronchiolaire.....	22
I.2.3.1 Les cellules de Clara.....	22
I.2.3.2 Les cellules neuroendocrines.....	22
I.2.4 L'épithélium respiratoire alvéolaire et le surfactant	23
I.2.4.1 L'épithélium respiratoire alvéolaire	23
I.2.4.2 Le surfactant.....	24
I.3. FONCTION DE DEFENSE DE L'ARBRE TRACHEO-BRONCHIQUE.....	24
I.3.1 La Clairance mucociliaire	25
I.3.1.1 Les Mucines	26
I.3.1.2 Les cils	27
I.3.2 L'Activité antimicrobienne.....	28
I.3.2.1 Le lysozyme	28
I.3.2.2 Le SLPI « Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor »:	28
I.3.2.3 Les défensines	29

I.4	SYSTEME DE DEFENSE IMMUNITAIRE DANS L'EPITHELIUM ET QUELQUES ACTEURS IMPORTANTS DE L'INFLAMMATION	30
I.4.1	Les différentes cellules immunitaires	31
I.4.1.1	Les neutrophiles	31
I.4.1.2	Les lymphocytes	32
I.4.1.3	Les macrophages	34
I.4.1.4	Les cellules dendritiques	35
I.4.1.5	Les mastocytes	35
I.4.2	Chimiokines et cytokines	37
I.4.2.1	Le TNF α	37
I.4.2.2	L'interleukine-6	40
I.4.2.3	L'interleukine 8	41
I.4.2.4	Le GM-CSF	42
I.4.3	Les amines biogènes : l'histamine	43
I.4.4	Les phospholipases	45
I.4.4.1	Généralités sur les phospholipases	45
I.4.4.2	La Phospholipase A	47
I.4.4.3	La Phospholipase A2 cytosolique	48
I.4.4.4	La Phospholipase A2 sécrétée	49
I.4.4.5	La Phospholipase A2 calcium indépendante	50
I.4.4.6	La phospholipase C	51
I.4.4.7	La phosphatidylcholine phospholipase C	52
I.4.4.8	La phospholipase D	54
I.4.5	Cyclooxygénases et médiateurs lipidiques	56
I.5	MALADIES INFLAMMATOIRES DU POUMON	58
I.5.1	Mucoviscidose : Généralités et physiopathologie de la maladie	58
I.5.1.1	Le gène CFTR	62
I.5.1.2	Les différentes mutations du gène CFTR	62
I.5.1.3	La protéine CFTR : la structure	65
I.5.1.4	La protéine CFTR : les fonctions	66
I.5.1.5	Stratégies thérapeutiques: les transporteurs comme cible thérapeutique	68
I.5.2	L'Asthme	70
I.5.2.1	Origine et physiopathologie de la maladie	70
I.5.2.2	Les récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes	72
I.5.2.3	Les stratégies thérapeutiques : la corticothérapie	74

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	77
 III. PREMIERE PARTIE: ETUDE DE L'IMPLICATION DE LA PC-PLC DANS L'INFLAMMATION SUR DES CELLULES GLANDULAIRES HUMAINES	81
III.1 INTRODUCTION.....	81
III.2 RESULTATS ET DISCUSSION.....	85
III.2.1 Etude du relargage de l'acide arachidonique par les cellules CF-KM4 et MM39.	85
III.2.2 Influence d'un contexte inflammatoire sur le relargage de l'AA par les cellules MM39 et CF-KM4.....	90
III.2.3 Mesure de l'activité de la PC-PLC dans les cellules CF-KM4 et MM39.....	91
III.2.4 Effet du D609 sur l'expression et l'activité de la Cyclo-oxygénase 2.....	93
III.2.5 L'implication de la PC-PLC dans l'expression de l'interleukine 8 dans les cellules CF-KM4	98
III.2.6 L'implication de la PC-PLC dans les défauts de réponse aux sécrétagogues.....	101
III.3 CONCLUSION.....	104
 IV. DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES TRANSPORTEURS PEPT1 ET PEPT2 DANS LES CELLULES GLANDULAIRES HUMAINES MUCOVISCIDOSIQUES.	108
IV.1 INTRODUCTION	108
IV.2 OBJECTIF DE L'ETUDE.....	111
IV.3 LA STRATEGIE EXPERIMENTALE.....	111
IV.4 LES RESULTATS	112
IV.4.1 Etude des transporteurs PEPT dans les cellules MM39.	113
IV.4.1.1 Expression des transporteurs PEPT1 et 2 dans les cellules MM39	113
IV.4.1.2 Étude du transport d'antibiotiques par les cellules MM39.	114
IV.4.1.3 Cinétique du transport du substrat Ala-lys-AMCA.....	115
IV.4.1.4 Effet de la concentration en substrat	116
IV.4.1.5 Etude de compétition par le Céfadroxil	117
IV.4.1.6 Implication potentielle du transporteur PEPT1 ?.....	118
IV.4.1.7 Effet d'un contexte inflammatoire sur le transport d'antibiotiques par les cellules MM39.....	121
IV.4.1.8 Effet des agents anti-inflammatoires sur le transport d'antibiotiques par les cellules MM39.....	122
IV.4.2 Etude du transport d'antibiotiques par les cellules CF-KM4.....	124
IV.4.2.1 Expression des transporteurs dans les cellules CF-KM4	124
IV.4.2.2 Étude du transport d'antibiotiques par les cellules CF-KM4.....	125
IV.4.2.3 Transport du Céfadroxil par les cellules CF-KM4	129

IV.4.2.4 Transport du Captopril par les cellules CF-KM4.....	130
IV.4.3 Etude de la cinétique du transport par les cellules MM39-CFTR _(-/-)	132
IV.4.3.1 Expression des transporteurs PEPT dans les cellules MM39-CFTR _(-/-)	133
IV.4.3.2 Etude du transport des antibiotiques par les cellules MM39-CFTR _(-/-)	133
IV.4.3.3 Détermination des paramètres cinétiques du transport par les cellules MM39-CFTR _(-/-)	135
IV.5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	139

TROISIEME PARTIE : ETUDE DU ROLE DE LA COBALAMINE DANS L'INFLAMMATION PULMONAIRE INDUITE PAR L'HISTAMINE ET LE TNF ALPHA SUR DES CELLULES BRONCHIQUES HUMAINES. 142

V.1 INTRODUCTION	142
V.1.1 La vitamine B12 ou cobalamine	142
V.1.1.1 Structure.....	142
V.1.2 Cycle de la méthionine et réactions de méthylation.....	144
V.1.3 Arguments en faveur d'un rôle potentiel du cycle de la méthionine dans le processus inflammatoire.....	147
V.1.3.1 Réactions de méthylation et expression des cytokines	147
V.1.3.2 Le cycle de la méthionine et l'inflammation.....	147
V.1.3.3 L'inflammation altère le cycle de la méthionine.....	148
V.1.3.4 La cobalamine peut avoir un effet anti-inflammatoire	149
V.2 OBJECTIFS.....	150
V.3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	151
V.3.1 Effet du TNF α et de l'histamine sur l'expression des cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF)	151
V.3.2 Influence de la cobalamine sur la production des cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF).....	153
V.3.3 Effets de la Dexaméthasone sur la production des cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF).	155
V.3.3.1 Effets de la Dexaméthasone sur la production de l'IL-8	155
V.3.3.2 Effets de la Dexaméthasone sur la production de l'IL-6	156
V.3.3.3 Effets de la Dexaméthasone sur la production du GM-CSF	157
V.3.4 Etude de l'expression des gènes des cytokines IL-6 et IL-8.....	158
V.3.4.1 Etude de l'expression des gènes de l'IL-8	159
V.3.4.2 Etude de l'expression des gènes de l'IL-6	160
V.3.5 Etude de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes.....	161
V.3.6 Immunoprécipitation de la Chromatine et étude de la fixation des GR α sur les promoteurs d'IL-6 et d'IL-8.....	165
V.3.6.1 Le GR α se fixe sur le promoteur de l'IL-8 en présence de la cobalamine	166
V.3.6.2 Le GR α se fixe sur le promoteur de l'IL-6 en présence de la cobalamine	167
V.4 CONCLUSION	169

VI CONCLUSION GENERALE	174
BIBLIOGRAPHIE	179
FICHES TECHNIQUES.....	200

Avant propos

Les maladies pulmonaires constituent l'un des enjeux majeurs de santé publique dans les pays industrialisés et, plus récemment, dans les pays émergents. Elles représentent directement ou indirectement la deuxième cause de décès dans le monde. A titre d'exemple, 10% des adultes et 35% des enfants à l'échelle mondiale souffrent d'asthme ou de maladies respiratoires allergiques.

Les maladies respiratoires touchent les voies aériennes, y compris les voies nasales, les bronches et les poumons. Elles vont d'infections aiguës comme la pneumonie et la bronchite à des affections chroniques telles que l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive et la mucoviscidose.

Les voies respiratoires sont continuellement face à un environnement chargé de pathogènes auxquels elles réagissent par la mise en place de réponses immunitaires et anti-inflammatoires adaptées. Cependant, dans des maladies pulmonaires comme l'asthme ou la mucoviscidose la persistance de la réponse inflammatoire est responsable du remodelage des voies aériennes et de leur obstruction ce qui nécessite d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires de l'inflammation pulmonaire. Ceci est important afin de développer des approches thérapeutiques dont l'objectif est d'améliorer la prise en charge des personnes atteintes par ces maladies.

Le traitement de la mucoviscidose n'est pas simple, il repose surtout sur la diminution des symptômes et la prévention des complications avec des séances très fréquentes de kinésithérapie respiratoire qui varie en fonction de l'âge et de l'encombrement bronchique. L'aérosolthérapie avec des fluidifiants, des bronchodilatateurs est prescrite aussi pour améliorer la respiration. A toute cette médication, vient se rajouter l'utilisation des anti-inflammatoires pour diminuer l'inflammation et les antibiotiques pour lutter contre les infections sans oublier le traitement des autres complications pancréatiques et digestives. Malgré cela et au fur et à mesure de l'avancée de la maladie, la capacité respiratoire diminue et il est parfois nécessaire d'avoir recours à l'oxygénothérapie pour contrer l'insuffisance

respiratoire, voire à la greffe poumons ou cœur-poumons lorsque le pronostic vital est en jeu. Malgré les progrès, la prise en charge de la mucoviscidose nécessite donc des soins quotidiens qui sont très contraignants.

A l'heure actuelle, la recherche continue d'explorer différentes voies pour trouver de nouvelles molécules thérapeutiques ou améliorer l'efficacité des traitements existants. Dans notre équipe, nous avons essayé de travailler sur ces deux fronts en étudiant le contexte inflammatoire d'un côté et de l'autre côté le transport d'antibiotiques par deux transporteurs peptidiques.

Dans un autre volet de mon travail, et en s'intéressant toujours à l'inflammation, j'ai travaillé sur l'effet des glucocorticoïdes sur un modèle cellulaire bronchique d'asthme. Les bronches sont une cible de la glucocorticothérapie, vu qu'elle est le siège d'une inflammation importante au moment des crises. Une grande majorité des asthmatiques présente un asthme qui nécessite un traitement anti-inflammatoire de fond, prescrit de nombreux mois, voire plusieurs années. Lors de crises sévères ou lorsque l'asthme s'aggrave au cours d'une bronchite par exemple, des médicaments corticoïdes sous forme de comprimés sont prescrits ; ce traitement est prescrit plus longtemps. Dans ce cas, beaucoup d'effets secondaires peuvent survenir. L'efficacité d'un médicament est alors en jeu. Le but est d'obtenir le plus de bénéfices escomptés avec la dose minimale et le temps de traitement le plus court.

Ce mémoire se composera ainsi d'une introduction bibliographique générale, permettant de fournir des données sur l'inflammation pulmonaire et le système immunitaire. J'ai pris soin dans cette introduction de détailler suffisamment le rôle que joue l'épithélium trachéal bronchique dans la défense immunitaire et son implication dans l'inflammation pulmonaire comme acteur mais aussi comme siège de l'inflammation commun aux maladies respiratoires (asthme, BPCO et mucoviscidose). Après cette partie introductive, j'ai présenté les résultats dans trois grands chapitres, un chapitre pour chaque maladie étudiée, avec une petite introduction suivie des résultats et des discussions. Enfin, une dernière partie a été consacrée à présenter une discussion générale sur le travail et ses perspectives.

Liste des abréviations

μL	Microlitre
μm	Micromètre
AA	Acide arachidonique
ABC	ATP-binding cassette
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AMP	Adénosine monophosphate
AP	Acide phosphatidique
ARNm	Acide ribonucléotidique
ATP	Adénosine triphosphate
ABC	ATP-binding cassette
BAL	Lavage broncho- alvéolaire
BCA	Bicinchoninique acide
BET	Bromure d'Ethidium
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
C	Cytosine
Ca ⁺⁺	Calcium
Carb	Carbachol
Cbl	Cobalamine
CD	Cluster de différenciation
CF	Cystic fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CMI	Concentration minimale d'inhibition
Cox	Cyclo-oxygénase
Cpm	Coup par minute
cPLA2	Phospholipase A2 cytosolique
Ct	Threshold cycle
CXCR	Chimiokine receptor

CXC	chimiokine
D609	Tricyclodecan-9-yl xanthogenate
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
Dex	Dexaméthasone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENaC	Epithelial sodium channel
F508	Phenylalanine
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GR	Glucocorticoid Receptor
GSH	Glutathion
H	Heure
HBD	β -défensines
Hz	Hertz
HDAC	Histone deacétylase
His	Histamine
HRP	Horseradish peroxidase
HNP	Human Neutrophil Peptide
IC50	Concentration inhibitrice 50
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN- γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukin
iNos	Inducible nitric oxide synthase
IP3	Inositol triphosphate
iPla2	Phospholipase A2 calcium independent
Iso.	Isoprotérenol
Jak	Janus kinase
KDa	Kilodalton
Ki	Constante d'inhibition
Km	Affinité
LPA	Acide Lysophosphosphatidique
LPS	Lipopolysaccharide
MAG	Monoacylglycerol

MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein
Min	Minute
mg	Milligramme
Mg	Magnesium
mM	Millimolaire
MM	Masse Molaire
MMP	Metalloprotéase matricielle
mTOR	Target of rapamycin
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
Muc	Mucine
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide déshydrogénase
NBD	Domaine membranaire de fixation des nucléotides
NEB	Corps neuro-épithéliaux
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NFκB	Facteur nucléaire kappa B
NK	Natural Killer
nM	Nanomolaire
OPD	Orthophényle diamine
P450	Cytochrome P450
Pa	Pseudomonas Aeruginosa
PAF	Platelet-activating factor
Pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PC-PLC	Phosphatidylcholine phospholipase C
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEPT	Peptid transporter
PG	Prostaglandines
PGI	Prostacyclines
pH	Potentiel hydrogène
pIgR	Polymeric immunoglobulin receptor
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
P-gp	Glycoprotéine P
PKA	Proteine kinase A
PKC	Proteine kinase c

PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase c
PLD	Phospholipase D
PNN	Neutrophiles polynucléaires
RIP-1	Receptor interacting protein-1
Rpmi	Rotation par minute
ROS	Espèces réactives d'oxygène
RT-PCR	Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction
S	Substrat
SA	Staphylococcus Aureus
SBF	Serum bovine Foetal
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor
SODD	Silencer of death domains
SP	Surfactant pulmonaire
sPLA2	Phospholipase A2 sécrétoire
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SV40	Simian Virus 40
TACE	TNF- α -converting enzyme
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRAF2	TNFR-associated factor 2
TNF	Tumor necrosis Factor
TX	Thromboxanes
UA	Unité arbitraire
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
V_i	Vitesse initiale
V_m	Vitesse maximale

Liste des figures

Figure 1: Les différents types d'épithéliums respiratoires de surface	18
Figure 2 : Système de défense de l'épithélium respiratoire des voies aériennes.....	25
Figure 3 : Structure générale des mucines sécrétées.....	27
Figure 4 : Distribution des récepteurs à l'histamine dans la muqueuse respiratoire..	45
Figure 5: Mode d'action des phospholipases.....	47
Figure 6: Représentation des différents domaines de la cPLA2.....	50
Figure 7: Mode d'action de la phospholipase C.	51
Figure 8 : Mécanisme d'action de la PC-PLC.	54
Figure 9: Synthèse des leucotriènes, des prostaglandines et des thromboxanes à partir des phospholipides membranaires.....	56
Figure 10 : Les conséquences du défaut d'expression de CFTR	60
Figure 11: Les différentes classes de mutations de CFTR.....	64
Figure 12: Représentation de la protéine CFTR.....	65
Figure 13 : Mécanisme d'action des récepteurs aux glucocorticoïdes	73
Figure 14: Interactions entre les bactéries, les cellules épithéliales et les cellules immunitaires..	82
Figure 15: Etude du relargage de l'AA par les cellules MM39 et CF-KM4	86
Figure 16: Schéma représentatif du métabolisme des phospholipides par les phospholipases....	88
Figure 17: Etude du relargage de l'AA par les cellules CF-KM4	89
Figure 18 : Le relargage de l'AA tritié par les cellules CF-KM4 et MM39.....	90
Figure 19: Mesure de l'activité de la PC-PLC dans les cellules CF-KM4 et MM39 et de la composition des membranes en PE et PC	92

Figure 20 : Effet de TNF α et du D609 sur l'expression de la cyclo-oxygénase-2 par les cellules MM39 et CF-KM4.....	94
Figure 21 : Mesure de l'expression protéique de Cox-1 et 2 dans les cellules CF-KM4.....	95
Figure 22 : Mesure du relargage du PGE2 par les cellules CF-KM4 et MM39.....	97
Figure 23: Etude de l'expression de l'IL-8 dans les cellules CF-KM4.....	98
Figure 24: Etude de l'expression de l'IL-8 en présence d'effecteurs de la PKC.....	100
Figure 25 : Dosage de l'IL-8 par ELISA.....	101
Figure 26 : Réponse des cellules MM39 et des cellules CF-KM4 aux agonistes cholinergiques et adrénergiques.....	102
Figure 27 : Schéma hypothétique du mécanisme d'implication de la PC-PLC dans la Mucoviscidose.	107
Figure 28 : Structures des substrats utilisés dans les études de transport.	112
Figure 29: Expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 par les cellules MM39.....	113
Figure 30 : Schématisation du système de culture cellulaire en double chambre pour les expériences d'étude du transport vectoriel.....	114
Figure 31 : Cinétique du transport du substrat dans les cellules MM39.....	115
Figure 32 : Courbe de saturation.....	117
Figure 33 : La vitesse de transport du substrat en fonction de la concentration en céfadroxil..	118
Figure 34 : Effet des compétiteurs sur la vitesse initiale.....	119
Figure 35: Vitesse de transport du substrat en fonction de la concentration en captopril.....	120
Figure 36 : Histogramme de la vitesse de transport dans un contexte inflammatoire.....	121
Figure 37 : Effet de la Dexaméthasone et de l'Ibuprofène sur la vitesse de transport.....	123
Figure 38: Effet des anti-inflammatoires sur la vitesse de transport.....	123
Figure 39: Expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 par les cellules CF-KM4.....	125
Figure 40: Cinétique de transport du substrat par les cellules CF-KM4.	125
Figure 41: Courbe de saturation.....	126
Figure 42 : Dégradation du substrat transporté par les cellules CF-KM4.....	127

Figure 43 : Effet du céfadroxil sur le transport par les cellules CF-KM4.	129
Figure 44 : Effet du Captopril sur le transport par les cellules CF-KM4.....	130
Figure 45 : Effet de la Cloxacilline, Histidine et Glutathion sur le transport.....	131
Figure 46 : Expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 dans les cellules MM39-CFTR _(-/-)	133
Figure 47 : La cinétique du transport du substrat par les cellules MM9-CFTR _(-/-)	134
Figure 48 : Proportions relatives du substrat en fonction du temps.....	134
Figure 49 : Evolution de la vitesse initiale du transport par les cellules MM39-CFTR _(-/-)	136
Figure 50 : La formule chimique de l'AMCA	141
Figure 51: La vitamine B12 ou cobalamine	143
Figure 52 : Cycle de la méthionine et des folates.....	145
Figure 53: La cobalamine comme cofacteur	146
Figure 54 : Dosage des cytokines IL-8, IL-6, GM-CSF dans les cellules 16HBE.....	152
Figure 55 :Effet de la cobalamine sur la production des cytokines IL-8, IL-6, GM-CSF par les cellules 16HBE.....	154
Figure 56 : Effet de la Dexaméthasone sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules 16HBE.....	155
Figure 57 : Effet de la Dexaméthasone sur la sécrétion d'IL-6 par les cellules 16HBE.....	156
Figure 58 : Effet de la Dexaméthasone sur la sécrétion de GM-CSF par les cellules 16HBE.....	157
Figure 59: Etude de l'expression de l'IL-8 par RT-qPCR par les cellules 16HBE.....	159
Figure 60 : Etude de l'expression de l'IL-6 RT-qPCR par les cellules 16HBE.....	160
Figure 61 : Influence de la cobalamine sur l'expression du GR β par les cellules 16HBE.....	162
Figure 62 : Influence de la Cobalamine sur l'expression du GR α par les cellules 16HBE.	163
Figure 63: Immunoprécipitation du site de fixation du GR α sur le promoteur de l'IL-8.....	166
Figure 64: Immunoprécipitation du site de fixation du GR α sur le promoteur de l'IL-6.....	167
Figure 65 : Les sites de phosphorylation connus pour les GR α	170
Figure 66: Les lignées trachéales glandulaires humaines MM39, CF-KM4 et 16HBE	203

Liste des tableaux

Tableau 1: Les peptides antimicrobiens humains de la famille des défensines et cathelicidines. ..	30
Tableau 2: Les principaux rôles biologiques du TNF α	39
Tableau 3: Structure des différentes isoformes de la PLC.	52
Tableau 4: Expression des PEPT1 et PEPT2 dans différentes lignées cellulaires.....	110
Tableau 5: Valeurs des constantes cinétiques pour les trois lignées cellulaires.	137
Tableau 6: Liste des différents agents utilisés pour l'étude de la génération de l'AA.....	241

I. Introduction générale

1.1 Généralité

Le système respiratoire humain a une fonction principale qui consiste à la conduction de l'air extérieur jusqu'aux alvéoles pulmonaires et permettre ainsi les échanges gazeux entre l'air et le sang. Les poumons sont ainsi exposés à de nombreux pathogènes inhalés chaque jour dans les 10 000 litres d'air inspirés quotidiennement. Malgré cela, les infections sont très rares, ce qui témoigne de l'efficacité du système de défense de la surface muqueuse des poumons.

Le système respiratoire est composé de deux parties, les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures. Les voies aériennes supérieures comprennent les fosses nasales (qui permettent de réchauffer, d'humidifier et de filtrer l'air), le pharynx et le larynx. Les voies aériennes inférieures correspondent à un arbre inversé avec plusieurs ramifications qui s'étendent depuis la trachée jusqu'aux bronchioles : deux principales bronches font suite à la trachée pour se diviser à leur tour en bronches secondaires et tertiaires qui continuent à se ramifier en voies respiratoires plus petites, appelées bronchioles, qui se terminent dans des poches à air appelées alvéoles.

1.2 Architecture de l'arbre trachéo-bronchique

L'architecture de la paroi trachéo-bronchique est très bien adaptée à la conduction de l'air car elle permet d'associer rigidité, flexibilité et extensibilité. Elle est formée de différentes couches dont la composition et la répartition varient de la trachée à la bronchiole afin de s'adapter au mieux au diamètre des voies aériennes et à leur fonction.

La couche qui tapisse la lumière bronchique est une muqueuse bronchique, elle comprend, de l'extérieur (du côté de la lumière trachéo-bronchique) vers l'intérieur, un épithélium de

surface pseudo-stratifié de type respiratoire reposant sur une membrane basale et un chorion conjonctif (*lamina propria*).

1.2.1 L'épithélium respiratoire de surface bronchique

L'épithélium de surface recouvre la face interne (coté de la lumière trachéo-bronchique) de la trachée et des bronches. Il est composé de quatre types cellulaires : Les cellules ciliées, les cellules caliciformes muqueuses, les cellules intermédiaires et les cellules basales (Figure 1).

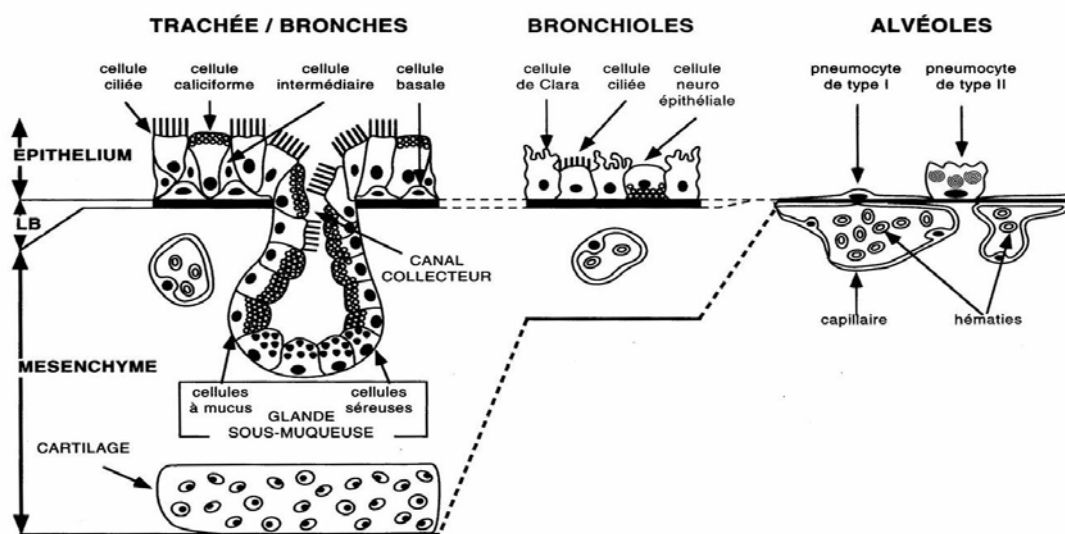


Figure 1: Les différents types d'épithéliums respiratoires de surface ; L'épithélium respiratoire est identique dans la trachée et les bronches. Il est pseudo-stratifié au niveau de l'épithélium respiratoire de surface qui est composé de quatre types cellulaires (cellules ciliées, caliciformes, intermédiaires et basales). L'épithélium glandulaire est composé de trois types cellulaires (les cellules à mucus, séreuses et myoépithéliales). L'épithélium respiratoire des bronchioles est de type monostratifié et composé de trois types cellulaires (cellules ciliées, neuro-épithéliales et de Clara). L'épithélium respiratoire des alvéoles est de type monostratifié et composé de deux types cellulaires (pneumocytes de type I et II). (Thèse Delphine GRAS, 2006)

1.2.1.1 Les cellules ciliées.

Ce sont des cellules cylindriques polarisées, ancrées à la lame basale via des contacts non jonctionnels ou indirectement par des desmosomes qui les lient aux cellules basales (1) et constituent la majorité des cellules composant l'épithélium de surface. Leur rôle est d'assurer la clairance mucociliaire en assurant l'évacuation du mucus grâce aux battements de leurs cils avec une vitesse qui peut atteindre 200 nm par seconde en moyenne. Ces cils sont eux-mêmes constitués de microtubules. Les cellules ciliées permettent les échanges d'ions entre le fluide extracellulaire et le cytoplasme intracellulaire (2) le transport d'eau (3) et la sécrétion de macromolécules (4). La fréquence de battements des cils est comprise entre 10 et 15 Hz *ex vivo* (5) et elle est plus élevée dans les bronches proximales que dans les bronches distales (6).

1.2.1.2 Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes sont disséminées entre les cellules ciliées, elles sont plus nombreuses dans les bronches souches et dans les bronches lobaires et plus rares dans les petites bronches. Elles sont remplies de grains de sécrétion riches en mucines qui participent, avec les sécrétions des glandes séro-muqueuses, à la formation du mucus (7). Le mucus produit permet d'emprisonner les impuretés de l'air inspiré et d'absorber certains gaz (8). Une hyperplasie de ces cellules est observée dans certaines pathologies respiratoires telles que les bronchites chroniques et la mucoviscidose. Les cellules caliciformes sont également capables de produire des protéines à activité anti-bactérienne telles que les IgA sécrétoires (9) et la peroxydase (10).

1.2.1.3 Les cellules basales

Les cellules basales sont des petites cellules triangulaires ancrées à la partie profonde de l'épithélium contre la membrane basale. Plusieurs desmosomes attachent les cellules basales aux cellules épithéliales qui les entourent. Elles sont très importantes dans la régénération cellulaire car elles sont capables de remplacer n'importe quel autre type de cellule bronchique (11). Elles peuvent donc se différencier en cellules ciliées ou en épithélium en fonction de l'intensité de l'agression de l'épithélium.

1.2.1.4 Les cellules intermédiaires.

Les cellules intermédiaires sont ancrées à la lame basale. De forme allongée, elles n'atteignent pas la lumière des voies respiratoires. Ces cellules seraient issues de la division des cellules caliciformes au cours du processus de stratification (12). Elles constituent des éléments de transition en cours de différenciation en cellules ciliées ou sécrétoires (13). Les cellules intermédiaires représentent 7% des cellules de l'épithélium de surface et constituent 33% des cellules proliférantes au niveau des voies aériennes de conduction (14).

1.2.2 L'épithélium respiratoire bronchique glandulaire

L'épithélium respiratoire glandulaire, présent dans la sous-muqueuse bronchique, est situé entre l'épithélium de surface et le cartilage. Il est constitué d'un tissu conjonctif lâche contenant les glandes sécrétoires mixtes, elles même constituées de trois types cellulaires : les cellules muqueuses, les cellules séreuses et les cellules myoépithéliales.

1.2.2.2 Les cellules muqueuses

Les cellules muqueuses ont un cytoplasme caractérisé par sa densité en granules sécrétoires riches en mucines au niveau apical. Elles produisent plusieurs types de mucines comme les MUC5B et MUC5AC qui permettent la synthèse du mucus (15). Ces cellules jouent un rôle important dans la défense immunitaire notamment contre les agressions bactériennes à travers le transport spécifique d'immunoglobulines, les IgA sécrétoires, par le transporteur pIgR.

1.2.2.3 Les cellules séreuses

Elles sont les principales sources de protéines de défense (16). Elles produisent une grande quantité du liquide de sécrétion des glandes ainsi que des protéines et des peptides à activité antibactérienne tel que le lysozyme (le lysozyme est considéré comme étant un marqueur spécifique de l'activité sécrétoire des cellules glandulaires séreuses (17)), la lactoferrine et l'inhibiteur bronchique de leucoprotéase (*Secretory LeucoProtease Inhibitor, SLPI*) ou encore des anti-protéases qui inactivent les enzymes bactériennes. Ces anti-protéases peuvent aussi détruire les protéases produites par les PNN (les polynucléaires neutrophiles) avant qu'elles ne puissent détériorer les tissus comme c'est le cas dans les pathologies pulmonaires. Ces cellules expriment fortement la protéine CFTR, notamment dans la membrane des granules sécrétoires. Ceci laisse penser que cette protéine joue un rôle dans le transport et l'exocytose des grains de sécrétion en dehors de la cellule séreuse (18).

1.2.2.4 Les cellules myoépithéliales

Les cellules myoépithéliales ont des propriétés contractiles, elles tapissent l'extérieur des glandes de la sous muqueuse ce qui facilite la libération des granules sécrétoires des cellules glandulaires vers la lumière des voies respiratoires. En effet, ces cellules allongées sont en contact avec la lame basale mais aussi en contact direct avec les cellules sécrétoires glandulaires trachéobronchiques.

1.2.3 L'épithélium respiratoire bronchiolaire

L'épithélium respiratoire bronchiolaire est composé de trois types cellulaires différents qui sont les cellules ciliées, les cellules de Clara et les cellules neuroendocrines. Les cellules ciliées de l'épithélium bronchiolaire ont la même morphologie et les mêmes propriétés que dans l'épithélium bronchique.

1.2.3.1 Les cellules de Clara

Les cellules de Clara sont un des principaux types cellulaires de l'épithélium bronchiolaire. Ce sont des cellules non ciliées avec un cytoplasme granuleux. Elles contiennent de nombreuses mitochondries de grande taille, un abondant réticulum endoplasmique lisse. Elles sont de forme ovale chez l'Homme et irrégulière chez les autres espèces (19). Ces cellules ont trois fonctions.

Elles produisent les collectines et les protéines associées au surfactant (SP-A, SP-B, SP-D) (20), synthétisées aussi par les cellules épithéliales alvéolaires et assurent ainsi une fonction antimicrobienne et sont capables de moduler l'inflammation des voies aériennes. Cette dernière fonction est également assurée par la protéine CC10, produite par les cellules de Clara (21). La deuxième fonction concerne leur rôle de cellules de progénitrices, c'est-à-dire qu'elles peuvent se diviser, se différencier et remplacer des cellules d'autres types endommagées. Enfin ces cellules contiennent des systèmes enzymatiques comme le cytochrome P450 (22) capables de détoxifier des substances nocives.

1.2.3.2 Les cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines sont des cellules épithéliales spécialisées des voies aériennes, elles sont de forme pyramidale avec des prolongements cytoplasmiques atteignant la lumière des voies respiratoires (23). Ces cellules peuvent être soit isolées les unes des autres ou être sous forme de « cluster », elles sont alors appelées corps neuro-épithéliaux (NEB). Elles sont situées dans l'épithélium respiratoire nasal, la muqueuse du larynx et dans toute la région respiratoire de la trachée aux voies aériennes terminales. Ces cellules possèdent différentes fonctions physiologiques dont une fonction de chemorécepteur du taux d'oxygène dans l'air respiratoire et une fonction sécrétrice paracrine d'hormones locales de sérotonine ainsi que d'hormones peptidiques (calcitonine, leu-enképhaline, bombésine) (24) agissant sur la musculature lisse des bronches et des vaisseaux pour contrôler l'aération et le débit sanguin. En outre, les corps neuroépithéliaux possèdent une innervation sensible très développée : leur fonction est vraisemblablement semblable à celle des glomus dans l'appareil circulatoire.

1.2.4 L'épithélium respiratoire alvéolaire et le surfactant

1.2.4.1 L'épithélium respiratoire alvéolaire

L'épithélium respiratoire alvéolaire est monostratifié et tapisse les alvéoles pulmonaires qui sont estimées à 150 millions par poumon et sa surface est évaluée à 80 m². Les cellules épithéliales alvéolaires sont pavimenteuses et appelées pneumocytes de type I. Les cellules épithéliales plus volumineuses sont les cellules alvéolaires de type II ou pneumocytes de type II. Les pneumocytes de type I sont des cellules aplaties impliquées dans les échanges gazeux. Les pneumocytes de type II sont des cellules qui prolifèrent afin de re-épithélialiser les surfaces alvéolaires dissociées puis qui sont transformées en pneumocytes de type I (25). Les pneumocytes de type II sont également impliqués dans les mécanismes de défense de l'hôte via la production du surfactant pulmonaire (26).

1.2.4.2 Le surfactant

Le surfactant est un matériel lipoprotéique complexe, comparable à un détergent. Il diminue la tension superficielle du film liquide qui tapisse les cavités alvéolaires ce qui empêche l'affaissement ou collapsus des alvéoles lors de l'expiration. Il renferme douze fois plus de phospholipides que de protéines. Les protéines les plus nombreuses sont des glycoprotéines et les phospholipides les plus importants sont des dérivés de la phosphatidylcholine ou lécithine.

Le pneumocyte de type II n'intervient pas uniquement dans la synthèse et l'excrétion des phospholipides de la partie active du surfactant. Il élabore aussi les glycoprotéines de l'hypophase, peut régénérer l'épithélium alvéolaire en se transformant en pneumocyte de type I et intervient par sa micropinocytose dans les échanges d'eau et d'électrolytes entre l'hypophase et l'interstitium.

Notons que l'hypophase n'est pas produite par les seuls pneumocytes de type II. Une part de ses protéines provient des cellules de Clara et son fluide est un transsudat à partir des vaisseaux. Le surfactant n'est produit qu'au 7^e mois de la vie embryonnaire. Son insuffisance chez les nouveaux nés prématurés est la cause d'une détresse respiratoire connue sous le nom de maladie des membranes hyalines.

1.3. Fonction de défense de l'arbre Trachéo-bronchique

L'arbre trachéo-bronchique constitue un système de défense, assuré par une barrière physico-chimique que constitue l'épithélium de surface et la clairance muco-ciliaire. L'action combinée du mucus et des cils de la muqueuse respiratoire visent à éliminer les particules étrangères. Le mucus capte les particules et permet leur élimination protégeant ainsi la muqueuse contre les irritants ou la dessiccation.

Le mucus est composé à 60%-70% de mucines et de substances insolubles diverses secrétées par les cellules caliciformes et les glandes sous- muqueuses. Il est composé à 30%-40% de protéines, surtout de nombreuses molécules de défense impliquées dans l'immunité (figure 2) possédant des activités antimicrobiennes comme les IgA sécrétoires, la lactoferrine, le lysozyme, la bronchotransferrine, les phospholipases A2, la lactoperoxydase, l'inhibiteur de leucoprotéase sécrétoire (SLPI) et les défensines. Il est également composé d'une couche fluide profonde (la phase sol), composée d'éléments hydrosolubles, formant un milieu aqueux permettant le battement des cils qui propulsent la couche superficielle (la phase gel) vers le pharynx.

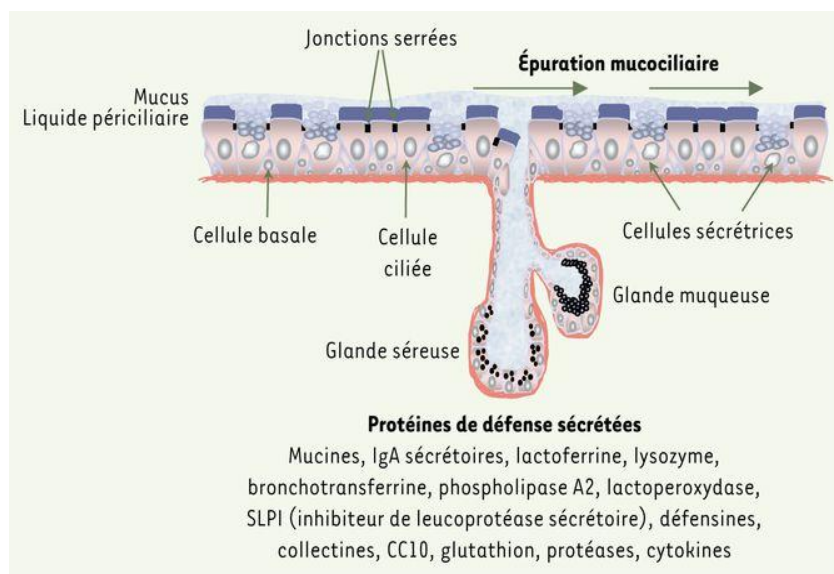


Figure 2 : Système de défense de l'épithélium respiratoire des voies aériennes. (Bals et al., 1999).

I.3.1 La Clairance mucociliaire

Le mucus forme un revêtement continu tapissant toutes les voies de conduction. Il est produit à des quantités entre 15 et 20 ml par jour et présente à l'état normal chez l'adulte une épaisseur variant entre 0.5 et 2 μm . Il provient essentiellement des glandes du chorion et se compose d'une couche visqueuse superficielle, qui capte les particules, appelée phase gel.

Le mucus est un gel dont l'état d'hydratation est conditionné par les mouvements actifs ioniques trans-épithéliaux. On décrit généralement le mucus respiratoire comme un système structuré en deux phases : une phase « sol », très fluide, dans laquelle baignent les cils, et une phase « gel », superficielle, viscoélastique. Cette structure bi-phasique est en fait probablement une simplification. Le mucus présent au niveau de l'épithélium mucociliaire est vraisemblablement formé d'un gradient continu de glycoprotéines en faible concentration à la base des cils et en concentration beaucoup plus forte à leur partie apicale.

Parmi les principaux composants du mucus, figurent les glycoprotéines, ou mucines, de très haut poids moléculaire (de l'ordre de 10^6 Da) très riches en sucres, très complexes, et qui sont formées d'un axe polypeptidique sur lequel viennent se brancher de milliers de chaînes glycaniques.

1.3.1.1 Mucines

Les mucines, qui sont des glycoprotéines filamenteuses de très haute masse moléculaire, porteuses de milliers de chaînes O-glycanniques (figure 3) et capables de former un réseau macromoléculaire par l'établissement de ponts disulfures, sont responsables des propriétés rhéologiques (élasticité, viscosité, filance, adhérence) du mucus. Les travaux de la période 1960-1990 ont permis la caractérisation physicochimique des chaînes glycaniques et du squelette peptidique, à partir de préparations de mucines purifiées d'origine tissulaire provenant d'espèces variées de mammifères. Ces travaux ont montré des constantes structurales : masse moléculaire élevée (pouvant atteindre plusieurs millions de Da, sous forme polymérique), une richesse en chaînes O-glycanniques (60% à 80% du poids sec), une

richesse en proline, thréonine, sérine (20% à 55% de la composition en acides aminés), présence de vastes domaines glycosylés résistant à la protéolyse et, enfin, l'existence de courtes régions « nues » libérées par protéolyse. La communauté des « mucinistes » s'attendait donc à ce que le clonage des gènes d'apomucines (gènes *MUC*) révèle une très vaste famille de gènes. À ce jour, 21 symboles *MUC* existent dans la littérature. Ils ne désigneraient pas tous des mucines.

Les glycoprotéines de type « mucine » ne peuvent pas être classées selon des critères liés à leur chaînes glycaniques. La seule base consensuelle actuelle est celle reposant sur les gènes codant pour les apomucines. Ainsi, la famille des mucines se divise en deux classes : les mucines sécrétées et les mucines membranaires. Les mucines membranaires sont ancrées à la membrane cytoplasmique et se projettent loin à l'extérieur de la cellule. Les mucines sécrétées par les cellules caliciformes de l'épithélium bronchique et les cellules muqueuses des glandes sous-muqueuses forment le constituant macromoléculaire majoritaire du mucus.

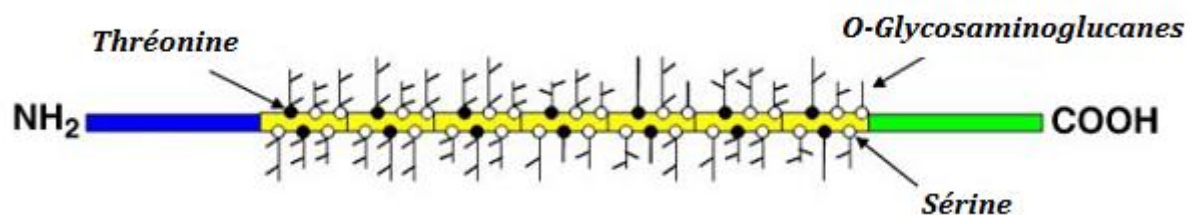


Figure 3 : Structure générale des mucines sécrétées. (D'après Pierre-Régis Burgel).

([http://b2pccr-esi.bcpp.master.univ-paris-diderot.fr/M2/R/diapo_rpw/UE5EpithelR/cours/Burgel Mucosaccharides_2012.pdf](http://b2pccr-esi.bcpp.master.univ-paris-diderot.fr/M2/R/diapo_rpw/UE5EpithelR/cours/Burgel%20Mucosaccharides_2012.pdf)).

1.3.1.2 Les cils

Les cils constituent des extensions cytoplasmiques des cellules épithéliales. Ils baignent dans la couche profonde du mucus (phase sol) et permettent la mise en place d'un système de battements synchrones (1000 coups/min) se faisant rapidement vers le pharynx et plus lentement au retour ce qui permet de pousser le mucus vers le pharynx à une vitesse d'environ 5-20 mm/min.

1.3.2 Activité antimicrobienne

1.3.2.1 Le lysozyme

Le lysozyme humain présent au niveau de l'appareil respiratoire est une enzyme antibactérienne sécrétée en grandes quantités (environ 10 à 20 mg de lysozyme sont sécrétés quotidiennement) essentiellement par les glandes de la sous-muqueuse de la trachée, l'épithélium de surface et les macrophages alvéolaires pulmonaires. Le lysozyme est considéré comme étant un marqueur de cellules séreuses des glandes sous-muqueuses respiratoires. C'est une protéine basique de 15 kDa capable de dégrader les peptidoglycanes des parois bactériennes des bactéries à Gram positif.

1.3.2.2 Le SLPI « Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor »

L'antileucoprotéase, ou SLPI, est une protéine non glycosylée de 12 kDa sécrétée par les cellules épithéliales séreuses (27), ainsi que par les cellules de Clara (28). Elle est constituée de 107 acides aminés avec 8 ponts disulfures formés par 16 résidus cystéine. Elle contient deux domaines avec une activité antibactérienne de transglutaminase en N-terminale et une activité d'inhibition de l'élastase en C-terminale (29). Le SPLI possède également une activité antibactérienne qui est dirigée à la fois contre les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (30) mais aussi une activité potentielle contre le VIH (31). Il est produit par plusieurs types de cellules dont les neutrophiles et les macrophages (32, 33). Sa concentration

physiologique dans la salive est de 0,1 à 10 µg/ml (34). Le SLPI joue également un rôle important dans l'apoptose et la cicatrisation (35).

1.3.2.3 Les défensines

Les défensines font partie de la très grande famille des peptides anti-microbiens. Ce sont des petits peptides contenant de 29 à 35 acides aminés, de masse moléculaire variant de 3,5 à 6 kDa et qui sont largement impliqués dans l'immunité innée du fait de leur activité antimicrobienne qui est probablement due à leur conformation spatiale et à l'exposition des charges positives. Ces peptides sont libérés par les cellules épithéliales et les cellules du système immunitaire et sont attirés par les charges négatives naturellement portées par les constituants lipidiques (les phospholipides) des membranes cellulaires des micro-organismes (36).

En fonction du positionnement des résidus cystéine et de leur combinaison, les défensines sont subdivisées, en α -défensines, β -défensines et θ -défensines, mais seules les α - et β -défensines sont présentes chez l'Homme.

Les α -défensines de type HNP (Human Neutrophil Peptide) sont toutes retrouvées dans les granules azurophiles des neutrophiles, ce qui explique que le recrutement de plusieurs neutrophiles sur le lieu de l'inflammation dans certains tissus résulte d'une concentration élevée en ces dernières. Il a été observé aussi des concentrations élevées de ces HNP dans le lavage broncho-alvéolaire dans les maladies inflammatoires pulmonaires (37).

Les HNP-1 à 3 sont également présentes dans les lymphocytes B, les lymphocytes NK (Natural-killer) et les monocytes. Les α -défensines humaines, HD (Human Defensin) 5 et 6, sont, quant à elles, présentes dans les granules des cellules de Paneth de l'intestin grêle et au niveau des cellules épithéliales du tractus génital de la femme.

La classe	Le nom	La localisation
-----------	--------	-----------------

α -Defensins	HNP1 HNP2 HNP3 HNP4	}	Neutrophiles
	HD5 HD6		Cellules de Paneth
β -Defensins	HBD-1 HBD-2	}	Dans plusieurs cellules épithéliales Voies respiratoires
	HBD-3 HBD-4		Voies gastrointestinales, La cornée, la peau, les reins, etc.

Tableau 1: Les peptides antimicrobiens humains de la famille des défensines.

Les β -défensines ont une taille plus importante que celle des α -défensines (36-42 acides aminés). Elles ont été caractérisées pour la première fois dans une étude (38) qui cherchait à étudier le rôle des peptides antimicrobiens dans l'immunité innée dans les voies aériennes. Aujourd'hui, 4 β -défensines, les β -défensines de 1 à 4, sont caractérisées. Elles sont produites principalement par les cellules épithéliales et quelques cellules myéloïdes (39).

En plus d'être des peptides antimicrobiens, les défensines possèdent également une activité pro-inflammatoire par stimulation du chimiotactisme des cellules dendritiques immatures, des lymphocytes T et des polynucléaires neutrophiles.

1.4 Système de défense immunitaire dans l'épithélium et quelques acteurs importants de l'inflammation

L'épithélium bronchique joue un rôle important dans la défense immunitaire pulmonaire et interagit avec les différents acteurs de la réaction inflammatoire dont les cellules immunitaires.

1.4.1 Les différentes cellules immunitaires

1.4.1.1 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules sanguines appartenant à la lignée leucocytaire. Ils sont produits et stockés dans la moelle osseuse (40). Au cours de leur maturation, les neutrophiles développent plusieurs compartiments intracellulaires comme les granules sécrétoires et les vésicules dans lesquels seront stockées des protéines antimicrobiennes et pro-inflammatoires importantes (41).

Les neutrophiles jouent un rôle crucial dans la défense immunitaire surtout contre les agents pathogènes de type bactérien et fongique en participant activement à la mise en place de la réaction inflammatoire. A ce rôle important dans la défense contre les pathogènes, on associe aux neutrophiles une activation accrue et délétère dans les réactions inflammatoires de type auto-immunes (42).

Au-delà de leur rôle dans la réponse immunitaire et la défense antimicrobienne, les neutrophiles semblent aussi être impliqués dans d'autres processus physiopathologiques, comme le diabète, l'athérosclérose et la formation du thrombus (43). Ceci est lié à leur capacité unique à libérer des «trappes neutrophiliques extracellulaires » ou NET, même en l'absence de stimulation par des agents pathogènes. Dans ces situations, les dommages associés aux NET sont causés par les molécules effectrices qu'ils contiennent ou par l'occlusion de la circulation sanguine causée par l'accumulation des filaments d'ADN.

Les neutrophiles participent à la défense antimicrobienne à la fois en tant qu'acteurs de première ligne de la défense immunitaire innée mais aussi en tant qu'acteurs majeurs dans la réponse adaptative du système immunitaire humain. Chaque jour, le corps humain produit et détruit plusieurs milliards de neutrophiles. Ce nombre particulièrement élevé pourrait s'expliquer par la faible durée de vie du neutrophile qui est d'environ 24 heures (44) avec une apoptose rapide qui survient généralement au cours de la lutte antimicrobienne (45) ce qui a laissé croire, par le passé, que le rôle de ces cellules se limitait simplement à l'élimination des micro-organismes. Cependant, dans les années 1990 et au début des années 2000, plusieurs immunologistes leur ont attribué plusieurs autres fonctions plus importantes et plus complexes, comme leur capacité à produire des cytokines et à réguler la réponse immunitaire et inflammatoire (46). Dans la réaction antimicrobienne, les neutrophiles agissent en augmentant leur propriété phagocytaire ainsi que la production de divers agents toxiques pour les pathogènes comme les espèces réactives de l'oxygène, générées par une importante activité NADPH oxydase.

Le déclenchement de l'apoptose et le processus d'élimination des neutrophiles par les macrophages (47) est un processus important car il est associé à la fin de la réaction inflammatoire (48).

1.4.1.2 Les lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules de l'immunité spécifique humorale et cellulaire. Ils sont produits dans le Thymus et la moelle osseuse. Cependant, on les retrouve essentiellement dans les tissus lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales, et la MALT (*Mucosa associated lymphoid tissue*). Avant de croiser un antigène, ces cellules sont dites « naïves ».

Parmi les lymphocytes, on trouve les lymphocytes T qui sont soit de type auxiliaires ou « helper » (CD4+) ou de type cytotoxiques (CD8+). On retrouve aussi les lymphocytes B qui sont impliqués dans le phénomène de la mémoire de l'immunité acquise et de la sécrétion

d'anticorps. Le troisième type de lymphocytes, est de type « NK » et il a plutôt une action cytotoxique.

Après la reconnaissance de l'antigène et l'activation des lymphocytes T (CD4+), ces derniers prolifèrent et une partie des clones devient des lymphocytes effecteurs ou auxiliaires. Ils recrutent et activent des cellules de l'immunité innée et favorisent l'activation des lymphocytes T (CD8+) cytotoxiques et des lymphocytes B spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes T (CD4+) activés présentent une hétérogénéité fonctionnelle, avec différents profils de sécrétion cytokinique. Les premiers profils de lymphocytes effecteurs auxiliaires (« Thelpers » ou Th) ont été identifiés il y a environ 25 ans. Trois familles sont décrites pour les lymphocytes T en se basant sur le profil de production de cytokines : les lymphocytes de type Th1, Th2 ou encore Th17 (49).

Les lymphocytes de type Th1 sont notamment caractérisés par la production d'IL-2, d'IFN- γ , et de TNF- β . Ce type de réponse immunitaire est spécialisé dans la défense antimicrobienne et antiparasitaire en raison de la capacité de ces cytokines à activer les phagocytes et à promouvoir la production d'anticorps par les Lymphocytes B. Cependant, quand l'organisme est incapable d'éliminer un pathogène, la réponse Th1 devient problématique en entretenant une réaction inflammatoire chronique. Ainsi, ce type de réponse est à l'origine de plusieurs maladies auto-immunes (50).

L'autre forme de réponse immunitaire est de type Th2 avec un profil de production cytokinique caractérisé par une sécrétion majoritaire de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-9, d'IL-10 et d'IL-13. Ils jouent un rôle important dans le déclenchement et le maintien de la cascade inflammatoire allergique. Cette réponse Th2 est une forme de réponse immunitaire de type cellulaire et joue un rôle physiopathologique majeur dans l'asthme. Elle est responsable, entre autres, de l'augmentation de la production d'anticorps de type IgE, du recrutement et de l'activation de plusieurs cellules inflammatoires (mastocytes, basophiles, éosinophiles), de l'hypersécrétion du mucus, de la fibrose sous-épithéliale et du remodelage tissulaire. Les cytokines produites par les lymphocytes de type Th2 induisent la différenciation, l'activation et la survie des éosinophiles *in situ* (par IL-5), la production d'anticorps par les lymphocytes B (par l'IL-4 ou l'IL-13) ainsi que la croissance des mastocytes et des basophiles (par l'IL-4, l'IL-9 et l'IL-10).

Le basculement de la réponse immunitaire vers une réponse immunitaire de type Th2 est responsable du développement des maladies allergiques telles que l'asthme. Les mécanismes sous-jacents à cette orientation Th2 demeurent hypothétiques.

Concernant le rôle des Th17, il est de recruter et d'activer les neutrophiles, directement ou non, ce qui a fait penser que leur fonction principale était celle d'une clairance des pathogènes extracellulaires en période infectieuse ; mais ces cellules jouent aussi un rôle dans la pathogénie de plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires. Ces cellules sont appelées ainsi en raison de leur production principale d'un groupe de cytokines appelées IL-17 A. L'IL-17A est essentiellement produite par les lymphocytes T auxiliaires CD4. Elle agit sur les tissus à travers un récepteur, constitué par les sous-unités IL-17RA et IL-17RC, et induit la sécrétion de chimiokines comme l'interleukine 8, qui permettent le recrutement de neutrophiles.

1.4.1.3 Les macrophages

Les macrophages dérivent des cellules monocytaires indifférenciées. Ces dernières quittent la circulation sanguine et migrent vers les tissus extravasculaires pour se différencier en macrophages de différents types en fonction du tissu cible (51). Dans l'inflammation, les macrophages ont trois grandes fonctions : la phagocytose, la présentation antigénique et l'immunomodulation (52).

Dans l'asthme, ils sont activés par les allergènes qui se fixent sur les récepteurs à faible affinité pour les IgE (FcεRII). L'activation des macrophages aboutit à la production d'un grand nombre de médiateurs de l'inflammation : leucotriènes, radicaux-libres oxygénés, PAF, enzymes protéolytiques, cytokines. Dans les poumons, 90% des macrophages se trouvent dans les alvéoles et on en retrouve beaucoup moins dans l'arbre trachéo-bronchique.

1.4.1.4 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques constituent une population hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Elles doivent leur nom aux nombreux prolongements, identiques aux dendrites des neurones, qui leur donnent leur forme étoilée. Dans l'asthme, elles jouent un rôle important dans l'initiation et le développement du processus immunitaire inné et adaptatif induits par l'allergène.

Les cellules dendritiques sont des cellules de type macrophagiques spécialisées et forment un réseau efficace de cellules présentatrices de l'antigène localisé au niveau de l'épithélium du tractus des voies aériennes (53). Ces cellules s'attaquent aux corps étrangers en les digérant en peptides. Elles peuvent aussi migrer dans les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T et contribuent à la mise en place de la mémoire immunitaire.

Dans les voies aériennes, les cellules dendritiques se situent dans la couche basale de l'épithélium des voies respiratoires où un épithélium à jonction étanche les sépare de la lumière des voies aériennes. Avec cette localisation, les cellules dendritiques possèdent une faible capacité de présentation des peptides antigéniques. Dans le cas d'une barrière épithéliale non fonctionnelle, les cellules dendritiques se trouveront face aux antigènes et donc seront activées.

Le GM-CSF qui est exprimé en abondance par les cellules épithéliales et les macrophages dans les pathologies pulmonaires, conduit à la différenciation et l'activation des cellules dendritiques ce qui aboutit à la production des cellules dendritiques myéloïdes qui permettent la différenciation des lymphocytes T de type Th2 (54).

1.4.1.5 Les mastocytes

Ce sont des cellules granuleuses qui se trouvent essentiellement dans les poumons, les muqueuses et la peau. Ils se caractérisent par la présence dans leurs cytoplasmes de très nombreuses granulations contenant des médiateurs chimiques comme la sérotonine, l'histamine, la tryptase ou l'héparine. Les mastocytes expriment un récepteur de haute affinité (FcεRII) pour la région Fc des IgE. La fixation d'un allergène active un processus biochimique qui conduit à la libération des médiateurs mastocytaires. En effet, la fixation du complexe IgE-allergène sur le récepteur de haute affinité FcεRI active une cascade de phosphorylation intracellulaire par des tyrosines kinases aboutissant au final à l'activation de la phospholipase C. Cette dernière catalyse la synthèse de seconds messagers comme l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) responsables respectivement de la mobilisation intracellulaire de Ca^{2+} et de l'activation de la protéine kinase C (PKC). Ces événements sont indispensables à l'activation de la phospholipase A2 (PLA2), elle-même responsable de la synthèse des médiateurs lipidiques. La fixation du complexe allergène-IgE sur le récepteur FcεRI conduit également à la sécrétion de plusieurs cytokines (55).

Dans l'asthme, le muscle lisse bronchique des malades se caractérise par une augmentation marquée du nombre de mastocytes (56) qui sécrètent des enzymes appelées tryptases. Celles-ci jouent un rôle important dans le remodelage des voies respiratoires et dans l'activation de la prolifération des fibroblastes dans le poumon (57). Ils participent également à la réaction inflammatoire allergique par la production de plusieurs cytokines comme l'IL-4 et le $\text{TNF}\alpha$ qui sont impliquées dans le maintien et le contrôle de la réponse inflammatoire allergique (58).

Afin de contrecarrer les conséquences de la surproduction des IgE et de l'effet de leur fixation sur les mastocytes, l'utilisation des anticorps anti-IgE a permis d'aboutir à un certain bénéfice thérapeutique en réduisant les IgE circulantes à des niveaux indétectables et en inhibant leur surproduction (59). Cependant, ces traitements restent très peu efficaces en clinique surtout dans le cas des patients atteints d'asthme cortico-dépendant (60).

1.4.2 Chimiotokines et cytokines

Les cytokines sont des substances solubles de la signalisation cellulaire produites par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules et/ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Les chimiotokines sont l'ensemble des cytokines de faible poids moléculaire ayant toutes en commun un pouvoir chimiotactique.

On retrouve lors des réactions inflammatoires de l'arbre bronchique des cytokines et des chimiotokines importantes qui permettent de coordonner et d'entretenir l'activation de différentes cellules immunitaires. Certaines de ces cytokines, comme l'IL-6, l'IL-8 et GM-CSF, sont produites par les cellules épithéliales de l'arbre bronchique et voient leurs expressions augmenter dans les maladies inflammatoires respiratoires.

1.4.2.1. Le TNF α

Le gène codant pour le TNF α se situe sur le chromosome humain 6. Il est formé par quatre exons et trois introns. Quatre vingt pour cent de la séquence de la protéine mature est codée par le quatrième exon (61).

Le TNF α est exprimé dans plusieurs types cellulaires, y compris les monocytes et les macrophages. L'expression de ce gène est régulée au niveau transcriptionnel par plusieurs éléments, notamment le facteur nucléaire kappa B (NF κ B) et le facteur nucléaire des cellules T activées (NF-AT). La production du TNF α humain est régulée également au niveau de la traduction par la séquence 3'AU de son ARNm (62).

Le TNF α humain est produit en tant qu'une protéine précurseur de 27-kDa (233 acides aminés). Cette dernière est clivée par protéolyse par une métalloprotéase, l'enzyme de conversion du TNF α (TACE), pour donner ainsi un TNF α soluble (TNF α s) de 17-kDa (157 acides aminés) qui se retrouve sous une forme de trimère (63).

La protéine précurseur porte une séquence de 76 acides aminés hautement conservée qui lui sert d'ancrage à la membrane cytoplasmique. Les extrémités C-terminales des sous-unités se situent à proximité de l'axe central du trimère alors que les extrémités N-terminales restent, elles, relativement libres. Ainsi, le TNF α peut exercer sa fonction soit à distance, sous sa forme soluble, ou directement lors des interactions entre les cellules, sous sa forme membranaire.

Le TNF α , également connu sous le nom de cachectine, est une cytokine pléiotrope produite chez l'homme par de nombreux types cellulaires y compris les macrophages, les astrocytes, les cellules microgliales, les cellules de Langerhans, les cellules de Kupffer, les macrophages alvéolaires (64, 65) et les cellules épithéliales de l'appareil digestif (66) et respiratoire.

Il existe deux récepteurs transmembranaires : TNFRI, connu sous le nom de p55 ou p60, et le récepteur TNFRII, connu également sous le nom de p75 ou p80. TNFRI est exprimé de façon constitutive dans la plupart des tissus des mammifères alors que l'expression de TNFRII est très inductible et généralement exprimée dans les cellules du système immunitaire.

Bien que la liaison du TNF α sur TNFRI soit un mécanisme irréversible, la fixation de TNF α sur TNFRII est rapide, même si ce dernier possède la même affinité pour les deux récepteurs. En réponse à un signal inflammatoire, les deux récepteurs TNFR sont clivés à la surface de la cellule par des métalloprotéases. Les domaines libérés conservent la capacité de lier le TNF α et se présentent ainsi comme des inhibiteurs endogènes de ce dernier (67).

L'enzyme de conversion du TNF α (TACE) joue un double rôle comme activatrice du TNF- α en hydrolysant sa liaison à la membrane, mais aussi en tant qu'inhibitrice en libérant le TNFR-II soluble qui forme un complexe avec le TNF- α .

L'activation du TNFRI est responsable d'un grand nombre de réactions inflammatoires classiquement attribuées au TNF α (tableau 2). Cela a été largement montré par plusieurs expériences utilisant des anticorps dirigés contre les récepteurs du TNF α (68), ou par l'étude de fixation des ligands sur ces mêmes récepteurs (69) ou encore par l'étude des conséquences de l'invalidation de l'expression des gènes codant pour ces derniers (70).

Actions sur les cellules de l'immunité	
<i>Monocytes-Macrophages Polynucléaires neutrophiles</i>	<i>Lymphocytes</i>
Active et auto-induit la production de TNF.	Induit la formation de superoxyde par les lymphocytes B.
Induit la synthèse de cytokines et de prostaglandines.	Augmente la production de superoxyde. Induit l'apoptose des lymphocytes T matures.
Induit le chimiotactisme et la transmigration.	Augmente l'adhérence à la matrice extra-cellulaire. Active la migration des lymphocytes T cytotoxiques.
Stimule le métabolisme.	
Inhibe la différenciation.	
Supprime la prolifération.	
<i>Inflammatoire (Autres)</i>	
Active la cytotoxicité.	
Augmente la fonction NK.	

Tableau 2: Les principaux rôles biologiques du TNF α .

Le TNF α , sous forme de trimère, se lie au domaine extracellulaire du TNFRII ce qui induit la libération de la protéine inhibitrice SODD (*silencer of death domains*) fixée au domaine intracellulaire du TNFRI. Ainsi, vient se fixer sur ce domaine une protéine adaptatrice TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) qui, elle-même, recrute d'autres protéines adaptatrices comme la protéine RIP-1 (*receptor interacting protein-1*) qui est une sérine / thréonine kinase et la protéine TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*) qui est une E3 ubiquitine ligase (71). Ces protéines adaptatrices sont ainsi impliquées dans l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire et dans l'activation de la transcription de

nombreux gènes impliqués dans l'inflammation dont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-18, la sélectine, l'ICAM, la VCAM, l'IFN- γ , le TGF- β , l'iNOS, la COX2 et le gène codant pour le TNF α lui-même.

Alors que le TNFRI est responsable de la plupart des réponses cellulaires aux TNF α y compris sur la croissance cellulaire, la régulation de l'adhérence et la modulation de l'expression d'autres cytokines, l'activation de TNFRII par le TNF α semble, elle, la voie majeure impliquée dans la prolifération des cellules lymphoïdes, dans la cytotoxicité et dans l'activation de NF κ B (72, 73).

Enfin, le TNF α joue un rôle primordial dans de nombreuses pathologies inflammatoires et dans de nombreuses réponses immunitaires. La production de TNF α est stimulée par une grande variété d'agents, essentiellement des facteurs bactériens et des stimuli immunologiques. Il induit le chimiotactisme et l'immunocompétence des neutrophiles au site de l'inflammation.

1.4.2.2 L'interleukine-6

L'interleukine-6 (IL-6) est une protéine composée de 184 acides aminés et de quatre hélices α . Elle a été clonée en 1986 (74) et classée dans une grande famille de cytokines, qui se partagent la même structure à quatre hélices.

Le récepteur de l'IL-6 (connu aussi comme l'IL-6R, gp80 ou CD126) est une glycoprotéine de 80kD, ou gp80. Il permet de lier l'IL-6 avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (75). Le complexe IL-6R et IL-6 s'associe à une autre protéine gp130 avant d'induire sa dimérisation et l'initiation de la signalisation intracellulaire via la voie JAK/STAT 4. Bien que la protéine gp130 soit exprimée dans toutes les cellules, l'IL-6R n'est exprimé que sur quelques types cellulaires. Il est à noter qu'une forme soluble de l'IL-6R (sIL-6R) comprenant la partie extracellulaire du récepteur, peut fixer l'IL-6 avec une affinité similaire à celle d'IL-6R membranaire. Le complexe IL-6 et son récepteur soluble sIL-6R peut se lier à la protéine gp130 sur des cellules n'expriment pas l'IL-6R.

L'IL-6 est produite par divers types cellulaires, tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales et les adipocytes. Sa production est augmentée dans plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes où on lui décrit plusieurs fonctions qui vont de la régulation de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (molécule d'adhésion des cellules vasculaires) et ICAM-1 à l'induction de la production, par de nombreux types cellulaires, de plusieurs chimiokines comme l'IL-8, MCP-1, MCP-3. Ces molécules d'adhésion et ces chimiokines sont nécessaires à la migration des neutrophiles vers les sites de l'inflammation où elles sont impliquées dans l'initiation et le maintien de l'inflammation. (76).

I.4.2.3 L'interleukine 8

L'Interleukine 8 a été purifiée en 1987 à partir du surnageant de culture de neutrophiles stimulés avec des lipopolysaccharides (77). Elle fait partie de la famille des chimiokines et elle est considérée comme la plus chimioattractive pour les PNN dans les poumons.

Le gène de l'IL-8 code pour une protéine précurseur de 99 acides aminés qui subit ensuite l'action des protéases libérant ainsi plusieurs formes de la protéine avec plusieurs tailles différentes dont principalement des protéines matures de 77 et 72 résidus d'acides aminés.

L'IL-8 est produite soit par les cellules leucocytaires dont les monocytes, les lymphocytes T, les neutrophiles, et les cellules NK ou encore par les cellules non leucocytaires somatiques telle que les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules épithéliales. Sa production n'est pas constitutive mais inductible par plusieurs stimulants comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF α et l'IL-1) (78) ou par les bactéries (comme l'*Helicobacter pylori* ou le *Pseudomonas aeruginosa*) (79) ou encore par des virus (l'adénovirus, le virus respiratoire syncytial, le cytomégalovirus, le rhinovirus). Une fois produite, l'IL-8 se lie avec une grande affinité sur deux récepteurs connus, l'IL-8R1 et l'IL-8R2. Ces récepteurs sont composés respectivement de 350 et de 360 acides aminés et de sept domaines transmembranaires et possèdent une forte homologie de séquence en acides aminés, sauf au niveau de la région

N-terminale qui fixe les chimiokines. Après la fixation de l'IL-8, ces récepteurs sont internalisés et puis recyclés rapidement à la surface de la cellule (80).

L'IL-8 est impliquée dans le phénomène d'infiltration leucocytaire au site de l'inflammation. En effet, elle est internalisée par les cellules et présentée sur leurs membranes aux neutrophiles circulants créant ainsi un gradient chimiotactique. Ceci favorise la stimulation et la migration des neutrophiles à travers l'endothélium, l'épithélium pulmonaire et les fibroblastes. Après stimulation, les neutrophiles libèrent alors plusieurs facteurs antimicrobiens tels que la défensine-1, la défensine-2 ou les peptides anti-microbiens CAP37 (81). En plus des neutrophiles, l'IL-8 induit non seulement le chimiotactisme des basophiles et leur adhérence aux cellules endothéliales mais aussi la libération d'histamine et de leucotriènes par ces derniers. L'IL-8 est également impliquée dans le chimiotactisme des lymphocytes B (82) et connue pour avoir une activité angiogénique comme toutes les chimiokines à motif ELR, pour acide glutamique-leucine-Arginine (83).

1.4.2.4 Le GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Le GM-CSF a été nommé ainsi en raison de sa capacité à stimuler la formation de colonies granulocytaires et macrophagiques dans les cultures de cellules de moelle osseuse en milieu semi-solide. On sait maintenant qu'il s'agit en fait d'un facteur multipotent au spectre d'action très large sur les neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages, les progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires et les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes. Le gène du GM-CSF humain s'étend sur 2,5 kbp sur le bras long du chromosome 5 (5q21-q32). Sa séquence nucléotidique permet de prédire une protéine de 144 amino-acides. Le GM-CSF est sécrété sous forme d'une glycoprotéine de 127 acides aminés pour un poids moléculaire apparent d'environ 22 kDa.

In vitro, le GM-CSF stimule la prolifération de tous les progéniteurs myéloïdes ; seul ou en combinaison avec d'autres facteurs, il induit la formation de colonies formées de cellules

issues de plusieurs lignées hématopoïétiques. Le GM-CSF est également capable de stimuler les fonctions effectrices des neutrophiles, des éosinophiles et des monocytes. *In vivo*, il stimule la production des granulocytes et des monocytes. L'administration de GM-CSF induit un accroissement du nombre des neutrophiles circulants, des éosinophiles, des monocytes et de toutes les cellules progénitrices ainsi qu'un accroissement du nombre et de l'état d'activation des macrophages tissulaires. Le GM-CSF provoque une réorganisation du cytosquelette dans les plasmocytes et les tricholeucocytes, induisant une inhibition de la motilité et la perte de l'adhésion à des ligands cellulaires ou de la matrice. Toutes ces activités biologiques impliquent la liaison du GM-CSF à un récepteur spécifique exprimé à la surface des cellules cibles.

Le GM-CSF est produit également par les cellules épithéliales des voies aériennes, les cellules du muscle lisse et les fibroblastes. L'administration d'anticorps anti-GM-CSF à des souris utilisées comme modèle pour la BPCO ou l'asthme a permis d'atténuer la réponse inflammatoire et l'activité neutrophilique et eosinophilique. Chez l'homme, le dosage de cette cytokine dans le lavage brachio-alvéolaire des personnes asthmatiques montre une augmentation importante de son expression. (84).

Le récepteur du GM-CSF est un récepteur de type I, constitué de deux types de chaînes : une chaîne alpha (GM-CSFR α) et une chaîne bêta (bc), cette dernière étant partagée avec les récepteurs de l'interleukine 3 (IL-3) et de l'IL-5.

1.4.3 Les amines biogènes : L'histamine

Les amines biogènes sont issues de la réaction de décarboxylation par des enzymes bactériennes et tissulaires des acides aminés. En raison de leur formation, la structure des amines biogènes est étroitement liée à celle des acides aminés. C'est pourquoi quelques

amines portent le nom de leur acide aminé d'origine. Ainsi par exemple, l'histamine provient de l'acide aminé histidine et la tyramine de la tyrosine. Les amines biogènes se définissent comme des molécules biologiquement actives sur le système nerveux central et sur le système vasculaire. Sept d'entre elles ont beaucoup été étudiées (amines aliphatiques : putrescine, cadavérine, spermidine, spermine ; amines aromatiques : histamine, tryptamine, tyramine).

L'histamine ou 2-(4-imidazolyl)-éthylamine est une monoamine biogène découverte en 1910 par Akerman. C'est un neuromédiateur largement impliqué dans les phénomènes inflammatoires et allergiques. Elle est synthétisée par décarboxylation de l'histidine par une histidine décarboxylase. Elle est stockée principalement dans les cellules immunitaires, les mastocytes, qui la libèrent lorsqu'ils sont stimulés par la présence d'une molécule étrangère comme un allergène. Les organes riches en histamine sont les poumons, le foie, la peau et la paroi gastrique.

La synthèse de l'histamine est catalysée par plusieurs enzymes du cytosol. Elle est alors chargée dans des vésicules de la cellule. Elle est relarguée ensuite par exocytose. Les signaux déclencheurs peuvent être de nature très différente suivant le type cellulaire. L'histamine libérée va pouvoir agir sur des cellules cibles qui portent des récepteurs histaminergiques. Quatre sous-types de récepteurs de l'histamine sont connus, ce sont les récepteurs H1, H2, H3 et H4. C'est par l'intermédiaire des récepteurs H1 que l'histamine intervient dans la réaction inflammatoire. Ce récepteur se trouve notamment sur la membrane des lymphocytes T, des polynucléaires, des basophiles et des mastocytes. Dans les voies aériennes, la plupart des cellules expriment au moins un sous-type de récepteur à l'histamine (Figure 4).

L'histamine participe aux phénomènes de vasodilatation, d'augmentation de la perméabilité capillaire, d'œdème, de prurit et de production d'eicosanoïdes. Elle régule aussi la balance Th1/Th2 en induisant la production de plusieurs cytokines pro- inflammatoires et de plusieurs médiateurs inflammatoires non seulement par les cellules immunitaires (notamment les basophiles) mais aussi par les cellules épithéliales pulmonaires (85), les cellules endothéliales artérielles (86) et les kératinocytes (87).

L'utilisation de corticoïdes, comme la dexaméthasone, cible entre autres, l'action intracellulaire de l'histamine voire sa propre biosynthèse. Ceci a été montré par plusieurs

études chez la souris, notamment sur des cultures cellulaires issues de la rate (88) ou des lymphocytes T (89). Il a été montré aussi que ces corticoïdes agissent en partie en régulant l'expression des récepteurs à l'histamine (90, 91).

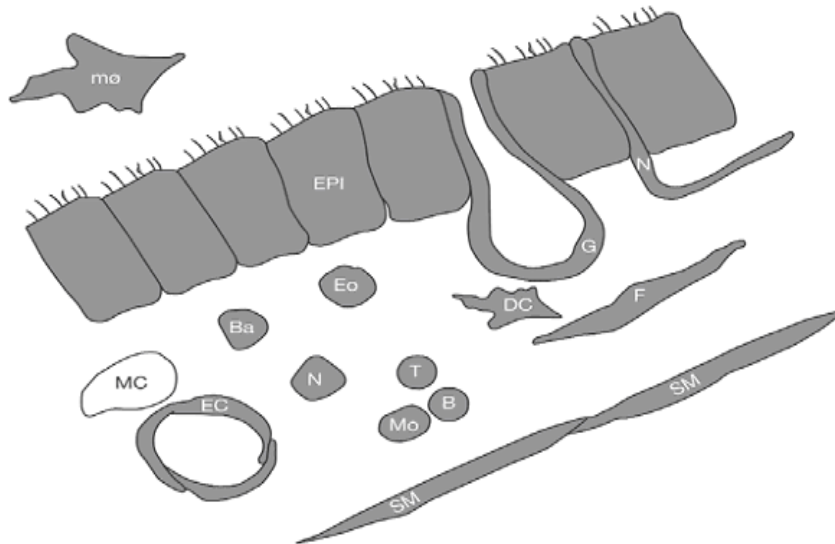


Figure 4 : Représentation de la distribution des récepteurs à l'histamine dans la muqueuse respiratoire. (MacGlashan et al., 2003). La couleur grise signifie la présence des récepteurs à l'histamine. Mø : Macrophages. EPI : Cellules épithéliales. MC : Mastocytes. EC : Cellules endothéliales. Ba : Basophiles. Eo : Eosinophiles. N : Neutrophiles. Mo : Monocytes. T : Lymphocytes T. B : Lymphocytes B. DC : Cellules dendritiques. F : Fibroblastes. SM : Cellules musculaires lisses. G : Cellules glandulaires. N : Cellules nerveuses.

1.4.4 Les phospholipases

1.4.4.1 Généralités sur les phospholipases

Les phospholipases sont des enzymes responsables de l'hydrolyse des phospholipides (figure 5). Elles se divisent en deux grandes familles : les acylhydrolases et les phosphodiesterases. Les enzymes appartenant à chaque famille sont classées en fonction du site de leur clivage sur les phospholipides cibles. Ainsi, dans la famille des acyl hydrolases on trouve : la phospholipase A1 (PLA1), la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase B (PLB) et la lysophospholipase A1/2 (ou LysoPLA1/2). Dans la famille des phosphodiesterases, on retrouve les phospholipases C et D. La réaction spécifique de chaque enzyme dépend de la nature de l'alcool fixé au phosphate (choline, sérine, inositol, etc) et de la position de la liaison à hydrolyser sur la molécule de phospholipide.

Les phospholipases sont ubiquitaires. Elles sont exprimées dans presque tous les types cellulaires. Elles peuvent être sous forme sécrétée, membranaire ou cytoplasmique. Leurs fonctions sont aussi variées que le sont leurs localisations ou leurs propriétés. Elles sont essentielles pour la membrane cytoplasmique et son remodelage. Elles sont importantes aussi dans la synthèse des médiateurs lipidiques impliqués dans la transduction du signal.

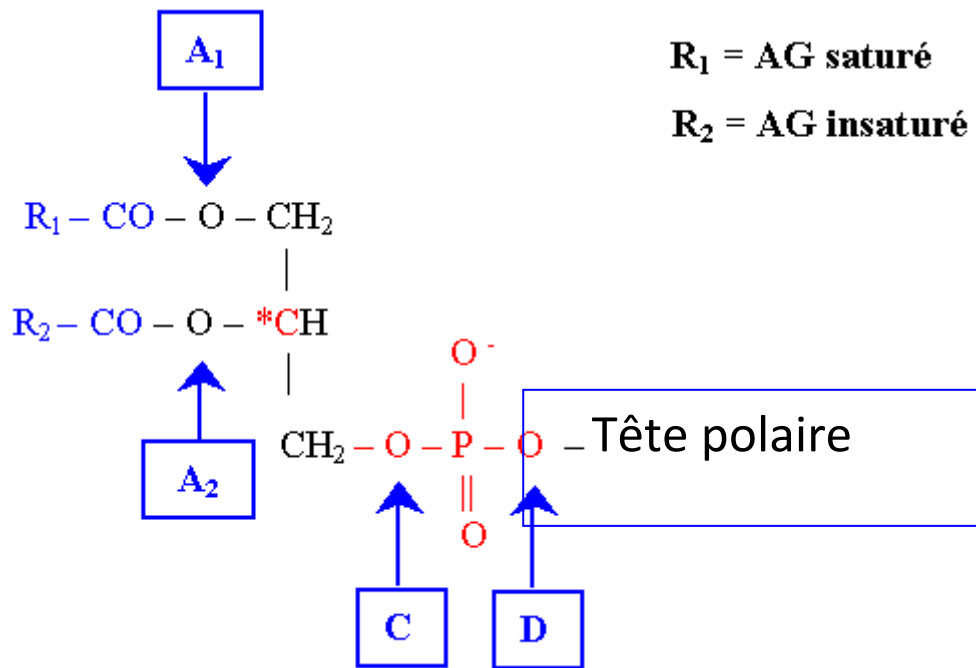


Figure 5: Mode d'action des phospholipases A, C et D. En rouge, le carbone asymétrique (*C) et le groupement phosphate qui fixe la tête polaire des phospholipides. La phospholipase B (non représentée) cumule les activités enzymatiques d'une phospholipase A1 et d'une phospholipase A2.

1.4.4.2 La phospholipase A

Elle existe sous deux formes : la PLA1 et la PLA2. La phospholipase A1 libère l'acide gras qui est en position C1 du phospholipide. La phospholipase A2 hydrolyse la liaison en C2 du phospholipide. L'acide gras libéré est le plus souvent de l'acide arachidonique, précurseur des eicosanoïdes.

La classification des PLA2 est très compliquée et est basée selon les auteurs sur leur localisation cellulaire (intracellulaire, lysosomale ou sécrétée) ou en fonction de leurs homologues structuraux (mécanisme catalytique, spécificité enzymatique, dépendance de l'activité PLA2 au calcium, ponts disulfures, etc).

La famille des phospholipases A2 comprend notamment la phospholipase A2 sécrétée, la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2, groupe IVA, B, C, D, E, F), la PLA2 intracellulaire (iPLA2, groupe VIA, B, C, E, F), qui est indépendante du Ca^{2+} et la PLA2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2), également connue sous le nom de PAF-acétylhydrolase (Platelet-Activating Factor Acétylhydrolases, PAF-AH, groupe VIII).

1.4.4.3 La phospholipase A2 cytosolique (cPLA2)

La cPLA2 (figure 6) est une protéine ubiquitaire qui est constitutivement exprimée dans plusieurs organes dont les reins, les poumons et le cœur. Elle est également retrouvée dans les cellules immunitaires comme les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les macrophages. Elle a une préférence de substrat pour les phospholipides estérifiées en sn-2 avec de l'acide arachidonique.

Après stimulation, la cPLA2 est régulée simultanément par la phosphorylation et par la fixation du calcium sur le domaine C2. Ceci est important pour la liaison de la cPLA2 à la membrane et sur les vésicules phospholipidiques (92). Cependant, la régulation de l'activité de la cPLA2 par le calcium semble être plus importante que celle par la phosphorylation seule (93) car la fixation du calcium permet de stabiliser la liaison des phospholipases aux membranes cytoplasmiques et il est responsable de la translocation de la cPLA2 du cytosol vers la membrane du réticulum endoplasmique ou vers l'enveloppe nucléaire.

La cPLA2 a une très forte sélectivité pour les phospholipides contenant l'acide arachidonique grâce à sa localisation cytosolique, qui la met au contact direct des mêmes phospholipides, concentrés dans le feuillet interne de la membrane. Son activité peut être augmentée par des cytokines inflammatoires, dont l'effet est contrecarré par les glucocorticoïdes. Cela suggère donc un rôle important de la cPLA2 dans la production de médiateurs lipidiques au cours des phénomènes inflammatoires.

I.4.4.4 La Phospholipase A2 sécrétée

Le groupe des PLA2 sécrétées comprend dix isoformes différentes (sPLA2-IB, -IIA, -IIC, -IID, -IIE, -IIF, -III, -V, -X et XII) dont la majorité est surexprimée en présence de molécules pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β et le lipopolysaccharide bactérien. Les sPLA2 partagent certaines caractéristiques communes comme un faible poids moléculaire, la présence d'au moins cinq ponts disulfures qui les rend particulièrement stables, et le besoin en calcium pour induire leur activité (94, 95). Ceci permet leur sécrétion par une voie cellulaire classique mais qui ne s'accompagne d'aucune glycosylation. Sur le plan enzymatique, elles fonctionnent avec une « pseudo » triade catalytique, dans laquelle la sérine est remplacée par une molécule d'eau. L'état de transition est stabilisé par un ion Ca²⁺, qui participe donc directement au fonctionnement du site actif et qui est requis à une concentration de l'ordre du millimolaire. Le résidu d'histidine du site actif est particulièrement réactif à la dibromo-acétophénone (*bromophenacyl bromide* ou BPB), qui a de ce fait été largement utilisée comme « inhibiteur spécifique » de la sPLA2.

La sPLA2 est parfois synthétisée de manière constitutive (cas des plaquettes ou de la prostate, qui la sécrète dans le plasma séminal), mais le plus souvent en réponse à des cytokines inflammatoires, dont les plus puissantes semblent être l'IL-1 et le TNF α .

La découverte, récemment, d'une autre voie alternative impliquant la sPLA2 qui consiste à la fixation de celle-ci sur des récepteurs membranaires, a permis de mettre en évidence plusieurs autres fonctions physiologiques de cette enzyme. Ces récepteurs ont été identifiés au niveau de plusieurs organes dont les poumons, le foie, le cœur et les reins (96, 97, 98).

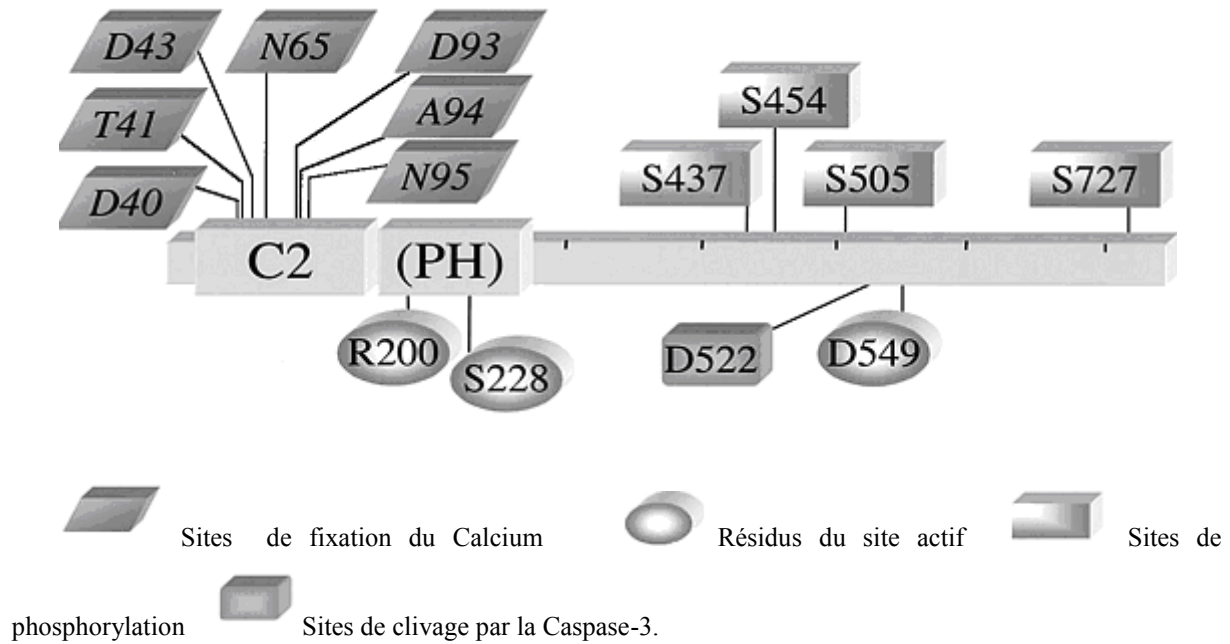


Figure 6: Représentation des différents domaines et résidus impliqués dans la régulation de l'activité enzymatique de la cPLA2.

1.4.4.5 La phospholipase A2 calcium indépendante (iPLA2)

L'iPLA2 est une protéine de 85 - 88 kDa. Elle présente une activité lysophospholipase en plus d'une activité phospholipase A2. Comme toutes les PLA2, elle hydrolyse les phospholipides sur la position sn-2 du glycérol en libérant un acide gras et un lysophospholipide. Ce sont des enzymes qui ne nécessitent pas de calcium pour leur activité. L'isoforme iPLA2 β est exprimée de manière ubiquitaire dans le cytosol de plusieurs cellules et est principalement impliquée dans l'homéostasie des membranes cellulaires (99). De plus, l'iPLA2 β semble également jouer un rôle dans la prolifération cellulaire (100).

1.4.4.6 La phospholipase C

Comme la phospholipase A2, la phospholipase C (PLC) joue un rôle important dans la génération des seconds messagers cellulaires. L'effet induit par la stimulation avec certains neurotransmetteurs, des hormones ou des facteurs de croissance passe par l'activation de la phospholipase C (PLC), ce qui conduit à l'activation des voies de signalisation lipidiques.

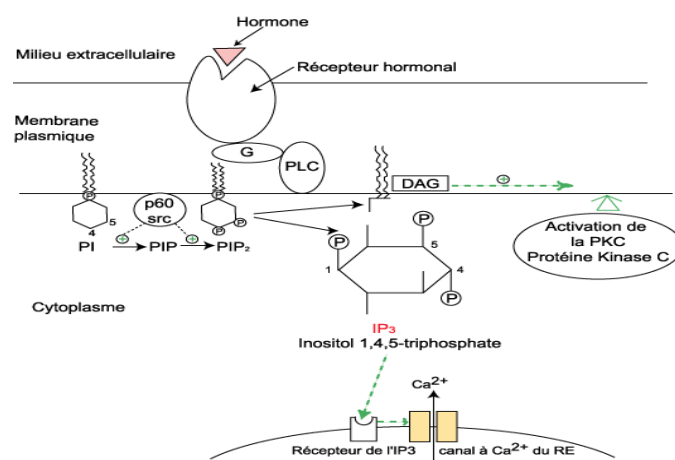


Figure 7: Mode d'action de la phospholipase C (d'après Lefranc 2001).

Classiquement, la PLC catalyse la réaction de conversion du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en Inositol-1, 4,5-P₃ (IP3), un second messenger connu, entre autre, comme régulateur du flux calcique intracellulaire, et en diacylglycerol, un autre second messenger important impliqué dans plusieurs voies de signalisation dont celles qui passent par l'activation de la PKC (figure7). En effet, l'IP3 hydrosoluble diffuse dans le cytosol et se lie à un récepteur spécifique, ce qui induit l'ouverture des canaux calciques et à l'efflux de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique vers le cytosol. En présence d'ions Ca²⁺, la PKC (Protéine Kinase C) cytosolique habituellement soluble et inactive, s'attache au feuillet interne de la membrane

plasmique où elle est activée par le 1,2-diacylglycérol. Cette réaction conduit aussi à la modulation de l'activité de plusieurs protéines contenant un domaine de liaison pour le phosphoinositide et pour qui le PIP2 joue le rôle de régulateur allostérique (101).

Cinq familles de PLC ont été identifiées : α , β , γ , δ et ε (tableau3). Elles diffèrent entre elles par leur organisation structurale et par la nature des récepteurs membranaires qui conduit à leur activation. En effet, les phospholipases C présentent, outre leurs domaines catalytiques, des domaines de liaison du calcium (domaine EF et le domaine C2), des domaines d'interactions protéine-protéine SH2 et SH3 et des domaines d'interaction protéine-membrane PH.

PLC	Structure
β	PH-EF-PLC-C2
γ	PH-EF-SH2-SH2-SH3-PH-PLC-C2
δ	PH-EF-PLC-C2
ε	PH-EF-PLC-C2-RA-RA

Tableau 3: Structure des différents isoformes de la PLC.

EF: Domaine hélice-tour-hélice, PH: Domaine d'homologie à la Pleckstrine

1.4.4.7 La phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC)

La phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC) a été retrouvée dans plusieurs organismes vivants, allant de la bactérie à l'homme. Dans les cellules des mammifères, l'enzyme a été trouvée dans les érythrocytes, les lymphocytes, le tissu musculaire, le tissu

adipeux et le système nerveux. Elle catalyse l'hydrolyse des liaisons ester entre le glycérol et le phosphate sur la molécule du phosphatidylcholine, le phospholipide le plus abondant dans les cellules eucaryotes, générant ainsi de la phosphocholine et du diacylglycérol (DAG). Ces derniers font partie des plus importants messagers secondaires intracellulaires (figure8).

La phosphatidylcholine, substrat de la PC-PLC, est plus connue sous le nom de lécithine. En tant que phospholipide, elle participe à la structure membranaire des cellules et sert à préserver leur viscoélasticité. Constituant essentiel des membranes des hépatocytes, la phosphatidylcholine aide à maintenir les capacités de résistance et de régénération du foie, nécessaire au processus de détoxification. Elle est un composant essentiel du système nerveux et constitue près de 30 % du poids sec du cerveau et 15 % des nerfs. La phosphatidylcholine agit en collaboration avec la vitamine B12 et l'acide folique dans la prévention des maladies cardiovasculaires en régulant le taux d'homocystéine dans le sang. L'organisme synthétise une faible partie de ses besoins en phosphatidylcholine. L'apport alimentaire est indispensable, à partir d'aliments particulièrement riches en phospholipides ou sous forme de compléments alimentaires.

L'expression et l'activité de la PC-PLC se trouvent dans le cytoplasme, la membrane plasmique et le noyau (102). Certaines équipes décrivent qu'après stimulation, notamment avec les lipopolysaccharides, la PC-PLC migre vers l'espace périnucléaire ou son activité est augmentée (103, 104). Le D609 (tricyclodecan-9-ylxanthogenate), un inhibiteur spécifique de la PC-PLC, permet d'abroger complètement cette translocation et d'inhiber son activité (103).

La séquence génétique de la PC-PLC n'est toujours pas déterminée ce qui rend difficile son étude. Cependant, la disponibilité de son inhibiteur spécifique, le D609, permet de mettre en place des stratégies d'étude de sa fonction en culture cellulaire (105). Il est à noter également que le D609 est un inhibiteur de la PC-PLD, mais à des concentrations de 35-50 mg/mL dans les cellules de fibroblastes (NIH 3T3 fibroblasts) (106) et inhiberait la PC-PLC à de beaucoup plus faibles concentrations (106).

Depuis les années 1990, on décrit une implication de la PC-PLC dans plusieurs processus cellulaires dont, entre autres, la prolifération, la différenciation des cellules neuronales et endothéliales (107), l'apoptose et la signalisation cellulaire où elle est impliquée dans l'activation des facteurs de transcription et l'expression de certains gènes dans les fibroblastes (108). La PC-PLC intervient aussi dans la différenciation et dans l'activation des cellules du système immunitaire (109).



Figure 8 : Mécanisme d'action de la PC-PLC.

1.4.4.8 La phospholipase D (PLD)

L'activité PLD a été décrite pour la première fois en 1947 par Hanahan et Chaikoff dans les carottes (110, 111). Il a fallu attendre 1975 et les travaux de Saito and Kanfer pour caractériser une activité la phospholipase D humaine. La PLD possède la spécificité d'hydrolyser la PC mais aussi la phosphatidyléthanolamine (PE).

Chez les mammifères on trouve deux isoformes de PLD (PLD1 et PLD2). La PLD1 a une activité constitutive faible qui augmente nettement suite à un stimulus externe. Elle se trouve principalement sur les membranes intracellulaires de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique ou des endosomes mais aussi sur la membrane cytoplasmique. La PLD2, quant à elle, possède une activité basale élevée avec une localisation membranaire.

La séquence de l'enzyme contient des motifs responsables de sa localisation membranaire et de son activité catalytique. L'activité de la PLD1 augmente après stimulation de deux protéines : la protéine tyrosine kinase liée aux récepteurs (PTKRs) et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). L'activation de la PLD1 semble dépendre de l'activation préalable d'autres voies de signalisation telles que la voie diacylglycérol (DAG) / protéine kinase C (PKC) ou la voie phosphoinositol-3-kinase (PI3K).

La phospholipase D catalyse la réaction suivante :



L'acide phosphatidique générée est hydrolysé à son tour par la phosphatidate-phosphatase :



L'activité de la PLD intervient dans plusieurs processus cellulaires comme dans la réaction hormonale, le trafic membranaire, la prolifération cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la différenciation et la reproduction. (112, 113, 114).

L'acide phosphatidique générée par la réaction catalysée par la PLD agit comme activateur de la PI3K ou comme partenaire lipidique de plusieurs protéines dans la voie de signalisation et de transduction du signal. Il peut stimuler l'activité de plusieurs enzymes comme mTOR (Target of rapamycin) ou la sphingosine kinase. Il joue aussi un rôle important dans la phagocytose et il est aussi un intermédiaire dans la voie de synthèse du DAG ou du LPA.

1.4.5 Cyclooxygénases et médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques constituent un groupe complexe de molécules synthétisées à partir du métabolisme des phospholipides membranaires et principalement issus du métabolisme de l'acide arachidonique. Il est connu que la PLA2 de type IV est la principale responsable de la libération de cet acide gras précurseur des eicosanoïdes. On distingue deux types d'eicosanoïdes : Les leucotriènes et les prostaglandines, parmi lesquelles on compte les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les prostacyclines (PGI). Les eicosanoïdes sont synthétisés principalement par deux voies enzymatiques : la voie cyclooxygénase (COX) et la voie lipoxygénase (figure 9).

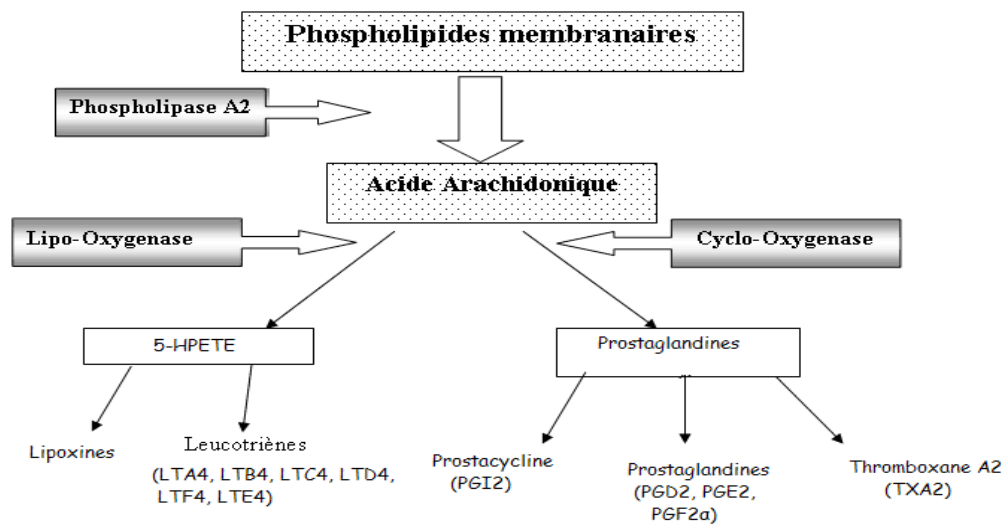


Figure 9: Synthèse des leucotriènes, des prostaglandines et des thromboxanes à partir des phospholipides membranaires.

La voie de la lipoxygénase assure la synthèse de leucotriènes (LTB4, LTC4, LTD4 et LTE4) et de lipoxines (LXA4 et LXB4) *via* le métabolisme de l'AA par l'enzyme 5-lipoxygénase.

La voie de la cyclooxygénase implique la participation de deux enzymes, COX-1 et COX-2. COX-1 est exprimée de manière constitutive dans la majorité des tissus de l'organisme et

assure de nombreuses fonctions physiologiques : agrégation plaquettaire, protection de la muqueuse gastroduodénale, régulation du flux sanguin rénal. A l'inverse, COX-2 est dite inductible, elle est localisée au niveau de la membrane nucléaire et elle est surexprimée en réponse à divers stress cellulaires et stimuli inflammatoires (ex : LPS, IL-1 β , TNF- α) (115) et elle est associée à de nombreux processus pathologiques (cancer, inflammation chronique, douleur, etc.). L'activation de ces deux enzymes est à l'origine de la synthèse des prostaglandines (PGD₂, PGE₂ et PGF₂ α), de la prostacycline (PGI₂) et du thromboxane A₂ (TXA₂).

Les prostaglandines ont un champ d'action important, dépendant du type de prostaglandines impliquées (PGD₂, PGE₂ ou PGF₂ α) et de leur concentration. De manière générale, les prostaglandines sont responsables de la fièvre, de la douleur, de la vasodilatation et du recrutement leucocytaire associé au processus inflammatoire.

Les leucotriènes (LTC₄, D₄ et E₄) sont impliqués dans la bronchoconstriction, la vasoconstriction et l'hyperméabilité vasculaire. Le LTB₄, quant à lui, joue un rôle essentiel dans le déroulement de la réaction inflammatoire puisqu'il est une puissante molécule chimiotactique pour les polynucléaires (116), les éosinophiles (117) et pour les lymphocytes T (118). De plus, il stimule aussi l'adhésion des polynucléaires aux cellules endothéliales, leur dégranulation et la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages.

Les thromboxanes sont, quant à eux, des vasoconstricteurs et des hypertenseurs puissants. Ils activent l'agrégation plaquettaire et favorisent la coagulation sanguine et la formation du thrombus. Ils sont en équilibre homéostatique dans l'appareil circulatoire avec les prostacyclines.

L'autre molécule libérée par la PLA₂ dans son action d'hydrolyse des phospholipides membranaires est le lysophospholipide, plus spécifiquement le lyso-PAF, qui est également essentiel à la synthèse d'un autre médiateur inflammatoire puissant, le facteur d'activation plaquettaire (PAF). Ce dernier provoque l'agrégation plaquettaire, est un vasodilatateur puissant, susceptible d'entraîner des hypotensions artérielles importantes. Il augmente la perméabilité vasculaire, l'œdème et le chimiotactisme cellulaire.

1.5 Maladies inflammatoires du poumon

1.5.1 Mucoviscidose : Généralités et physiopathologie de la maladie

La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique létale la plus répandue dans la population caucasienne. Elle se caractérise par des mutations du gène codant pour la protéine CFTR (pour Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), sur le chromosome 7. Elle se transmet suivant un mode récessif avec une incidence d'environ 1 nouveau-né sur 2500 dans l'ouest de l'Europe et aux Etats-Unis. On estime à plus de 500 000 personnes atteintes par cette maladie à travers le monde.

L'espérance de vie des patients atteints ne cesse de croître grâce à de nouvelles thérapies, à la prise en charge précoce, notamment l'utilisation régulière et précoce de kinésithérapie et à la mise en place de centres spécialisés. Sur la base de données statistiques, l'espérance de vie des enfants nés à partir de 1990 est estimée à 40 ans, alors qu'en 1970, 50 % des patients ne dépassaient pas l'âge de 14 ans.

Cette pathologie est caractérisée par une inflammation chronique et une surinfection bronchopulmonaire avec une colonisation bactérienne par des microorganismes particuliers comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. L'infection et l'inflammation conduisent progressivement à une bronchiectasie, une destruction pulmonaire et une insuffisance respiratoire.

Les symptômes pulmonaires déterminent la gravité de la maladie où une hypersécrétion d'un mucus épais et visqueux est à l'origine de l'obstruction des voies aériennes et ceci est accompagné par une hyperplasie des glandes sous muqueuses, une grande infiltration de la muqueuse par des polynucléaires neutrophiles et une infection persistante. Cette infection bactérienne persistante n'est pas observée dans d'autres maladies pulmonaires caractérisées par une hypersécrétion du mucus, comme l'asthme ou la BPCO.

L'atteinte pulmonaire est généralement plus marquée par rapport à l'atteinte d'autres organes (119) et constitue la cause principale de mortalité de cette maladie. Bien qu'au

moment de la naissance, on n'observe pas d'anomalie particulière dans le poumon alors que les lésions pancréatiques et les anomalies du mucus intestinal sont fréquemment présentes dès la phase fœtale et rapidement après la naissance, les manifestations de l'atteinte pulmonaire vont être déclenchées et amplifiées en associant un processus inflammatoire et un processus infectieux qui vont s'auto-entretenir progressivement altérant les capacités de défense de l'organisme contre l'infection à *Pseudomonas*.

D'une part, on observe une inflammation chronique qui contribue à l'altération des tissus pulmonaires et au pronostic vital avec des mécanismes qui sont encore complexes (120, 121, 122). D'autre part, on a une clairance mucociliaire altérée à cause de l'absence de transport des ions chlore par le canal CFTR et d'une internalisation importante de sel et d'eau par le canal ENac. Le mucus est alors déshydraté, épais et visqueux ce qui favorise la colonisation par des pathogènes spécifiques comme *Staphylococcus Aureus* (SA) ou *Pseudomonas Aeruginosa* (Pa).

La multiplication bactérienne augmente et échappe au système de défense innée dont les peptides anti microbiens, le surfactant et les défensines. Les défensines, par exemple, qui ont une activité sodium-dépendante, sont inactivées en absence de CFTR fonctionnelle. Les mucines, nécessaires pour la clairance des pathogènes, sont également en défaut ce qui permet aux bactéries, et principalement leurs produits de dégradation, d'interagir directement avec les cellules épithéliales bronchiques et induire le recrutement des cellules phagocytaires, favorisant ainsi la chronicité du processus inflammatoire (123,124, 125, 126, 127). Suite à l'infection, on observe une inflammation bronchique caractérisée par une hyperglobulinémie et un afflux démesuré de polynucléaires neutrophiles (PNN) avec une libération importante de cytokines proinflammatoires dont l'interleukine-8 (IL-8), l'IL-6 et l'IL-1 (figure 10). La présence de l'IL-8, par exemple, aux propriétés chémoattractantes, entraîne une accumulation de PNN dans les voies aériennes. Ces derniers libèrent alors des protéases qui exerceront leurs actions sur les bactéries mais attaqueront également l'épithélium bronchique.

En conclusion, la physiopathologie de l'inflammation dans la mucoviscidose est complexe avec une interaction et une potentialisation infinies des différents mécanismes responsables.

Cette spirale inflammatoire perpétuelle est une cible thérapeutique primordiale car elle est un facteur pronostique majeur.

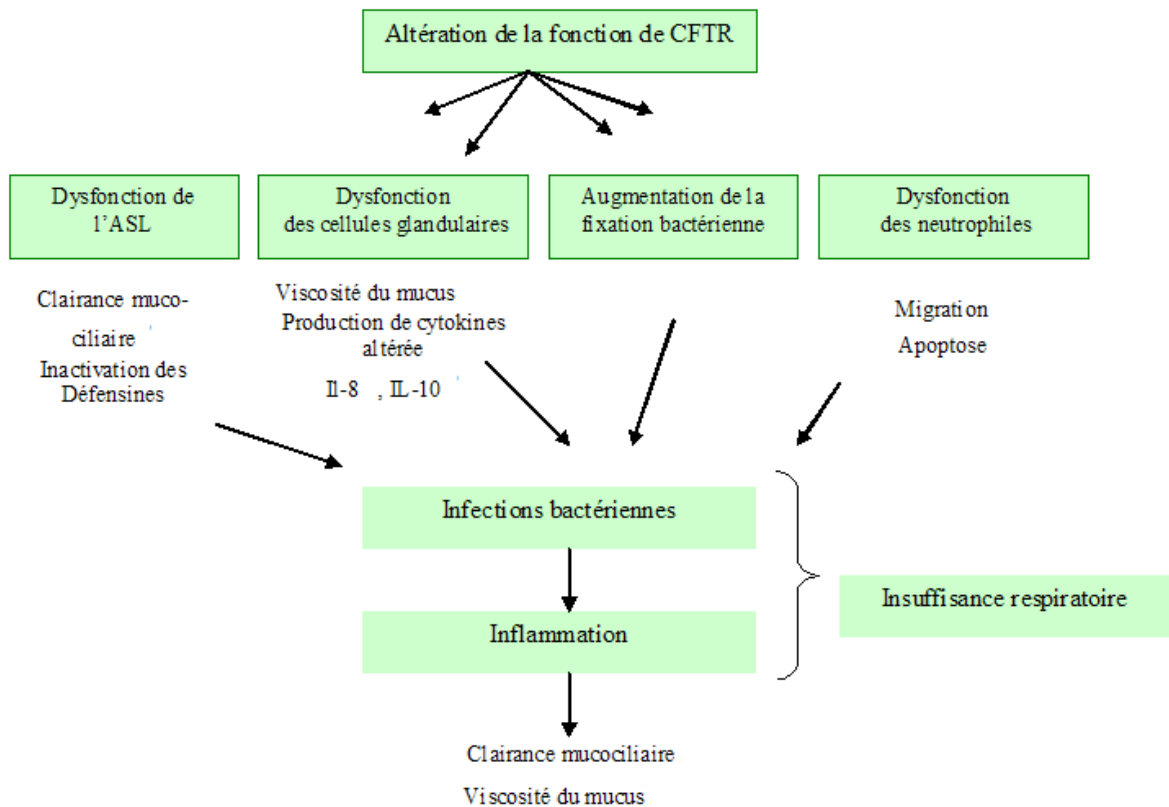


Figure 10 : Figure représentative des conséquences du défaut d'expression de CFTR et le rôle des neutrophiles dans le développement de la mucoviscidose. L'altération de la fonction de CFTR est associée à la mise en place d'un cercle vicieux : inflammation/infection. ASL : liquide de surface.

Quelques autres atteintes touchant d'autres organes que les poumons :

- Les atteintes du système gastro-intestinal :

Certains problèmes gastro-intestinaux chez les patients atteints de mucoviscidose sont dus à l'incapacité du pancréas à faire parvenir les enzymes digestives à l'intestin suite à la sécrétion d'un mucus épais par le pancréas qui va obstruer les canaux pancréatiques et diminuer ainsi la quantité d'enzymes sécrétées. Le déficit de sécrétion est global, atteignant toutes les enzymes mais également les sécrétions d'eau et d'électrolytes, notamment de bicarbonates. Cette incapacité pancréatique est responsable d'une malabsorption des protéines et influence l'absorption des vitamines liposolubles A, D, E et K qui sont prescrits en compléments alimentaires avec des suppléments en enzymes pancréatiques.

Au niveau intestinal, les sécrétions et le mucus sont aussi épais et visqueux et la perméabilité est modifiée surtout en ce qui concerne les acides gras essentiels.

- Les atteintes du système endocrinien :

Environ 13% des patients mucoviscidosiques présentent un diabète qui est le plus souvent diagnostiqué après l'âge de 30 ans. Cette complication est corrélée à une carence en insuline et une obstruction du canal pancréatique. Les patients ont besoin d'une alimentation riche en énergie.

Le métabolisme du glucose est influencé par de nombreuses anomalies spécifiques à la mucoviscidose tels que la déshydratation sévère, la prescription de corticostéroïdes, la malabsorption, les infections fréquentes, l'augmentation de la dépense énergétique, le ralentissement du transit gastro-intestinal et le dysfonctionnement du foie (128).

- Les atteintes des glandes sudoripares :

En raison du défaut d'expression de la protéine CFTR qui régule la teneur de la sueur en sel, les patients atteints de mucoviscidose peuvent avoir une perte excessive de sel et une déshydratation intense par de forte chaleur.

- Les atteintes du système reproducteur :

La plupart des hommes atteints de mucoviscidose sont stériles parce qu'ils n'ont pas de canal déférent ou que celui-ci est mal formé. Chez la femme, la morphologie de l'appareil génital est normale mais la fertilité est néanmoins diminuée en raison de modifications de la glaire cervicale qui est très épaisse et laisse difficilement passer les spermatozoïdes. La puberté est retardée dans les deux sexes.

1.5.1.1. Le gène CFTR

Le gène *cfr* responsable de la maladie de la mucoviscidose a été identifié en 1989 par l'équipe de Riordan (129) sur le bras long du chromosome 7 (7q31-3). Sa séquence a été définie par Collins et coll. (130). Il s'étend sur 230 kb répartis en 27 exons et il est transcrit en un ARN messager de 6,5 kb. Il est présent dans les différents tissus épithéliaux classiquement affectés par la mucoviscidose. Il est notamment présent dans les glandes sudoripares, les poumons, l'intestin, le pancréas, la vésicule biliaire, les glandes salivaires et le tractus génital. Ce gène code pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés appelée *CFTR* pour Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator avec une masse moléculaire de 170 kDa lorsqu'elle est entièrement glucosylée.

1.5.1.2 Les différentes mutations du gène CFTR

A ce jour, on a décrit plus de 1949 mutations du gène *cfr* (à la date du 29/10/2013) (www.genet.sickkids.on.ca/cfr/StatisticsPage.html). Parmi les différentes mutations recensées du gène *cfr*, 40 % sont des mutations faux-sens, 18 % de mutations non-sens, 22 % des insertions-délétions entraînant un déphasage du cadre de lecture, et 18% des mutations altérant des codons essentiels pour l'épissage, les 2% restant correspondent à des mutations localisées dans le promoteur ou à des délétions dans le cadre de lecture. Ces mutations sont

classées en 6 groupes correspondant aux dysfonctionnements moléculaires observés (131) (Figure 11).

- Les mutations de Classe I :

Ce type de mutations est caractérisé par une absence d'expression de la protéine CFTR à la surface de la membrane apicale des cellules épithéliales. Cela correspond à un défaut de synthèse qui peut être lié à une mutation non sens ou à un décalage de la phase de lecture par addition ou délétion d'une paire de base qui produira une protéine tronquée non fonctionnelle. Environ 50% des mutations du canal CFTR affectent la synthèse de l'ARNm.

- Les mutations de classe II :

Ces mutations conduisent à des anomalies de repliement et de trafic intracellulaire de la protéine: la protéine ne sera pas adressée au bon endroit, en général elle reste localisée dans le cytoplasme. Dans ce cas encore, très peu de protéines fonctionnelles arrivent à la membrane apicale des épithéliums. La mutation F508del est incluse dans cette classe et constitue la mutation majoritaire qui concerne près de deux tiers des cas. Elle a pour conséquence une délétion de trois nucléotides codant pour un résidu phénylalanine (ΔF) en position 508 ce qui engendre un mauvais repliement de la protéine nouvellement synthétisée et son acheminement vers le protéasome où elle sera dégradée avant d'avoir atteint la membrane plasmique

- Les mutations de classe III :

La fonction de la protéine CFTR est mal régulée. Ces mutations impactent la régulation de la protéine CFTR et sont souvent des mutations faux sens situées au niveau des domaines NBF (*Nucleotide Binding Fold*) où se lie l'ATP.

- Les mutations de classe IV:

Ces mutations sont caractérisées par une altération de la conduction ionique par CFTR. Ce sont des mutations faux-sens localisées dans les domaines transmembranaires formant le pore du canal.

- Les mutations de classe V et VI:

La production de protéine CFTR est diminuée. Cette classe comporte des mutations dans le promoteur et des mutations qui affectent l'épissage alternatif ce qui conduit à une diminution de la quantité de transcrits exprimés et par conséquent la quantité de protéine CFTR exprimée à la membrane.

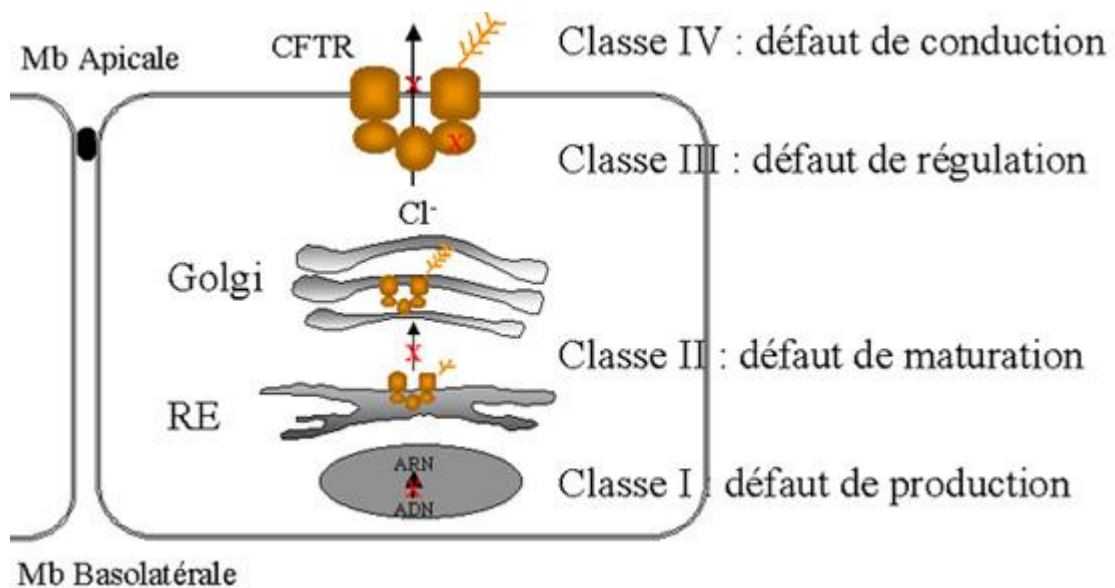


Figure 11: Les différentes classes de mutations. D'après Welsh & Smith, 1993.

(Pascale Fanen).

1.5.1.3 La protéine CFTR : la structure

Un modèle de structure a été proposé pour cette protéine en se basant sur sa séquence nucléotidique (Figure 12) (132). La protéine CFTR est insérée dans la membrane cytoplasmique via deux domaines transmembranaires à six hélices hydrophobes et possède deux domaines hydrophiles cytoplasmiques appelés Nucléotide Binding Domain (NBD1 et NBD2) capables de fixer l'ATP ainsi qu'un domaine dit régulateur (R) qui expose à sa surface plusieurs sérines régulées par les protéines kinases A et C. Ces caractéristiques structurales ont permis de classer CFTR dans une famille de 14 transporteurs membranaires, celle des protéines ATP-binding cassette (ABC) et plus précisément ABCC7. Cette famille regroupe les protéines eucaryotes et bactériennes qui importent et exportent des petites molécules telles que les sucres, les protéines, les métaux ou encore les médicaments. Parmi le grand nombre de protéines ABC, CFTR est la première à être identifiée comme un canal ionique.

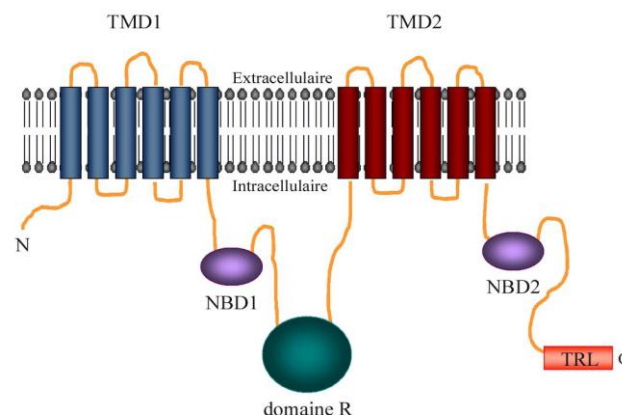


Figure 12: Représentation de la protéine CFTR. CFTR est composée de deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2), deux domaines intracellulaires de liaison nucléotidique (NBD1 et NBD2) et un domaine intracellulaire régulateur (domaine R).

1.5.1.4 La protéine CFTR : les fonctions

Les fonctions de la protéine CFTR sont multiples mais ne sont pas toutes encore complètement élucidées d'un point de vue moléculaire.

- Fonction de canal ionique :

CFTR est une protéine multifonctionnelle, on lui attribue principalement une fonction de transport d'ions chlorures.

Trois observations ont permis de confirmer cela : premièrement, on observe suite à l'introduction d'un gène *cfr* dans des cellules qui ne l'exprimaient pas l'apparition d'une protéine AMPc dépendante et dont les propriétés sont identiques à celles trouvées dans les cellules épithéliales exprimant la protéine CFTR (133, 134). Deuxièmement, la mutagenèse dirigée contre la séquence codante pour CFTR modifie sensiblement l'activité de transport vis-à-vis des ions chlorures (135). Troisièmement, l'introduction d'une protéine CFTR purifiée dans des membranes lipidiques artificielles produit un canal avec des propriétés semblables aux protéines CFTR rencontrées de façon naturelle sur les cellules (136).

La protéine CFTR possède des domaines membranaires de fixation des nucléotides (NBD) avec des séquences consensus pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Ces domaines NBD sont le lieu de plusieurs mutations (137) dont la plus fréquente est la délétion d'une phénylalanine en position 508.

La protéine CFTR contient aussi un domaine de régulation (R) qui s'étend entre les résidus 590 et 831. Ce domaine est codé par l'exon 13 et possède des sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases A et C (138). La phosphorylation de ce domaine par la PKA conduit à un changement de conformation de la protéine CFTR et à son ouverture au passage des ions. Au contraire, une phosphorylation partielle de ce domaine conduit à l'hydrolyse de l'ATP et sa dissociation rapide de son lieu de fixation sur le domaine NBD1 induisant ainsi la fermeture du canal.

Les résidus qui composent la première boucle de la protéine CFTR sont responsables de sa sélectivité (139). La sélectivité du canal CFTR pour les ions halogénures, dans l'ordre : Br- > Cl- > I- > F-, distingue CFTR des autres canaux chlorure épithéliaux, dans lesquels la perméabilité de l'iodure est plus importante que celle du chlorure (140). La conductance du canal varie entre 6 et 11pS en fonction du type cellulaire, de la température et de la concentration des ions.

- *Autres fonctions :*

Le rôle de CFTR dans les cellules épithéliales n'est pas restreint à l'activité de transport des ions chlorures. Chez les patients mucoviscidosiques, l'absence de CFTR influence l'expression d'autres protéines ayant un rôle important dans la réponse inflammatoire, les transports ioniques et la signalisation cellulaire.

Le lien entre la défaillance du canal CFTR chez les patients mucoviscidosiques et l'activité d'un autre transporteur épithélial, qui est l'ENaC, a fait l'objet de beaucoup d'intérêt (141). En effet, CFTR régule négativement l'activité du canal ENaC, ce qui a comme conséquence une absorption accrue de Na⁺, qui est également responsable de la déshydratation et de la diminution de la clairance mucociliaire dans les voies respiratoires (142). Les études de surexpression du transporteur ENaC chez des souris transgéniques a montré l'apparition d'une déshydratation et d'une clairance défaillante similaires à celles observées dans les poumons humains mucoviscidosiques (143).

La protéine *CFTR* est également exprimée dans certaines cellules immunitaires (144) comme les macrophages alvéolaires où l'absence de CFTR sur la membrane de ses vacuoles est délétère pour l'activité de phagocytose par les macrophages étant donné que la fonction de CFTR comme transporteur ionique permet le maintien de l'acidité à l'intérieur de ces vacuoles (145).

L'ORCC est un canal chlorure régulé par l'AMPc dont on a longtemps pensé qu'il pouvait être la protéine, impliquée dans la régulation de la conductance membranaire. Dans la mucoviscidose, ORCC est inactif et insensible aux protéines kinases A et C (146). Les études d'interactions entre CFTR et d'autres canaux ioniques membranaires montrent que la présence du canal CFTR fonctionnel est indispensable à l'activation du canal ORCC par les PKA. Schwiebert et collaborateurs (147) proposent également que l'interaction entre CFTR et le canal ORCC dans les cellules épithéliales, soit liée à un mécanisme autocrine/paracrine impliquant l'ATP. La libération d'ATP intracellulaire par le CFTR permettrait à celui-ci d'aller se fixer sur les récepteurs purinergiques qui activent l'ouverture du canal ORCC par l'intermédiaire d'une protéine G (148).

La protéine CFTR est impliquée également dans la régulation de la sécrétion des ions HCO₃⁻ qui permettent de tamponner le pH extracellulaire et moduler le flux de potassium par les canaux potassiques sensibles à l'ATP (149). Elle a également une fonction de transport du tri-peptide glutathion : g-glutamyl-cystéinyl-glycine (GSH), qui est un antioxydant très abondant dans les poumons, qui en contiennent environ 400 mM, ce qui représente cinquante fois la concentration trouvée dans le plasma. Cependant, la concentration en GSH dans les épithéliums présentant un phénotype mucoviscidosique est fortement réduite (150).

1.5.1.5 Stratégies thérapeutiques: les transporteurs comme cible thérapeutique

Combattre les infections bactériennes dans la mucoviscidose constitue un défi incontestable dans les stratégies thérapeutiques afin de limiter la progression de la maladie qui conduit à terme à la destruction progressive du tissu pulmonaire. Cependant et malgré l'apport des antibiotiques, la pneumonie continue à être une cause majeure de la morbidité et de la mortalité.

La biodisponibilité en antibiotiques et en agents antimicrobiens constitue un paramètre primordial dans l'éradication des bactéries dans les poumons. Ceci met en avant le rôle critique que peuvent jouer les épithéliums alvéolaires et bronchiques dans le devenir et

l'efficacité des traitements. L'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires du transport des antibiotiques dans l'épithélium des voies respiratoires représente ainsi un intérêt primordial dans l'objectif d'avoir une prise en charge médicamenteuse plus efficace.

L'administration par voie orale des antibiotiques a été décrite comme ayant le bénéfice d'avoir moins d'effets secondaires et plus d'efficacité comparée à l'administration par voie systémique chez les patients atteints de mucoviscidose (151, 152, 153). Dans le tissu pulmonaire, les antibiotiques utilisent des mécanismes de transport qui consistent, entre autres, en la diffusion passive et le transport actif. Après avoir traversé la membrane, ces médicaments font face à un métabolisme pulmonaire qui va contribuer à la réduction de la concentration tissulaire de ces derniers. Ainsi, certains médicaments comme les beta-lactamines restent principalement extracellulaires (154). Les aminosides sont, quant à eux, trop polaires pour passer à travers les membranes phospholipidiques, ils pénètrent alors plus lentement à l'intérieur des cellules grâce à l'endocytose (155). Cependant, l'étude des macrophages issus du lavage alvéolaire montre que d'une part on a une faible absorption des pénicillines et les céphalosporines et de l'autre part une grande absorption de rifampicine, de tétracycline, d'érythromycine ou d'éthambutol.

Pour avoir une bonne efficacité de l'antibiothérapie, il est nécessaire d'avoir des concentrations en antibiotiques qui soient supérieures à la CMI au site d'infection et que la stabilité et la composition chimique de ces derniers leur permettent de contourner des systèmes enzymatiques susceptibles de les dégrader comme les beta-lactamases. Ainsi, l'étude du transport des médicaments dans le tissu pulmonaire est importante afin de remédier au besoin d'utiliser des concentrations élevées de certains médicaments avec les effets secondaires potentiels qui leur sont associés avant d'obtenir un bénéfice.

L'utilisation des antibiotiques comme les macrolides dans le traitement de la mucoviscidose a fait ses preuves depuis plusieurs années. Les macrolides permettent, en plus de leur activité anti-virulente, d'altérer la signalisation intercellulaire (Quorum Sensing) responsable de la formation du biofilm de *Pseudomonas*. Ils présentent également une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de NFkB, impliqué dans l'expression de certaines

cytokines pro-inflammatoires, et permettent ainsi de réduire la migration des neutrophiles (156,157).

L'antibiothérapie est utilisée, dans la prise en charge des malades, contre l'infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa* qui forme un biofilm dans les voies aériennes, source de complications cliniques mais aussi de résistance aux antibiotiques (158,159). Il est nécessaire d'avoir des concentrations locales élevées en antibiotiques. Contrairement à la voie systémique, l'administration d'antibiotiques par voie inhalée permet d'atteindre de telles concentrations en minimisant le risque de toxicité.

1.5.2 L'asthme

1.5.2.1 Origine et physiopathologie de la maladie

Les maladies respiratoires, essentiellement les allergies, l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), constituent un problème majeur de santé publique dans le monde. Les dernières statistiques de l'OMS (2007) estiment que 300 millions de personnes dans le monde souffrent d'asthme avec 250.000 personnes qui en meurent chaque année, 210 millions de personnes souffrent de BPCO, et des millions de personnes sont touchées par les allergies. La prévalence de ces maladies est en augmentation et il ya toujours un besoin de nouvelles thérapies améliorées.

L'asthme est une maladie plurifactorielle. Parmi les facteurs qui sont susceptibles de déclencher les crises, on retrouve la prédisposition génétique et les facteurs d'environnement qui sont assez nombreux, comme les infections, les virus, les facteurs digestifs (aliments), les facteurs endocriniens, les facteurs psychologiques (le stress), les facteurs professionnels, la pollution, le tabagisme et les médicaments.

Les principales caractéristiques pathologiques impliquent plusieurs phénomènes complexes, à savoir :

- * le bronchospasme : le muscle bronchique lisse est responsable du rétrécissement du calibre des bronches et peut provoquer des troubles ventilatoires obstructifs. La contraction du muscle peut se faire soit spontanément essentiellement sous la dépendance du système nerveux autonome soit sous l'effet de drogues telles les β_2 -sympathomimétiques. Chez les asthmatiques on peut observer également une hypertrophie du muscle lisse bronchique. Ceci est responsable de l'augmentation de la réactivité bronchique.

- * la réaction inflammatoire de la muqueuse bronchique : une inflammation, caractérisée par une infiltration cellulaire, où dominant les polynucléaires éosinophiles. De nombreux médiateurs impliqués dans l'asthme peuvent être responsables de cette augmentation de l'infiltration cellulaire : l'histamine, les leucotriènes, le PAF (*platelet activating factor*), les bradykinines et les neuropeptides. L'idée que l'inflammation soit une composante majeure de l'asthme a été établie depuis plus de 100 ans grâce aux autopsies qui ont permis d'évaluer les paramètres macroscopiques et histologiques des voies respiratoires chez les patients asthmatiques (160). En effet, dans l'asthme, les voies respiratoires sont obstruées par un mucus visqueux (provenant des cellules à mucus et des glandes sous-muqueuses). La paroi des voies aériennes est également œdémateuse et infiltrée par des cellules inflammatoires, qui sont essentiellement les éosinophiles et les lymphocytes. L'examen de ces voies aériennes par fibroscopie ou par biopsie bronchique ainsi que l'analyse du lavage broncho-alvéolaire (BAL) révèle des concentrations élevées en lymphocytes, en mastocytes et en éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires chez les patients asthmatiques par rapport aux sujets non asthmatiques et une activité mastocytaire, macrophagique, éosinophilique et lymphocytaire accrue (161).

Chez les asthmatiques, l'inflammation se trouve préférentiellement dans la muqueuse bronchique mais peut toucher également tout le poumon. La production des cytokines, comme l'IL-5, l'IL-4, l'IL-8, l'IL-13, le GM-CSF et RANTES, est augmentée dans les voies aériennes des patients asthmatiques favorisant l'activation et la survie des cellules inflammatoires (162). Toutes les cellules résidentes des voies aériennes, notamment les cellules épithéliales bronchiques et les cellules musculaires, participent à l'inflammation

(163). L'interaction entre les cellules résidentes des voies aériennes et les cellules immunitaires aboutit au remodelage des voies aériennes.

Les allergènes, comme les acariens et les pollens, stimulent le système immunitaire qui se mobilise afin d'éradiquer ces parasites envahissants. Dans les maladies allergiques, la stimulation du système immunitaire persiste et la réponse inflammatoire aiguë se convertit en une réponse inflammatoire chronique dite « IgE-dépendante ». Cette réponse est caractérisée, essentiellement, par une infiltration importante des éosinophiles.

Tous ces éléments physiopathologiques conduisent à une mise à nu de la membrane basale et des terminaisons nerveuses, sensibles à l'irritation, ce qui facilite la pénétration des allergènes et des agents irritants nocifs.

1.5.2.2 Les récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes

Dans le traitement de l'inflammation pulmonaire, les glucocorticoïdes utilisés ont une action pléiotrope car ils agissent en se liant à un récepteur spécifique qui est présent dans pratiquement toutes les cellules de l'organisme. Il s'agit du récepteur GR qui appartient à une grande famille de récepteurs ayant une structure conservée composée d'une partie C-terminale de fixation au ligand (ici les glucocorticoïdes), une région centrale de localisation intra-nucléaire et de fixation à l'ADN et enfin une partie N-terminale de fixation à certaines protéines.

Les glucocorticoïdes sont des substances lipophiles qui ont la possibilité de diffuser passivement à travers la membrane plasmique de la cellule et d'atteindre leur récepteur dans le cytoplasme. Avant la fixation des glucocorticoïdes, le récepteur est à l'état inactif dans le cytoplasme, associé à des protéines comme les Heat Shock Proteins, HSP-90, HSP-70 et les immunophilines HSP-56. Lorsque les glucocorticoïdes se fixent à la partie C-terminale, ils entraînent l'activation du récepteur et la libération des HSP et des immunophilines. Le complexe glucocorticoïdes/récepteur peut alors passer la membrane nucléaire pour se

localiser dans le noyau et s'associer à des séquences d'ADN particulières appelées Glucocorticoid Response Element (GRE) situées dans les régions promotrices de certains gènes (Figure 13). La fixation du complexe glucocorticoïdes/récepteur aux GRE entraîne une modification de la transcription de certains gènes, soit l'activation de gènes codant pour des protéines anti-inflammatoires, soit la répression de gènes codant pour des protéines inflammatoires.

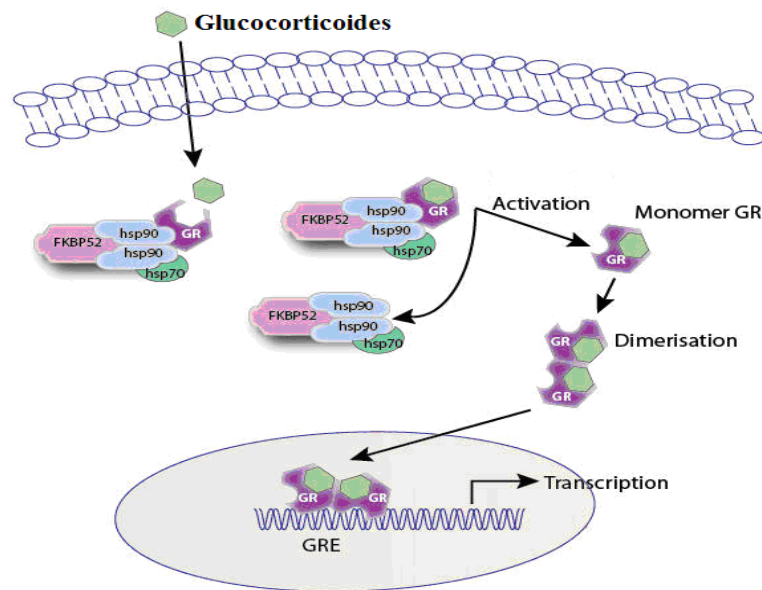


Figure 13 : Mécanisme d'action des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). La fixation des GC sur les GR induit leur activation, leur dimérisation et leur translocation dans le noyau où ils se fixent sur les éléments de réponse aux GC sur les promoteurs des gènes cibles.

Le gène codant le GR humain se trouve sur le chromosome 5q31-32 et il est composé de 9 exons. Le promoteur du gène GR contient des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription, dont le facteur nucléaire NFκB et le GR lui-même. Cependant, il ne possède pas de TATA box ni de CCAAT Box. La traduction des ARNm donne deux variants : GRα et GRβ. Ces deux isoformes ont une séquence identique jusqu'à l'acide aminé 727 à l'extrémité C-terminale. À partir de cette position GRα possède 50 acides aminés supplémentaires et GRβ, 15 acides aminés. Cette différence empêche la fixation des GCs par GRβ. Au niveau de

la structure, GR α et GR β , comme tous les récepteurs nucléaires, comportent des motifs en doigts de Zinc.

L'expression des GR a été caractérisée par plusieurs études dans plusieurs lignées cellulaires dont les cellules épithéliales bronchiques (164, 165, 166) et dans les voies aériennes supérieures et inférieures (167).

Après la fixation des GC sur les GR, ces derniers subissent une régulation par phosphorylation sur des serines spécifiques. Cette phosphorylation est effectuée par les kinases cyclin-dépendantes, des MAPK et des c-jun. La phosphorylation affecte la stabilité du récepteur, sa localisation et son interaction avec ses co-régulateurs et avec l'ADN.

Bien que Pujols et al (168) aient trouvé une diminution de l'expression de GR α dans la polypose nasale, l'expression de GR α est généralement montrée inchangée entre un état normal comparé à un état inflammatoire. Cependant, sa fonction et sa localisation est dépendante de l'altération de l'état physiologique. Concernant GR β , il est, comme GR α , exprimé dans plusieurs tissus humains (169). Cependant, en raison de l'altération de son domaine de fixation du ligand, il est incapable de fixer les GCs et incapable d'activer la transcription (170). Dans certaines études, il est décrit comme ayant un effet inhibiteur de l'activation de la transcription de certains gènes conduits par le GR α , jouant ainsi le rôle de dominant négatif (171).

1.5.2.3 Les stratégies thérapeutiques : la corticothérapie

L'efficacité de la corticothérapie dépend de son mode d'administration, de sa rétention pulmonaire et de sa liaison aux récepteurs des glucocorticoïdes.

Le mécanisme d'action des glucocorticoïdes passe par leur fixation sur des récepteurs nucléaires. Cette fixation conditionne l'efficacité et la durée d'action anti-inflammatoire. Plus l'affinité pour les récepteurs est grande plus l'effet anti-inflammatoire escompté est important même avec des concentrations faibles en GC.

Les glucocorticoïdes modulent l'activité biologique des cytokines inflammatoires et le contrôle de l'inflammation des voies aériennes dans l'asthme est en grande partie due à l'inhibition de la transcription de plusieurs gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires telles que les cytokines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-13, TNF- α , GM-CSF, IFN-gamma), les chimiokines (IL-8, RANTES, MIP-1a, MCP-1), les molécules d'adhésion (ICAM1, VCAM1, la sélectine E), et les enzymes impliquées dans la production de médiateurs (i-NOS, COX2, cPLA2) (172, 173, 174).

La fixation des GC sur leurs récepteurs, induit l'activation du complexe récepteur-ligand formé et sa translocation intranucléaire. Ce dernier exerce plusieurs effets anti-inflammatoires par fixation sur de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes sur les promoteurs des gènes cibles et par interaction directe avec les facteurs de transcription comme NF-KB ou encore AP-1. Ceci se traduit par la diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires et de production de médiateurs lipidiques impliqués dans l'inflammation bronchique [cytokines, enzymes (protéases, cyclo-oxygénases, NO synthase)]. Les molécules ayant la plus grande affinité pour les récepteurs des corticoïdes sont celles qui, in vitro, ont la plus puissante activité inhibitrice des facteurs de transcription et de la production des cytokines.

Les glucocorticoïdes sont une recommandation essentielle dans le traitement de l'inflammation dans les voies aériennes des asthmatiques; ils permettent l'amélioration clinique des symptômes et la prévention des exacerbations (175, 176). Au niveau cellulaire, les corticostéroïdes réduisent le nombre de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires, y compris les éosinophiles, les lymphocytes T, les mastocytes et les cellules dendritiques. Ces effets remarquables des corticostéroïdes sont dus à l'inhibition du recrutement des cellules inflammatoires dans les voies aériennes en supprimant la production des médiateurs chimiotactiques, en diminuant leur adhérence et en inhibant la survie des cellules inflammatoires telles que les éosinophiles, les lymphocytes T et les mastocytes dans les voies respiratoires. Les cellules épithéliales constituent aussi une cible pour les corticostéroïdes inhalés qui représentent un pilier de la prise en charge des patients asthmatiques (177).

La voie optimale pour l'administration des glucocorticoïdes dans le traitement de l'asthme est la voie inhalée. Cependant, les corticoïdes inhalés peuvent entraîner des effets

systemiques dépendant de la dose et de la durée du traitement. Il est donc recommandé d'utiliser une dose minimale nécessaire afin d'obtenir un effet optimal sur la cible bronchique et avec une pénétration systémique minimale. L'utilisation des corticoïdes par d'autres voies d'administration comme la voie injectable est parfois indispensable selon l'état clinique du patient asthmatique, surtout en état de crise. La voie orale est utilisée aussi pour des traitements de courtes durées.

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les maladies inflammatoires pulmonaires comme la mucoviscidose et l'asthme constituent des centres d'intérêts majeurs pour la recherche biomédicale car elles sont à l'origine de l'altération de la fonction respiratoire.

Bien qu'elles aient des origines ou des symptômes différents, ces maladies se caractérisent par une composante inflammatoire importante responsable de plusieurs complications cliniques graves. L'étude de cette inflammation, nécessite plusieurs approches dont :

1. L'approche moléculaire et mécanistique de la réaction inflammatoire et de son déroulement ce qui consiste à comprendre l'origine des perturbations moléculaires propres à chaque maladie.
2. L'approche thérapeutique qui vise à améliorer la biodisponibilité des médicaments et leurs efficacités.

Le système immunitaire développe une réponse inflammatoire comme un outil de défense contre toute agression. Cette réaction immunitaire est orchestrée par différentes classes de cellules immunitaires qui coordonnent leurs actions afin de mettre en place une réponse appropriée. Les cytokines sont à l'origine de la communication entre les différents acteurs cellulaires de la réaction inflammatoire. Elles sont responsables de l'exacerbation de la réaction inflammatoire et de sa chronicité. Ainsi, comprendre les mécanismes moléculaires qui accompagnent ou qui sont à l'origine de l'augmentation de l'expression de ces cytokines constitue un défi majeur dans l'objectif d'établir des stratégies thérapeutiques permettant de contrôler la réaction inflammatoire et ses conséquences délétères sur l'organisme.

Certaines cytokines comme l'IL-8 ont plusieurs cibles cellulaires, elles recrutent plusieurs types cellulaires immunitaires au lieu de l'inflammation, d'autres comme le TNF α agissent sur certaines cellules immunitaires spécifiques comme les neutrophiles. L'importance du rôle biologique du TNF α ne se résume pas seulement à son action sur les cellules immunitaires mais aussi sur les cellules épithéliales bronchiques qui sont connues, aujourd'hui, et surtout quand elles sont stimulées, comme des producteurs de cytokines et donc jouant un rôle primordial dans le processus inflammatoire.

Dans la mucoviscidose, les mutations génétiques du canal chlorure, *CFTR*, sont responsables de conséquences physiopathologiques graves. Au niveau cellulaire, ces mutations engendrent un certain nombre de perturbations moléculaires, bien que le lien direct entre les mutations et ces perturbations ne soit pas toujours établi. Cependant, il y a une inflammation chronique qui mobilise un certain nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires. C'est dans ce cadre, que j'ai essayé, d'une part, d'étudier la réponse des cellules épithéliales bronchiques saines ou mucoviscidosiques face à un contexte inflammatoire induit par le $TNF\alpha$ et d'autre part d'essayer de proposer une stratégie de correction des défauts de sécrétion ou d'expression de facteurs inflammatoires comme IL-8, SLPI ou Cox-2.

Le contexte inflammatoire dans la mucoviscidose s'accompagne d'une infection des voies aériennes qui nécessite le recours à l'antibiothérapie. Cependant, l'efficacité de l'antibiothérapie est relative à l'efficacité et la biodisponibilité des médicaments utilisés. Ainsi, j'ai essayé d'étudier l'effet de la composante inflammatoire sur le transport et la biodisponibilité des antibiotiques. Je me suis intéressé à deux transporteurs de dipeptides PEPT1 et PEPT2 qui appartiennent (tout comme *CFTR*) à la grande famille de transporteurs transmembranaires, la famille ABC pour *ATP-Binding-Cassette*. Ces deux transporteurs ont comme substrats des beta-lactames, médicaments utilisés dans le traitement de l'infection dans la mucoviscidose.

Notre laboratoire s'intéresse, entre autres, au cycle de la méthionine source principale des réactions de méthylation intracellulaire. Ce cycle est contrôlé par des cofacteurs vitaminiques comme la cobalamine (vitamine B12). Il module l'expression des gènes par son activité de méthylation de l'ADN. La cobalamine est aussi connue pour pouvoir moduler la réaction inflammatoire. Nous avons donc recherché si et dans quelle mesure il pouvait y avoir une synergie d'action entre la cobalamine et un autre anti-inflammatoire, la dexaméthasone, sur la production de cytokines par des cellules épithéliales bronchiques.

Enfin, l'objectif général de ce travail était d'approfondir l'étude d'un contexte inflammatoire sur la réponse des cellules épithéliales bronchiques. J'ai donc essayé d'étudier le lien qui pourrait exister entre cet état inflammatoire et un certain nombre de perturbations moléculaires dans ces cellules bronchiques.

Résultats

Première partie : Etude de l'implication de la PC-PLC dans l'inflammation sur des cellules glandulaires humaines.

Deuxième partie : Etude des transporteurs PEPT1 et PEPT2 dans les cellules glandulaires humaines mucoviscidosiques.

Troisième partie : Etude du rôle de la cobalamine dans l'inflammation pulmonaire induite par l'histamine et le $\text{TNF}\alpha$ sur des cellules trachéales glandulaires humaines.

Première partie : Etude de l'implication de la PC-PLC dans l'inflammation sur des cellules glandulaires humaines.

III.1 Introduction

Comme nous l'avons développé dans l'introduction générale, la mucoviscidose est caractérisée par un déséquilibre cytokinique (178). L'IL-8 est la cytokine pro-inflammatoire la plus étudiée dans la CF. Elle est aussi utilisée comme un marqueur de l'inflammation. Elle est surexprimée dans la mucoviscidose et son dosage dans le lavage broncho-alvéolaire de patients CF montre des taux élevés. L'augmentation de l'IL-8 dans la CF a été observée pour la première fois en 1992 (179). Ensuite, une série d'études a montré un taux élevé de cette cytokine dans la mucoviscidose (180, 181, 182, 183, 184). Quelques études contradictoires ne montrent pas de différence significative du taux de l'IL-8 entre CF et non-CF (185, 186, 187) ou même un taux sécrété par les cellules CF inférieur à celui des cellules non-CF (188). Cependant, le nombre de ces études reste largement inférieur à celui des études qui montrent une augmentation de l'IL-8 dans la CF, *in vitro* et *in vivo*.

De nombreuses cellules, dont les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales des voies aériennes, une fois stimulées par l'IL1 ou les TNF α , produisent de grandes quantités d'IL8. Cette dernière est impliquée dans le recrutement des cellules immunes sur le site inflammatoire par chimiotactisme. Les polynucléaires neutrophiles sont la cible privilégiée de l'interleukine 8 par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique : l'IL8-R.

Dans la réaction inflammatoire, le TNF α est exprimé de façon précoce, il joue ainsi un rôle central dans l'induction de la sécrétion de cytokines essentielles pour le recrutement des monocytes et des PNN au site de l'inflammation y compris l'induction de son propre gène. Il joue aussi un rôle déterminant dans la sécrétion d'autres protéines inflammatoires puisque l'inactivation du gène du TNF α ou encore la neutralisation de l'effet par des anticorps anti-TNF α bloque la sécrétion de l'IL-1 et de l'IL-6 (189). Le TNF α active par voie paracrine

l'expression de molécules d'adhésion à la surface de cellules endothéliales. Ceci permet l'extravasation des leucocytes des vaisseaux vers le site de l'infection. En plus de l'augmentation de la production des cytokines il y a une altération de l'équilibre entre l'expression des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires caractéristique d'une inflammation. Les études ont montré d'autres marqueurs inflammatoires augmentés chez les patients mucoviscidosiques, dans les cellules épithéliales des voies aériennes, on y retrouve aussi une surproduction des médiateurs lipidiques (figure14).

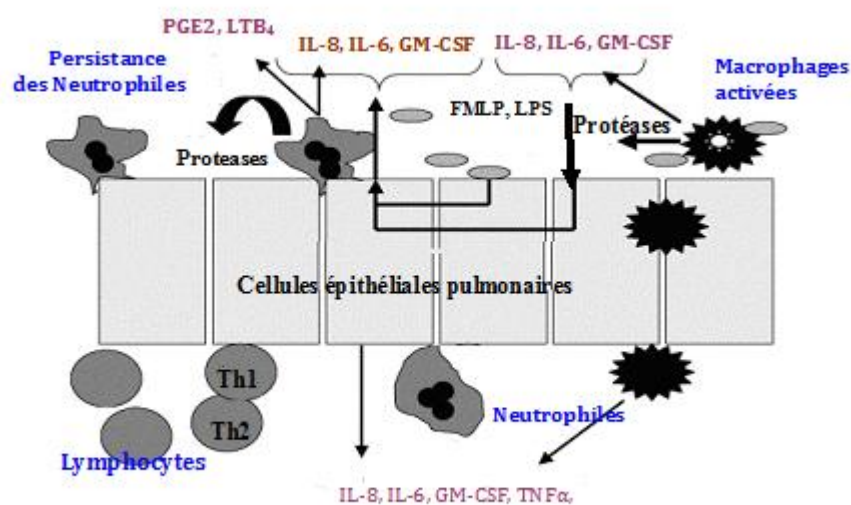


Figure 14: Interactions entre les bactéries, les cellules épithéliales et les cellules immunitaires. Les bactéries stimulent la production d'IL-1 β et TNF α par les macrophages. L'IL-1 β et le TNF α stimulent à leur tour la sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales. L'IL-8 recrute les neutrophiles au site de l'inflammation ou ils secréteront plus d'IL-8 et de médiateurs lipidiques (PGE2 et LTB4) qui sont à leur tour des chimioattractants pour les neutrophiles. En plus, les neutrophiles et les macrophages produisent des protéases qui vont attaquer les protéines épithéliales et stimuler la sécrétion de mucines et de plus de cytokines par les cellules épithéliales. La persistance des neutrophiles dans les voies aériennes est aidée par la présence de GM-CSF.

Plusieurs équipes ont mesuré des quantités élevées en médiateurs lipidiques (190) comme les prostaglandines et les leucotriènes dans les lavages broncho-alvéolaires des patients CF par rapport à celui des sujets sains. Rigas et al., par exemple (191), ont détecté une augmentation significative de la concentration de plusieurs métabolites de l'acide arachidonique, dont les prostaglandines E2 et F2 α , dans la salive des patients CF. Plus récemment, Chen et al. ont conclu qu'un lien de régulation négative existe entre CFTR et la voie Cox-2/PGE2 dans un modèle cellulaire épithélial bronchique (192). Carlstedt-Duke et al ont montré de leur côté que le *turnover* du métabolisme de l'AA est augmenté dans les neutrophiles CF et que ceci est en lien avec l'augmentation de l'activité de la phospholipase A2 (193). Toutes ces études, parmi d'autres, décrivent donc un métabolisme des acides gras altéré chez les patients CF notamment celui de l'acide arachidonique qui constitue le précurseur de tous les médiateurs lipidiques impliqués dans l'inflammation.

L'acide linoléique (C18 : 2n-6) et l'acide alpha-linolénique (C18 : 3n-3) sont indispensables ou dits « essentiels ». Ils sont les chefs de file de deux familles d'acides gras : la famille des ω -3 et la famille des ω -6. De la première famille découle la synthèse de l'acide docosohexanoïque (DHA), précurseur des eicosanoïdes de série 1, qui jouent un rôle anti-inflammatoire en stimulant le système immunitaire. De la deuxième famille découle la synthèse de l'acide arachidonique (AA).

L'invalidation de *CFTR* chez la souris provoque une augmentation anormale du rapport AA/DHA des phospholipides dans des organes comme le pancréas, l'iléon ou le poumon. La supplémentation avec de fortes doses de DHA permet de normaliser non seulement ce déséquilibre mais ceci a été également accompagné par une correction de l'hypertrophie iléale, des lésions pancréatiques et d'une diminution de l'inflammation pulmonaire (194).

Chez le patient mucoviscidose, on a longtemps décrit une carence en acides gras (195) portant sur les ω -6 et les ω -3 avec une élévation des AG monosaturés indépendamment de l'état nutritionnel. Le fait d'observer une hyperproduction d'eicosanoïdes alors qu'il y a un déficit en acides gras essentiel est en faveur d'une augmentation du *turn-over* de l'AA (196). Il est connu que les phospholipases jouent aussi un rôle primordial dans la génération des eicosanoïdes impliqués dans le processus inflammatoire. On note, parmi ces phospholipases, les PLA2 qui hydrolysent la position sn-2 des acides gras. Cette position est occupée le plus

souvent par un acide gras insaturé tel que l'acide arachidonique. Ainsi, l'inhibition de ces enzymes constitue une cible pharmacologique pour les anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes qui induisent la synthèse de protéines comme la lipocortine (classée parmi les annexines) connue pour être une protéine inhibitrice naturelle de la phospholipase A2.

III.2 Résultats et discussion

III.2.1 Etude du relargage de l'acide arachidonique par les cellules CF-KM4 et MM39.

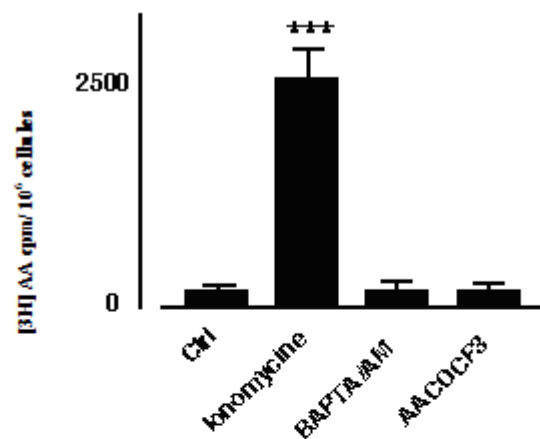
Comme il a été décrit dans l'introduction, l'acide arachidonique constitue un précurseur important pour la synthèse des médiateurs lipidiques et l'étude de son métabolisme est essentielle pour la compréhension du mécanisme de l'inflammation dans la mucoviscidose. On s'est intéressé dans l'équipe à cet acide gras et à son relargage par les deux lignées épithéliales trachéales bronchiques, MM39 et CF-KM4. L'objectif est de comparer le taux du relargage de cet acide gras entre la lignée CF-KM4, qui est une lignée mucoviscidose avec une mutation F508del, et une lignée normale MM39 qui sert de contrôle. Ces deux lignées sont décrites plus en détails dans le chapitre fiches techniques.

Le principe de cette expérience est d'incuber les cellules avec de l'acide arachidonique tritié. Celui-ci est incorporé par les cellules dans leurs membranes phospholipidiques. Ainsi, l'utilisation des différents agents des voies de métabolisme des phospholipides permet de déterminer la phospholipase ou la voie majeure responsable du relargage de l'acide arachidonique (fiche technique n°8).

Les phospholipases A2 sont connues pour être les principales responsables de la génération de l'acide arachidonique dans la cellule, on décrit celles qui sont Ca^{++} indépendante (iPLA2) ou Ca^{++} dépendantes. Ces phospholipases clivent les liaisons phospholipides en position sn-2 pour libérer un lysoglycérol et un acide gras, en général de l'acide arachidonique (197). Afin d'explorer le rôle de ces phospholipases A2, nous avons utilisé le BAPTA/AM, un chélateur de Ca^{++} intracellulaire peu sensible à la variation du pH et connu pour avoir un effet inhibiteur sur les PLA2 Ca^{++} dépendantes et l'arachidonyl

trifluoromethyl ketone (AACOCF₃) (198), un autre inhibiteur des cPLA₂. Nous avons également utilisé de l'ionomycine, qui est un libérateur de Ca⁺⁺ intracellulaire, afin de vérifier si l'augmentation du Ca⁺⁺ intracellulaire induirait l'action de ces phospholipase et la libération du relargage de l'acide arachidonique en conséquence.

A



B

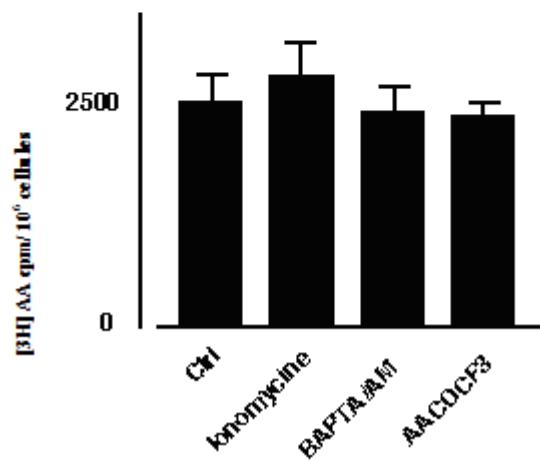


Figure 15: Etude du relargage de l'acide arachidonique par les cellules MM39 (A) et CF-KM4 (B). Les deux lignées cellulaires ont été incubées avec de l'acide arachidonique tritié [3H] AA (0.5 µCi/ml) et ensuite pré-incubées avec soit de l'Ionomycine, du BAPTA/AM ou de l'AACOCF₃. (***: $p < 0.001$). Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en triplicates. (Fiche technique n°8).

La figure 15A montre les résultats obtenus sur les cellules MM39. L'ionomycine induit un relargage d'acide arachidonique trois fois plus important que le relargage basal. Ceci semble être lié à l'augmentation du calcium intracellulaire par l'ionophore. Le BAPTA/AM et l'AACOCF3 ne montrent pas de variation significative sur ce relargage basal. Ainsi, on peut conclure que le relargage de l'acide arachidonique par les cellules MM39 est sensible à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium.

Nous avons mené les mêmes expériences sur la lignée CF-KM4. La figure 15.B présente les résultats obtenus. Ces résultats montrent, d'abord, que les cellules CF-KM4 ont un taux de relargage d'acide arachidonique basal trois fois plus élevé que celui des cellules MM39. Cette observation est concordante avec les données de la bibliographie, qui parlent d'une augmentation de ce relargage dans certains types cellulaires CFTR-/- (199). En effet, les cellules CF-KM4 sont porteuses d'une mutation F508del qui touche la protéine CFTR. Cette mutation engendre un certain nombre de perturbations intracellulaires, notamment les propriétés sécrétoires des cellules, mais ceci est également associé à l'augmentation de la synthèse de certains marqueurs inflammatoires. Par ailleurs, l'utilisation du chélateur de calcium, le BAPTA/AM, de l'ionophore à calcium, l'ionomycine ou de l'inhibiteur de la cPLA2, le AACOCF3, ne modifie pas le niveau de relargage d'acide arachidonique par les cellules CF-KM4 (figure 15B). A l'inverse du cas observé avec les cellules MM39, le relargage de l'acide arachidonique par les cellules CF-KM4 semble être insensible à la variation du calcium intracellulaire et à l'inhibition de la cPLA2 (figure 15B).

Afin d'explorer les voies responsables du relargage basal par les cellules CF-KM4, nous avons utilisé plusieurs inhibiteurs contre d'autres phospholipases, autres que les cPLA2, connues pour être impliquées directement ou indirectement dans la génération de l'acide arachidonique (Figure 16).

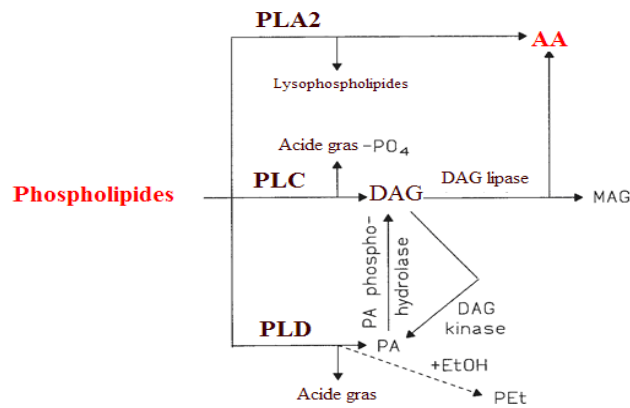


Figure 16: Schéma représentatif du métabolisme des phospholipides par les phospholipases. La PLA2, la PLC et la PLD libèrent respectivement de l'AA, le DAG et du PA. Ces derniers constituent de puissants acteurs de signalisation intracellulaires.

Comme il est représenté dans la figure 16, la PLD hydrolyse les phospholipides au niveau de la position sn-3 et libère ainsi un acide phosphatidique (PA) et un groupe polaire. Le PA peut être hydrolysé par une phosphohydrolase pour générer du DAG. Ce dernier peut être hydrolysé à son tour par une Diacylglycérol lipase (DAG lipase) pour donner du monoacylglycérol (MAG) et de l'acide arachidonique. Ainsi, l'hypothèse serait que l'inhibition de la PLD générerait une baisse du relargage de l'AA. Nous avons alors utilisé pour cette expérience, le but-1-ol, comme inhibiteur de la PLD et l'oléate qui est connu pour être un activateur de cette dernière.

Nous avons également ciblé la DAG kinase qui est connue pour avoir comme action de phosphoryler le diacylglycérol, qui devient ainsi un acide phosphatidique, substrat pour la PLA2. Cette réaction peut également contribuer à la génération de l'acide arachidonique. Nous avons alors utilisé le R59949 qui est un inhibiteur spécifique de la DAG kinase.

Le diacylglycérol peut être hydrolysé directement par la diacylglycérol lipase pour libérer de l'acide arachidonique. Cette réaction est connue pour être l'une des principales sources de l'acide arachidonique. Nous avons alors utilisé le RHC 80267 un inhibiteur spécifique de cette enzyme.

Enfin, une autre phospholipase, importante dans le métabolisme des phospholipides membranaire, est la phosphatidylcholine phospholipase C qui a comme substrat, un phospholipide majeur des membranes phospholipidiques, le phosphatidylcholine. Afin d'étudier l'implication de cette phospholipase dans le relargage de l'acide arachidonique par les cellules CF-KM4, nous avons utilisé le tricyclodecan-9-yl-xanthogénate (D609) qui est un inhibiteur spécifique de la PC-PLC.

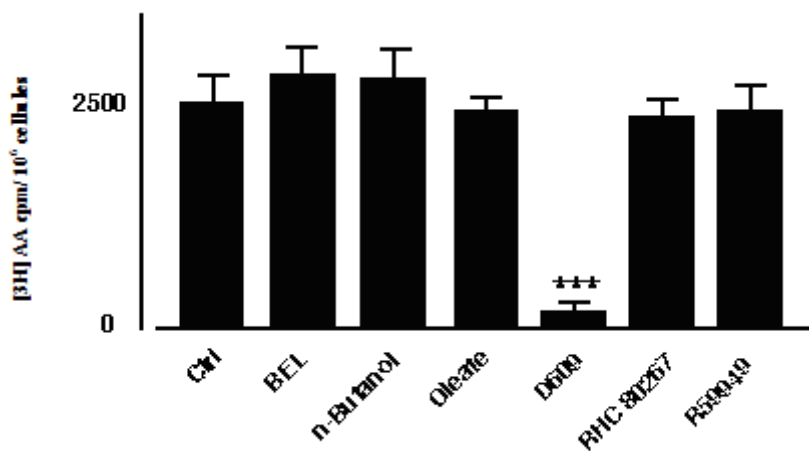


Figure 17: Etude du relargage de l'acide arachidonique par les cellules CF-KM4. Les cellules CF-KM4 ont été incubées avec de l'acide arachidonique tritié [3H] AA (0.5 μ Ci/ml) et pré-incubées avec différents inhibiteurs pendant 30 min (Bromoénol-lactone ; BEL, Sodium Oléate, D609, RH80267, R59949). (***) : $p < 0.001$). Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en triplicates. (Fiche technique n°8).

La figure 17 montre que l'activateur de la PLD, l'Oléate, l'inhibiteur de la PLD, le n-butanol et l'inhibiteur de la iPLA2 (Bromo-énol lactone) n'ont aucun effet sur le niveau de relargage basal de l'acide arachidonique. L'incubation des cellules avec des inhibiteurs pour la DAG lipase ou la DAG kinase ne modifie pas non plus ce taux de relargage. Cependant, le traitement des cellules CF-KM4 avec le D609, l'inhibiteur spécifique de la PC-PLC, montre

une diminution assez significative du relargage de l'AA (diminution de 60%) par les cellules CF par rapport au contrôle. Ce résultat est d'autant plus surprenant qu'après traitement avec le D609 on a un niveau de relargage de l'acide arachidonique similaire à celui des cellules MM39. Ceci est en faveur d'un rôle important de la PC-PLC dans la génération de l'AA par les cellules CF-KM4.

III.2.2 Influence d'un contexte inflammatoire sur le relargage de l'AA par les cellules MM39 et CF-KM4

Nous avons observé, en comparant le relargage de l'acide arachidonique par les cellules CF-KM4 à celui par les cellules MM39, que celui-ci est plus important dans les cellules CF. Il serait, maintenant, intéressant de comparer la réponse de ces deux modèles à un contexte inflammatoire. Nous avons, alors, incubé les deux lignées avec du TNF α à (10ng/ml).

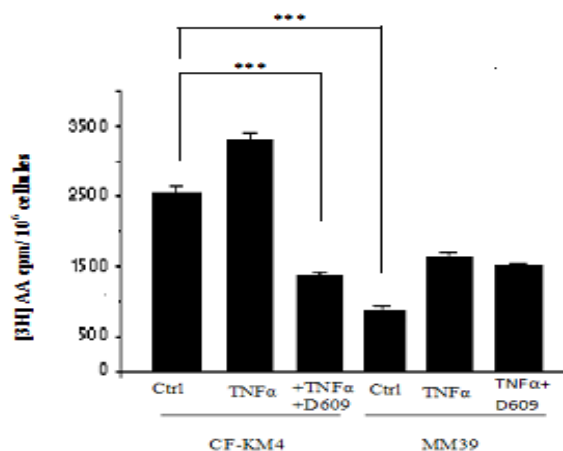


Figure 18 : Le relargage de l'AA tritié par les cellules CF-KM4 et MM39. Les deux lignées cellulaires ont été incubées avec de l'acide arachidonique tritié [3H]AA (0.5 μ Ci/ml) dans un milieu sans sérum pendant 24h. Elles ont été ensuite incubées en présence ou en absence de TNF α (10ng/ml) et de D609 (50 μ g/ml) pendant 8h. Le taux de relargage de l'[3H]AA a été comparé à celui des cellules CF-KM4 contrôles non traitées (Ctrl). (***) : $p < 0.001$). Cette figure est representative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°8).

Les résultats obtenus après stimulation des cellules avec le TNF α montrent une augmentation du relargage dans les deux lignées cellulaires. Ceci est attendu parce qu'un contexte inflammatoire instauré par la stimulation au TNF α induirait une augmentation de la production de l'AA nécessaire à la synthèse d'un certain nombre de médiateurs lipidiques, impliqués dans le processus inflammatoire. Cependant, l'incubation des cellules stimulées par le TNF α avec du D609 inhibe cette élévation du relargage dans les cellules CF-KM4 mais n'a aucun effet significatif dans les cellules MM39. L'effet du D609 sur le taux de relargage par les cellules CF-KM4 est important et permet de le réduire à un taux inférieur à celui du contrôle (figure18).

En conclusion, selon nos résultats, la PC-PLC jouerait un rôle important aussi bien à l'état basal qu'en condition inflammatoire dans les cellules CF-KM4. La question qui s'impose à ce stade de l'étude : Comment expliquer la différence de réponse des deux lignées cellulaires ?

III.2.3 Mesure de l'activité de la PC-PLC dans les cellules CF-KM4 et MM39

Afin de confirmer le rôle important que joue la PC-PLC dans le relargage de l'AA dans les cellules CF-KM4, nous avons pensé à mesurer son activité avec le kit « « Amplex® Red Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C » » (Molecular Probe, France). Comme expliqué dans la fiche technique n°12, cette technique se base sur un principe simple qui aboutit au dosage d'une fluorescence émise à 640 nm après excitation à 530 nm. En absence d'autre technique de dosage de l'activité de la PC-PLC *in vitro*, l'utilisation de ce kit était plus que nécessaire.

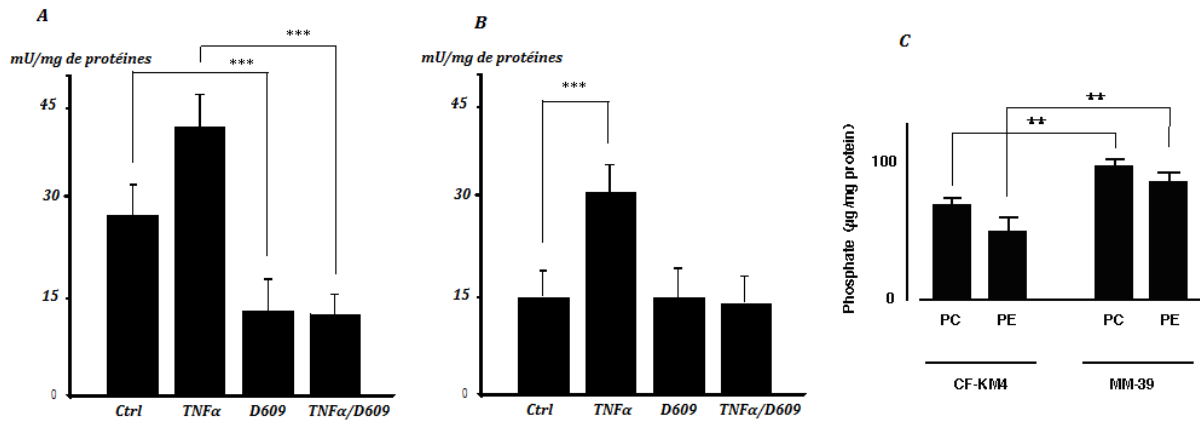


Figure 19: Mesure de l'activité de la PC-PLC dans les cellules CF-KM4 (A) et MM39 (B) et de la composition des membranes en PE et PC (C). Les cellules CF-KM4 et MM39 ont été incubées en présence ou en absence de TNFα (10ng/ml) et du D609 (50µg/ml) pendant 12h. Le lysat cellulaire de chaque échantillon a été prélevé et utilisé pour le dosage de l'activité PC-PLC. (C) La composition lipidique en PE et PC des cellules MM39 et CF-KM4 a été estimée par chromatographie en couche mince suivant la technique de Bligh and Dyer's suivi par la quantification de leur contenu en phosphates (voir fiche technique n°7). Le résultat est représentatif de trois expériences réalisées en triple (*** : $p < 0.001$) et (** : $p < 0.01$).

Les résultats du dosage de l'activité de la PC-PLC (figure 19 A et B) montrent, comme attendu, que l'activité PC-PLC est bien plus importante à l'état basal dans les cellules CF-KM4 que dans les cellules MM39. Cette observation vient s'associer avec les résultats obtenus avec le relargage de l'AA qui montrent un relargage basal important dans les cellules CF. D'un autre côté, on observe une augmentation de l'activité de la PC-PLC après stimulation des deux lignées cellulaires avec du TNFα. Un contexte inflammatoire contribue donc à l'élévation de l'activité de la PC-PLC. D'un autre côté, les mesures du rapport (Figure 19 C) entre PE/PC dans chaque lignée cellulaire ne montrent pas de différences significatives ce qui suggère que la disponibilité du substrat pour la PC-PLC, en occurrence la PC, n'est pas affectée entre les deux lignées cellulaires. Par contre, nous trouvons une moindre quantité des espèces PC et PE dans les cellules CF-KM4 ce qui suggérerait une plus forte consommation ou utilisation de ces composés par les cellules.

Cette expérience nous a également permis de vérifier que le D609 inhibe bien l'activité de la PC-PLC dans les deux lignées cellulaires (figure 19A et 19B).

En conclusion, le D609 nous a permis de mettre en évidence une activité élevée de la PC-PLC dans les cellules CF, qui serait responsable de l'augmentation de la production de l'AA à l'état basal. L'acide arachidonique est le précurseur des médiateurs lipidiques qui caractérisent l'inflammation chronique dans la mucoviscidose où les médiateurs lipidiques jouent un rôle essentiel dans cette chronicité. A ce niveau, la thérapie anti-inflammatoire a comme objectif, entre autres, de réduire la production excessive de ces médiateurs afin de contrôler la réaction inflammatoire.

III.2.4 Effet du D609 sur l'expression et l'activité de la Cyclo-oxygénase 2

Nous nous sommes intéressés dans cette partie de l'étude à l'expression génique de la Cox-2. Cette dernière fait partie d'une famille d'enzymes inductibles par de multiples facteurs pro-inflammatoires comme les cytokines et les interférons qui modulent son activité et son expression. Ainsi, la surexpression de la COX-2 reflète un état inflammatoire dans la cellule. L'autre cyclo-oxygénase, dite Cox-1 serait une enzyme constitutivement exprimée par les cellules. Étant donné qu'un des devenir de l'AA dans les cellules est d'être métabolisé par les cyclooxygénases ce qui permet de produire des médiateurs lipidiques, constituants importants de la réaction inflammatoire, l'étude de l'expression de ces cyclooxygénases est importante afin de voir si l'augmentation de relargage de l'AA par les cellules CF-KM4 est associée à cette voie Cox.

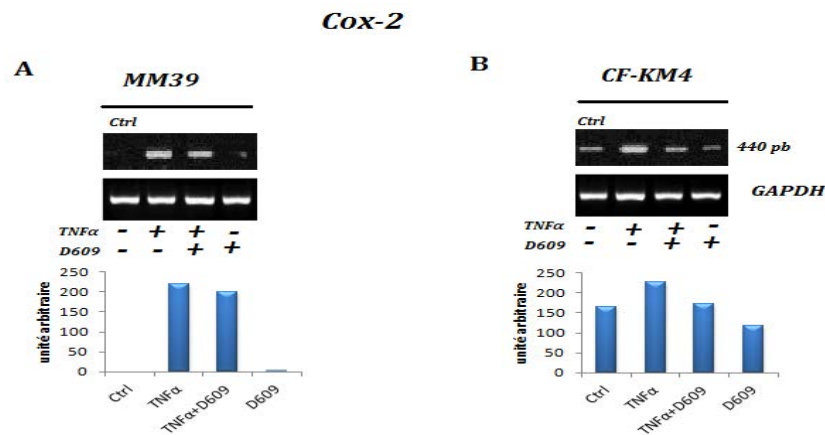


Figure 20 : Effet de TNF α et du D609 sur l'expression de la cyclo-oxygénase-2 par les cellules MM39 (A) et CF-KM4 (B). Les cellules ont été pré-incubées ou non avec du TNF α (10ng/ml) et du D609 (50 μ g/ml) pendant 8h. L'ARN total a été extrait et analysé par RT-PCR avec les amorces spécifiques de COX-2 et de la GAPDH. Cette figure est representative de 3 expériences différentes.

Dans la figure 20, l'étude de l'expression de la Cox-2 montre une expression constitutive dans les cellules CF et une absence de cette expression à l'état basal dans les cellules MM39. Ceci suggère encore une fois, que l'état physiologique des deux lignées est différent et il est en faveur d'un état inflammatoire qui caractérise les cellules CF. On suppose que la mutation de *CFTR* contribue à l'augmentation de certains marqueurs de l'inflammation. Par ailleurs, les deux lignées cellulaires répondent à la stimulation par le TNF α par une surexpression de la Cox-2 ce qui vérifie le caractère inducible de cette enzyme.

Nous avons montré par ailleurs, que le relargage de l'AA est augmenté dans les cellules CF à l'état basal par rapport aux cellules normales. La Cox-2 induite métabolise cet AA en plusieurs autres médiateurs lipidiques. Nous avons voulu ainsi vérifier si la suractivation de la PC-PLC pourrait être liée à cette induction constitutive de la Cox-2 dans les cellules CF.

La figure 20 montre aussi par RT-PCR semi-quantitative que l'effet de l'inhibition de la PC-PLC par l'incubation des cellules CF avec le D609 réduirait l'expression génique basale de la Cox-2 dans ces cellules. Nous suggérons alors que la sur-activation de la PC-PLC serait

impliquée dans l'expression constitutive de la *Cox-2* dans les cellules CF. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons stimulé les cellules CF et non CF avec du $TNF\alpha$. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de la *Cox-2* après stimulation dans les deux lignées cellulaires. Ceci est concordant avec les données de la littérature qui confirment cette observation (200).

Quel serait alors l'effet du D609 sur cette surexpression induite par le $TNF\alpha$? La figure 20 montre encore une fois une diminution de l'expression de la *Cox-2* induite par le $TNF\alpha$ après incubation avec le D609. Ceci suggère que la suractivation de la PC-PLC est impliquée dans la modulation de l'expression génique, constitutive ou induite par stimulation au $TNF\alpha$, de *Cox-2*. Qu'en est-il alors de l'expression en protéine de cette enzyme ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la technique du Western blot afin de juger la quantité de protéines présentes dans les cellules CF. Nous avons aussi voulu vérifier si on retrouve les mêmes résultats que ceux obtenus avec l'étude de l'expression génique.

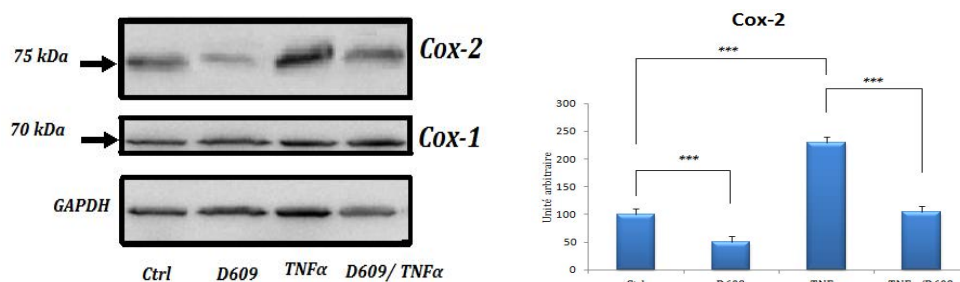


Figure 21 : Mesure de l'expression protéique de Cox-1 et 2 dans les cellules CF-KM4 par Western Blotting. Les cellules ont été soit incubées avec le $TNF\alpha$ seul pendant 8h ou pré-incubées pendant 12h avec du D609 (50 $\mu g/ml$) puis avec le $TNF\alpha$ (10 ng/ml) pendant 8h. Le Western Blot a été réalisé trois fois avec des anticorps Anti-Cox-1, Anti-Cox-2 et Anti-GAPDH (*** : $p < 0.001$). (Fiche technique n°20, 21 et 22).

La figure 21 montre qu'avec la technique du Western Blot on retrouve une quantité de Cox-2 plus importante dans les cellules stimulées avec le $TNF\alpha$, mais aussi une expression

basale en protéines dans les cellules CF contrôle (Ctrl). Ceci va dans le même sens que les résultats obtenus au niveau génique de *Cox-2*.

D'un autre coté, la pré-incubation des cellules avec le D609 atténue l'expression de *Cox-2* stimulée par le TNF α et le D609 incubé seul sur les cellules réduit toujours l'expression basale de *Cox-2*.

Enfin, le taux de *Cox-1* reste inchangé dans les différentes conditions. Nous suggérons qu'au temps d'incubation des cellules (plusieurs heures), seule la *Cox-2* est mobilisée dans la réaction inflammatoire. Dans la littérature, il est décrit qu'au début de la réaction inflammatoire *Cox-1* serait activée en premier. Au fur et à mesure du déroulement de la réaction inflammatoire, la *Cox-2* serait plus active que la *Cox-1* vis-à-vis de leur substrat commun, l'acide arachidonique.

En final, les résultats du Western blot et de la RT-PCR vont dans le sens d'un lien entre la suractivation de la PC-PLC et l'expression au niveau génique ou protéique de *Cox-2*.

Une modulation de l'expression de *Cox-2* dans les cellules CF par la PC-PLC laisse présager que l'activité de *Cox-2* serait, elle aussi, influencée par cette phospholipase. Nous avons alors considéré dans la suite de l'étude, comme marqueur de l'activité de notre enzyme, le taux de production d'une prostanoïde, la PGE₂, par les cellules CF et non CF.

En effet, les prostanoïdes, comme les PGE₂, sont des produits de la voie cyclo-oxygénase qui métabolise l'AA. Ce dernier est séquentiellement oxydé en prostaglandine G₂ (PGG₂) et transformé en un intermédiaire lipidique instable, la PGH₂. Ce dernier composé est rapidement converti en divers prostanoïdes dont la PGE₂.

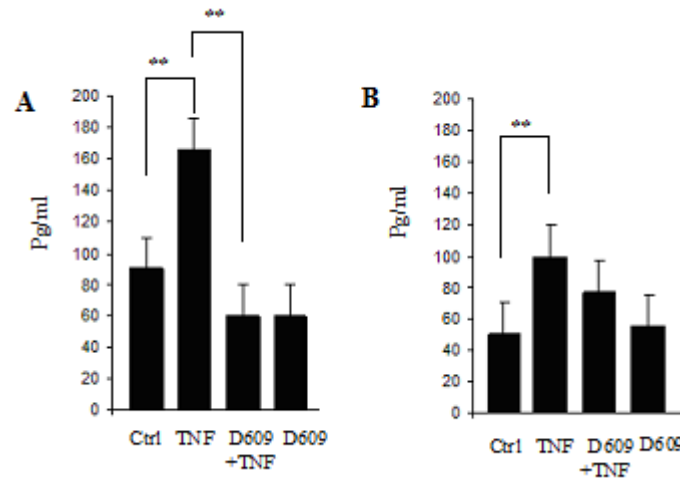


Figure 22 : Mesure du relargage du PGE2 par les cellules CF-KM4 (A) et MM39 (B) par ELISA. Les cellules ont été incubées avec les différents agents : 10ng de TNF α et 50 μ g/ml de D609 pendant 8h. Cette figure est representative de 3 expériences différentes. (** : $p < 0.01$).

Le profil des histogrammes (figure 22) correspondant à la sécrétion de PGE2 par les deux lignées cellulaires est similaire à celui du relargage de l'AA. En effet, on retrouve une surproduction de PGE2 suite à la stimulation des cellules CF ou non CF avec le TNF α . Cette surproduction est plus marquée dans le cas des cellules CF comparée aux cellules non CF. Cependant, l'inhibition de la PC-PLC par le D609 a permis, dans le cas des cellules CF, de réduire la quantité de PGE2 synthétisée par les cellules à un niveau inférieur à celui du contrôle CF et similaire à celui des cellules non CF contrôles.

En conclusion, nos résultats, jusque là, associent la suractivation de la PC-PLC dans les cellules CF à :

- 1/ l'augmentation du relargage de l'AA arachidonique.
- 2/ l'expression constitutive de la Cox-2.
- 3/ l'augmentation de la production de PGE2.

III.2.5 L'implication de la PC-PLC dans l'expression de l'interleukine 8 dans les cellules CF.

Comme nous avons observé dans nos résultats ultérieurs, une augmentation de la sécrétion de la PGE2 et de l'AA dans notre modèle cellulaire CF, nous avons voulu dans cette partie de l'étude nous intéresser à une cytokine qui constitue un marqueur important de l'inflammation dans la mucoviscidose qui est l'IL-8. Cette cytokine est notamment connue comme le principal facteur chimiotactique des polynucléaires neutrophiles induisant un afflux de ces derniers au niveau bronchique et alvéolaire.

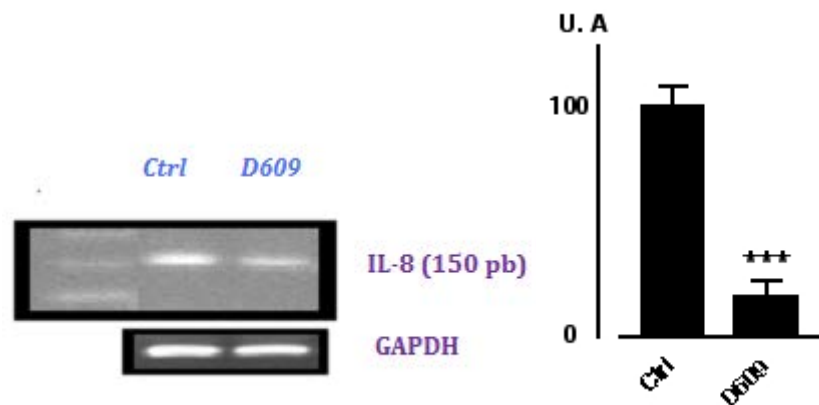


Figure 23: Etude de l'expression de l'IL-8 dans les cellules CF-KM4. Les cellules CF ont été incubées avec D609 (50µg/ml) pendant 6h. Ensuite, l'extraction de l'ARN et la RT-PCR ont été effectuées (fiche technique °16). U.A : unité arbitraire. Les résultats sont représentatifs de trois expériences différentes (***) : $p < 0.001$.

L'étude de l'expression d'IL-8 par RT-PCR (figure 23), semi-quantitative, dans les cellules CF montre sa diminution après incubation des cellules avec le D609. Cette observation suggère que l'expression d'IL-8 soit elle aussi associée à l'activité élevée de la PC-PLC qu'on décrit ici dans les cellules CF. Le mécanisme général de cette modulation reste

inconnu. Cependant, nous avons essayé d'explorer une des voies de régulation qu'on pense être impliquée dans cette modulation.

En effet, la PC-PLC hydrolyse les PC et libère de la Phosphocholine et du DAG. Ce dernier constitue un puissant second messager intracellulaire, impliqué dans plusieurs voies de régulation de l'expression de divers gènes.

Nous avons utilisé un Kit Amplex Red pour mesurer l'activité de la PC-PLC. Bien que le Kit ne dose que la quantité de phosphocholine libérée, nous en déduisons que la quantité de DAG est elle aussi élevée étant donné qu'une molécule de PC hydrolysée est équivalente à une molécule de phosphocholine et une molécule de DAG libérée.

Le DAG libéré a plusieurs destinations : il est soit dégradé par des enzymes comme les lipases (DAG lipases) afin de libérer de l'AA ou fixé par le domaine C1 sur des protéines jouant un rôle dans la régulation de la transcription des gènes comme la PKC. Une fois la PKC activée par la fixation du DAG sur son domaine C1, elle migre du cytosol vers la membrane cytoplasmique où elle se fixe et phosphoryle plusieurs protéines cibles impliquées dans plusieurs voies de signalisations intracellulaires.

Afin de vérifier une potentielle implication de la PKC dans la régulation de l'expression de l'IL-8 par la PC-PLC, nous avons incubé les cellules CF avec du 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (DOG) qui est un analogue du DAG, la Calphostin C, inhibiteur spécifique de la PKC et nous avons suivi l'expression de l'IL-8 par RT-PCR semi-quantitative.

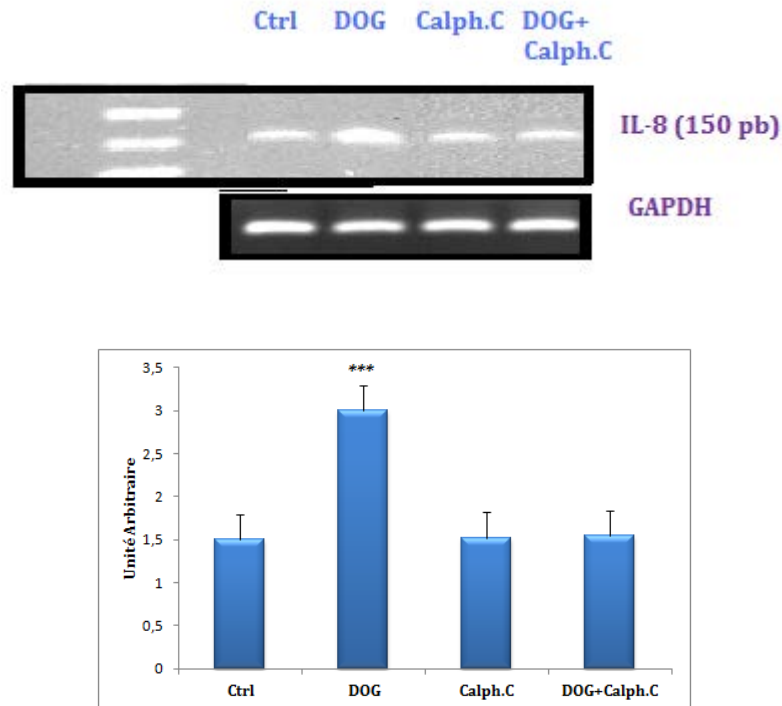


Figure 24: Etude de l'expression de l'IL-8 en présence d'effecteurs de la PKC. Les cellules ont été incubées avec les agents suivants : Calphostine C (100ng/ml), un inhibiteur de la PKC, le DOG (10 μ M), un activateur de la PKC, ou avec le mélange des deux pendant 8h. La RT-PCR semi-quantitative a été ensuite réalisée (fiche technique n°16). Cette figure est representative de 3 expériences différentes. (*** : $p < 0.001$).

Selon les résultats obtenus avec la RT-PCR (figure 24), l'activateur de la PKC, le Dioctylglycerol, induirait une augmentation de l'expression génique de l'IL-8. La calphostine C, inhibiteur spécifique des PKC, réduirait l'expression d'IL-8, induite par le DOG, à un niveau d'expression basale. Ce constat a été observé plusieurs fois en RT-PCR semi-quantitative ($p < 0.05$) et vérifié en ELISA (cf. figure 25).

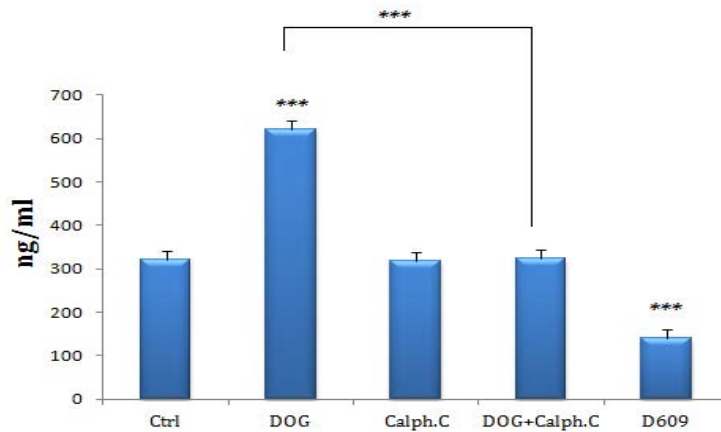


Figure 25 : Dosage de l'IL-8 par ELISA. Le surnageant des cellules CF a été prélevé après incubation des cellules avec les différents agents : D609 (50µg/ml) pendant 8h, Calphostin C (100 ng/ml) seul pendant 8h ou avec DOG (10µM). Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en triplicates. (***) : $p < 0.001$). Fiche technique n°11.

Bien que ces résultats préliminaires nécessitent d'être approfondis par le dosage de l'activité PKC et le suivi de la phosphorylation des facteurs de transcription cibles pour la PKC comme NFκB, après stimulation avec le DOG et/ou D609, afin de confirmer notre hypothèse, nous pensons, qu'à ce stade de l'étude, ces résultats soulignent l'intérêt de la voie DAG-PKC dans la modulation de l'expression d'IL-8 par la PC-PLC.

III.2.6 L'Implication de la PC-PLC dans les défauts de réponse aux sécrétagogues

Dans la suite de l'étude du lien entre la PC-PLC et les défauts de sécrétion observés dans la mucoviscidose et caractérisés dans nos cellules CF, nous nous sommes intéressés à la sécrétion de la protéine SLPI.

Le SLPI est produit en grande quantité sous forme inactif dans le liquide épithélial de surface par les cellules glandulaires de la sous muqueuse bronchique. Ayant principalement

une activité antibactérienne, il est impliqué dans la défense innée constitutive de l'épithélium respiratoire et constitue un marqueur spécifique de la fonction biologique des cellules en culture et un bon marqueur aussi de la sécrétion épithéliale. Nos deux lignées cellulaires (MM39 et CF-KM4) produisent le SPLI (178) à des taux différents où les cellules CF présentent une production basale plus importante.

Kammouni. *et al.* ont montré qu'il y'a un défaut de sécrétion de SLPI en réponse aux agonistes cholinergiques et adrénergiques dans les cellules CF-KM4 et que ce défaut est corrigé suite à la transfection de ces cellules CF avec le gène *CFTR* (201).

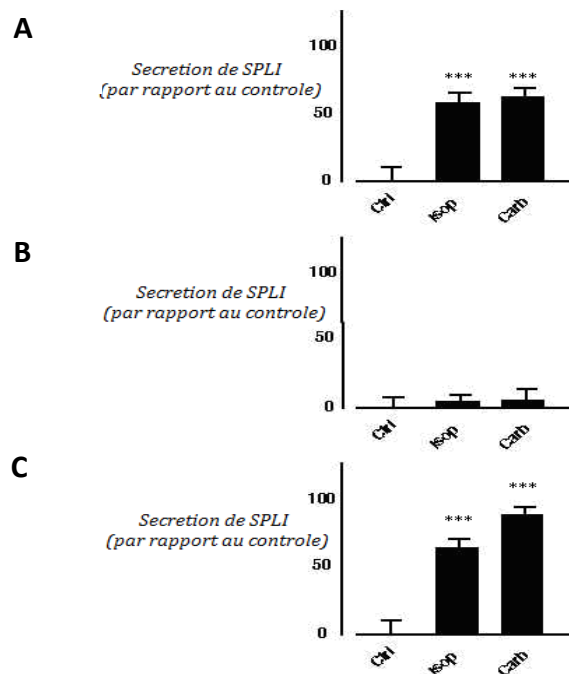


Figure 26 : Réponse des cellules MM39 (A) et les cellules CF-KM4 (B, C) aux agonistes cholinergiques et adrénergiques. Les cellules CF-KM4 (C) ont été pré-incubées avec le D609 (50µg/ml) pendant 12h. Pour chaque expérience, la sécrétion de SPLI par les cellules a été mesurée par ELISA après stimulation à 100µM d'Isoterénol et 100µM de Carbachol. Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (***) : $p < 0.001$. Fiche technique n°10.

Nous avons cherché alors à savoir si la PC-PLC serait impliquée dans ces défauts de réponses. Les résultats du dosage de SPLI obtenus par ELISA après stimulation des cellules avec du Carbachol, un analogue de l'acétylcholine et agoniste non sélectif des récepteurs muscariniques et nicotiniques, montrent que l'inhibition de la PC-PLC avec le D609 permet de rétablir la capacité des cellules CF à répondre aux secrétagogues (Iso et Carb.) par la sécrétion de SLPI de manière similaire aux cellules MM39. Le même résultat est obtenu après stimulation des cellules CF avec l'Isoprotérénol qui est un agoniste β -adrénergique bronchodilatant et vasorelaxant (figure 26).

Ces résultats suggèrent qu'en absence de CFTR, il y'a une désensibilisation des récepteurs adrénériques et cholinériques. Naren et al. (202) ont montré que CFTR et les récepteurs β -adrénériques fixent, grâce à leur domaine PDZ, un complexe de : protéines (ezrin/radixin/NHERF) formant ainsi un plus grand complexe macromoléculaire. Ces domaines PDZ permettent à CFTR d'interagir avec les protéines du cytosquelette ce qui permet ainsi la régulation de sa fonction. D'un autre côté, il a été montré aussi que la réponse aux agonistes cholinériques et β -adrénériques par les glandes sudorales est perturbée dans la mucoviscidose (203).

Parallèlement, la désensibilisation a été démontrée pour différents récepteurs parmi lesquels le récepteur β 2-adrénérique (204), le récepteur muscarinique m2 (205) ou encore le récepteur α 1 β -adrénérique (206) cela fait intervenir la protéine kinase A (PKA) activée par l'AMPc ou la protéine kinase C (PKC) activée par les diacylglycérols. La désensibilisation hétérologue par la PKC a été démontrée pour le récepteur muscarinique m1 (207). En effet, les protéines kinases A ou C (PKA, PKC) activées par les seconds messagers (AMPc, calcium et DAG) phosphorylent le récepteur indépendamment de son état conformationnel. Cette phosphorylation se traduit par le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine cytosolique, la β -arrestine, qui prend probablement la place de la protéine G sous le récepteur (208). Cette étape de translocation marque l'arrêt de la signalisation cellulaire induite par le récepteur activé. Ainsi, on suggère qu'une activité augmentée de la PC-PLC dans les cellules CF, induirait une production élevée du DAG et une activation plus importante de la PKC. Cette dernière serait responsable de l'augmentation de l'expression de l'IL-8 et de la désensibilisation des récepteurs β -adrénériques et cholinériques.

III.3 Conclusion

Nous avons abordé dans cette première partie du travail un mécanisme important impliqué dans l'expression et la sécrétion d'un certain nombre de marqueurs de l'inflammation dans la mucoviscidose. Ce mécanisme met en jeu une phospholipase particulière, la phosphatidylcholine-phospholipase C. Cette phospholipase est responsable de l'hydrolyse des phospholipides membranaires afin de générer du diacylglycerol et de la phosphocholine. Nos résultats suggèrent une implication de cette enzyme dans le relargage important de l'AA par les cellules CF. Ceci est d'autant plus surprenant que l'utilisation des effecteurs contre deux autres PLA2 (iPLA2, cPLA2) ne montre pas d'effet sur ce taux de relargage. Pourtant, il est connu que ces enzymes sont responsables de la génération de l'AA dans plusieurs pathologies inflammatoires et qu'elles hydrolysent les phospholipides membranaires au niveau de la position dite « sn-2 » préférentiellement occupée par les AA. Certaines équipes décrivent un rôle important de la DAG lipase dans la production de l'AA à partir de l'hydrolyse du DAG produit essentiellement par les PLC. Dans notre étude, cette lipase semble ne pas être, non plus, responsable du taux de relargage basal de l'AA élevé dans les cellules CF.

Nous supposons que, bien que l'activité de la PC-PLC soit responsable d'un relargage important en AA dans notre modèle cellulaire CF, une autre phospholipase pourrait être activée suite à l'action de la PC-PLC. Des résultats préliminaires, en attente de confirmation, montrent que l'ajout de sPLA2 sur les cellules CF induit une augmentation de l'expression d'IL-8 par RT-PCR, cette augmentation est inhibée par le BPB, un inhibiteur spécifique de la sPLA2. Des expériences sont poursuivies dans ce sens afin d'explorer l'implication de cette phospholipase dans le relargage de l'AA par les cellules CF.

Medjane. S et *al.*, (2009) ont montré que l'expression basale de la sPLA2A dans les cellules CF (CFT-2) est élevée par rapport aux cellules NT-1 (non CF) et que cette expression est stimulée par le LPS. Selon les mêmes auteurs, la sPLA2 serait activée par l'augmentation de production du PGE2. Dans notre étude, on suppose que la suractivation basale de la sPLA2

serait responsable de la synthèse de la PGE2 dans nos cellules. Nous travaillons actuellement à confirmer cette hypothèse.

Nous avons supposé que la disponibilité du substrat PC dans la lignée CF-KM4 était responsable de la différence d'activité de la PC-PLC entre les cellules CF et non CF. La mesure du rapport PE/PC dans les deux lignées n'a pas montré de différences significatives ce qui suggère encore une fois que l'activité PC-PLC est modulée par un contexte cellulaire associé à la dysfonction de CFTR. La suite de l'étude prévoit la mesure de cette activité sur des cellules MM39 transfectées avec un anti-sens dirigé contre l'ARNm CFTR.

Le D609 est connu pour être un inhibiteur spécifique de la PC-PLC dans plusieurs types cellulaires avec une IC50 de l'ordre de 50 µg/ml (200 µM). Par ailleurs, d'autres équipes suggèrent que ce dernier soit aussi un inhibiteur de la PC-PLD (210) ou la sphingomyelinase. Cependant, la mesure de l'activité de la PC-PLC montre une inhibition importante de celle-ci par le D609 et l'utilisation d'effecteurs contre les différentes phospholipases dont la PLD ne reproduit pas l'effet obtenu avec le D609. En absence de l'identification de la séquence du gène correspondant à la PC-PLC, il y'a pas de siRNA dirigé contre celle-ci et il y' a pas non plus d'autres inhibiteurs spécifiques connus. Le seul moyen d'étude de la PC-PLC se réduit à l'heure actuelle encore à l'utilisation du D609.

Une autre observation importante tirée des résultats concerne les caractéristiques de sécrétion basale et constitutive des cellules CF. Les cellules CF non stimulées ont un métabolisme d'AA plus important. Ceci est reflété par une production plus élevée de PGE2. L'expression d'IL-8, de Cox-2 et de SLPI est également plus importante que celle trouvée dans les cellules non-CF. Ceci, suggère que la dysfonction de CFTR générerait un état physiologique caractéristique de l'inflammation même en absence de toute infection bactérienne. Afin de vérifier que ces défauts ne sont pas caractéristiques de notre modèle cellulaire, nous comptons reprendre les expériences ultérieurement avec d'autres modèles cellulaires glandulaires CF ou non comme les lignées Calu3 ou encore la lignée MM39 (cftr/-) décrite dans le chapitre suivant.

Nous avons choisi d'étudier une cytokine produite de façon élevée dans la mucoviscidose qui est l'interleukine-8. Celle-ci est surexprimée et semble être régulée par la voie

PC-PLC/DAG/PKC. Cependant, il a été montré sur divers modèles cellulaires que le métabolisme de l'AA peut moduler l'expression de l'IL-8 aussi via la PGE2. La stimulation des fibroblastes par IL-1 β permettrait l'augmentation de la sécrétion de PGE2 ce qui induit une surproduction d'IL-8 (211). Nous comptons vérifier cette hypothèse dans nos cellules. En effet, la PC-PLC apparaît, dans notre étude, impliquée dans l'activation de la voie Cox-2/PGE2 d'un côté et de la PC-PLC/DAG/PKC de l'autre côté. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si l'augmentation de la production de PGE2 serait liée aussi à la modulation de l'expression de l'IL-8.

Bien que notre étude propose la PC-PLC comme une cible anti-inflammatoire dans la mucoviscidose, il est encore difficile pour nous d'expliquer que d'autres phospholipases comme les PLA2 cytosoliques ne soient pas impliquées dans la modulation de nos marqueurs étudiés. Il faut noter par ailleurs, que les anti-inflammatoires non stéroïdiens utilisés dans la mucoviscidose, comme l'ibuprofène, montrent une certaine efficacité mais à fortes doses avec des effets secondaires qui peuvent induire des complications aboutissant à termes à l'arrêt du traitement. L'utilisation de l'ibuprofène sur les cellules CF-KM4 montre effectivement une diminution de l'expression de l'IL-8 qui n'est pas aussi drastique que l'effet trouvé après utilisation du D609.

En conclusion, nous montrons (figure 27) une forte activité de la PC-PLC dans les cellules CF-KM4. Nous émettons l'hypothèse que cette forte activité serait responsable d'une production de DAG qui active la PKC, conduisant à une production/activation (?) de sPLA2 responsable en retours d'une surproduction basale d'AA, de PGE2 et une augmentation de l'expression du gène de *l'IL-8*.

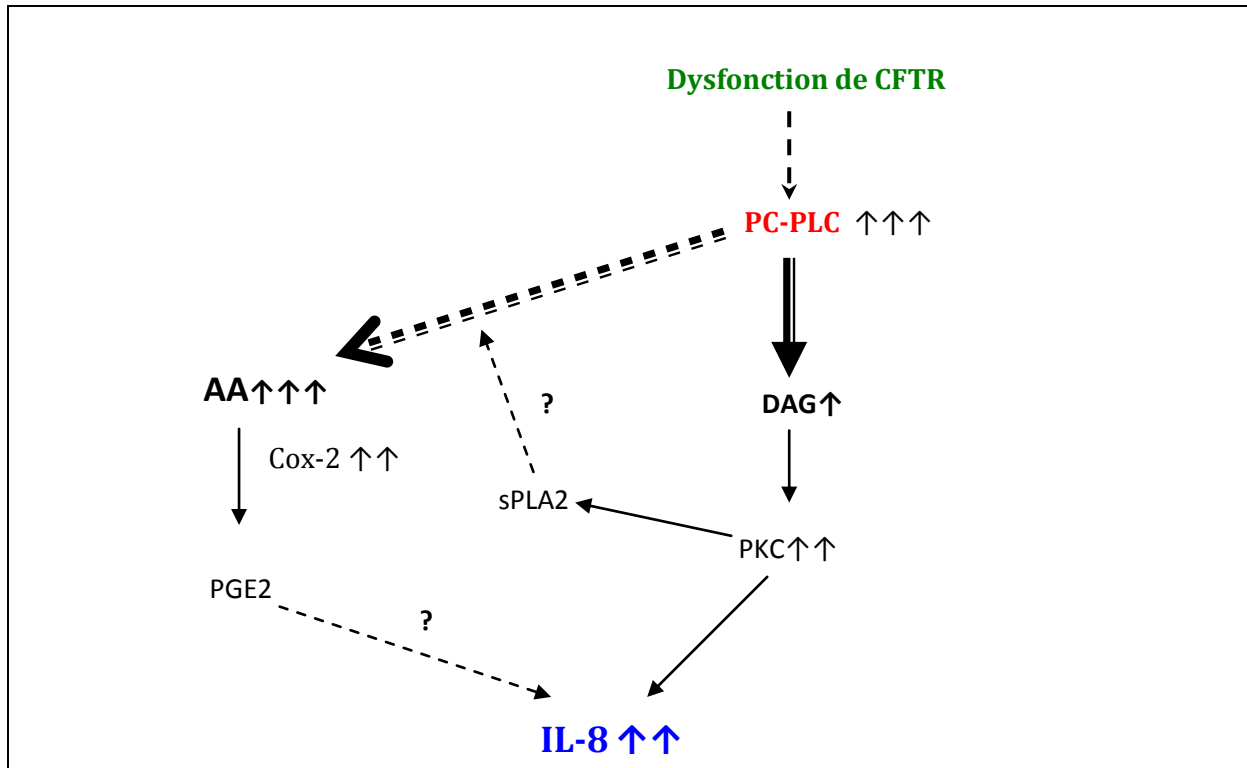


Figure 27 : Schéma hypothétique du mécanisme d'implication de la PC-PLC dans la Mucoviscidose. L'activité de la PC-PLC est augmentée dans les cellules CF. Il semble que cette suractivation soit liée au dysfonctionnement de CFTR. Les conséquences de l'action de la PC-PLC sont une augmentation d'un certain nombre de marqueurs de l'inflammation.

Deuxième partie : L'étude des transporteurs PEPT1 et PEPT2 dans les cellules glandulaires humaines Mucoviscidosiques.

IV.1 Introduction

Les transporteurs de peptides sont des membres de la famille, dite SLC15. Cette famille de transporteurs, connue pour son rôle dans l'absorption cellulaire des xénobiotiques, constitue un sous-groupe d'une plus grande famille de transporteurs d'oligopeptides (POT). Ces transporteurs de peptides n'utilisent pas directement de l'ATP pour leur activité, mais l'énergie produite par une différence de potentiel électrochimique créé par un transport actif primaire. Les deux principaux transporteurs de cette famille (PEPT1 et PEPT2) ont des rôles physiologiques très variés. Ils sont connus, principalement, pour leur fonction comme transporteurs de di- et tri-peptides. Ce transport est couplé à un transport de protons.

Le PEPT1 est essentiellement exprimé sur la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin grêle et des tubules rénaux et biliaires. Tandis que le PEPT2 est présent dans de nombreux organes tels que les reins, le cerveau, les poumons, l'hypophyse, les glandes mammaires et les organes reproducteurs (212, 213, 214).

Les transporteurs PEPT1 et PEPT2 ont une très grande spécificité de substrat et une grande capacité de translocation des médicaments peptidomimétiques tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine comme le captopril, l'énalapril et le fosinopril (215) ou encore les β -lactamines (216). Aujourd'hui, la contribution de ces deux transporteurs dans la biodisponibilité des médicaments de type peptidique utilisés en clinique est bien étudiée.

La thérapie par inhalation représente une voie intéressante pour les traitements contre les infections pulmonaires. Plusieurs agents anti-infectieux dirigés contre les agents pathogènes des voies respiratoires sont des substrats pour PEPT1 et/ou PEPT2 comme la pénicilline, les

céphalosporines et les médicaments antiviraux : valaciclovir et valganciclovir (217). Ainsi, la présence de ces transporteurs de peptides dans les voies respiratoires est importante étant donné que ces derniers sont impliqués directement dans l'absorption et la distribution de ces composés anti-infectieux ainsi que de leur efficacité (218).

Chez l'homme, les transporteurs PEPT1 et PEPT2 sont composés de 700 à 730 acides aminés qui forment douze domaines transmembranaires dont le neuvième et le dixième sont liés par une grande boucle extracellulaire (219). Les domaines transmembranaires 1-4 et 7-9 ont été caractérisés comme étant nécessaires à la fixation et l'affinité pour le substrat (220, 221, 222). D'autre part, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les résidus essentiels pour la régulation et le contrôle du transport tels que l'affinité pour le substrat et la vitesse du transport (223, 224).

Les études cinétiques ont mis en évidence l'effet de la concentration extracellulaire en protons sur la cinétique de ces transporteurs et l'implication majeure de deux histidines (His) dans la fixation des substrats sur le PEPT1 et le PEPT2 ; His57 et His121 pour PEPT1 et His87 et His142 pour PEPT2 (225). Le traitement avec le diéthylpyrocarbonate (DEPC), un réactif qui permet la modification des résidus histidines, se traduit par une inhibition complète du transport des peptides. Bien que l'implication de l'His57 et l'His87 ait bien été mise en évidence dans la fixation des peptides respectivement sur le PEPT1 et le PEPT2, le mécanisme exact de ce transport reste encore mal connu (226, 227, 228).

Les expériences sur l'expression du PEPT2 dans les poumons montrent une présence importante de ce dernier dans les poumons humains, de lapins (229,230), de rats (231) et de souris (232). En revanche, selon ces mêmes études, le PEPT1 semble être absent dans cet organe. Récemment, on a montré que ce transporteur n'est pas complètement absent dans l'appareil respiratoire humain comme cela a été suggéré mais qu'il est plutôt présent dans une moindre mesure que le PEPT2. Le transporteur PEPT1 a même été détecté avec une forte expression par RT-PCR dans les cellules bronchiques humaines Calu-3 (233) et dans les cellules 16HBE14o- suggérant ainsi son implication dans le transport peptidique au niveau de l'épithélium des voies aériennes (tableau 4).

	hBEpC	Calu-3 jour 15	Calu-3 jour 8	16HBE14 jour 11	16HBE1o jour18	BEAS-2B	A549	Caco-2	Bleasby et al. 2006
PEPT1	-	+	++	+	++	+	+	+++	-
PEPT2	++	+	++	+	++	++	+	+++	++
b-Actin	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Tableau 4 : Expression des PEPT1 et PEPT2 en RT-PCR selon S. Endtera et al. (234). Intensité du signal : - , pas d'expression; + , expression faible ; ++ , expression modérée ; +++ , expression élevée. La dernière colonne représente l'intensité de l'expression dans le tissu pulmonaire issue d'une banque de 1900 gènes (235).

Grâce à sa forte expression pulmonaire, plusieurs études utilisant des techniques d'immunohistochimie ont pu étudier la distribution de PEPT2 chez le rat, la souris (236) ou encore dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose (237). Chez tous ces sujets étudiés, une forte expression de PEPT2 a été observée dans le pôle apical des cellules épithéliales des voies aériennes, dans le cytoplasme des pneumocytes de type II et sur l'endothélium des petits vaisseaux sanguins.

Dans l'intestin, le transporteur PEPT1 régule la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires suite aux stimulations par des bactéries et / ou par des produits bactériens. Il joue ainsi un rôle important dans l'induction de la colite. Il semble être impliqué aussi dans le transport des antigènes bactériens, tels que le muramyl-dipeptide et le tripeptide : l'acide L-Ala-gamma-D-Glu-méso-diamino-pimelique, dans les macrophages. Ces derniers, une fois transportés à l'intérieur de la cellule, peuvent être fixés sur des récepteurs NBS/LRR (nucleotide binding site/leucine-rich repeat) altérant ainsi l'homéostasie du microbiote intestinal (238).

IV.2 Objectif de l'étude

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (*cf.* paragraphe 1.5.1), la mucoviscidose est caractérisée par une infection bactérienne qui entretient une réponse inflammatoire chronique des cellules épithéliales ce qui conduit à terme à une défaillance respiratoire. L'antibiothérapie constitue la prise en charge majeure des infections et l'administration des antibiotiques par aérosols dans ces cas présente des avantages en termes d'effets secondaires et d'efficacité comparée à celle par voie systémique.

Une des questions qui se pose lorsque l'on considère l'antibiothérapie est la lourdeur des traitements. Les cures d'antibiothérapie sont longues et font intervenir des doses élevées. Ces cures ne peuvent être entreprises d'ailleurs qu'en milieu hospitalier. Seules ces conditions permettent de contrôler (encore parfois que partiellement) l'infection pulmonaire. Les résistances importantes acquises par les bactéries participent sans doute à cet état de fait. Cependant on peut aussi se demander si l'hôte (c.a.d les cellules épithéliales pulmonaires) ne pourrait pas aussi participer à cette relative faible efficacité des antibiotiques sachant que les antibiotiques, pour atteindre la lumière bronchique, doivent être transportés par des transporteurs membranaires exprimés sur les cellules épithéliales.

Dans notre étude, nous nous sommes proposés de caractériser les transporteurs PEPT1 et PEPT2 impliqués notamment dans le transport des β -lactames utilisés dans la mucoviscidose.

IV.3 La Stratégie expérimentale

Notre objectif est ici d'étudier les transporteurs PEPT1 et PEPT2, et de rechercher si nous aurions des différences d'expression ou de fonction de ces transporteurs entre les cellules

normales et les cellules CF. Nous rechercherons dans un premier temps par RT-PCR l'expression de ces transporteurs. Dans un deuxième temps, nous évaluerons la fonction de transport transépithélial assurée par ces transporteurs dans nos modèles cellulaires. Ce transport sera déterminé par mesure du transport vectoriel d'un substrat fluorescent (fiche technique n°6). Ce transport sera caractérisé également avec l'utilisation d'autres substrats pour les PEPT1 et PEPT2 comme le céfadroxil ou le captopril (figure 28).

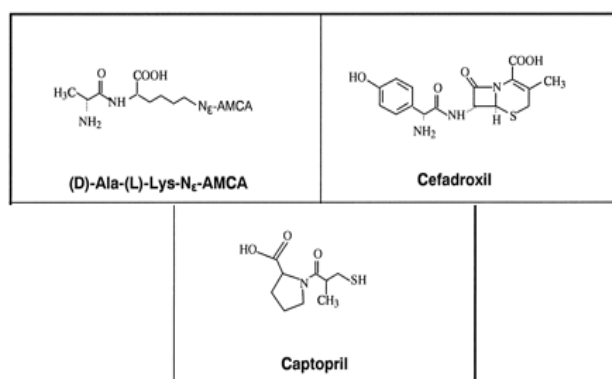


Figure 28 : Structures des substrats utilisés dans les études de transport. Le dipeptide fluorescent l'acide D-Ala-Lys-N ϵ -7-amino-4-methylcoumarin-3-acétique (D-Ala-L-Lys-AMCA) est utilisé comme substrat dans les études d'absorption *ex vivo* et les molécules cefadroxil et captopril comme des inhibiteurs par compétition.

IV.4 Les résultats

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressés en premier lieu à trois points essentiels :

D'abord, la caractérisation du transport d'antibiotiques par les cellules MM39 et CF-KM4 dans un système en double chambre. Ensuite, il était prévu d'étudier l'influence d'un

contexte pro-inflammatoire sur le transport vectoriel d'antibiotiques dans les cellules MM39. Dans un troisième temps, nous avons voulu rechercher l'impact potentiel des anti-inflammatoires sur l'activité de transport des deux transporteurs étudiés dans un contexte pro-inflammatoire sur les cellules MM39.

Il était d'abord nécessaire de vérifier, par RT-PCR, la présence de l'expression des deux transporteurs PEPT1 et PEPT2 par les lignées cellulaires utilisées : MM39, CF-KM4 et MM39-*CFTR*_(-/-).

IV.4.1 Etude des transporteurs PEPT dans les cellules MM39.

IV.4.1.1 Expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 dans les cellules MM39

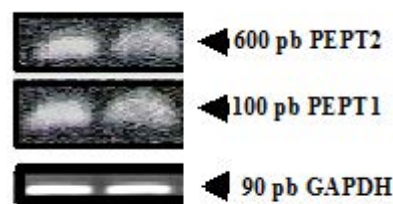


Figure 29: *Expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 par les cellules MM39. Une RT-PCR a été réalisée à partir des cellules MM39. L'expression du gène de référence GAPDH est indiquée.*

Nous observons une expression des deux transporteurs PEPT2 et PEPT1 dans la lignée cellulaire MM39 (figure 29). Ceci est à corrélérer avec des études antérieures (239) qui ont montré principalement une expression de PEPT2 et à moindre mesure une expression de PEPT1 dans le tissu pulmonaire.

IV.4.1.2 Étude du transport d'antibiotiques par les cellules MM39.

La stratégie utilisée est d'étudier le transport d'un substrat spécifique des PEPT1 et PEPT2 (l'Ala-lys-AMCA) par des cellules cultivées en double chambre. Il s'agit d'un dispositif expérimental (voir fiche technique n°6 et la figure n°30) qui permet d'accéder aux deux pôles cellulaires, le pôle apical et le pôle baso-latéral.

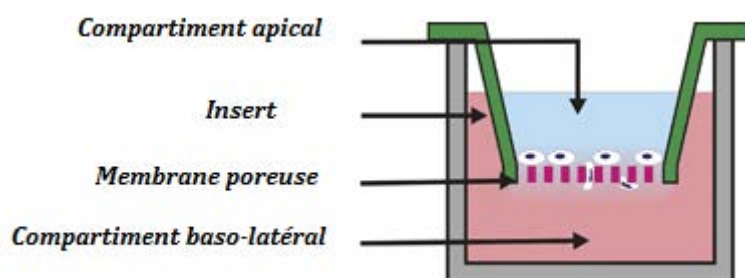


Figure 30 : Représentation schématique du système de culture cellulaire en double chambre pour les expériences d'étude du transport vectoriel.

Ce substrat fluorescent permet avec une très grande sensibilité de suivre la fonction de ces transporteurs en mesurant, simplement, la fluorescence transportée d'une chambre à l'autre, que ce soit du côté apical vers le côté baso-latéral ou inversement. Ces expériences ne peuvent être réalisées que si la monocouche épithéliale est non seulement étanche mais aussi polarisée. Ces derniers critères sont essentiels et ont été évalués de trois manières différentes. La première est l'observation visuelle. La différence de niveau de liquide dans les deux compartiments ne persiste que lorsque la couche est étanche. Nous avons aussi utilisé le glucose (4.5g/l au pôle basolatéral et 0 g/l au pôle apical) et les protéines totales mesurées par la technique de Bradford (6 g/l au pôle baso-latéral et 0 g/l au pôle apical) pour juger de l'étanchéité de la monocouche. Enfin, l'appareil Millicell-ERS de Millipore permet de mesurer la résistance transépithéliale de la monocouche. Les cellules ne seront utilisées que lorsque la résistivité aura atteint la valeur de 200-300 Ohm/cm².

IV.4.1.3 Cinétique du transport du substrat Ala-lys-AMCA

La première caractéristique que nous avons étudiée est la cinétique de transport. Nous avons déterminé les vitesses de transport à la fois du pôle baso-latéral vers le pôle apical et inversement du pôle apical vers le pôle baso-latéral. Les figures 31.A et 31.B montrent les résultats obtenus.

La figure 31.A montre que le transport est rapide puisque l'équilibre est atteint vers 8 heures d'exposition au substrat, temps au bout duquel 50% du substrat est passé. On observe aussi un phénomène de saturation puisque cette valeur de 50% semble être une limite du transport du substrat. La figure 31.B montre le transport du même substrat mais cette fois-ci du côté apical vers le côté baso-latéral.

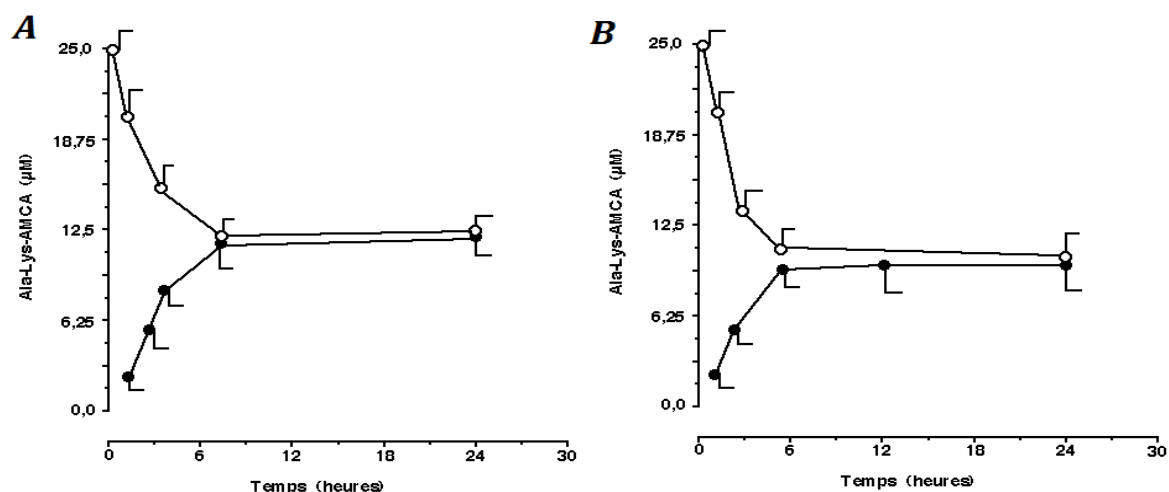


Figure 31 : Cinétique du transport du substrat Ala-Lys-AMCA par le transporteur PEPT2 du pôle baso-latéral vers le pôle apical (A) ou du pôle apical vers le pôle baso-latéral (B) dans les cellules MM39. 25 µM de substrat ont été déposés dans le pôle baso-latéral ou apical et la cinétique de passage de ce substrat a été mesurée dans le compartiment opposé (●). Inversement, la diminution du substrat dans le pôle où a été déposé le substrat a été suivie (○). La somme constante des concentrations en substrat dans les deux compartiments indique l'absence d'accumulation et/ou la dégradation du substrat par les cellules. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

La cinétique observée est très similaire entre les courbes A et B de la figure 31. Nous nous sommes assuré que ce phénomène ne provient pas d'un manque d'étanchéité de la monocouche cellulaire. En effet, dans un tel cas, la diffusion du substrat de part et d'autre de la membrane serait rapide et atteindrait un équilibre avec une concentration équivalente de chaque côté. Si cette condition advenait, nous aurions aussi une diffusion de glucose et de protéines (en effet, le milieu apical est dépourvu de glucose et de protéines) ainsi qu'une absence de différence de potentiel transépithélial. Dans chaque puit étudié, nous avons observé un transport de glucose $< 0.1\%$ de la valeur de la concentration de glucose basolatéral, une absence de protéines dans le pôle apical dans la limite de sensibilité de la technique de Bradford (< 0.1 mg/ml), et le maintien de la différence de potentiel transépithélial mesurée à une valeur proche de 250-280 mV/cm². Cette valeur serait nulle en cas d'inétanchéité de la monocouche cellulaire. Ceci signifie donc que nous avons bien un transport actif et rapide de ce substrat des PEPT du pôle apical vers le pôle baso-latéral et inversement. La forme logarithmique des courbes obtenues proviendrait ainsi du transport du substrat qui s'effectue dans les deux sens. Le calcul de la limite de ces courbes au temps 0 (donc de l'asymptote) donne les vitesses des transports. Elle est de 28 ± 4 pmol/min/10⁶ cellules dans le sens apical vers basolatéral et de 41 ± 6 pmol/min/10⁶ cellules dans le sens basolatéral vers apical.

IV.4.1.4 Effet de la concentration en substrat

La courbe dite de "saturation" permet de caractériser le transport actif de ces cellules. Le principe est d'ajouter des concentrations croissantes dans le pôle baso-latéral et de mesurer respectivement les vitesses de transport vers le pôle apical. Ainsi pour chaque point représenté, une cinétique a été réalisée et une vitesse au point zéro a été calculée et représentée (figure 32) en fonction des concentrations initiales en substrat.

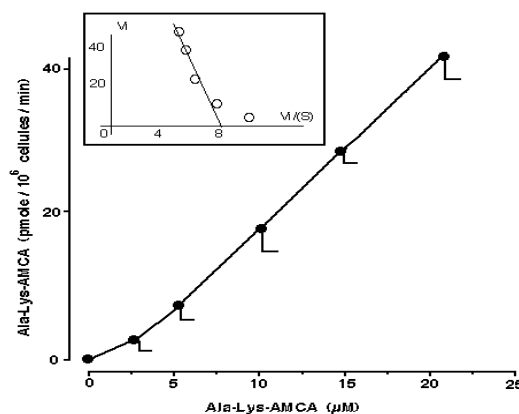


Figure 32 : Courbe de saturation représentant les vitesses initiales de transport en fonction de la concentration de substrat. En insert, la représentation d'Eadie-Hofstee $V_i = f(V_i/[S])$. Cette figure est representative de 3 expériences différentes.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 32, nous ne sommes pas en condition saturante à la concentration maximale de substrat utilisée (ici 25 μM). La littérature documente des valeurs de K_m de l'ordre du μM à la dizaine de μM en fonction du substrat concerné. Des concentrations supérieures auraient été nécessaires pour obtenir une courbe satisfaisante. Ces conditions n'ont pu être testées pour des raisons techniques et financières. Malgré ces restrictions, la représentation d'Eadie-Hofstee nous permet de déterminer plus précisément K_m et V_m . La valeur de K_m est de $14,3 \pm 3 \mu\text{M}$. La valeur de V_m est de $115 \pm 22 \text{ pmoles} / 10^6 \text{ cellules} / \text{min}$.

IV.4.1.5 Etude de compétition par le Céfadroxil

Le céfadroxil est un substrat spécifique du transporteur PEPT2 (240). Nous avons alors étudié son transport par les cellules MM39. La stratégie est ici d'ajouter des concentrations croissantes de cet antibiotique en présence d'une concentration fixe de substrat fluorescent. Il

se crée alors une compétition entre le substrat et l'antibiotique avec comme conséquence, en théorie, une diminution du transport du substrat. La figure 33 montre les résultats obtenus.

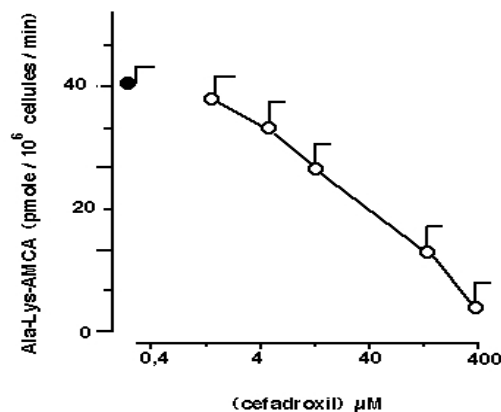


Figure 33 : Courbe représentant la vitesse de transport du substrat Ala-Lys-AMCA en fonction des concentrations croissantes en céfadroxil. Le point noir représente la vitesse initiale en absence de compétiteur. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

La concentration de céfadroxil qui conduit à une diminution de 50% de la vitesse initiale de transport de substrat est d'environ 35 μM . Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle connue du K_m du transporteur PEPT2 : 44 μM (240), 23 μM (Mohamed A. Kamal, 2008) ou encore 14 μM (dans notre étude). D'autre part, une concentration forte de céfadroxil inhibe fortement le transport de substrat, renforçant l'idée que le transport du substrat est bien spécifique et n'est pas la conséquence d'un transport passif non spécifique.

IV.4.1.6 . Implication potentielle du transporteur PEPT1 ?

Le transporteur PEPT2 est décrit comme étant de forte affinité (de l'ordre du μM) mais de faible vélocité, alors que le transporteur PEPT1 serait de faible affinité (de l'ordre du mM) mais de forte vélocité. Nous avons observé que le transporteur PEPT1 était exprimé dans les cellules MM39. Aux concentrations de substrat utilisées, on doit s'attendre à ce que seul le

transporteur PEPT2 soit responsable des phénomènes observés. Toutefois, à cause de la forte vélocité connue de PEPT1, on ne peut pas exclure une possible participation de ce dernier. Pour vérifier cela, nous avons utilisé le captopril qui est un compétiteur connu du substrat utilisé vis-à-vis du transporteur PEPT1. Nous avons déterminé la vitesse de transport du substrat en utilisant une concentration supérieure (ici 4X) de captopril. La même expérience a été réalisée avec le céfadroxil mis ici en comparaison. La figure 34 montre les résultats obtenus.

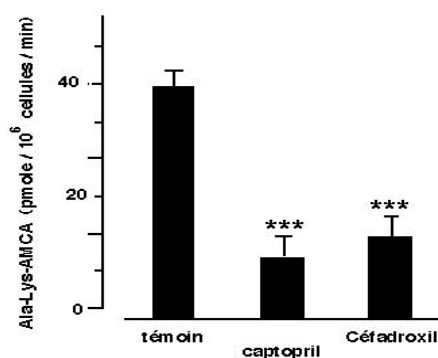


Figure 34 : Vitesse initiale de transport de substrat en présence des compétiteurs céfadroxil et de captopril. Les cellules MM39 ont été mises en contact au pôle baso-latéral, dans un système à double chambre, avec 25 μ M d'Ala-Lys-AMCA sans compétiteur (témoin) ou avec 100 μ M soit du céfadroxil ou du captopril. Le transport dans le pôle apical est déterminé en fonction du temps et la vitesse initiale au temps T0 est calculée. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates. (***) : $p < 0.001$

De manière surprenante, le captopril induit une diminution significative du transport de substrat qui est transporté par les deux transporteurs PEPT1 et PEPT2. Cependant, au regard de la valeur élevée connue du K_m (autour du mM) du PEPT1 pour ce substrat, on ne devrait logiquement pas s'attendre à observer un quelconque transport inhibé par le captopril. Afin de caractériser cette observation, des concentrations croissantes de captopril ont été ajoutées avec une concentration constante de substrat et les vitesses initiales de transport déterminées et calculées (figure 35).

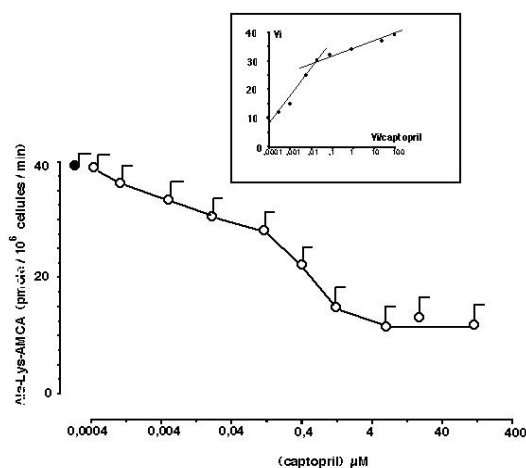


Figure 35: Courbe représentant la vitesse de transport de l'Ala-Lys-AMCA en fonction des concentrations croissantes de captopril. Le point noir représente la vitesse initiale en absence de compétiteur. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

La figure 35 montre que l'effet inhibiteur du captopril est biphasique, avec deux K_i , l'un de l'ordre du nM et l'autre de l'ordre du μM. Les valeurs de K_i sont loin de celles connues pour un effet compétiteur potentiel vis-à-vis du PEPT1 (de l'ordre du mM à la dizaine de mM). Nous pouvons suspecter que l'effet du captopril puisse passer par un effet autre que celui d'agir directement sur le transporteur. Ce composé est non seulement un substrat de PEPT1 mais aussi un inhibiteur de l'ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine). Cet effet inhibiteur a été décrit dans des cellules pulmonaires avec un K_i de 2 nM (240). Par contre, Gronnenberg et coll. (213) décrivent aussi un transporteur PEPT2 dans des cellules épithéliales pulmonaires mais ne trouvent pas d'effet des inhibiteurs des ACE dont le captopril. Il est à noter ici que dans ces travaux, la localisation du PEPT2 est restreinte aux cellules épithéliales de surface, aux pneumocytes et aux cellules endothéliales.

Une localisation du PEPT2 dans les cellules glandulaires n'a pas été retrouvée. Une autre lignée cellulaire de type glandulaire, la lignée Calu-3, montre une expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 mais dans ces cellules, le transport passerait préférentiellement

par le PEPT1. Les auteurs basent leur conclusion sur les effets inhibiteurs du captopril et d'autres molécules de la même famille et avouent d'ailleurs leur surprise quant à ces résultats. Ces auteurs ne font pas l'hypothèse d'une voie autre possible que celle de substrat de PEPT1 impliquée par les inhibiteurs des ACE dans les effets observés.

IV.4.1.7 Effet d'un contexte inflammatoire sur le transport d'antibiotiques par les cellules MM39

Dans cette étude, nous avons également essayé d'étudier les effets d'un contexte pro-inflammatoire et pro-infectieux sur l'activité de ces transporteurs. Ce contexte a été généré par l'ajout de la cytokine TNF α (100 nM) mimant une situation pro-inflammatoire et de lipopolysaccharide (LPS: 25 μ g/ml) de *Pseudomonas aeruginosa* mimant une situation pro-infectieuse. Ces agents ont été ajoutés aux cellules 24 heures avant l'expérience et rajoutés aussi en même temps que le substrat. Les cinétiques de transport ont été mesurées et les vitesses initiales calculées. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure 36.

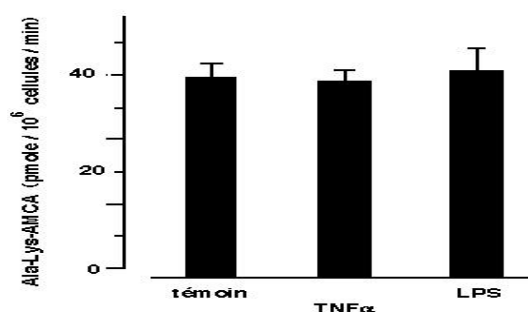


Figure 36 : Histogramme représentant les vitesses de transport de substrat en fonction ou non de la présence de TNF α ou du LPS. Les cellules ont été incubées pendant 24h avec soit du TNF α (100nM) soit avec du LPS (25 μ g/ml) avant l'expérience de transport de l'Ala-Lys-AMCA (25 μ M). Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

A notre grande surprise, nous n'observons aucun effet du $\text{TNF}\alpha$ ou du LPS sur le transport d'antibiotiques. Nous avons bien sûr vérifié que ces agents n'influençaient pas la polarisation cellulaires ni l'étanchéité de la monocouche. Nous avons aussi vérifié que ces agents étaient actifs sur les cellules. En effet, ces deux agents induisent bien une augmentation de la production d'interleukine-8, dosée par ELISA, comme cela avait déjà été montré par ailleurs (241). Celle-ci passe de $0,4 \pm 0,01 \text{ ng}/10^6 \text{ cellules / heure}$ à $2,1 \pm 0,3 \text{ ng}/10^6 \text{ cellules / heure}$ (augmentation induite par le LPS) ou à $2,3 \pm 0,4 \text{ ng}/10^6 \text{ cellules / heure}$ (augmentation induite par le $\text{TNF}\alpha$). Ceci signifie que l'agent pro-inflammatoire $\text{TNF}\alpha$ et l'agent pro-infectieux LPS conduisent bien à une réaction cellulaire en induisant une production de cytokines et que cette réaction ne s'accompagne pas d'une modification du transport assuré par le PEPT2.

IV.4.1.8 Effet des agents anti-inflammatoire sur le transport d'antibiotiques par les cellules MM39.

Si les agents pro-inflammatoires n'ont montré aucun effet sur le transport assuré par le PEPT2 dans les cellules MM39, on ne peut pas exclure que les agents anti-inflammatoires puissent avoir un effet. Ces composés sont utilisés en clinique pour limiter la réaction inflammatoire en agissant sur les voies de signalisations intracellulaires qui sont suractivées en cas d'inflammation mais qui sont normalement actives physiologiquement dans toutes les cellules. Ainsi, les anti-inflammatoires influencent la physiologie basale des cellules et pourraient, probablement, influencer la fonction basale du transporteur PEPT2. Nous avons pré-incubé les cellules avec la dexaméthasone (Dex, $1 \mu\text{M}$) et de l'ibuprofène (Ibu, $10 \mu\text{M}$) et ensuite évalué les vitesses de transport de substrat. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 37.

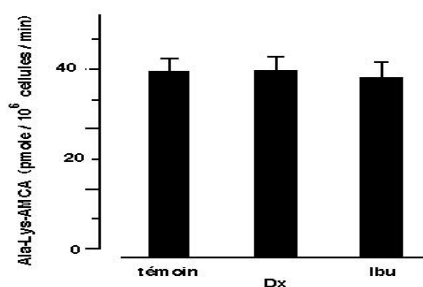


Figure 37 : Histogramme représentant les vitesses de transport de substrat en fonction de la présence ou non de la Dexaméthasone ou de l'Ibuprofène. Les cellules ont été pré-incubées avec la dexaméthasone (Dex, 1 μ M) et l'ibuprofène (Ibu, 10 μ M) pendant 24h. Les vitesses de transport du substrat Ala-Lys-Amca ont été évaluées après ajout de 25 μ M de substrat. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

Nous n'observons aucun effet de la dexaméthasone ou de l'ibuprofène sur le transport de substrat assuré par le PEPT2. Nous avons ensuite recherché les effets possibles des combinaisons agents pro-inflammatoires / agents anti-inflammatoires, combinaisons rencontrées en situation clinique. Les agents ont été ajoutés aux cellules 24 heures avant l'étude du transport et les vitesses initiales de transport déterminées et calculées. La figure 38 montre les résultats obtenus.

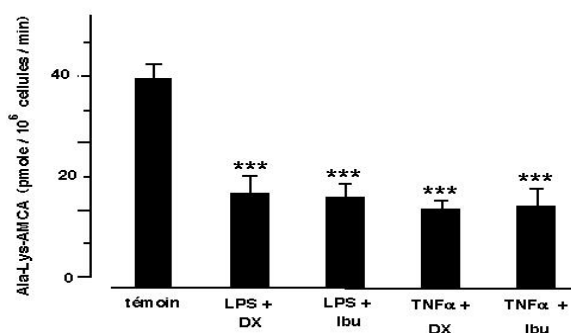


Figure 38: Histogramme représentant les vitesses de transport de l'Ala-Lys-AMCA en condition inflammatoire et en présence d'anti-inflammatoires. Les cellules ont été incubées avec les différents agents 24h avant l'étude du transport de l'Ala-Lys-AMCA. LPS (25 μ g/ml), TNF α (100 nM), Dex (1 μ M), Ibu (10 μ M). Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates. (***) : $p < 0.001$.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 38, les différentes combinaisons TNF α ou LPS + Dex ou Ibu provoquent une diminution significative ($p < 0,001$) de la vitesse de transport de substrat. En effet, elles sont de 19 ± 4 , 18 ± 3 , 16 ± 2 et 16 ± 2 pmoles/ 10^6 cellules/min pour les combinaisons LPS+Dex, LPS + Ibu, TNF α +Dex et TNF α +Ibu respectivement. Cet effet est surprenant car aucun des agents utilisés seul ne conduit à une variation quelconque de la vitesse initiale de transport. Les mécanismes impliqués restent encore inconnus.

Ces résultats suggèrent que certaines voies intracellulaires mobilisées par les combinaisons de ces agents influenceraient la fonction du transporteur PEPT2. Les voies intracellulaires mobilisées par ces agents sont complexes, redondantes, intriquées et peu ou pas documentées. Il est clair que de rechercher les mécanismes responsables de cette observation prendra du temps. D'autre part, nous montrons aussi que les anti-inflammatoires induisent une inhibition de l'augmentation d'IL-8 provoquée par le TNF α ou le LPS, comme cela avait été décrit auparavant par notre équipe (242).

IV.4.2 Etude du transport d'antibiotiques par les cellules CF-KM4

IV.4.2.1 Expression des transporteurs dans les cellules CF-KM4

Avant d'entreprendre l'étude du transport avec les cellules CF-KM4, nous avons, d'abord, vérifié l'expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 par ces cellules. La figure 39 montre la présence de ces transporteurs dans nos cellules CF.

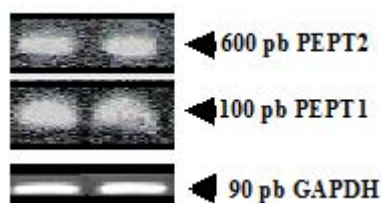


Figure 39: Expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 par les cellules CF-KM4. Une RT-PCR a été réalisée avec les cellules CF-KM4. L'expression du gène de référence GAPDH est indiquée.

IV.4.2.2 Étude du transport d'antibiotiques par les cellules CF-KM4

Afin de comparer les résultats précédents obtenus avec la lignée cellulaire MM39, nous avons étudié le transport d'Ala-Lys-AMCA par des cellules CF-KM4, cultivées en double chambre. La figure 40 montre la cinétique du transport du substrat fluorescent Ala-Lys-AMCA en fonction du temps.

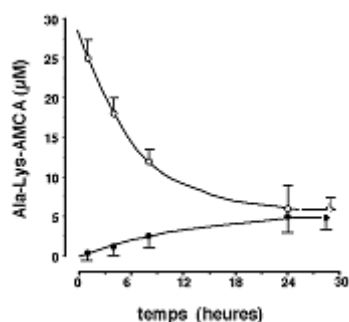


Figure 40: Cinétique de transport du substrat Ala-Lys-AMCA par les cellules CF-KM4. 25 µM de substrat sont déposés dans le pôle baso-latéral et l'évolution des concentrations du substrat est suivie au cours du temps dans les pôles baso-latéraux (cercles clairs) et apicaux (cercles noirs). Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

La figure 40 montre que le transport est lent. En effet l'équilibre est atteint vers 24 heures d'exposition au substrat, alors qu'il est atteint vers 8 heures pour les cellules MM39 (figure 31). Dans La figure 41, on a la représentation graphique de l'évolution de la vitesse du transport en fonction des concentrations en substrats. Cette courbe dite de « saturation » permet de caractériser le transport du substrat de cette lignée cellulaire. Le principe est d'ajouter des concentrations croissantes dans le pôle baso-latéral et de mesurer respectivement les vitesses de transport vers le pôle apical. Ainsi pour chaque point une cinétique a été réalisée et la vitesse au point zéro a été calculée et représentée ici (figure 41) en fonction des concentrations initiales de substrat.

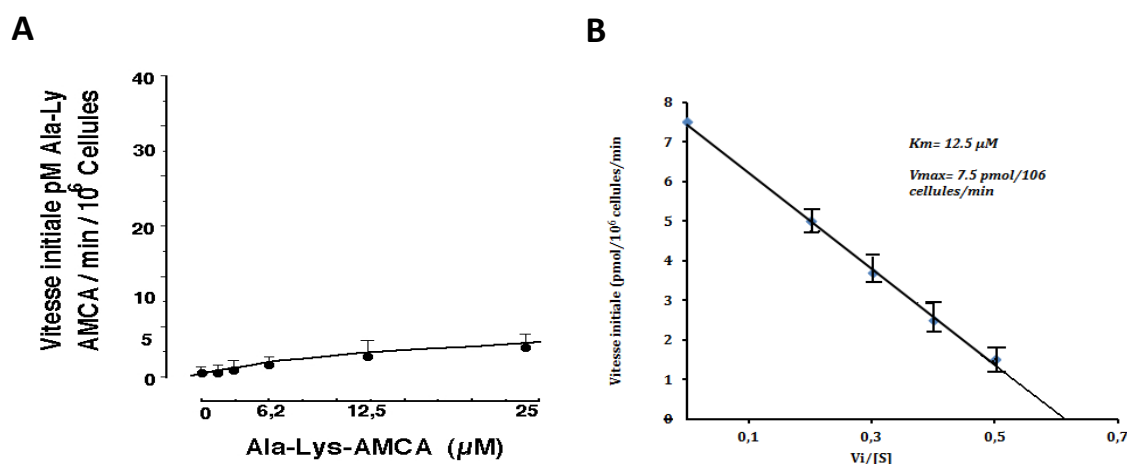


Figure 41: Courbe de saturation(A) montrant les vitesses initiales de transport du dipeptide (Ala-Lys-AMCA) en fonction de la concentration par les cellules CF-KM4. La représentation d'Eadie-Hofstee (B) des données. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

Les résultats montrent que la courbe est de type michaelienne. La transformation selon Eadie-Hofstee des données permet de déterminer les valeurs de K_m et V_m . Elles sont de 12.5 μM et de 7.5 pmol/10⁶ cellules/min. Lorsqu'on compare ces valeurs avec celles trouvées avec les cellules MM39 ($K_m = 14.3 \pm 3 \mu M$, $V_{max} = 115 \pm 22 \text{ pmol}/10^6/\text{min}$), on note une

constante d'affinité qui ne change pas entre les deux lignées mais une vitesse maximale beaucoup plus faible dans les cellules CF-KM4. Ce changement de la V_{max} à constante K_m fixe est caractéristique d'un effet inhibiteur non compétitif. En absence d'inhibiteur ajouté dans l'expérience, nous suggérons que la différence entre les lignées MM39 et CF-KM4, conséquence de l'absence d'expression de CFTR dans les cellules CF-KM4, serait responsable de la faible activité du transport du substrat Ala-Lys-AMCA par les cellules CF-KM4. En effet, l'analyse de la figure 40 montre que la concentration en substrat dans le pôle baso-latéral diminue plus rapidement que l'augmentation de substrat mesurée dans le pôle apical. Ceci laisse supposer qu'il y a une partie du substrat qui ne se retrouve pas dans le surnageant apical et pourrait être possiblement accumulée ou métabolisée par les cellules. La figure 42 reprend les données de la figure 40 mais en exprimant les résultats en pourcentage de la quantité initiale de substrat déposée.

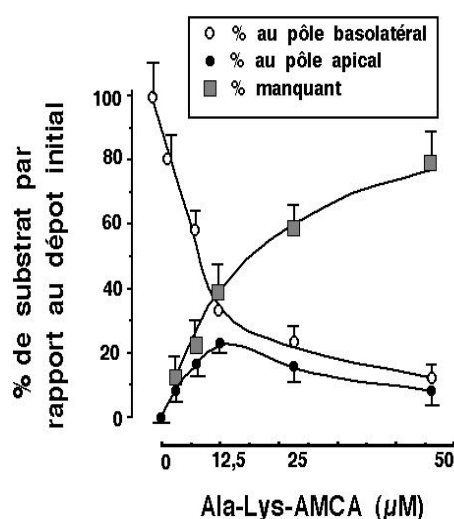


Figure 42 : Courbe représentative de la dégradation du dipeptide transporté par les cellules CF-KM4. Pourcentage relatif de substrat retrouvé dans les pôles apicaux et basolatéraux des cellules après 24 heures d'incubation des cellules avec des concentrations croissantes de substrat déposées dans le pôle basolatéral.

La figure 42 montre qu'il y a une perte de substrat qui est d'autant plus importante que la concentration augmente. Celle-ci peut atteindre 80 % pour une concentration de 50 μ M de substrat déposé. La quantité relative de substrat retrouvée dans le pôle apical augmente jusqu'à une valeur de 12,5 μ M et diminue ensuite. Ceci suggère un phénomène bimodal, un avant cette valeur et un autre après cette valeur. Avant cette valeur, on note que le transport reste proportionnel à la concentration, alors qu'après cette valeur, on observe un phénomène de saturation. L'interprétation de cette observation est difficile.

D'autre part, des mesures dites de « Dye uptake » ont été effectuées. Dans cette expérience, des concentrations croissantes de substrat ont été déposées sur les cellules et la fluorescence a été déterminée dans les lysats cellulaires. La lyse a été effectuée avec un tampon RIPA (HEPES 50 mM pH=7,5 ; Déoxycholate 1 % ; Nonidet P-40 1 % ; SDS 0,1 % ; NaCl 150 mM ; Aprotinine 20 μ g/ml). Aucune fluorescence n'a pu être détectée dans ces lysats cellulaires. Il n'y aurait donc pas d'Ala-Lys-AMCA capturée et accumulée dans les cellules.

En conclusion, les résultats, jusque là, montrent une dégradation plus importante du substrat spécifique aux cellules CF-KM4 et qui serait responsable de la diminution du transport (à K_m constante) dans celles-ci. Toutefois, cette dégradation du substrat peut subvenir au niveau extracellulaire ou intracellulaire par une activité métabolique importante sur le substrat.

Comme nous l'avons fait pour les cellules MM39, nous avons voulu caractériser l'implication des deux transporteurs PEPT1 et PEPT2 dans le transport observé du substrat par les cellules CF-KM4 avec une stratégie de compétition.

IV.4.2.3 Transport du Céfadroxil par les cellules CF-KM4

L'antibiotique étudié (Céfadroxil) est un substrat du transporteur PEPT2. Son K_m pour le transporteur est connu. Il est de 6 μM pour les cellules SKPT, une lignée de cellules de tubule proximal de rat (240). Nous avons alors étudié dans quelle mesure le céfadroxil est transporté par PEPT2. La stratégie est ici d'ajouter des concentrations croissantes de cet antibiotique en présence d'une concentration constante de substrat fluorescent (25 μM). Il devrait alors se créer une compétition entre le substrat et l'antibiotique avec comme conséquence, en théorie, une diminution du transport du substrat. La figure 43 montre les résultats obtenus.

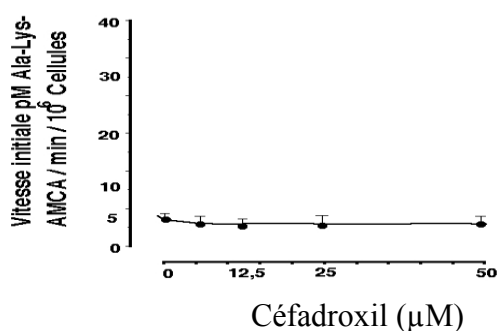


Figure 43 : Courbe de l'inhibition du transport de l'Ala-Lys-AMCA par le Céfadroxil dans les cellules CF-KM4. Courbe représentant les vitesses initiales de transport du substrat (25 μM déposés au pôle basolateral) en fonction de concentrations croissantes en Céfadroxil. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

Nous observons que l'ajout de concentrations croissantes de Céfadroxil ne modifie pas les vitesses de passage du substrat vers le pôle apical. Ceci suggère qu'il n'y aurait pas de compétition entre l'Ala-Lys-AMCA et le Céfadroxil et pose la question de la fonctionnalité du transporteur PEPT2 dans les cellules CF-KM4 (figure 43).

IV.4.2.4 Transport du Captopril par les cellules CF-KM4

Le captopril est connu comme étant un substrat du transporteur PEPT1. Le PEPT2 est un transporteur de forte affinité (de l'ordre du μM) mais de faible vélocité. Le PEPT1 est de faible affinité (de l'ordre du mM) mais de forte vélocité. Ainsi en utilisant une concentration de compétiteur supérieure à celle de substrat (ici 2X), nous devrions obtenir un effet compétiteur important avec le captopril. La figure 44 montre les résultats obtenus.

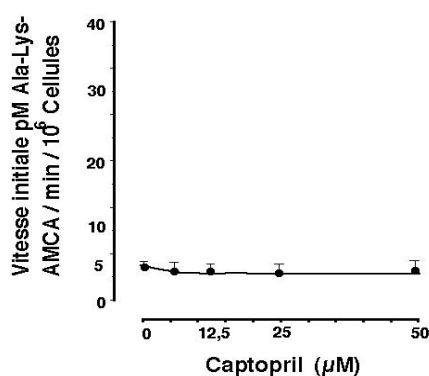


Figure 44 : Courbe de l'inhibition du transport de l'Ala-Lys-Amca par le Captopril. Courbe de compétition représentant les vitesses initiales de transport de substrat ($25\mu\text{M}$ déposés au pôle basolaréral) en fonction d'une concentration croissante de captopril. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

Nous observons que des concentrations croissantes de captopril ne modifient pas non plus les cinétiques de passage de substrat. Il n'y a donc pas non plus de compétition entre le captopril et l'Ala-Lys-AMCA. Bien qu'étant deux fois plus concentré, le captopril ne semble pas être transporté non plus.

Les résultats obtenus suggèrent que les transporteurs PEPT1 et PEPT2 sont inactifs. Nous supposons qu'il pourrait y avoir d'autres transporteurs qui pourraient suppléer la défaillance des PEPTs. Il existe une autre famille de transporteurs capables d'avoir l'Ala-Lys-AMCA comme substrat. Ce sont les transporteurs de type PHT1 et PHT2. Ces derniers font parti de la même famille que les PEPT1 et PEPT2. De plus, on sait qu'ils sont aussi capables de transporter des antibiotiques, ainsi que des di- et tri- peptides (219). Une caractéristique de ces transporteurs est qu'ils ont une grande affinité pour l'histidine. C'est pourquoi nous avons décidé de voir si et dans quelle mesure ces transporteurs PHT pouvaient être responsables de ce passage résiduel de substrat. 25 μ M de substrat Ala-Lys-AMCA ont été déposés au pôle baso-latéral des cellules en présence de concentrations importantes de cloxacilline (un antibiotique, 6 mM), d'histidine (10 mM) et de glutathion (un tripeptide, 25 mM). La figure 45 montre les résultats obtenus.

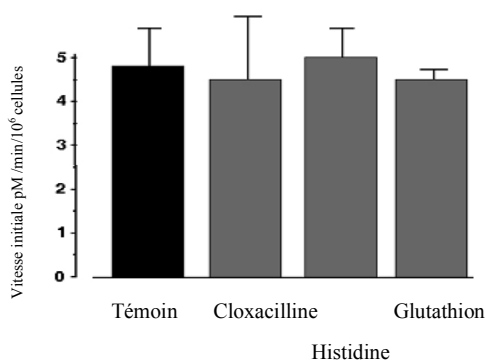


Figure 45 : Histogramme représentant les vitesses de transport de l'Ala-Lys-AMCA après incubation avec Cloxacilline, Histidine ou Glutathion. Les cellules ont été incubées avec la l'Ala-Lys-AMCA en présence de Cloxacilline (6 mM), l'Histidine (10 mM) ou le Glutathion (25 mM) pendant 8 heures. Des prélèvements de 50 μ l du milieu apical ont été effectués toutes les 30 min. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

La figure 45 indique que des concentrations importantes de trois substrats de PHT ne modifient pas la vitesse de passage du substrat Ala-Lys-AMCA par les cellules CF-KM4. Les transporteurs PHT semblent également être inactifs. Ainsi, nous supposons que les antibiotiques semblent diffuser passivement à travers les cellules CF-KM4 avec une cinétique de passage lente (équilibre atteint à 24 heures).

En conclusion, les résultats du transport du substrat Ala-Lys-AMCA par les cellules CF-KM4 montrent une cinétique lente (un équilibre atteint après 24h) avec une dégradation importante du substrat. L'étude de l'implication des transporteurs PEPT1 et PEPT2, par une stratégie de compétition avec le substrat Ala-Lys-AMCA, indique que ces derniers sont inactifs et qu'une diffusion passive simple soit responsable du transport observé dans les cellules CF-KM4.

La nature des cellules CF-KM4, qui sont porteuses d'une mutation F508del, pose la question de l'implication de ce caractère mucoviscidosique dans ce défaut du transport du substrat par ces cellules. Ainsi, il nous a semblé intéressant de voir l'effet de l'inhibition de l'expression de CFTR dans les cellules normales MM39 sur les caractéristiques du transport que nous avons précédemment déterminées. Pour cela nous étudierons dans le chapitre suivant un modèle dans lequel l'expression du gène *CFTR* a été invalidée, les cellules MM39-*CFTR*_(-/-).

IV.4.3 Etude de la cinétique du transport par les cellules MM39-*CFTR*_(-/-)

Dans le but d'étudier le lien entre le défaut de transport de l'Ala-lys-AMCA par les cellules mucoviscidosiques et l'absence de CFTR, nous avons travaillé sur des cellules MM39 transfectées avec un antisens *CFTR*. Un clone stable a été isolé et cultivé. L'absence de l'expression de *CFTR* a été vérifiée par RT-PCR. De plus, des caractéristiques dysfonctionnelles ont été mises en évidence comme l'absence de réponse beta-adrénérique ainsi qu'une synthèse constitutive accrue de cytokines, comme pour les cellules CF-KM4. Cette lignée, que nous appelons MM39-*CFTR*_(-/-), possède bien des caractéristiques CF. Cette

lignée a été établie et caractérisée par l'équipe du Dr Parini (INSERM U16, Lille, France) qui nous l'a fournie gracieusement.

IV.4.3.1 Expression des transporteurs PEPT dans les cellules MM39-CFTR_(-/-)

Nous avons, d'abord, vérifié, par RT-PCR, que l'expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 était toujours présente dans les cellules MM39-CFTR_(-/-). Les résultats (figure 46) confirment que l'inactivation de CFTR, n'a pas d'effet sur cette expression.

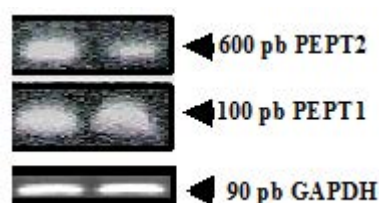


Figure 46 : Expression des transporteurs PEPT1 et PEPT2 par les cellules MM39-CFTR_(-/-). Une RT-PCR a été réalisée avec les cellules MM39-CFTR_(-/-). L'expression du gène de référence GAPDH est indiquée.

IV.4.3.2 Etude du transport des antibiotiques par les cellules MM39-CFTR_(-/-)

Nous avons utilisé la même stratégie d'étude du transport d'Ala-Lys-AMCA comme nous l'avons précédemment effectuée avec les cellules MM39 et CF-KM4. Nous avons alors suivi la cinétique du transport vectoriel du substrat Ala-Lys-AMCA par les cellules MM39-CFTR_(-/-). Le substrat a été déposé au pôle basolatéral et la fluorescence mesurée dans les deux compartiments (figure 47). Les résultats montrent un transport du substrat lent du pôle basolatéral au pôle apical et un équilibre atteint vers 24 heures d'exposition au substrat.

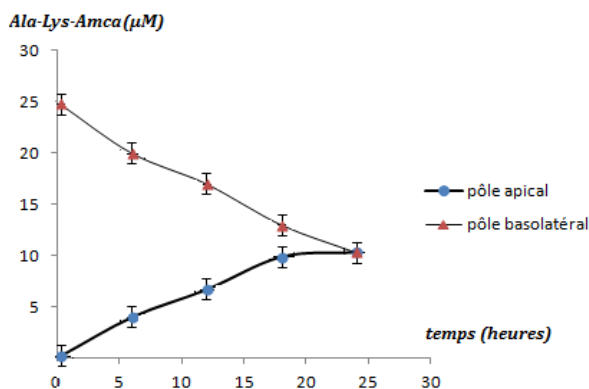


Figure 47 : La cinétique du transport de l'Ala-Lys-Amca en fonction du temps par les cellules MM39-CFTR_(-/-). Des prélèvements (50μl) ont été réalisés au pôle apical et basolatéral des doubles-chambres à des temps différents. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

Nous avons aussi cherché à vérifier si le substrat était dégradé par les cellules MM39-CFTR_(-/-) comme c'est le cas avec les cellules CF-KM4.

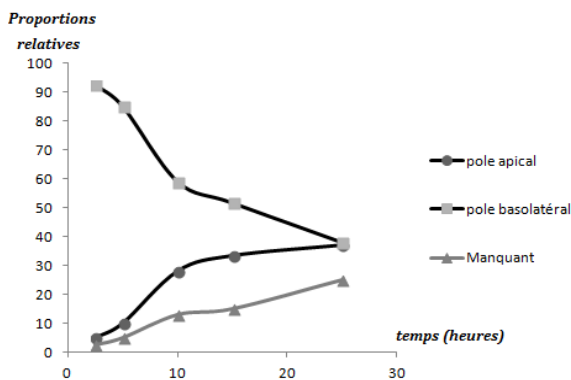


Figure 48 : Proportions relatives des concentrations de substrat dans les deux pôles. 25μM de substrat ont été déposés au pôle baso-latéral. 50μl de milieu ont été prélevés à différents temps. Les concentrations du substrat ont été calculées dans les deux compartiments et rapportées à aux concentrations de substrat déposées. La concentration du substrat manquante désigne la quantité du substrat qui n'apparaît ni au pôle apical ni au pôle baso-latéral.

La courbe de la figure 48 nous montre les proportions relatives des concentrations du substrat dans les différents compartiments, apical et baso-latéral. La proportion de substrat manquante, montre des valeurs augmentées pour les cellules MM39-CFTR_(-/-). A la concentration de 25µM d'Ala-Lys-Amca déposée, on note 25% de fluorescence perdue dans le cas des cellules MM39-CFTR_(-/-). Elle est presque nulle dans le cas des cellules MM39 (résultats non montrés). Cette perte de la fluorescence n'est, toutefois, pas due à un stockage intracellulaire du substrat par les cellules car les mesures réalisées sur les extraits cellulaires des deux lignées ne montrent pas de présence de ce substrat. Ce résultat montre encore une fois que les cellules CF ont, en plus de leur caractéristique d'avoir une cinétique de transport lente, un phénomène de perte de la fluorescence qui est probablement dû à sa dégradation par les cellules CF. Toutefois, la relation entre l'absence de CFTR et ce caractère observé reste inexpliquée et nécessitera plus d'investigations.

IV.4.3.3 Détermination des paramètres cinétiques du transport par les cellules MM39-CFTR_(-/-).

Afin de déterminer les constantes qui caractérisent le transport par les cellules MM39-CFTR_(-/-), nous avons déposé différentes concentrations en substrat dans le pôle baso-latéral des doubles chambres et avons mesuré la quantité du substrat transportée au pôle apical à des intervalles de temps différents. La vitesse initiale calculée aux temps proches de zéro pour chaque concentration de substrat déposée a servi à tracer la courbe $V_i=f([S])$ (figure 49).

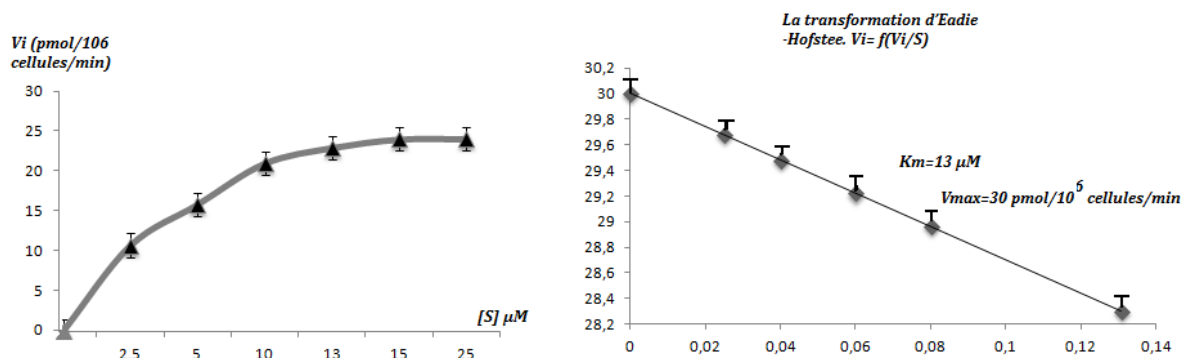


Figure 49 : Courbe représentative des vitesses initiales du transport de substrat par les cellules MM39-CFTR_(-/-): $V_i = f([S])$. Les vitesses initiales ont été calculées aux temps proches de zéro pour chaque concentration de substrat déposée au pôle baso-latéral. La transformation d'Eadie-Hofstee a été effectuée ($V_i = f(V_i/S)$) afin de déterminer les paramètres cinétiques V_{max} et K_m . Cette figure est représentative de 3 expériences différentes réalisées en duplicates.

Nous observons, lorsque nous analysons la courbe $V_i = f(S)$ que la cinétique est michaelienne. Ce type de cinétique est caractérisé par une vitesse initiale importante qui diminue par la suite, proportionnellement à la concentration en substrat jusqu'à atteindre une valeur de vitesse dite maximale où tous les sites de fixation des substrats sont saturés par l'excès en substrat dans le milieu. Atteindre cette zone stationnaire, dite de saturation, de la courbe de Michaelis et Menten permet de déterminer graphiquement les paramètres cinétiques propres au transport comme la vitesse maximale ou l'affinité au substrat. Dans notre cas, à la concentration, la plus élevée utilisée ($25 \mu M$), le transport n'est pas saturé. Toutefois, on peut remarquer des vitesses de transport différentes, qui sont plus importantes dans le cas des cellules MM39 comparées à celles des cellules MM39-CFTR_(-/-).

La détermination des constantes d'affinité et des vitesses maximales de transport sont des paramètres importants dont nous avons besoin pour apprécier l'effet de l'absence de CFTR sur l'activité des transporteurs. Une transformation selon Eadie-Hofstee a été effectuée. Dans

cette représentation, on trace la V_i en fonction de (V_i/S) : la pente de la droite et l'intersection de celle-ci avec les ordonnées permettent de déterminer les valeurs respectives de K_m et de V_m . La figure 49 montre la droite obtenue.

La valeur de K_m de la lignée MM39-CFTR_(-/-) déduite de la transformation d'Eadie-Hofstee ($13,4 \pm 3 \mu\text{M}$) est similaire à celle trouvée avec MM39 ($14.3 \pm 3 \mu\text{M}$). La valeur de V_{max} déduite de la transformation d'Eadie-Hofstee, est de $30 \pm 4 \text{ pmol}/10^6/\text{min}$. Cette valeur, bien qu'elle, soit plus grande que celle obtenue avec les cellules CF-KM4 ($7,5 \pm 4 \text{ pmol}/10^6/\text{min}$), reste bien inférieure à la valeur de V_{max} des cellules MM39 ($115 \pm 5 \text{ pmol}/10^6/\text{min}$).

	MM39	CF-KM4	MM39-CFTR_(-/-)
$K_m (\mu\text{M})$	14.3	12.5	13,4
$V_{\text{max}} (\text{pmol}/10^6/\text{min})$	115	7.5	30

Tableau 5 : Valeurs des constantes d'affinités et des vitesses maximales pour les trois lignées cellulaires MM39, CF-KM4 et MM39-CFTR_(-/-).

Le tableau 5 met évidence deux observations importantes. La première concerne l'affinité du transporteur impliqué responsable du transport vectoriel observé qui n'est pas influencé par l'invalidation de CFTR dans les cellules MM39. L'ordre de grandeur des valeurs de l'affinité trouvées (micro-molaire) reste, lui aussi, compatible avec celle des PEPT2. L'autre observation concerne les vitesses maximales qui sont plus faibles dans le cas des cellules où la protéine CFTR est déficiente comparées à celles obtenues avec les cellules MM39. Ainsi, il semble que l'inhibition de CFTR dans les cellules CF modulerait la vitesse du transport. Cet effet est similaire à celui qu'aurait un inhibiteur non compétitif où la fixation de ce dernier sur

l'enzyme cible la rend incapable de catalyser la réaction bien qu'elle soit capable de fixer normalement son substrat. Dans notre exemple, la fixation du substrat sur son site de liaison semble être indépendante de la déficience de CFTR. Cependant, l'activité de transport est diminuée et ceci explique les faibles vitesses observées avec les deux lignées de cellules CF, les lignées CF-KM4 et MM39-CFTR_(-/-).

La diminution de l'activité de transport est plus marquée avec les cellules CF-KM4 où l'on retrouve de faibles concentrations de substrats transportées (de l'ordre de 10-20% à de fortes concentrations de substrats). Cette observation suggère donc une altération de l'activité de ce transport dans les cellules bronchiques mucoviscidosiques. Nous émettons l'hypothèse que ce phénomène serait probablement impliqué dans la résistance aux antibiotiques qui nécessite, dans certains cas, l'utilisation de doses importantes avant d'avoir des concentrations minimales locales nécessaires pour que ces derniers soient efficaces.

Un autre point important que révèle nos résultats est la proportion de la fluorescence perdue pendant l'incubation du substrat avec les cellules CF-KM4 et les cellules MM39-CFTR_(-/-). L'extinction de cette fluorescence, qui est plus importante avec les cellules CF qu'avec les cellules normales, est étonnante. Cette observation nécessite plus d'investigations notamment par l'étude des produits de dégradation du substrat dans les cellules CF et non CF. Nous pouvons souligner aussi qu'une éventuelle dégradation du substrat pourrait être aussi la raison de la faible vitesse de transport observée avec les cellules CF.

IV.5 Conclusion et perspectives

Dans la mucoviscidose, le dysfonctionnement de la protéine CFTR engendre des conséquences physiologiques multiples. Cette protéine est décrite essentiellement comme étant un transporteur de chlorure. Cependant, son interaction fonctionnelle directe ou indirecte avec plusieurs protéines membranaires constitue un grand intérêt pour la recherche afin de comprendre les diverses manifestations pathologiques observées en clinique. Parmi les axes de recherches actuels, on retrouve ceux qui s'intéressent à l'amélioration de la prise en charge médicamenteuse des malades. En effet, bien que l'utilisation des anti-inflammatoires contre l'exacerbation de la réaction inflammatoire ou des antibiotiques contre les germes opportunistes connaît une certaine efficacité, la voie d'administration et la dose mise en jeu constituent un enjeu important dans le traitement. Aujourd'hui, de plus en plus de recherches s'intéressent aux avantages de la voie inhalée. L'un des principes fondamentaux de la pharmacologie, est la notion de l'effet-dose. En effet, une meilleure distribution du médicament dans le tissu cible lui permet d'avoir une concentration plus efficace. Une fois administré, un médicament peut utiliser, entre autres, deux mécanismes de transport, la diffusion simple ou le transport actif. Plusieurs transporteurs membranaires qui fixent ces molécules ont été caractérisés chez l'homme. Parmi ceux-ci, il y a la famille des protéines ABC qui sont impliquées dans le transport d'un grand nombre de substances biologiques dont les peptides, les hormones, les sucres et les ions mais également les substances toxiques comme les métaux lourds et les drogues. Ces protéines se révèlent donc d'une importance toute particulière dans leur diversité de fonction. En effet, elles sont responsables de nombreux phénomènes de résistance (résistance aux antibiotiques, aux agents antifongiques, aux antiparasitaires, aux herbicides, ou aux anticancéreux). Parmi celles-ci, on trouve les protéines MDR (multi drug résistance).

Dans la mucoviscidose, l'implication des transporteurs d'oligopeptides, comme les PEPT1 et PEPT2, dans le transport à travers l'épithélium pulmonaire rend l'étude de ces transporteurs (fonctions, activité et régulation) d'un grand intérêt.

Nous avons montré à travers la détermination des paramètres cinétiques du transport vectoriel d'un dipeptide spécifique des transporteurs PEPT1 et PEPT2 que l'influence de l'absence de protéine CFTR fonctionnelle est probablement responsable de l'altération de l'activité du transporteur PEPT2. Les études cinétiques montrent que cet effet conduit probablement à une perte de fonction du transporteur PEPT2. Ceci explique le transport lent observé avec les cellules CF et pourrait, probablement, expliquer la nécessité de d'administration de doses plus importantes en médicaments avant d'avoir l'effet escompté chez les patients CF.

La question qui se pose, au regard de ces résultats, concerne l'activité des autres transporteurs membranaires connus et qui, comme le PEPT2, peuvent voir leur activité dépendre de la présence ou de l'absence d'une fonction CFTR. Parmi ces transporteurs, les protéines MRP, qui sont impliquées, pour certaines d'entre elles, dans la résistance à la chimiothérapie. En effet, avant qu'on ne lui reconnaisse des fonctions de canal chlorure, on attribuait à CFTR des propriétés de régulation de la conductance membranaire (129). Ainsi, il existe une régulation directe ou indirecte d'un certain nombre de transporteurs comme les transporteurs potassiques, ENaC ou encore ORCC par la CFTR. Dans nos cellules, on montre pour la première fois, que les transporteurs peptidiques PEPT2 peuvent être aussi régulés par la CFTR, il nous reste maintenant à approfondir les mécanismes moléculaires qui conduisent à cette dérégulation.

Cependant, l'apparition d'une perte plus importante de la fluorescence du substrat après invalidation de l'expression de CFTR dans les cellules MM39, ou par les cellules CF-KM4 suggère que l'absence d'expression de CFTR engendrerait soit un métabolisme intracellulaire augmenté par les cytochromes P450 ou alors une activité lysosomale augmentée ou différente. Une activité lysosomale perturbée avait été antérieurement observée dans les cellules HTG mucoviscidosiques par l'équipe (243). La perte du substrat pourrait être expliquée aussi par son oxydation sur sa partie fluorescente, l'acide 7-amino-4-méthylcoumarin-3-acétique (figure 50).

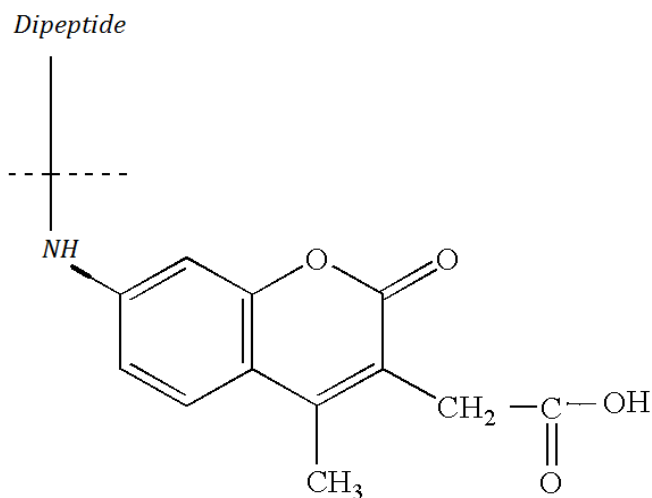


Figure 50 : La formule chimique de l'AMCA ; acide 7-amino-4-methylcoumarin-3-acétique.

Lorsque l'on considère la formule du substrat on remarque une fonction lactone, aisément oxydable. Cette oxydation pourrait se passer dans des compartiments intracellulaires via des Cytochromes P450 ou des oxygénases, ou alors dans le compartiment extracellulaire par des peroxydases. Ces cellules sont connues pour être capables de produire la lactopéroxydase (244). Ceci supposerait que cette peroxydase serait plus sécrétée par les cellules CF ? Cette lactone correspond aussi à une fonction ester intracellulaire qui pourrait être sensible à l'action des estérases. De la même façon, on pourrait se demander si les cellules CF ne contiendraient pas une activité estérase importante. Il serait intéressant maintenant de rechercher s'il y a réellement une différence de production de ces enzymes par ces cellules

En conclusion, la caractérisation fonctionnelle des transporteurs peptidiques dans la mucoviscidose, pourrait avoir un intérêt pharmacologique dans la compréhension de mécanisme de résistance aux médicaments et permettrait probablement de comprendre certains défauts physiologiques, observés dans les cellules mucoviscidosiques, associés au dysfonctionnement de CFTR

Troisième partie : Etude du rôle de la Cobalamine dans l'inflammation pulmonaire induite par l'histamine et le TNF α sur des cellules bronchiques humaines.

V.1 Introduction et objectifs

La réaction inflammatoire fait intervenir un certain nombre de médiateurs et d'intervenants intracellulaires dont la mobilisation aboutira à une modification profonde et transitoire du métabolisme cellulaire et tissulaire. Les effecteurs de type allergique et/ou proinflammatoire vont conduire à l'activation de phospholipases et d'autres protéines comme les cyclo-oxygénases, (Cox), les lipoxygénases (LO), la NO synthase (NOS) et mobiliser des facteurs de transcription comme NF κ B, Stat, C/EB β , NF-AT et PPAR. Toutes ces voies de signalisation sont susceptibles d'être affectées par la disponibilité en groupements méthyl. Notre intention est de déterminer dans quelle mesure la disponibilité en groupements méthyl influence la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et GM-CSF) induite par un contexte inflammatoire (histamine, TNF α) sur un modèle de cellules épithéliales pulmonaires humaines.

V.1.1 La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl)

V.1.1.1 Structure

La cobalamine (Cbl) ou vitamine B12, est une vitamine hydrosoluble. Elle doit son nom à l'atome de cobalt qu'elle contient (Fig.51).

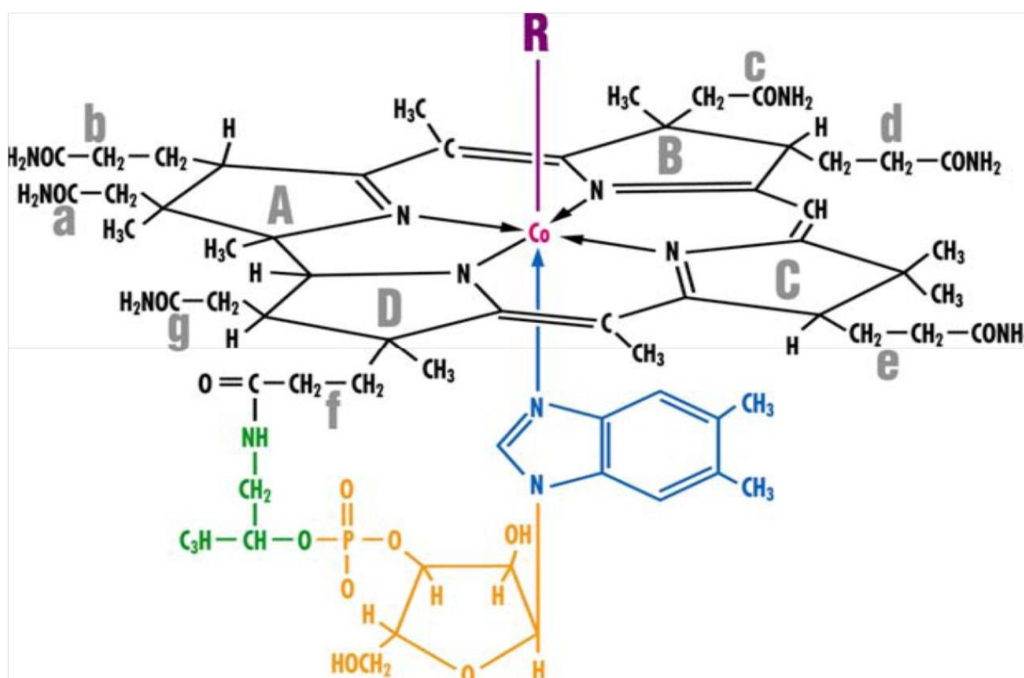


Figure 51: La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl). La cobalamine est constituée par un noyau tétrapyrrolique central appelé noyau corrine et deux chaînes axiales, l'une en position α avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole et l'autre un radical anionique variable R en position β qui détermine le nom du composé vitaminique (modifiée par Guéant, Namour, 2003).

Les Cbl appartiennent à la famille des corrinoïdes. Elles existent sous plusieurs formes en fonction du ligand fixé à l'atome de cobalt qui peut être tri, bi ou monovalent (3 niveaux d'oxydation) : [Cob(I)alamine], [Cob(II)alamine], [Cob(III)alamine], les deux premières étant les formes les plus stables.

Les Cbl sont composées d'un noyau corrine (en noir) et un ribonucléotide (en brun) reliés par un pont amino-2 propanol (en vert). Le noyau corrine est formé d'un atome de cobalt avec 4 noyaux pyrroles (A, B, C et D) et un ligand anionique (R). Selon la nature du ligand R il est possible d'obtenir les différentes formes de cobalamine :

- CN : cyanocobalamine
- OH : hydroxocobalamine

- CH₃ : méthylcobalamine (forme circulante)
- 5'd Ado : 5'-désoxyadénosylcobalamine.

La cyanocobalamine est la forme commerciale la plus courante de la vitamine B12, car la plus stable à l'air libre et la plus facile à cristalliser, et donc à purifier une fois produite par fermentation bactérienne ou par synthèse in vitro. Les formes biologiquement actives de la vitamine B12 sont la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine, qui sont instables à l'air libre.

La cobalamine n'est pas synthétisée par l'organisme. Les sources de vitamine B12 sont d'origine animale (le foie, la viande, les laitages, les oeufs, les poissons). Les apports nutritionnels recommandés sont de 2 µg/jour chez l'adulte et de 2,8 µg/jour chez la femme enceinte. Le taux plasmatique est compris entre 160-800 pg/mL. Les valeurs normales doivent être supérieures à 200 pg/mL (150 pmol/L) chez un sujet sain. Nous utilisons 0,05-0,2 % de la cobalamine corporelle totale par jour.

La majorité des Cbl est liée à des protéines, principalement sous forme d'ado-Cbl et de méthyl-Cbl. Dans la salive, les haptocorrines (protéines R ou transcobalamine 1/TCN1) prennent en charge les Cbl libres (10-30%) et les Cbl liées sont libérées de leur support protéique par les sécrétions chlorohydropeptiques de l'estomac. La cobalamine entre dans la cellule grâce au récepteur TCIIR et elle est utilisée soit en tant que méthyl-Cbl au cytosol soit sous la forme d'adénosyl-Cbl dans la mitochondrie.

V.1.2 Cycle de la méthionine et réactions de méthylation

Le cycle de la méthionine (figure 52) est une voie métabolique qui utilise la méthionine pour les réactions de méthylation cellulaire (voie de trans-méthylation) et génère comme sous produit l'homocystéine. Cette homocystéine est reconvertie en méthionine grâce à la méthionine synthase qui utilise comme cofacteur la vitamine B12 (cobalamine) et comme donneur de groupement méthyle la vitamine B9 (acide folique). La riboflavine, le zinc et le magnésium sont aussi des facteurs limitants de cette voie métabolique. Ce cycle de la

méthionine est donc intimement lié à celui des folates. La méthionine produite par ce cycle est conjuguée à l'adénosine par la méthionine adénosine transférase pour former la S-adénosyl-méthionine, substrat de la majorité des réactions cellulaires de méthylation.

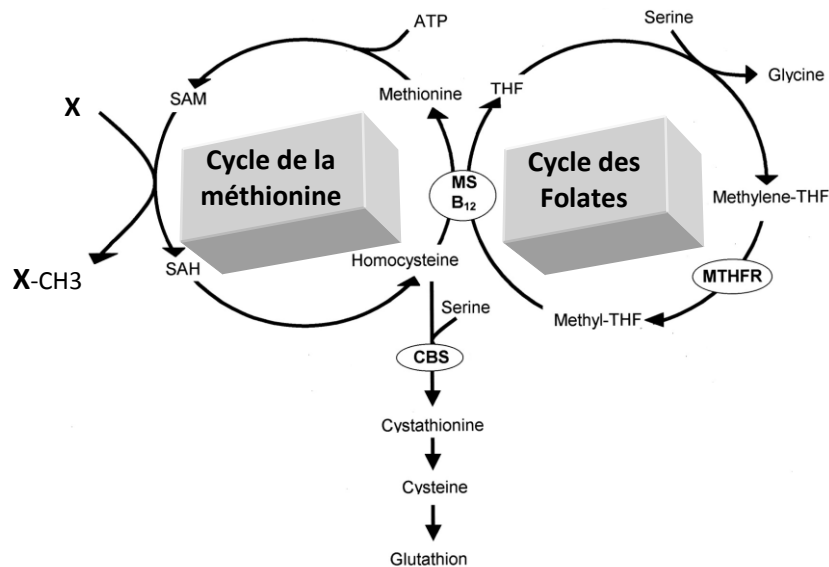


Figure 52 : Cycle de la méthionine et des folates. La cobalamine (ou vitamine B12) est un cofacteur de la méthionine synthase, une enzyme clé du cycle de la méthionine qui constitue la source intracellulaire de méthylation.

Les rôles de la cobalamine sont multiples (figure 53) :

- Elle agit comme cofacteur de l'enzyme méthyl-malonyl CoA mutase. Cette enzyme intervient dans le métabolisme des acides aminés branchés, des acides gras saturés à nombre impair de carbone et dans celui du cholestérol. Ces produits sont métabolisés en un intermédiaire qui est le Méthyl-malonyl-CoA qui sera transformé en succinyl CoA qui intégrera le cycle de Krebs.
- Elle agit comme cofacteur de l'enzyme méthionine synthase et participe ainsi à des réactions de méthylation des différents substrats cellulaires, tels que l'ADN, les lipides et les protéines.

par la voie de trans-méthylation mais aussi par la voie de trans-sulfuration (figure 52), qui aboutit à la formation du glutathion. La méthionine synthase participe également au cycle des folates, responsable de la transformation de l'acide folique apporté par l'alimentation en homocystéine.

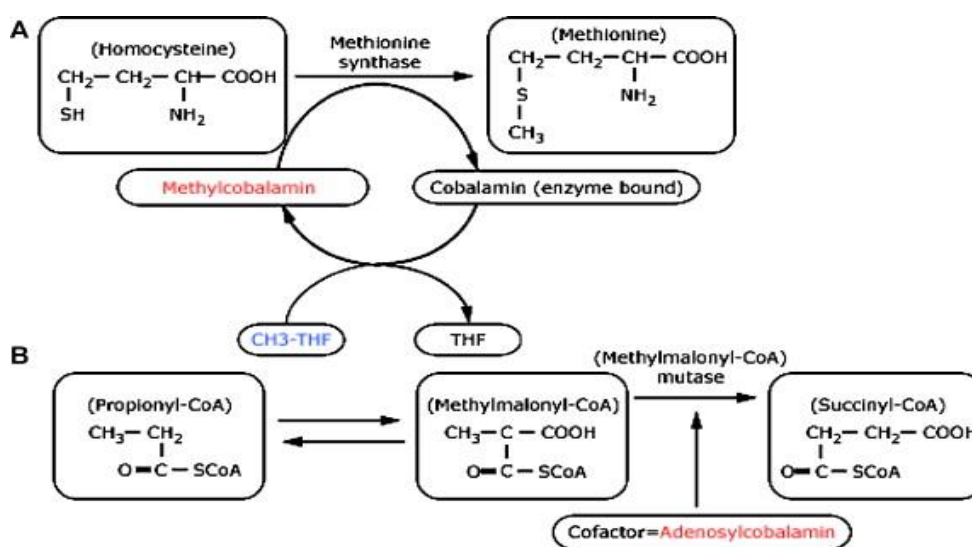


Figure 53: La cobalamine (Cbl) cofacteur de deux réactions indépendantes. A) Dans le cytoplasme, grâce à la méthionine synthase, le groupement méthyle du N5-méthyltetrahydrofolate (CH₃-THF) est transféré sur la Cbl pour donner le Tetrahydrofolate (THF). Ensuite, le groupement méthyle de la méthyl-Cbl est transféré sur l'homocystéine pour former la méthionine. B) Dans la mitochondrie, l'acide méthylmalonique, dérivé du malonate, est converti en acide succinique grâce au coenzyme Ado-Cbl et à la méthylmalonyl CoA mutase.

Les besoins en cobalamine sont environ de 3 à 4 µg/jour et ils sont couverts par une alimentation normale. Les réserves étant de 3 à 4 mg, une carence en cobalamine ne se manifestera qu'après plusieurs années. Les carences d'apport sont plutôt rares chez l'adulte en bonne santé dans les pays industrialisés mais plus fréquentes chez les sujets végétaliens car la cobalamine est exclusivement apportée par l'alimentation d'origine animale. Les maladies

digestives et la malabsorption peuvent aussi être à l'origine d'une carence en cobalamine (245). Les déficits congénitaux du métabolisme de la cobalamine sont liés à un déficit en Transcobalamine II (transporteur sérique de la cobalamine) ou en récepteurs du Facteur Intrinsèque (transporteur gastrique de la cobalamine).

V.1.3 Arguments en faveur d'un rôle potentiel du cycle de la méthionine dans le processus inflammatoire

V.1.3.1 Réactions de méthylation et expression des cytokines

Il a été rapporté que le vieillissement, l'inflammation chronique et les infections virales pouvaient être associés avec les réactions de méthylation, sans qu'aucun lien mécanistique n'ait pu être cependant clairement avancé. D'autre part, l'expression des gènes de l'IL-6, de l'IL-8 et du GM-CSF est très finement contrôlée et induite dans les tissus cibles par des stimuli appropriés. Les désordres de régulation de l'IL-6 sont associés à un certain nombre de pathologies comme certaines tumeurs, des maladies auto-immunes et des pathologies inflammatoires chroniques ou aiguës (246,247). Parmi les facteurs modulateurs, il semblerait que le statut de méthylation joue un rôle important dans l'expression de l'IL-6 (248) de l'IL-8 (249) ou encore du MCP-1 (250).

V.1.3.2 Le cycle de la méthionine et l'inflammation

Une diminution de l'activité du cycle de la méthionine va conduire à l'accumulation de l'homocystéine qui est reconnue comme étant un facteur de risque cardiovasculaire. De manière générale, un déficit en l'un de ces cofacteurs (vitamines B9 et/ou cobalamine) conduit à une augmentation d'homocystéine, qui est non seulement un facteur de risque cardiovasculaire bien connu, mais aussi associé à de nombreuses pathologies dégénératives et inflammatoires.

Le lien entre l'hyperhomocystéinémie et les maladies cardiovasculaires est connu depuis longtemps. Le mécanisme d'action n'est cependant pas encore clairement élucidé. Il a été démontré que le premier signe de l'athérosclérose, la plaque athéromateuse, est une lésion purement inflammatoire en réponse à une agression (251). En effet, Hofman et col. ont montré que l'homocystéine conduit à la libération d'un grand nombre de médiateurs inflammatoires (252), comme des taux accrus de $\text{TNF}\alpha$, une translocation nucléaire du facteur de transcription NF κ B, une expression accrue du récepteur des AGE (advanced glycation end-products) et de son ligand naturel (EN-RAGE), qui sont tous deux des partenaires récemment identifiés de la réaction inflammatoire (253).

D'autre part, les espèces cobalaminiées (glutathionylcobalamine, adénosylcobalamine, méthylcobalamine), sont essentielles pour la régulation de la NO synthase inducible (254). La génération de NO par cette enzyme est un déterminant majeur de la réaction inflammatoire. Les cobalamines régulent à la fois la production de NO et sa juste utilisation car 1) la cobalamine est responsable de la synthèse des substrats de la NOS, 2) elle module, en activant la méthylmalonyl CoA mutase, le rapport FAD/FMN essentiel à l'activité de la NOS. Un déficit de l'activité du cycle de la méthionine et/ou en cobalamines conduira à la production ou à la dérégulation des ROS (espèces réactives de l'oxygène comme O_2^- , H_2O_2 , ONOO-) ou encore des RNIS (reactive nitric oxide species) et conduisant à une atteinte pathologique. En particulier, la glutathionylcobalamine conduit à la production de NO par la NOS au stade initial de l'inflammation réduisant par la même la production de $\text{TNF}\alpha$ et donc contrôlant la réaction inflammatoire. Ainsi, le statut en cobalamine cellulaire est de plus en plus considéré comme étant un déterminant important de la réaction inflammatoire en permettant la génération de médiateurs inflammatoires mais aussi en contrôlant leur synthèse et/ou activité.

V.1.3.3 L'inflammation altère le cycle de la méthionine.

Il est actuellement reconnu que lors de la phase aigue de l'inflammation, il y a des modifications profondes du métabolisme protéique (255,256) et en particulier le métabolisme des acides aminés comme la méthionine et la cystéine (257). La voie de transsulfuration est

celle qui transforme l'homocystéine du cycle de la méthionine en cystéine (258). Lors du processus inflammatoire, la contribution de cette voie de trans-sulfuration augmente et constitue l'une des plus importantes sources de cystéine cellulaire, suggérant un besoin accru de cystéine durant l'inflammation. Cette cystéine est en fait un constituant essentiel du glutathion qui est le composé anti-oxydant majoritaire et qui est très impliqué lors du stress oxydant. L'inflammation va donc conduire à une activation du cycle de la méthionine augmentant à la fois la synthèse de cystéine et le potentiel intracellulaire de méthylation.

V.1.3.4 La cobalamine peut avoir un effet anti-inflammatoire

La cobalamine, sous forme de timbres, gels, pommades, est proposée en tant qu'anti-inflammatoire en traitement topique (259) notamment dans le traitement des maladies de la peau (260). Ces produits médicamenteux contiennent des molécules de cobalamine en tant que principe actif et sont destinés au traitement de pathologies inflammatoires, ulcéreuses et douloureuses de surfaces muqueuses, telles que la mucosite, la stomatite, la vestibulite, les ulcérations aphteuses, et le syndrome de Behcet. Par contre, dans ces pathologies, il n'y a pas d'association entre les taux d'homocystéine circulante et l'inflammation (261). La cobalamine est aussi proposée comme anti-inflammatoire pour le traitement des neuropathies généralisées ou périphériques locales (262). Le mécanisme d'action de la cobalamine en tant qu'anti-inflammatoire n'est malheureusement pas connu et la documentation relative à cet effet anti-inflammatoire est rare et peu explorée.

La cobalamine présenterait aussi un bénéfice quand administrée chez des patients allergiques. En effet, elle limiterait aussi la réaction allergique (263, 264) avec une amélioration de la respiration, de l'appétit, du sommeil et de la condition générale. Chez l'animal, elle diminuerait les concentrations d'interleukine-2. Des études récentes ont suggéré qu'un taux sérique de folates bas et une altération du métabolisme des folates soient des facteurs de risque potentiels pour le développement de l'asthme et des maladies atopiques, mais les résultats sont peu consistants.

Thuesen et col. montrent que les faibles taux de folates et le génotype TT du polymorphisme MTHFR-C677 étaient associés à une prévalence d'asthme plus élevée (265).

Cependant, une association directe entre symptômes d'asthme et carence en folates ou vitamine B12 n'était pas confirmée par le test d'explorations fonctionnelles respiratoires.

V.2 Objectifs

La réaction inflammatoire fait intervenir un certain nombre de médiateurs et d'intervenants intracellulaires dont la mobilisation aboutira à une modification profonde et transitoire du métabolisme cellulaire et tissulaire. Les effecteurs de type allergique et/ou proinflammatoire vont conduire à l'activation de phospholipases et d'autres protéines comme les cyclo oxygenases, (Cox), les lipoxigenases (LO), la NO synthase (NOS), et mobiliser des facteurs de transcription comme les GRs, NFkB, Stat, CERB, NF-AT, PPAR, etc... Toutes ces voies de signalisation sont susceptibles d'être affectées par la disponibilité en groupements méthyl.

Notre intention est dans cette partie de mon travail de déterminer dans quelle mesure la disponibilité en groupements méthyle influence la production de cytokines induites par un contexte inflammatoire (histamine, $TNF\alpha$) sur un modèle de cellules épithéliales pulmonaires humaines. Nous avons utilisé la lignée pulmonaire épithéliale 16HBE qui a montré une compatibilité de culture avec des concentrations variables de cobalamine. Les cellules MM39 et CF-KM4 n'ont pas pu être utilisées car leur dépendance en cette vitamine est très forte et ne permet pas leur étude dans ce cadre. En effet, ces dernières meurent ou dépérissent très vite en condition de culture contenant des concentrations réduites de cobalamine. Les cellules 16HBE ont été utilisées largement pour étudier la réaction inflammatoire pulmonaire (266).

Nous avons ainsi, dans ce travail, cherché à voir si et comment la cobalamine pouvait influencer la production de cytokines (ici IL6, IL8 et GM-CSF), induite par l'histamine et le $TNF\alpha$. Nous avons ensuite étendu ce travail et recherché s'il pouvait y avoir un effet d'influence réciproque avec des anti-inflammatoires comme la dexaméthasone.

V.3 Résultats et discussion

V.3.1 Effet du TNF α et de l'histamine sur l'expression des cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF) produites par les cellules 16HBE

Nous nous sommes intéressés dans cette partie au dosage de trois cytokines pro-inflammatoires : l'IL-6, IL-8 et GM-CSF, le GM-CSF étant impliqué dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles dans les voies aériennes. L'IL-6 et l'IL-8 sont augmentées dans l'asthme et sont considérées ici, avec le GM-CSF, comme étant des marqueurs de l'inflammation.

La stimulation des cellules pendant 12h avec 10 ng/ml de TNF α , induit une augmentation de la production des trois cytokines : 1200 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour l'IL-6 ; 800 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour l'IL-8, et 45 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour le GM-CSF, vs contrôle qui est de 200 $\pm$ 3, 170 $\pm$ 5, et 10 $\pm$ 1 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour les 3 cytokines, respectivement (figure 54).

La stimulation des cellules pendant 12h avec 10 μ M d'histamine, induit une augmentation de la production des trois cytokines : 850 $\pm$ 25 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour l'IL-6 ; 430 $\pm$ 56 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour l'IL-8, et 33 $\pm$ 6 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour le GM-CSF, vs contrôle qui est de 200 $\pm$ 3, 170 $\pm$ 5, et 10 $\pm$ 1 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour les 3 cytokines, respectivement (figure 54).

La stimulation des cellules pendant 12h avec le mélange de 10 ng/ml de TNF α et 10 μ M d'histamine, induit une augmentation de la production des trois cytokines : 1400 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour l'IL-6 ; 1000 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour l'IL-8, et 30 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour le GM-CSF, vs contrôle qui est de 200, 170, et 10 pg/ml/10⁶ cellules /heure, $p < 0.001$ pour les 3 cytokines, respectivement (figure 54).

Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature (267). AOKI *et al* ont montré que les cellules 16HBE répondent à la stimulation à l'histamine et au $\text{TNF}\alpha$ par la production d'une quantité importante en IL-8 (268). Cependant, ces auteurs avaient utilisé des concentrations plus fortes en histamine (de l'ordre du millimolaire) pendant 6h pour l'étude RT-PCR et 16h pour l'étude ELISA contre un temps de stimulation de 12h et une concentration de 10 μM dans notre cas. Avec ces conditions de stimulation, ces auteurs trouvent des concentrations en IL-8 sécrétées (de l'ordre de 2000 pg/ml) plus importantes que dans notre cas de figure. Li et al., ont, quant à eux, observé, sur des cellules endothéliales et à une concentration de 10 μM en histamine, une augmentation importante de production par les cellules d'interleukine 8 et 6 mais ceci après 24h de stimulation (269).

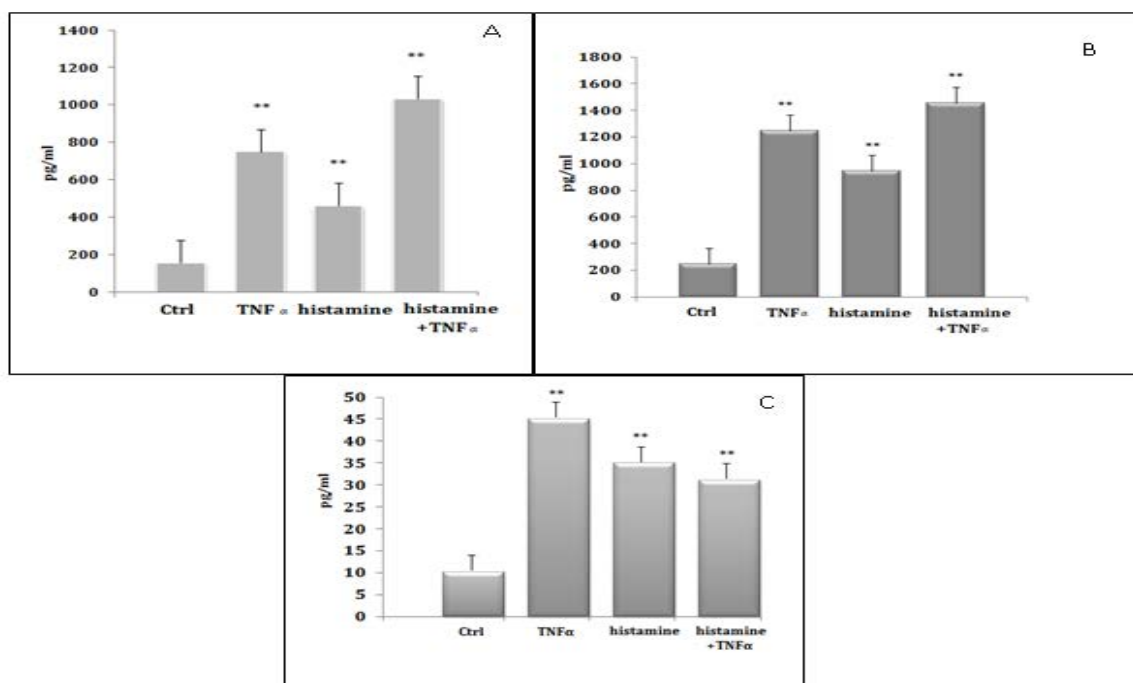


Figure 54 : Dosage des cytokines IL-8 (A), IL-6 (B), GM-CSF (C) par ELISA. Les cellules 16HBE ont été stimulées par le $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) pendant 12h, l'Histamine (10 μM) pendant 12h ou par la combinaison : Histamine (10 μM) et $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) pendant 12h. 4x100 μl de surnageant sont prélevés par puits pour un dosage ELISA. La lecture au spectromètre se fait à 450nm. Les valeurs obtenues sont rapportées à une gamme étalon réalisée à partir de la dilution des standards fournis avec le Kit. (Fiche technique n°11). Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en triplicates.

Le TNF α induit ainsi une réponse importante par les cellules 16HBE. La production d'IL-8 est multipliée par 4 par rapport au contrôle et l'histamine augmente la production d'IL-8 par deux par rapport au contrôle. La combinaison histamine et TNF α semble montrer un effet cumulatif des effets de chaque facteur. Dans ce cas, La production des cytokines, IL-8 et IL-6 est plus fortement amplifiée (IL-8 x 5, IL-6 x 7).

V.3.2 Influence de la cobalamine sur la production des cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF) par les cellules 16HBE stimulées avec le TNF α et l'Histamine

Afin d'explorer l'effet d'une supplémentation en cobalamine sur la réponse des cellules épithéliales bronchiques à la stimulation par le TNF α ou par l'histamine, nous avons, dans cette partie du travail, reproduit les mêmes expériences que précédemment mais en ajoutant de la cobalamine.

Les cellules 16HBE sont cultivées dans un milieu DMEM carencé en cobalamine. Le milieu de culture contient normalement 5% de sérum de veau foetal (SVF). Le dosage de la quantité de cobalamine contenu dans le milieu de culture est de 36.5 pM, ce qui correspond à une carence. En effet la concentration physiologique en cobalamine sérique est de 150 à 650 pM. Nous avons comparé ainsi la réponse des cellules 16HBE cultivées en condition de carence en cobalamine avec les mêmes cellules cultivées en milieu contenant une concentration finale de 100 nM en cobalamine (figure 55).

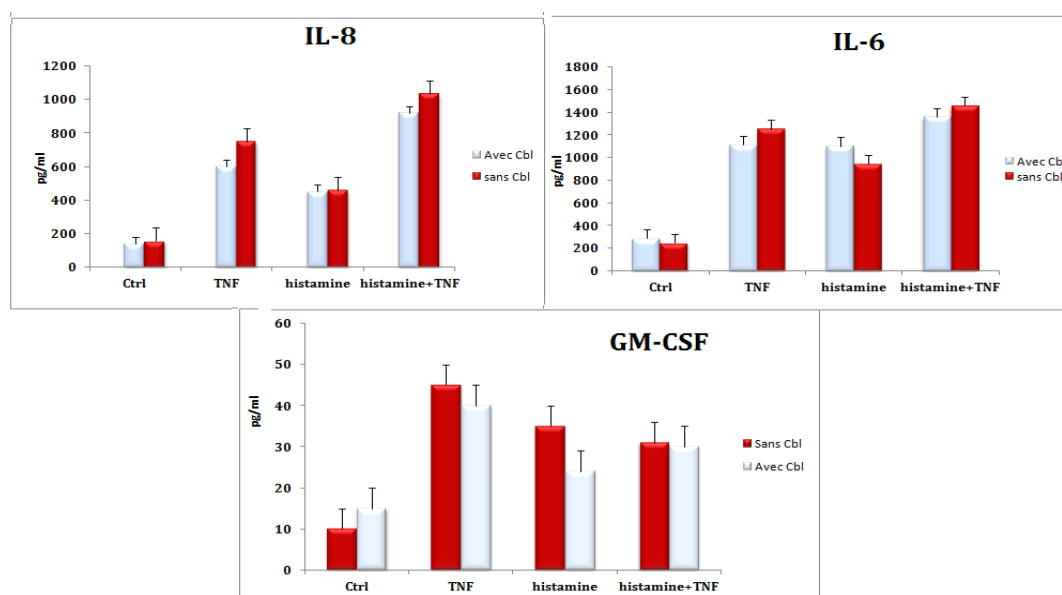


Figure 55 : Dosage des cytokines IL-8, IL-6, GM-CSF par ELISA. Les cellules 16HBE ont été cultivées 48 heures avec 100 nM de cobalamine (Cbl), stimulées par le TNF α (10 ng/ml, l'histamine (10 μ M) ou par la combinaison (Histamine+TNF α) pendant 12h. 4x100 μ l de surnageant sont prélevés par puit pour un dosage ELISA. La lecture au spectromètre se fait à 450nm. Les valeurs obtenues sont rapportées à une gamme étalon réalisée à partir de la dilution des standards fournis avec le Kit. Cette figure est representative de 3 expériences différentes réalisées en triplicates. Nous n'observons aucune différence significative de sécrétion des trois cytokines en présence de concentrations faibles ou fortes de cobalamine. (Fiche technique n°11).

Le profil général des histogrammes est le même entre les deux conditions de culture. Les expériences ont été effectuées 3 fois en triplicate chacune et aucune variation statistique significative n'a pu être déterminée par le test ANOVA. En conclusion, les résultats du dosage du taux des trois cytokines d'intérêt dans le surnageant des cellules 16HBE montrent que la synthèse de ces cytokines, après stimulation des cellules, est indépendante du statut vitaminique B12.

V.3.3 Effets de la Dexaméthasone sur la production des cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF).

Les glucocorticoïdes sont capables d'inhiber la libération de divers médiateurs inflammatoires et des cytokines comme l'IL-1, l'IL-2, le TNF- α , l'interféron β et l'interféron- γ (270, 271). Il a également été montré dans divers modèles de culture cellulaire, y compris les cultures épithéliales et les fibroblastes provenant des voies respiratoires humaines, que les glucocorticoïdes peuvent inhiber la production d'IL-8.

Nous avons pensé alors à utiliser un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone (Dex), utilisée dans le traitement de l'inflammation chronique chez les patients asthmatiques afin d'explorer son effet dans la réponse de ces cellules stimulées avec le TNF α et avec l'histamine. Pour le faire, les cellules 16HBE ont été incubées ou non pendant 48 h avec 100 nM de cobalamine en présence ou non de 100 nM de Dex. 12 heures avant la fin de l'expérience, le TNF α (100 nM) et/ou l'histamine (10 nM) ont alors été rajoutés. Le surnageant est récupéré et l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF dosés par ELISA. Les résultats sont présentés dans les figures 56, 57 et 58.

V.3.3.1 Effets de la Dexaméthasone sur la production de l'IL-8

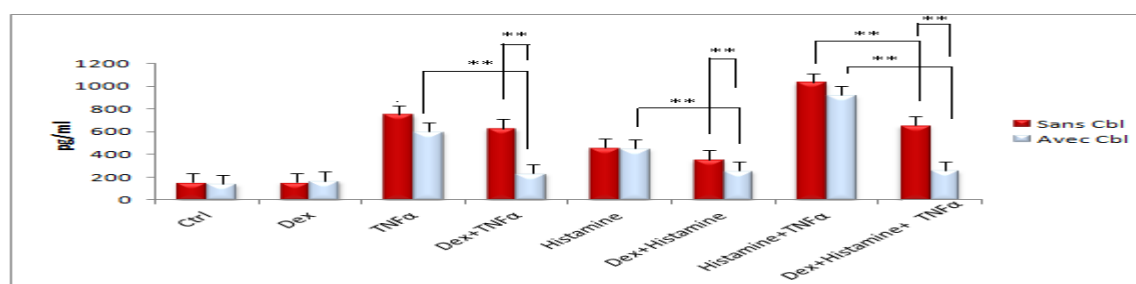


Figure 56 : Effet de la Dexaméthasone (Dex) sur le taux d'expression d'IL-8 par les cellules 16HBE cultivées dans différentes conditions: avec (histogrammes bleus) ou sans Cbl (100nM) (histogrammes rouges) pendant 48h et stimulées ou non avec du TNF α (10 ng/ml), de l'Histamine (10 μ M) ou la combinaison (Histamine+TNF α) pendant 12h en présence ou non du Dex (10 μ M) pendant 12h. Cette figure est representative de 3 expériences différentes.

**: $p < 0.01$

Nous observons que la Dex ne modifie pas l'augmentation de la production d'IL-8 induite par le TNF α ni par l'histamine en condition de concentration faible en cobalamine. Par contre la Dex est capable de réduire l'augmentation de l'IL-8 provoquée par le mélange TNF α et histamine (-30 +/- 6%, $p < 0.01$). Au contraire, lorsque les cellules sont cultivées en présence de cobalamine, la Dex est alors capable de diminuer les productions d'IL-8 induites par le TNF α (-55 +/- 6% ; $p < 0,01$), l'histamine (-30 +/- 5% ; $p < 0,01$), et le mélange TNF α et histamine (-75 +/- 8% ; $p < 0,01$). Ainsi la cobalamine semble potentialiser les effets de la Dex. Nous pouvons aussi remarquer que c'est seulement en présence de la cobalamine, que la Dex sera capable de ramener les valeurs de l'IL-8 à hauteur des valeurs contrôle, en présence soit de TNF α , d'histamine ou encore du mélange TNF α et histamine (figure 56).

V.3.3.2 Effets de la Dexaméthasone sur la production de l'IL-6

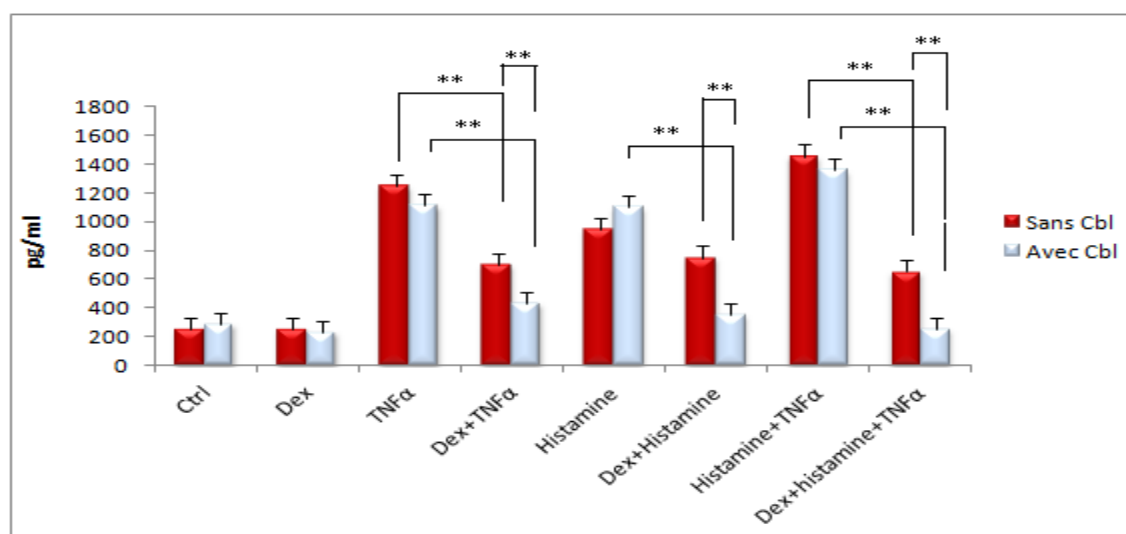


Figure 57 : Effet du Dexaméthasone sur le taux d'expression d'IL-6 par les cellules 16HBE cultivées dans différentes conditions : avec (histogrammes bleus) ou sans Cbl (100nM) (histogrammes rouges) pendant 48h et stimulées ou non avec du TNF α (10 ng/ml), de l'histamine (10 μ M) ou la combinaison (histamine+TNF α) pendant 12h en présence ou non du Dex (10 μ M) pendant 12h. Cette figure est representative de 3 expériences différentes.
 ** : $p < 0.01$

Nous observons que la Dex réduit l'augmentation de la production d'IL-6 induite par le TNF α (-40+/- 6%, $p < 0.01$), par l'histamine (-40+/- 6%, $p < 0.01$) ou par le mélange histamine + TNF α (-55+/- 7%, $p < 0.01$), en condition de concentration faible en cobalamine. Lorsque les cellules sont cultivées en présence de 100 nM de cobalamine, la Dex est alors capable de diminuer plus fortement les productions d'IL-6 induites par le TNF α (-65+/- 6% ; $p < 0,01$), l'histamine (-60+/- 5% ; $p < 0,01$), et le mélange TNF α et histamine (-90+/- 8% ; $p < 0,01$). Ainsi la cobalamine semble ici aussi potentialiser les effets de la Dex. Comme dans le chapitre précédent, nous pouvons aussi remarquer que c'est seulement en présence de cobalamine, que la Dex sera capable de ramener les valeurs de l'IL-6 à hauteur des valeurs contrôle, en présence soit de TNF α , d'histamine ou encore du mélange TNF α et histamine (figure 57).

V.3.3.3 Effets de la Dexaméthasone sur la production du GM-CSF

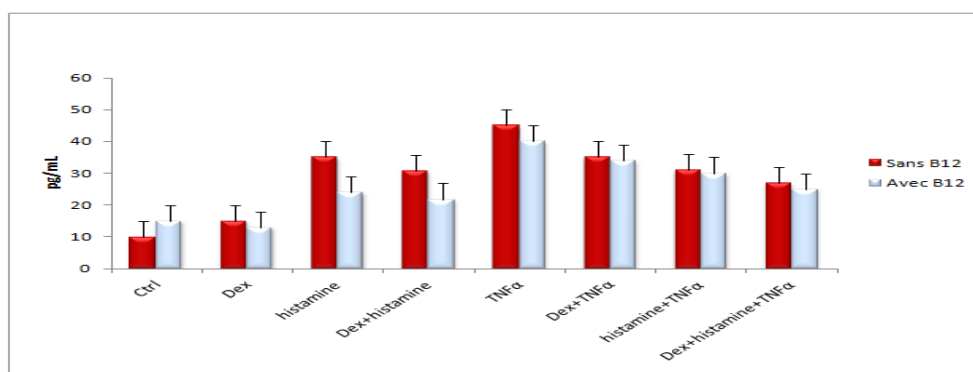


Figure 58 : Effet du Dexaméthasone sur le taux d'expression de GM-CSF par les cellules 16HBE cultivées en différentes conditions : avec (histogrammes bleus) ou sans cobalamine (100nM) (histogrammes rouges) pendant 48h et stimulées ou non avec du TNF α (10 ng/ml), de l'histamine (10 μ M) ou la combinaison (histamine+TNF α) pendant 12h en présence ou non du Dex (10 μ M) pendant 12h. Cette figure est représentative de 3 expériences différentes.

Nous observons que la Dex ne semble avoir aucun effet sur les productions de GM-CSF induites par le TNF α ou l'histamine ajoutées seules ou encore par le mélange histamine + TNF α dans les conditions de culture en présence ou non de 100 nM de cobalamine (figure 58). Nous nous attendions à un effet similaire à celui observé pour les deux autres cytokines.

Il est à noter que le taux de production de GM-CSF par les cellules 16HBE est faible (de l'ordre de 10 à 15 pM) et qu'un effet potentiel de la Dex est difficilement observable car la sensibilité de la technique d'ELISA se situe entre 5 et 10 pM.

Plusieurs études montrent que le Dex pourrait inhiber l'effet du TNF α par un mécanisme transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Mukaida et al. (272, 273) ont montré un mécanisme transcriptionnel de la Dex qui serait dû à l'inhibition de la fixation de NF κ B. Alors quel serait le type de mécanisme mis en jeu par la Dex dans notre étude ? Et quel serait le rôle de la cobalamine à ce niveau ?

V.3.4 Etude de l'expression des gènes des cytokines IL-6 et IL-8

Afin d'explorer à quel niveau la dexaméthasone intervient dans le processus de production de ces cytokines par les cellules 16HBE, nous avons étudié leurs expressions dans les différentes conditions expérimentales par qPCR (le descriptif de la technique est décrite extensivement en fiche technique n°18).

V.3.4.1 Etude de l'expression des gènes de l'IL-8

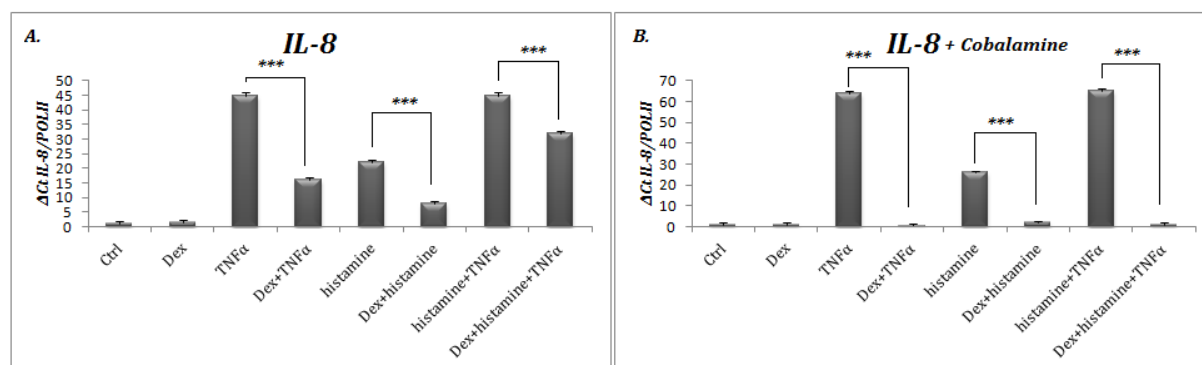


Figure 59: Etude de l'expression de l'IL-8 par RT-qPCR dans les cellules 16HBE. Les cellules ont été extraites après traitements avec de la Dex (1 μM), de l'histamine (10 μM) et du TNFα (10 ng/ml) pendant 12h en présence (A) ou non (B) de 100 nM de cobalamine pendant 48h. Une RT-qPCR a été effectuée. En axe des ordonnées, l'augmentation de l'expression des différentes cytokines par rapport au contrôle. Le gène de référence étant la POLII. (Fiche technique n°18). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. *** : $p < 0.001$.

Nous voyons (figure 59 A) que l'expression de l'IL-8 est augmentée lorsque les cellules sont stimulées avec le TNFα ($x 45 \pm 2$, $p < 0,001$), l'histamine ($x 22 \pm 2$, $p < 0,001$) ou avec le mélange TNFα + histamine ($x 45 \pm 2$, $p < 0,001$) en présence d'une concentration faible de cobalamine. Le niveau d'expression stimulée d'IL-8 est encore plus important lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une concentration élevée en cobalamine (figure 59.B) puisqu'il atteint alors $x 64 \pm 2$, 26 ± 2 et 65 ± 3 pour les stimulations induites par le TNFα, l'histamine et le mélange TNFα + histamine, respectivement.

Nous voyons aussi que la Dex est capable de réprimer partiellement l'expression du gène de l'IL-8 induite par le TNFα ($-65 \pm 6\%$, $p < 0.01$), par l'histamine ($-64 \pm 6\%$, $p < 0.01$) ou par le mélange TNFα + histamine ($-30 \pm 5\%$, $p < 0.01$) en absence de cobalamine. Par contre, lorsque les cellules sont cultivées en présence de cobalamine, l'effet de la Dex est fortement

potentialisé. Ainsi, la réduction de l'augmentation de l'expression du gène de l'IL-8 atteint 99+/-7%, $p<0.001$, pour le TNF α , -92+/-6%, $p<0.001$, pour l'histamine et -98+/-4%, $p<0.001$, pour le mélange TNF α + histamine. Ainsi, la cobalamine semble avoir un effet important sur la potentialisation de l'effet de la Dex (figure 59 B).

V.3.4.2 Etude de l'expression des gènes de l'IL-6

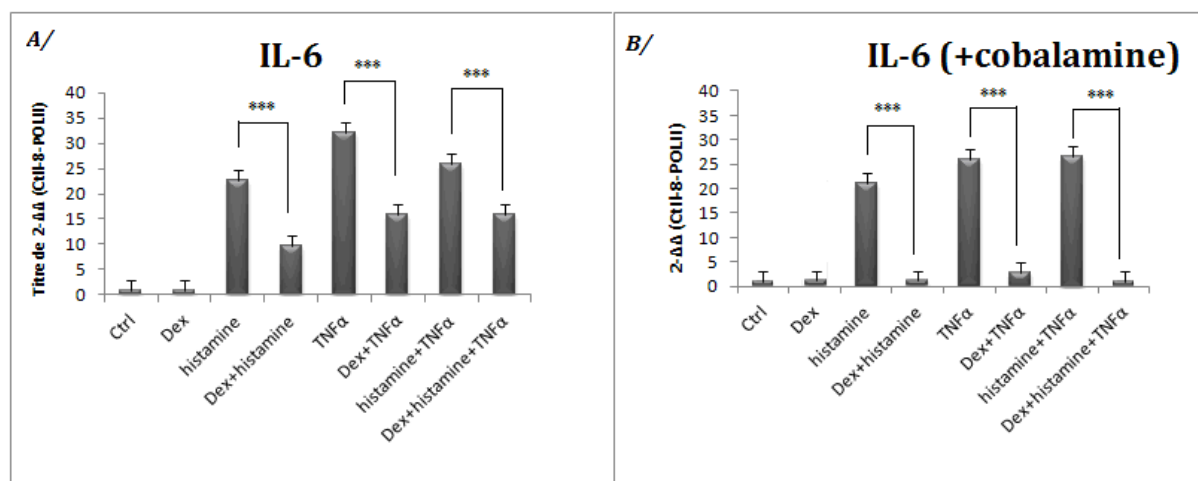


Figure 60 : Etude de l'expression de l'IL-6 RT-qPCR dans les cellules 16HBE. Les cellules ont été extraites après traitement avec la Dex (1μM), l'histamine (10μM) et le TNFα (10ng/ml) pendant 12h en présence (A) ou non (B) de 100nM de cobalamine pendant 48h. Une RT-qPCR a été effectuée. En axe des ordonnées l'augmentation de l'expression des différentes cytokines par rapport au contrôle. Le gène de référence étant la POLII. (Fiche technique n°18). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. *** : $p<0.001$.

Nous voyons (figure 60.A) que l'expression de l'IL-6 est augmentée lorsque les cellules sont stimulées avec le TNFα ($x 32 \pm 6$, $p<0,001$), l'histamine ($x 24 \pm 5$, $p<0,001$) ou avec le mélange TNFα + histamine ($x 26 \pm 3$, $p<0,001$) lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une concentration faible de cobalamine. Le niveau de cette expression stimulée d'IL-6 ne change pas significativement lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une concentration élevée en cobalamine (figure 60.B) puisqu'il atteint alors $x 25 \pm 3$, 21 ± 3 et

26+/-5 pour les stimulations induites par le TNF α , l'histamine et le mélange TNF α + histamine, respectivement.

Nous voyons aussi que la Dex est capable de réprimer partiellement l'expression du gène de l'IL-6 induite par le TNF α (-50 +/-6%, $p<0.01$), par l'histamine (-60 +/-7%, $p<0.01$) ou par le mélange TNF α + histamine (-40 +/-5%, $p<0.01$) en absence de la cobalamine.

Par contre, lorsque les cellules sont cultivées en présence de la cobalamine, l'effet de la Dex sur la stimulation de l'expression de l'IL-6 dans les différentes conditions est fortement potentialisé. Ainsi, cet effet atteint -90+/-7%, $p<0.001$, pour le TNF α , -90+/-6%, $p<0.001$, pour l'histamine et -81+/-6%, $p<0.001$, pour le mélange TNF α + histamine. La cobalamine semble donc avoir un effet modeste sur la stimulation de l'expression du gène de l'IL-6 induite par le TNF α et l'histamine mais semble par contre avoir un effet important sur la potentialisation de l'effet de la Dex.

V.3.5 Etude de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes

Nous avons vu que la dex induisait une diminution de l'expression des gènes de l'IL-8 et de l'IL-6 par les cellules 16HBE. Cet effet est puissant pour le gène de l'IL-8, mais modeste pour le gène de l'IL-6. D'autre part, nous avons vu que la cobalamine potentialisait l'effet de la dex sur la stimulation de l'expression du gène de l'IL-6 induite par le TNF α et l'histamine. La Cobalamine semblerait potentialiser l'effet de la Dex à un niveau transcriptionnel. Il est connu qu'à ce niveau, les glucocorticoïdes agissent sur l'expression des gènes via l'activation de récepteurs nucléaires, appelés GR. Les GR se fixent sur des éléments de réponses sur les promoteurs des gènes cibles ce qui induit leur inhibition ou leur activation. Ainsi, il était nécessaire d'évaluer l'expression des GR α et β dans les différentes conditions de cultures et de vérifier l'expression basale de ces récepteurs dans notre modèle cellulaire.

Afin d'expliquer le rôle que joue la cobalamine dans la potentialisation de l'effet Dex sur les cellules 16HBE, nous avons regardé dans cette partie expérimentale si l'expression des GRs est influencée par l'incubation ou non des cellules avec la cobalamine. Les cellules

16HBE ont été incubées avec ou sans cobalamine en présence ou non de la Dex pendant 12 h, et ensuite stimulées ou non avec du TNF α ou de l'histamine. L'ARN est ensuite extrait et une RT-PCR a été réalisée. Les résultats sont présentés dans la figure 61.

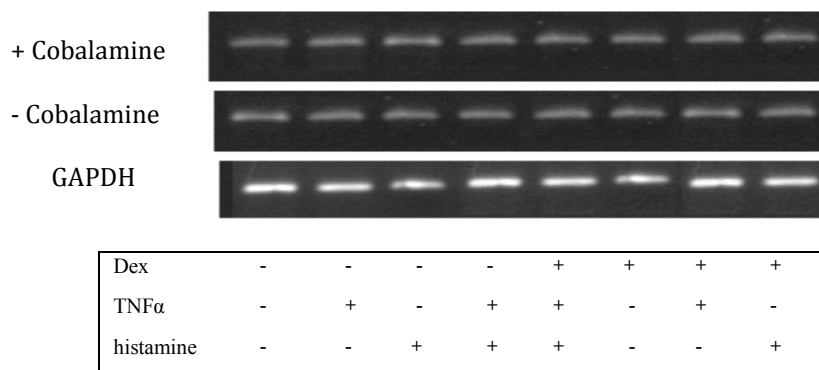


Figure 61 : Influence de la cobalamine sur l'expression du GR β par les cellules 16HBE. Etude de l'expression des gènes GR β par RT-PCR (fiche technique n°16) après stimulation avec TNF α (10 ng/ml), Histamine (10 μ M) ou la combinaison (TNF α , histamine) en présence ou en absence de 100 nM de cobalamine. Cette figure est representative de 3 expériences différentes.

Nous observons que l'expression du GR β n'est influencée ni par le TNF α ni par l'histamine. Ceci est indépendant de la présence ou de l'absence de la cobalamine. Nous avons testé alors l'effet de la Dex sur cette expression. Les résultats montrent, comme précédemment, l'absence de variation de cette expression en fonction de la concentration en cobalamine.

Ainsi, on peut conclure que l'expression de GR β n'est pas influencée par les différentes conditions de traitement de notre étude. Ainsi, GR β ne serait pas impliqué dans l'effet observé de la dex en présence de la cobalamine sur l'expression de l'IL-6 et l'IL-8.

Le GR β est connu comme étant un dominant négatif dans la réponse aux glucocorticoïdes comme la Dex. Généralement, l'augmentation de l'expression de GR β est associée à un effet de résistance aux glucocorticoïdes étant donné que celui-ci est capable de fixer les

glucocorticoïdes sans pouvoir interagir directement avec l'ADN sur les éléments de réponses aux glucocorticoïdes qui se trouvent dans les promoteurs de plusieurs gènes. De manière comparable, une diminution de la synthèse du GR β pourrait rendre compte de l'hypersensibilité aux glucocorticoïdes. En effet, le mode d'action du GR β n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, trois mécanismes sont décrits dans la littérature: (1) le GR β pourrait former un hétérodimère avec le GR α , incapable de s'associer à l'ADN (2) le GR β pourrait lier des protéines accessoires ou des coactivateurs du GR α et ainsi inhiber leur action ; (3) le GR β pourrait former, soit un homodimère, soit un hétérodimère avec le GR α , capable de fixer les éléments de réponse aux glucocorticoïdes mais possédant une activité transcriptionnelle nulle ou réduite.

Etant donné que GR α est connu pour être activé par les GC et que l'action des glucocorticoïdes passerait généralement par l'activation de celui-ci, nous avons alors regardé si l'expression de GR α est influencée par la cobalamine. Les cellules 16HBE ont été incubées avec ou sans cobalamine en présence ou non de la dex pendant 12 h, et ensuite stimulées ou non avec du TNF α ou de l'histamine. L'ARN est ensuite extrait et une RT-PCR a été réalisée. Les résultats sont présentés dans la figure 62.

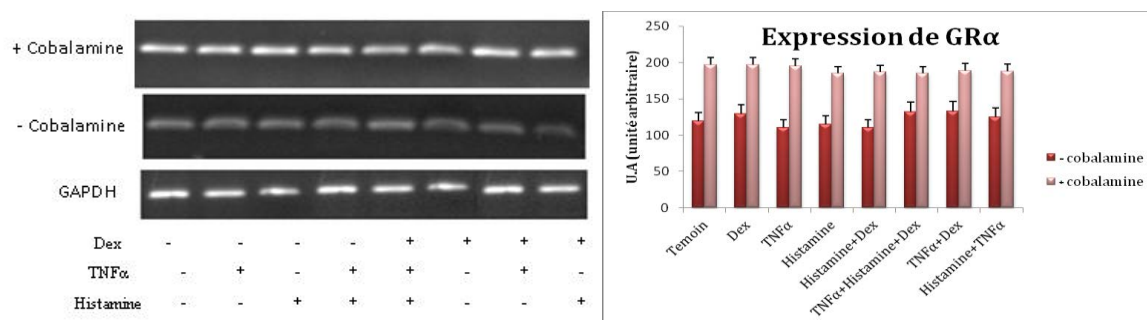


Figure 62 : Influence de la Cbl sur l'expression du GR α par les cellules 16HBE. Etude de l'expression des gènes GR α par RT-PCR (fiche technique n°16) après stimulation des cellules avec le TNF α (10ng/ml), de l'histamine (10 μ M) ou la combinaison (TNF α , Histamine) pendant 12h ; en présence ou en absence de 100 nM de Cobalamine et on absence ou en présence de la Dex à 1 μ M pendant 12h. Cette figure est representative de 3 expériences différentes.

La mesure de l'intensité des bandes obtenues dans les différentes conditions expérimentales, la stimulation des cellules ou non avec le $\text{TNF}\alpha$, l'histamine ou le mélange des deux, ne montre pas de différence significative de l'expression de $\text{GR}\alpha$. L'utilisation de la dexaméthasone ne semble pas influencer cette expression non plus. Ainsi, l'expression de $\text{GR}\alpha$ semble être insensible à ces stimulants.

Nous avons alors regardé si l'incubation des cellules 16HBE avec 100nM de cobalamine pendant 48h en plus des différentes conditions de stimulations, $\text{TNF}\alpha$, histamine ou le mélange $\text{TNF}\alpha$ + histamine avec ou sans dexaméthasone, pourrait influencer l'expression de $\text{GR}\alpha$.

Les résultats de la RT-PCR (figure 62) ne montrent pas de variation significative de l'expression de $\text{GR}\alpha$ en fonction du traitement en présence ou en absence de la cobalamine. Cependant, l'analyse de l'intensité des bandes issues de la RT-PCR, montre qu'on a une expression plus importante de $\text{GR}\alpha$ dans les cellules stimulées avec la cobalamine comparée à celle observée pour les cellules non stimulées. A des quantités d'ARN (1 μg) égales utilisées pour la RT-PCR, cette différence d'expression observée semble être due à l'effet de la cobalamine. Ainsi, la stimulation des cellules avec la cobalamine serait responsable de l'augmentation de l'expression de $\text{GR}\alpha$.

En conclusion, nous observons que la cobalamine permet, d'un côté, de potentialiser l'effet de la Dex sur l'expression de l'IL-6 et l'IL-8 et de l'autre côté, d'induire une augmentation de l'expression des $\text{GR}\alpha$. Les $\text{GR}\alpha$ sont connus pour être des récepteurs pour les glucocorticoïdes dont la dexaméthasone. Ainsi, la question qui se pose à ce stade est de savoir si l'augmentation de l'expression de $\text{GR}\alpha$ par la cobalamine pourrait être impliquée dans l'effet de potentialisation de l'effet de la Dex par la cobalamine.

V.3.6 Immunoprécipitation de la Chromatine et étude de la fixation des GR α sur les promoteurs d'IL-6 et d'IL-8

A ce stade de l'étude, nous avons montré une augmentation de l'expression des GR α par la Cbl et un effet plus important des glucocorticoïdes en présence de la cobalamine mais, comme nous l'avons expliqué dans l'introduction de la troisième partie, les glucocorticoïdes peuvent avoir plusieurs mécanismes d'action qui peuvent être soit génomiques ou soit non génomiques. L'action génomique des glucocorticoïdes peut être liée à sa capacité d'interagir avec des facteurs de transcription comme le NF κ B ou l'AP-1 mais aussi par la fixation directe sur des éléments de réponse GRE dans les régions promotrices des gènes. Ainsi l'étude de la région promotrice des gènes des cytokines IL-6 et IL-8 par immuno-précipitation de la chromatine était nécessaire pour valider ou exclure l'hypothèse selon laquelle l'action des glucocorticoïdes dans notre cas serait une action génomique par fixation sur l'ADN.

Nous avons entrepris alors de réaliser une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine qui permet de regarder la fixation du GR sur la région promotrice des gènes codant pour l'IL-6 et l'IL-8. La technique est détaillée dans la fiche technique n°17. Dans cette technique, nous avons utilisé des amorces qui permettent d'amplifier par PCR la région -250 à +15 du gène de l'IL-6 et de la région -126 à +61 du gène de l'IL-8. Ces zones couvrent les séquences des promoteurs minimaux. La fixation du GR sur ces zones induirait une inhibition plus importante sur la transcription que sa fixation sur les séquences GREs connues et qui se situent plus loin dans les promoteurs dans les zones dites *enhancer*. La séquence consensus connue, GRE, la plus proche du site d'initiation de la transcription de l'IL-8 se situe entre -325 et -330 pb et entre la zone choisie pour l'étude de l'immunoprécipitation de la chromatine pour l'IL-6 couvre des sites de fixation de plusieurs GRE dont celui qui est au niveau de la TATA box à -21 pb ou celui qui se situe autour du site d'initiation de la transcription du promoteur de l'interleukine 6 (274).

Quand à l'étude du promoteur de l'IL-8, nous avons choisi la zone -126 à +61 qui couvre un site GRE qui se trouve à +14 pb du site de l'initiation de la transcription (275).

Les promoteurs des gènes de l'IL-8 et de l'IL-6 sont très similaires. Ils contiennent des sites consensus de reconnaissance pour CCAAT/ NF1, AP1, AP2, NF- κ B, NFAT, C/EPB entre autres.

V.3.6.1 Le GR α se fixe sur le promoteur de l'IL-8 en présence de la cobalamine

La figure 63 présente les résultats obtenus avec l'immunoprécipitation de la chromatine, cette technique permet d'étudier la fixation des protéines à l'ADN. En l'occurrence ici nous avons regardé la fixation de GR α sur la région promotrice du gène de l'IL-8 après traitement avec soit le TNF α , soit l'histamine, ou encore la Dex.

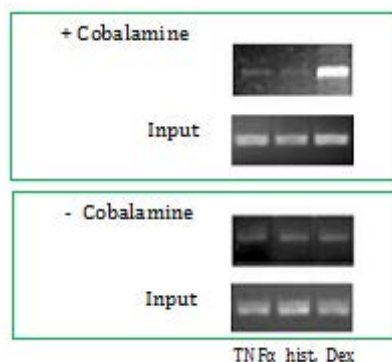


Figure 63: Immunoprécipitation du site de fixation du GR α sur le promoteur de l'IL-8. Les cellules 16HBE ont été incubées ou non avec de la Cobalamine (100 nM) pendant 24 h, avec ou non du TNF α (10ng) pendant 8h, avec ou non de l'Histamine (10 μ M) pendant 8h et avec ou non de la Dex (1 μ M) pendant 8h. Les cellules ont été utilisées pour réaliser une ChIP (Fiche technique n°17) avec les amorces dirigées contre la zone -212 à +61 pb du promoteur de l'IL-8 et avec des anticorps anti-GR α . Input : représente l'ADN non immunoprécipité qui permet d'estimer la quantité d'ADN présente dans chaque échantillon. Cette figure est representative de 3 expériences différentes.

Nous observons que lorsque les cellules 16HBE sont cultivées en concentration faible de cobalamine, ni l'histamine, ni le TNF α et surtout ni la Dex n'induit une fixation du GR α sur la

zone -121 à +61 du promoteur du gène de l'IL-8. Par contre, lorsque les cellules sont cultivées en concentrations élevées de cobalamine, on trouve une fixation importante du GR α sur cette zone induite pas la Dex.

V.3.6.2 Le GR α se fixe sur le promoteur de l'IL-6 en présence de la cobalamine

La figure 64 présente les résultats obtenus avec l'immunoprécipitation de la chromatine, cette technique permet d'étudier la fixation des protéines à l'ADN. En l'occurrence ici nous avons regardé la fixation de GR α sur la région promotrice du gène de l'IL-6 après traitement avec soit le TNF α , soit l'histamine, ou encore la Dex.

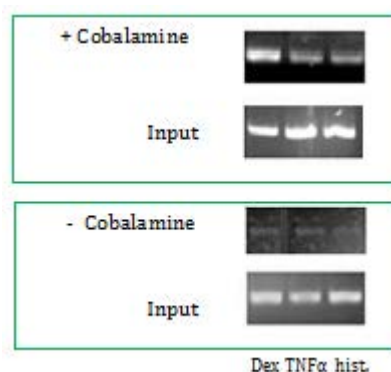


Figure 64: Immunoprécipitation du site de fixation du GR α sur le promoteur de l'IL-6. Les cellules 16HBE ont été incubées ou non avec de la Cobalamine (100 nM) pendant 24 h, avec ou non du TNF α (10ng) pendant 8h, avec ou non de l'Histamine (10 μ M) pendant 8h et avec ou non du dex (1 μ M) pendant 8h. Les cellules ont été utilisées pour réaliser une ChIP (Fiche technique n°17) avec les amorces dirigées contre la zone -250 à +15 pb du promoteur de l'IL-6 et avec des anticorps anti-GR α . Input : représente l'ADN non immunoprécipité qui permet d'estimer la quantité d'ADN présente dans chaque échantillon. Cette figure est representative de 3 expériences différentes.

Nous trouvons des résultats très similaires à ceux trouvés pour l'IL-8. Nous observons que lorsque les cellules 16HBE sont cultivées en concentration faible de cobalamine, ni l'histamine, ni le TNF α et surtout ni la dexaméthasone n'induit une fixation du GR α sur la zone -250 à +15 du promoteur du gène de l'IL-6. Par contre, lorsque les cellules sont cultivées en concentration élevée de cobalamine, on trouve une fixation importante du GR α sur cette zone, induite par la Dex.

La première remarque qu'on peut tirer de nos résultats de ChIP est l'absence de la fixation du GR α sur les zones étudiées des promoteurs des gènes IL-6 et IL-8 après stimulation des cellules avec le TNF α ou l'histamine bien que les séquences promotrices des deux gènes portent des séquences GREs. Ainsi, en absence des glucocorticoïdes, en l'occurrence ici de la Dex, les zones promotrices étudiées ne fixent pas le GR α qui est probablement présent au niveau du cytoplasme sous une forme dimérique associé aux protéines Hsp90 et Hsp70.

L'activation du GR est décrite dans la littérature comme étant essentiellement dépendante de la fixation de son ligand. Cependant, la présence de forme de GR actif indépendamment de la fixation du ligand a été également décrite (276). Cette forme de GR semble ne pas intervenir dans notre cas de figure étant donné qu'on observe un effet inhibiteur de l'expression des deux cytokines IL-6 et IL-8 uniquement en présence de la Dex.

La deuxième remarque est que la Dex induit une immunofixation du GR α sur le promoteur des deux gènes de l'IL8 et de l'IL-6, uniquement lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une concentration élevée de cobalamine. Ainsi, selon ce résultat, la présence de la cobalamine dans le milieu serait nécessaire pour la fixation du GR α après son activation avec la Dex. Ceci est concordant avec l'observation effectuée dans le paragraphe (V.3.4) selon laquelle l'effet de la Dex sur la diminution de l'expression de l'IL-8 et de l'IL-6 induite par le TNF α et l'histamine serait plus important en présence de cobalamine.

Maintenant, la question qui se pose à ce stade est de savoir comment expliquer qu'on observe un effet de la Dex sur l'expression de l'IL-6 et de l'IL-8 lorsque les cellules sont cultivées en concentration faible de cobalamine, condition où l'on n'observe pas de fixation du GR α sur les deux promoteurs.

V.4 Conclusion

Nous suggérons ici que la cobalamine jouerait un rôle important dans la potentialisation de l'effet de la dexaméthasone sur la sécrétion d'acteurs majeurs dans l'inflammation pulmonaire qui sont les cytokines l'IL-6 et l'IL-8. La recherche du mécanisme de cet effet, montre l'implication du récepteur nucléaire GR α connu comme étant impliqué dans la transcription d'un certain nombre de gènes. En effet, plusieurs corticoïdes se fixent sur ce récepteur afin d'accéder aux régions promotrices des gènes cibles. Il a été décrit plusieurs conséquences à cette fixation, qui peuvent aller de l'activation jusqu'à l'inhibition de l'expression des gènes concernés (277). D'après nos résultats, la dexaméthasone, qui est un ligand des GRs, aurait un effet plutôt inhibiteur de la stimulation de l'expression des deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-6 et l'IL-8, induite par le TNF α et l'histamine. L'augmentation de l'expression de GR α par la cobalamine n'est pas la seule explication à cet effet. En effet, l'étude de la fixation du récepteur GR α sur les promoteurs minimaux respectifs du gène IL-6 et IL-8 montre que seule l'association cobalamine et dexaméthasone permettait cette fixation. Nous suggérons que la cobalamine faciliterait la fixation des GR activés par la dexaméthasone sur le promoteur minimal de l'IL-6 et de l'IL-8.

Lorsque nous considérons ces résultats, nous nous demandons si un tel effet observé avec la combinaison de la cobalamine et de la dexaméthasone sur l'expression des cytokines IL-6 et IL-8 serait également vérifié avec d'autres cytokines pro-inflammatoires qui contiennent dans leurs régions promotrices des séquences de fixation pour les GR α . Il est à noter également qu'en présence de concentration très faible de cobalamine, l'effet de la dexaméthasone passerait probablement par une autre voie, différente de la première, qui semble être moins efficace qu'en présence d'une concentration forte en cobalamine. Ceci souligne encore une fois un rôle potentiel de la cobalamine dans l'effet observé. Afin d'expliquer cela nous pouvons envisager plusieurs hypothèses.

Il est connu que les GRs peuvent être phosphorylés sur plusieurs résidus sérine et thréonine par plusieurs kinases dont les MAPK, les CDK et les GSK- β . Ceci permet de moduler l'activité des GR dans les cellules. La structure des GRs fait apparaître un motif « doigt de zinc » qui sert à la fixation sur l'ADN, un domaine en C-terminal qui sert à la fixation des ligands et surtout un domaine en N-terminal qui porte la fonction de facteur de transcription du GR. Ce dernier porte plusieurs sites de phosphorylation potentiels (voir figure 65).

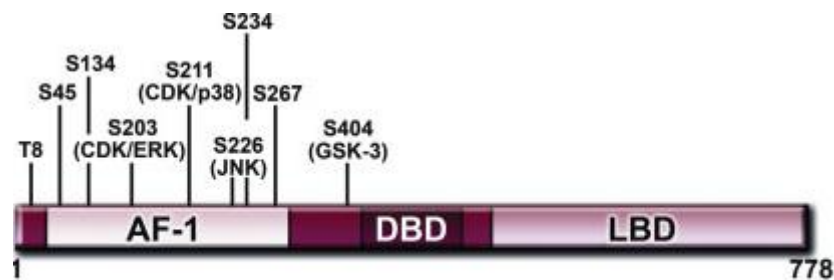


Figure 65 : Les sites de phosphorylations connus pour les GR α . Les kinases qui sont connues pour être impliquées dans la phosphorylation du domaine AF-1 du GR α sont citées entre parenthèses. CDK: cyclin-dependent kinase. ERK : extracellular-regulated kinase. GSK : glycogen synthase kinase. JNK : c-Jun N-terminal kinase. MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase. (Source : Galliher-Beckley and al., 2009).

L'importance de la phosphorylation de ces sites sur les GRs a été le sujet de recherche de plusieurs équipes (278). Il a été montré par exemple que la phosphorylation de la sérine 203 sur le GR α est associée à la rétention du GR dans le cytoplasme et que la phosphorylation des sérines 211 et 226 est, quant à elles, associées à la translocalisation du GR du cytoplasme vers le noyau. (279). Cependant, la phosphorylation de la sérine 211 semble être plus importante que celle de la sérine 226 dans plusieurs types cellulaires (280). Ainsi, le profil de phosphorylation du GR avant la fixation de son ligand semble être dépendant de la présence d'une activité phosphatase sur son domaine C-ter qui permet de le maintenir à un statut de

phosphorylation basal. La fixation d'un ligand sur ce domaine est associée à une phosphorylation plus importante et à l'inhibition d'une activité phosphatasique (281).

Récemment, d'autres équipes ont déterminé plusieurs autres sites de phosphorylation sur les GR qui semblent être aussi importants pour la fonction de ces derniers. (282). Il est à noter que la détermination de tous les sites de phosphorylation et de leur impact sur la fonction des GRs n'est pas encore complètement établie et que la nature de l'activité phosphatasique n'est pas complètement connue.

Nous avons montré dans le laboratoire sur d'autres modèles cellulaires, que l'activité PP2A, qui est une phosphatase impliquée dans de nombreux processus cellulaires, peut être modulée par la carence en donneurs de méthyles (283). Par ailleurs, d'autres équipes ont montré *in vitro* qu'une diminution de l'expression et de l'activité de cette phosphatase, ce qui est observé dans l'asthme sévère, permet une augmentation de la phosphorylation de la sérine 226 sur les GR et leur translocation dans le noyau (284). Ces données suggèrent que la présence d'une concentration importante de la cobalamine sur les cellules 16HBE, pourrait être responsable d'un profil de phosphorylation plus important du GR grâce à la diminution de l'activité de phosphatases comme la PP2A, ce qui permet une meilleure activation des GR après fixation de la Dex, une meilleure translocation des GR dans le noyau et une inhibition plus marquée de l'expression des gènes cibles (IL-6 et IL-8) par la fixation de ces derniers sur le promoteur minimal. Il s'agit bien évidemment d'une hypothèse, qui servira de base de travail pour un futur étudiant.

La cobalamine joue le rôle d'un cofacteur enzymatique important dans le processus de méthylation intracellulaire. Sa fixation sur l'enzyme méthionine synthase (MS) permet l'activation de celle-ci et la transformation de l'homocysteine en méthionine. Cette étape permet de régénérer de la méthionine qui sera transformée en adénosylméthionine qui est un donneur majeur de méthyles pour de nombreuses réactions intra-cellulaires. Parmi les récepteurs des groupements méthyles, on retrouve l'ADN, les histones ou encore certaines protéines. Ce processus de méthylation permet, entre autres, de réguler l'expression de gènes mais aussi l'activité de plusieurs protéines notamment certaines qui sont impliquées dans la signalisation intracellulaire.

La déficience en donneurs de méthyles a été associée à la dérégulation de l'expression de plusieurs cofacteurs transcriptionnels comme le PGC1 α . Il a été montré par ailleurs que l'interaction des GR avec les cofacteurs comme GRIP-1 (GR Interacting Protein-1) est importante dans l'efficacité et dans la potentialisation de l'effet inhibiteur ou activateur des GR (285). Ainsi, l'étude des interactions de GR avec les autres cofacteurs potentiels en condition de faibles ou de fortes concentrations en cobalamine permettrait de vérifier si la nature de ces interactions est influencée par la variation de la concentration en cobalamine. Nous avons observé que la Dex permet de diminuer l'expression et la production des deux cytokines IL-6 et IL-8 par les cellules cultivées en condition de concentration faible en cobalamine et que dans ces conditions, le GR ne se fixe pas sur la séquence du promoteur minimal étudiée. Cependant, l'incubation des cellules avec une concentration élevée en cobalamine a montré un effet plus important de la Dex et une fixation du GR sur la séquence du promoteur étudiée. Ainsi, la fixation du GR sur la région du promoteur minimal est associée à une efficacité plus importante de la Dex. On suppose dans ce cas, que la carence en cobalamine modifierait les interactions et éventuellement l'activité de facteurs recrutés au niveau du promoteur comme les histones déacétylases ou des déméthylases ce qui empêcherait la fixation du GR à cet endroit. En effet, plusieurs cofacteurs peuvent être recrutés par les GR comme les protéines GRIP qui font partie de la famille des protéines p160. Ces cofacteurs sont capables de recruter des protéines comme les histones acétyltransférases CBP/p300 ou les méthyltransférases comme CARM1. Le cycle de la méthionine permet à des protéines méthyltransférases, comme CARM-1 ou PRMT-1, de transférer un groupement méthyle sur les histones. Ceci permet de moduler la fixation des protéines de transcription.

Les modifications transcriptionnelles comme l'acétylation ou la méthylation de protéines qui régulent la transcription sont importantes à étudier dans notre cas de figure afin d'expliquer l'effet de la cobalamine. Ainsi, l'étude de l'activité des protéines CARM-1 ou PRMT-1 serait nécessaire ici. D'un autre côté, les récepteurs nucléaires interagissent au site de fixation de ceux-ci avec d'autres facteurs de transcription comme NF κ B ou AP-1 et ceci est également important dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, L'interaction des complexes GR avec NF- κ B et AP-1 en particulier, serait responsable de la majorité des effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes chez l'homme. Ainsi, nous envisageons

l'étude de ces interactions et en particulier de voir dans quelle mesure la cobalamine favoriserait ces interactions.

L'utilisation thérapeutique des glucocorticoïdes synthétiques a transformé la prise en charge des patients depuis plus d'un demi-siècle et constitue d'une certaine façon, le premier type de biothérapie utilisée chez l'homme. Dans l'asthme, ces glucocorticoïdes jouent un rôle d'anti-inflammatoires et sont des immuno-modulateurs naturels puissants. Sans leurs effets périphériques endocriniens, les glucocorticoïdes constitueraient même des anti-inflammatoires parfaits par leurs effets pléiotropes sur les cellules immunitaires. Ils sont administrés d'ailleurs souvent en cure de courte durée pour des maladies aiguës. Malheureusement, les complications métaboliques, cardio-vasculaires et osseuses gênent considérablement leur utilisation prolongée dans des maladies inflammatoires qui sont souvent chroniques. Pour contourner ce problème, les cliniciens diminuent la durée et les doses cumulatives des traitements. Chaque prescription doit prendre en compte l'importance des effets secondaires qui demeure un obstacle à la corticothérapie prolongée. Nos résultats supposent qu'un effet potentialisateur de l'effet des corticoïdes est associé à la cobalamine. Une carence en B12 serait probablement responsable d'une plus faible efficacité de la corticothérapie dans l'inflammation pulmonaire et du recours à des doses élevées. D'autre part, il est à noter, que la carence en cobalamine augmente avec l'âge. La malabsorption de la cobalamine alimentaire en est la principale raison (de 50 % à 70 % des cas) chez les personnes âgées. L'utilisation de suppléments en cobalamine dans la corticothérapie proposée à ces personnes aurait-il un avantage quant à l'efficacité de la prise en charge ?

IV Conclusion générale

L'objectif de départ de mon travail de thèse, était d'étudier l'implication du cycle de la méthionine dans l'inflammation pulmonaire mucoviscidose et cela pour plusieurs raisons. D'abord, il a été observé chez les patients mucoviscidosiques une augmentation de la concentration plasmatique en homocystéine et en S-adenosylhomocystéine et une diminution de la concentration en méthionine (286) ce qui suppose que le cycle de la méthionine serait perturbé provoquant ainsi une hyperhomocystéinémie et un métabolisme accru de la méthionine endogène. Par ailleurs, une supplémentation en cobalamine et en 5-MTHF (la forme active des folates) chez des enfants mucoviscidosiques montre une amélioration de plusieurs paramètres caractéristiques des membranes érythrocytaires comme la réduction des conséquences de l'oxydation des acides gras membranaires. On a décrit également une altération de l'équilibre entre les acides gras (n-6) et (n-3) et une diminution importante de la quantité de DHA dans la membrane cytoplasmique.

Toutes ces observations, nous ont orientés vers l'étude de l'activité du cycle de la méthionine qui est essentiellement responsable de l'activité de méthylation de l'ADN mais également de plusieurs protéines ou voies métaboliques impliquées dans plusieurs processus intracellulaires. Parmi ces protéines, on retrouve la phosphatidylcholine ou la phospholipase D. En effet, le cycle de la méthionine permet de transférer un groupement méthyle sur l'éthanolamine pour générer de la phosphatidylcholine. Cette dernière est le constituant majoritaire, avec la phosphatidyléthanolamine, de la membrane plasmique et constitue une cible pour les phospholipases PC-PLC et PC-PLD. Une influence du cycle de la méthionine sur l'expression du gène MDR-1, et du gène Cox-2 avait été retrouvée par notre équipe (287, 288).

Nos premières études se sont révélées difficiles dans ce sens car malheureusement, les modèles cellulaires glandulaires bronchiques, CF-KM4 et MM39, nécessitent un milieu de culture riche en vitamines dont particulièrement la cobalamine. Ces cellules dégénèrent et meurent rapidement en présence d'un milieu pauvre en cobalamine. Les expériences envisagées initialement n'ont donc pas pu être réalisées.

Cependant, nos expériences sur ces cellules en condition de culture avec un milieu riche, ont montré une activité importante de la PC-PLC dans les cellules CF par rapport aux cellules MM39. Nous avons alors continué à nous intéresser à l'implication de cette phospholipase.

Les résultats obtenus mettent en évidence une implication majeure de cette dernière dans plusieurs défauts sécrétoires observés avec notre modèle cellulaire CF. nous avons pu montrer que cette phospholipase était constitutivement active dans les cellules CF et de manière plus importante que les cellules non CF. L'inhibition de cette dernière a permis de corriger les défauts observés. Plus surprenant, cette phospholipase semble être plus impliquée dans le relargage élevé de l'AA par les cellules CF que les autres phospholipases A2 Calcium indépendante ou dépendante. Ces données vont nous permettre de continuer à étudier plus en détails cette voie PC-PLC dans d'autres modèles cellulaires mais aussi de nous intéresser à d'autres phospholipases importante comme la sPLA2. En effet, nous suggérons que la PC-PLC serait la première phospholipase à être activée dans les cellules mucoviscidosiques, générant une quantité importante de DAG qui est un activateur endogène de plusieurs voies de signalisation, aboutissant, in fine, à l'activation de la sPLA2. Les résultats préliminaires, qui sont en cours de validation, montrent que cette phospholipase serait effectivement impliquée avec la PC-PLC dans les défauts de sécrétion observés dans les cellules CF.

Les résultats obtenus dans cette première partie du travail, supposent que la PC-PLC serait une cible pharmacologique potentiellement importante, voire majeure, dans le traitement de l'inflammation pulmonaire mucoviscidosique. Ainsi, la synthèse d'antagonistes plus spécifiques pourrait avoir un intérêt potentiel dans la compréhension de l'activité de cette enzyme et peut être aussi dans le traitement de la maladie.

Comme nous l'avons montré dans la première partie du travail, le dysfonctionnement de CFTR dans la mucoviscidose, qui est associé à plusieurs perturbations de fonctions cellulaires, est lié à la suractivation de la PC-PLC qui joue donc un rôle important dans l'exacerbation de l'inflammation. Cependant, la mucoviscidose est caractérisée, en plus de l'inflammation, par une infection chronique qui participe à la persistance d'une inflammation délétère. La prise en charge des patients mucoviscidosiques nécessite l'utilisation de doses supra-pharmacologiques en antibiotiques pour pouvoir contenir les germes qui colonisent les voies aériennes comme les bactéries *P. aeruginosa* ou *S. aureus*.

Nous nous sommes alors intéressés aux transporteurs peptidiques PEPT1 et PEPT2 qui ont un large spectre de substrats qui comprennent les beta-lactames. Nous avons pu d'abord caractériser l'expression de ces transporteurs dans les cellules glandulaires bronchiques et

nous avons montré également, grâce à des études cinétiques de transport, que l'activité de transport du PEPT2 était altérée dans les cellules CF. L'inhibition de l'expression de CFTR dans les cellules MM39 en transfectant ces dernières avec un antisens CFTR a permis de faire le lien entre le dysfonctionnement de CFTR et l'altération de l'activité du transport par PEPT2. Ainsi, la nécessité du recours à des doses importantes en antibiothérapie pour avoir une meilleure biodisponibilité et donc une meilleure efficacité contre l'infection serait, en partie, une possible conséquence de l'altération de l'activité de transport des médicaments à travers la membrane épithéliale bronchique comme c'est le cas avec l'activité du transporteur PEPT2.

La poursuite du travail a été effectuée sur un autre modèle cellulaire qui est la lignée 16HBE. Cette lignée possède des caractéristiques épithéliales conservées et sont capables de croître en conditions variables de cobalamine, à la différence des modèles précédents. Cette lignée nous a donc permis d'aborder l'implication du cycle de la méthionine dans l'inflammation pulmonaire. En particulier, nous avons recherché si des conditions de culture avec des concentrations de cobalamine faibles ou fortes auraient une influence sur l'expression et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et GM-CSF) induites ou non avec du TNF α ou de l'histamine.

Nos résultats montrent que la cobalamine n'influence ni l'expression, ni la production de ces cytokines. Nous avons alors voulu savoir si dans un contexte inflammatoire, la cobalamine influencerait la réponse des cellules aux glucocorticoïdes. Les résultats montrent que la dexaméthasone aurait un effet plus marqué en présence de concentrations plus importantes en cobalamine. Cet effet serait dû à la fixation du GR, récepteur de glucocorticoïdes, sur les promoteurs minimaux des gènes de l'IL-6 et de l'IL-8. Ce résultat souligne que l'évaluation du statut vitaminique en cobalamine serait nécessaire pour une meilleure efficacité des traitements par les glucocorticoïdes. On envisage, dans l'équipe, d'approfondir ces résultats avec l'étude du mécanisme exact qui relie le statut de méthylation et de phosphorylation avec la machinerie transcriptionnelle au niveau des promoteurs de ces cytokines.

Ces résultats bien qu'ils nécessitent évidemment des approfondissements, nous ont ouvert des perspectives de recherche sur le rôle important que peut jouer la cobalamine dans la

corticothérapie et dans le traitement de l'inflammation pulmonaire ou encore le rôle que peut jouer celle-ci dans la résistance aux glucocorticoïdes.

En conclusion, les différents résultats de ce travail, constituent pour une partie d'entre eux, une base pour des recherches futures plus approfondies avec des perspectives d'application clinique potentiellement intéressantes.

Bibliographies

1. Shebani E, Shahana S, Janson C, Roomans GM. Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. *Tissue Cell*. 2005. 37:145-52
2. Puchelle E. Airway secretions: new concepts and functions. *Eur Respir J*. 1992. 5 :3-4.
3. Nadel HR, Stringer DA, Levison H, Turner JA, Sturgess JM. The immotile cilia syndrome: radiological manifestations. *Radiology*. 1985. 154 :651-5.
4. Varsano S, Basbaum CB, Forsberg LS, Borson DB, Caughey G, Nadel JA. Dog tracheal epithelial cells in culture synthesize sulfated macromolecular glycoconjugates and release them from the cell surface upon exposure to extracellular proteinases. *Exp Lung Res*. 1987. 13 :157-84.
5. Zahm DS, Heimer L. Two transpallidal pathways originating in the rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol*. 1990. ;302:437-46.
6. Rutland J, Griffin WM, Cole PJ. Human ciliary beat frequency in epithelium from intrathoracic and extrathoracic airways. *Am Rev Respir Dis*. 1982. 125 :100-5.
7. Verdugo P. Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1990. 52:157-76.
8. Jeffery PK. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis*. 1983 ;128 : 14-20.
9. Goodman MR, Link DW, Brown WR, Nakane PK. Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis*. 1981;123:115-9.
10. Reid, L. Pathology of chronic bronchitis. *Lancet*. 1954. 1 ; 275-278.
11. Ayers MM, Jeffery PK. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur Respir J*. 1988. 1 :58-80.
12. Jeffery PK, Li D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J*. 1997;10 :1655-62.
13. Donnelly GM, Haack DG, Heird CS. Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue. *Cell Tissue Kinet*. 1982 ;15 :119-30.
14. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 ; 157 : 2000-6.
15. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*. 2006 ; 86 :245-78.
16. Finkbeiner WE. Physiology and pathology of tracheobronchial glands. *Respir Physiol*. 1999 ;118 :77-83.
17. Franken C, Meijer CJ, Dijkman JH. Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans *J Histochem Cytochem*. 1989. 37 :493-8..
18. Puchelle E, Zahm J, Bonnet N. Imaging of airway cells. *Eur Respir J*. 1998 ;12 :3-5.
19. Plopper CG. Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. *Am Rev Respir Dis*. 1983. 128 : 37-41.
20. Widdicombe JG, Pack RJ. The Clara cell. *Eur J Respir Dis*. 1982 ;63 :202-20.

21. Mukherjee AB, Kundu GC, Mantile-Selvaggi G, et al. Uteroglobin: a novel cytokine? *Cell Mol Life Sci* 1999 ; 55 : 771-87.
22. Domin, B. A., T. R. Devereux, and R.M. Philpot. The cytochrome P-450 monooxygenase system of rabbit lung enzyme components, activities, and induction in the nonciliated bronchial epithelial (clara) cell, alveolar type 2 cell, and alveolar macrophage. *Mol. Pharmacol.*, 1986. 30 : 296-303.
23. Weichselbaum M, Sparrow MP, Hamilton EJ, Thompson PJ, Knight DA. A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium. *Respir Res.* 2005. 10;6:115.
24. Cutz E, Chan W, Track NS. Bombesin, calcitonin and leu-enkephalin immunoreactivity in endocrine cells of human lung. *Experientia.* 1981. 15;37 :765-7.
25. Fuchs S, Hollins AJ, Laue M, Schaefer UF, Roemer K, Gumbleton M, Lehr CM. Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell Tissue Res.* 2003;311 :31-45.
26. Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J.* 1994 ; 8 :957-67.
27. Franken C, Kramps JA, Meyer CJ, Dijkman JH. Bull Localization of a low molecular weight protease inhibitor in the respiratory tract. *Eur Physiopathol Respir.* 1980. 16 :231-6.
28. Willems LN, Kramps JA, Stijnen T, Sterk PJ, Weening JJ, Dijkman JH. Antileukoprotease-containing bronchiolar cells. Relationship with morphologic disease of small airways and parenchyma. *Am Rev Respir Dis.* 1989 ;139 :1244-50.
29. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun.* 1996. ;64 :4520-4.
30. Sallenave JM. Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochem Soc Trans.* 2002. 30 :111-5.
31. McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest.* 1995: 96:456-64.
32. Abe, T., N. Kobayasi, and K. Yoshimura. Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J. Clin. Investig.* 1991. 87:2207-151.
33. Fahey, J. V., and C. R. Wira. Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture. *J. Infect. Dis.* 2002. 185:1606-13.
34. McNeely, T. B., M. Dealy, and D. J. Dripps. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J. Clin. Investig.* 1995. 96:456-464.
35. Ashcroft, G. S., K. Lei, and W. Jin. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat. Med.* 2000. 6:1147-53.
36. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun.* 1996 ;64 :4520-4.

37. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Elevated alpha-defensin levels in plasma of patients with pulmonary Sarcoidosis. *Respirology*. 2007;12: 339-45.
38. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88 :3952-6.
39. Diamond G, Laube D, Klein-Patel ME. Mammalian β -defensins in mucosal defences.. *Mammalian host defence peptides*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2004; 111–138. .
40. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010; 33 :657-70.
41. B Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*. 2007; 28 :340-5.
42. Németh T, Mócsai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2012.30:143:9-19.
43. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S.J. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo*. *Exp Med*. 2012. 209 :819-35.
44. Geering B, Simon HU. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ*. 2011 : 18 :1457-69.
45. Witko-Sarsat V, Pederzoli-Ribeil M, Hirsch E, Sozzani S, Cassatella MA. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol*. 2011 : 32 :117-24.
46. Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med*. 1991. 173 :771-4.
47. Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol*. 2011. ;32 :350-7.
48. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010 ;10 :427-39.
49. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*. 2008 ; 123 :326-38.
50. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003 ;8 :223-46.
51. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 ;4 :281-6.
52. Nazimek K, Bryniarski K. The biological activity of macrophages in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw*. 2012. 20:507-20.

53. Holt PG, Stumbles PA. Regulation of immunologic homeostasis in peripheral tissues by dendritic cells: the respiratory tract as a paradigm. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 421–429.
54. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000; 1: 199–205.
55. Currie S, Roberts E, Spaethe S, Roehm N, Kramer R. Phosphorylation and activation of Ca²⁺ sensitive cytosolic phospholipase A2 in MCII mast cells mediated by high-affinity Fc receptor for IgE. *Biochem J* 1994 ; 304 : 923-8.
56. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1699–1705.
57. Akers IA, Parsons M, Hill MR, et al. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* . 2000; 278: 193–201.
58. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105: 847–859.
59. Fahy JV. Reducing IgE levels as a strategy for the treatment of asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 16–21.
60. Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, et al. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. *New Engl J Med*. 1999; 341: 1966–73.
61. Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF- α . *Immunol Ser*. 1992; 56:3–34.
62. Mukaida N, Matsushima K. Regulation of IL-8 production and the characteristics of the receptors for IL-8. *Cytokines*. 1992;4:41-53.
63. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*.2003;10 :45-65.
64. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Krönke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. 1993. 73 : 457–467.
65. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995. 2:561–572.
66. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996. 27;334 :1717-25.
67. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992. 89 :4845–49.
68. Shalaby MR, Sundan A, Loetscher H, Brockhaus M, Lesslauer W, Espevik T. Binding and regulation of cellular functions by monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor receptors. *J Exp Med*. 1990 ; 172 :1517–20.

69. Nomura T, Abe Y, Yoshioka Y, Nakagawa S, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Creation of TNFR1-selective antagonist and its therapeutic effects. *Yakugaku Zasshi*. 2010. 130:63-8.
70. Bianchi K, Meier P. A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Mol Cell*. 2009. 36:736-42
71. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV. Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor- κ B activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem*. 1996 ; 271:19935–42.
72. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr, Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 ; 88 :9292–96.
73. Heller RA, Song K, Fan N, Chang DJ. The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell*. 1992 ; 70 :47–56.
74. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T. et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986;324:73–6.
75. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B. et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*. 1988;241:825–8. .
76. Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V. and Sozzani, S. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. 1997; 6, 315-25.
77. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, and Oppenheim JJ. Molecular cloning of a human monocytederived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1988; 169: 1485–90.
78. Mukaida N. A newly discovered chemotactic factor for neutrophil: interleukin 8. *Rinsho Byori*. 1992. 40:371-9.
79. Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, Mukaida N, and Matsushima K. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun*. 1997; 65: 3218–24.
80. Samanta AK, Oppenheim JJ, and Matsushima K. Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem*. 1990; 265: 183–189.
81. Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy, WJ, Longo DL, Taub DD, and Oppenheim JJ. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 271: 2935–2940, 1996.
82. Jinquan T, Moller B, Storgaard M, Mukaida N, Bonde J, Grunnet N, Black FT, Larsen CG, Matsushima K, and Thestrup-Pedersen K. Chemotaxis and IL-8 receptor expression in B cells from normal and HIV-infected subjects. *J Immunol*. 1997; 158: 475–484.

83. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, and Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798–1801, 1992.
84. Woolley KL, Adelroth E, Woolley MJ, Ellis R, Jordana M, O'Byrne PM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, eosinophils and eosinophil cationic protein in subjects with and without mild, stable, atopic asthma. *Eur Respir J.* 1994 ; 7 :1576-84.
85. Terry L. Noah, Anthony M. Paradiso, Michael C. Madden, Karen P. McKinnon, and Robert B. Devlin. The Response of a Human Bronchial Epithelial Cell Line to Histamine: Intracellular Calcium Changes and Extracellular Release of Inflammatory Mediator. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 1991;5: 484-492.
86. Li Y, Chi L, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Microvasc Res.* 2001;61:253-62.
87. Kohda F, Koga T, Uchi H, Urabe K, Furue M. Histamine-induced IL-6 and IL-8 production are differentially modulated by IFN-gamma and IL-4 in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2002;28 :34-41.
88. Oh C, Nakano K. Inhibition by glucocorticoids of mitogen dependent histamine biosynthesis caused by histidine decarboxylase incultured mouse spleen cells and peritoneal adherent cells. *Immunology.* 1988;65:433-6.
89. Kubo Y, Nakano K. Regulation of histamine synthesis in mouse CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Inflamm Res.* 1999;48 :149-53.
90. Kitamura Y, Miyoshi A, Murata Y, Kalubi B, Fukui H, Takeda N. Effect of glucocorticoid on upregulation of histamine H1 receptor mRNA in nasal mucosa of rats sensitized by exposure to toluene diisocyanate. *Acta Otolaryngol.* 2004;124 :1053-8.
91. Karlstedt K, Sallmén T, Eriksson KS, Lintunen M, Couraud PO, Joó F, Panula P. Lack of histamine synthesis and down-regulation of H1 and H2 receptor mRNA levels by dexamethasone in cerebral endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19 :321-30.
92. Nalefski, E. A., Sultzman, L. A., Martin, D. M., Kriz, R. W., Towler, P. S., Knopf, J. L., Clark, J. D. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca21-dependent lipid-binding domain and a Ca21-independent catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 1994; 269, 18239–49.
93. Qiu, Z.-H., Gijo'n, M. A., de Carvalho, M. S., Spencer, D. M., Leslie, C. C. Role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 In regulating arachidonic acid release in macrophages. *J. Biol.* 1998; *Chem.* 273, 8203–11.
94. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem.* 1994 ; 269 : 13057-60..
95. Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W. Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation : the relationship with associated disease states. *J Lipid Mediat* 1993 ; 8 : 1-30.

96. Lambeau, G., Barhanin, J., Schweitz, H., Qar, J., Lazdunski, M. Identification and properties of very high affinity brain membranebinding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J Biol Chem.* 1989; 264, 11503-10.
97. Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., Barhanin, J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J. Biol Chem.* 1990; 265, 9526-32.
98. Valentin, E., Lambeau, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1488, 59-70.
99. Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., Dennis, E. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *A Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92, 8527-31.
100. Roshak, A.K., Capper, E.A., Stevenson, C., Eichman, C., Marshall, L.A. Human calcium-independent phospholipase A2 mediates lymphocyte proliferation. *J Biol Chem.* 2000; 275, 35692-8.
101. Falkenburger BH, Jensen JB, Dickson EJ, Suh BC, Hille B. Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J. Physiol.* 2010. 588:3179–85.
102. Spadaro F, Ramoni C, Mezzanzanica D, Miotti S, Alberti P, Cecchetti S, Iorio E, Dolo V, Canevari S, Podo F. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2008 ;68 :6541-9.
103. Zhang L, Li HY, Li H, Zhao J, Su L, Zhang Y, Zhang SL, Miao JY. Lipopolysaccharide activated phosphatidylcholine-specific phospholipase C and induced IL-8 and MCP-1 production in vascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2011 ;226 :1694-701.
104. Ramoni C, Spadaro F, Barletta B, Dupuis ML, Podo F. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mitogen-stimulated fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2004 ;299 :370-82.
105. Rao M. A. J. F. Hatcher and A. Gusain. Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609) mechanism of actions: A Mini-review of literature. *Neurochem Res.* 2012; 37 : 671–9.
106. Kiss Z, Tomono M. Compound D609 inhibits phorbol ester-stimulated phospholipase D activity and phospholipase C-mediated phosphatidylethanolamine hydrolysis. *Biochim Biophys Acta.* 1995 ;1259 :105-8.
107. Kahle PJ, Shooter EM, Johnson RM, Phosphatidylcholine-specific phospholipases inhibitor D609 differentially affects MAP kinases and immediate-early genes in PC12 cells. Verity AN. *Cell Signal.* 1998.
108. Van Dijk MC, Muriana FJ, de Widt J, Hilkmann H, van Blitzezswijk WJ. Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipases C in platelet-derived growth factor-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem.* 1997; 272:11011-6.
109. Ramoni C, Spadaro F, Menegon M, Podo F. Cellular localization and functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipases C in NK cells. *J Immunol* 2001; 167: 2642–50.

110. Hanahan D. J. and Chaikoff I. L. The phosphorus-containing lipides of the carrot. J. Biol. Chem. 1947; 168: 233–240.
111. . J. Hanahan D. J. and Chaikoff I. On the nature of the phosphorus-containing lipides of cabbage leaves and their relation to a phospholipase-splitting enzyme contained in these leaves. Biol. Chem. 1948; 172: 191–198.
112. Morgan CP, Sengelov H, Whatmore J, Borregaard N, Cockcroft. ADP-ribosylation-factor-regulated phospholipase D activity localizes to secretory vesicles and mobilizes to the plasma membrane following N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of human neutrophils. Biochem J. 1997 Aug 1;325 (Pt 3):581-5.
113. Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuler Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. Curr Biol. 1997 Mar 1;7(3):191-201.
114. Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. Differential regulation of phospholipase D and phospholipase A2 by protein kinase C in P388D1 macrophages. Biochem J. 1997 ;321 (Pt 3):805-9.
115. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. Am J Med. 1999;106 :37S-42S.
116. Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature. 1980; 286, 264-5.
117. Faccioli, L.H., Nourshargh, S., Moqbel, R., Williams, F.M., Sehmi, R., Kay, A.B., Williams, T.J. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, *in vivo*. Immunology. 1991; 73, 222-7.
118. Goodarzi, K., Goodarzi, M., Tager, A.M., Luster, A.D., von Andrian, U.H. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. Nat Immunol. 2003; 4: 965-73.
119. Davis P., Drumm M., Konstan M. Cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1996; 154 : 1229-12561.
120. J.F. Chmiel, M. Berger, M.W. Konstan. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. Clin Rev Allergy Immunol .2002; 23: 5 - 27.
121. M. Griesse, M. Kappler, A. Gaggar. Inhibition of airway proteases in cystic fibrosis lung disease. Eur Respir J. 2008; 32 783 - 95.
122. M.W. Konstan, P.B. Pharmacological approaches for the discovery and development of new anti-inflammatory agents for the treatment of cystic fibrosis. Davis.Adv Drug Deliv Rev . 2002;54: 1409 – 23.
123. Doring, I.G. Parameswaran, T.F. Murphy. Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. G FEMS Microbiol Rev. 2011; 35: 124 – 146.
124. J. Jacquot, O. Tabary, P. Le Rouzic. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40: 1703 - 15.

125. S. Brennan. Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2008; 9: 271 - 279.
126. L. Imundo, J. Barasch, A. Prince, et al. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92: 3019 – 23.
127. B.K. Rubin. Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2007: 8: 4 - 7.
128. Moran A, Hardin D, Rodman D, et al. Diagnosis, screening and management of cystic fibrosis related diabetes mellitus: a consensus conference report. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999;45:61–73.
129. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989;245: 1066-73.
130. Collins FS. Cystic fibrosis : Molecular biology and therapeutic implications. *Science.* 1992 ; 256 : 774-9.
131. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005;352 :1992-2001.
132. Navarro J, Bellon G. La mucoviscidose ; de la théorie à la pratique. 2 em edition. ed. Espaces ; 2001.
133. Rich, D. P., M. P. Anderson, R. J. Gregory, S. H. Cheng, S. Paul, D. M. Jefferson, J. D. McCan, K. W. Klinger, A. E. Smith, and M. J. Welsh. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature.* 1990. 347:358-63.
134. Anderson, M. P., D. P. Rich, R. J. Gregory, A. E Smith, and M. J. Welsh. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science.* 1991; 251:679-82.
135. Anderson, M. P., R. J. Gregory, S. Thompson, D. W. Souza, S. Paul, R. C. Mulligan, A. E. Smith, and M. J. Welsh. *Science.* Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. 1991; 253: 202-204.
136. Bear, C. E, C. Li, N. Kartner, R. J. Bridges, T. J. Jensen, M. Ramjeesingh and J. A. Riordan. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell.* 199; 268:809-18.
137. Tsui, L.-C. Mutations and sequence variations detected in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene: a report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Hum. Mutat.* 1992; 1:197-203
138. Cheng, S. H., D. P. Rich, J. Marshall, R. J. Gregory, M. J. Welsh, and A. E Smith. Phosphorylation of the R-domain by cAMP dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell.* 1991; 66: 1027-36.
139. Seibert FS, Loo TW, Clarke DM, Riordan JR. Cystic fibrosis: channel, catalytic, and folding properties of the CFTR protein. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29: 429-42.
140. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 1999;79 : 23-45.
141. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science.* 1995; ;269 :847-50.

142. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med.* 2007; ;13 :231-40.
143. Zhou Z, Duerr J, Johannesson B, Schubert SC, Treis D, Harm M, Graeber SY, Dalpke A, Schultz C, Mall MA. The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros.* 2011 2:172-82.
144. Painter RG, Valentine VG, Lanson NA Jr, Leidal K, Zhang Q, Lombard G, Thompson C, Viswanathan A, Nauseef WM, Wang G, Wang G. CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry.* 2006;45 :10260-9.
145. Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, Huang P, Tong J, Naren AP, Bindokas V, Palfrey HC, Nelson DJ. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol.* 2006;8 :933-44.
146. Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature.* 1993 ;363 :263-8.
147. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* 1999 ;79 :S145-66.
148. Schwiebert EM, Gruenert DC, Guggino WB, Stanton BA. G protein G alpha i-2 inhibits outwardly rectifying chloride channels in human airway epithelial cells. *Am J Physiol.* 1995 ;269 :C451-6.
149. Loussouarn G, Demolombe S, Mohammad-Panah R, Escande D, Baró I. Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am J Physiol.* 1996 ;271 :C1565-73.
150. Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol.* 1998 ;275 :C323-6.
151. Hodson ME, Penketh AR, Batten JC. Aerosol carbenicillin and gentamicin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *Lancet.* 1981; 2 :1137–9.
152. Bressolle F, de la Coussaye JE, Ayoub R, et al. Endotracheal and aerosol administrations of ceftazidime in patients with nosocomial pneumonia: pharmacokinetics and absolute bioavailability. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 ;36.
153. Nolan G, Moivor P, Levison H, et al. Antibiotic prophylaxis in cystic fibrosis: inhaled cephaloridine as an adjunct to oral cloxacillin. *J Pediatr.* 1982; 101:626–30.
154. Schentag J. Clinical significance of antibiotic tissue penetration. *Clin Pharmacokinet* 1989;16 :25-31.
155. Aubert-Tulkens G, Van Hoof F, Tulkens P. Gentamicin-induced lysosomal phospholipidosis in cultured rat fibroblasts. *Lab Invest* 1979; 40:481- 93.
156. Kikuchi, T., K. Hagiwara, Y. Honda, K. Gomi, T. Kobayashi, H. Takahashi, Y. Tokue, A. Watanabe, and T. Nukiwa J. Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF- κ B transcription factors. *Antimicrob. Chemother.* 2002; 49:745-755.
157. Tamaoki, J., J. Nakata, E. Tagaya, and K. Konno. Effects of roxithromycin and erythromycin on interleukin 8-induced neutrophil recruitment and goblet cell secretion in guinea pig tracheas. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40:1726-1728.

158. Costerton, J. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.* 2001; 9:50-52.
159. Henry, R. L., C. M. Mellis, and L. Petrovic. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1992. 12:158-161.
160. Curschmann H. Ueber Bronchiolitis exsudative und ihr Verhältniss zum Asthma nervosum. *Dtsch Arch Klin Med* 1882; 32: 1–34.
161. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344: 350–62.
162. Woolley KL, Gibson PG, Carty K, Wilson AJ, Twaddell SH, Woolley MJ. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154:237-43.
163. Raeburn D, Webber SE. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *Eur Respir J.* 1994. 7:2226-33.
164. Verheggen MM, van Hal PT, Adriaansen-Soeting PW, Goense BJ, Hoogsteden HC, Brinkmann AO, Versnel MA. Modulation of glucocorticoid receptor expression in human bronchial epithelial cell lines by IL-1 beta, TNF- α and LPS. *Eur Respir J* 1996; 9: 2036–43.
165. LeVan TD, Behr FD, Adkins KK, Miesfeld RL, Bloom JW. Glucocorticoid receptor signaling in a bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol* 1997; 272:L838–L843.
166. LeVan TD, Babin EA, Yamamura HI, Bloom JW. Pharmacological characterization of glucocorticoid receptors in primary human bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 1003–9.
167. Adcock IM, Gilbey T, Gelder CM, Chung KF, Barnes PJ. Glucocorticoid receptor localization in normal and asthmatic lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 771–82.
168. Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski JA, Picado C. Expression of glucocorticoid receptor α - and β -isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol* 2002; 283:1324–31.
169. Robert H. Oakley, Madhabananda Sar, and John A. Cidlowski. The Human Glucocorticoid Receptor β Isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *The journal of biological chemistry* 1996; 16: pp. 9550–9.
170. M. de Castro, S. Elliot, T. Kino, C. Bamberger, M. Karl, E. Webster, and G. P. Chrousos. The Non-Ligand Binding f3-Isoform of the Human Glucocorticoid Receptor (hGRf): Tissue Levels, Mechanism of Action, and Potential Physiologic Role. *Mol Med.* 1996; 2: 597–607.
171. Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor β isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 1999; 274: 27857–66.
172. Stellato C. Post-transcriptional and nongenomic effects of Glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1:255-63.
173. Bladh LG, Liden J, Pazirandeh A, Rafter I, Dahlman-Wright K, Nilsson S, Okret S. Identification of target genes involved in the antiproliferative effect of Glucocorticoids reveals a role for nuclear factor-(κ)B repression. *Mol Endocrinol.* 2005 Mar;19 :632-43.

174. Brewer JA, Khor B, Vogt SK, Muglia LM, Fujiwara H, Haegele KE, Sleckman BP, Muglia. T-cell glucocorticoid receptor is required to suppress COX-2-mediated lethal immune activation. *Nat Med.* 2003;9 :1318-22.
175. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci.* 1998;94:557-72 .
176. Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy.* 2001;56:928-36 .
177. Schwiebert LM, Stellato C, Schleimer RP. The epithelium as a target of glucocorticoid action in the treatment of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:S16-9.
178. Hubeau C, Le Naour R, Abély M, Hinnrasky J, Guenounou M, Gaillard D, Puchelle E. Dysregulation of IL-2 and IL-8 production in circulating T lymphocytes from young cystic fibrosis patients. *Clin Exp Immunol.* 2004 ;135 :528-34.
179. McElvaney NG, Nakamura H, Birrer P, Hébert CA, Wong WL, Alphonso M, Baker JB, Catalano MA, Crystal RG. Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. *In vivo* suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerosolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor. *J Clin Invest.* 1992;90 :1296-301.
180. Machen TE. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 ;291 : 218-30.
181. Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hébert CA, Ueki I, Nadel JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol.*1993; 264 :L413-8.
182. Francoeur C, Denis M. Nitric oxide and interleukin-8 as inflammatory components of cystic fibrosis. *Inflammation.* 1995 ;19 :587-98.
183. Noah TL, Black HR, Cheng PW, Wood RE, Leigh MW. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1997 ;175 :638-47.
184. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, Hinnrasky J, Jacquot J, Péault B, Puchelle E. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 ;23 :121-7.
185. Reiniger N, Ichikawa JK, Pier GB. Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on gene expression in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection of human bronchial epithelial cells. *Infect Immun.* 2005 ;73 :6822-30.
186. Wiszniewski L, Jornot L, Dudez T, Pagano A, Rochat T, Lacroix JS, Suter S, Chanson. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 ;34 :39-48.
187. Scheid P, Kempster L, Griesenbach U, Davies JC, Dewar A, Weber PP, Colledge WH, Evans MJ, Geddes DM, Alton EW. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. *Eur Respir J.* 2001 ;17 :27-35.

188. Massengale AR, Quinn F Jr, Yankaskas J, Weissman D, McClellan WT, Cuff C, Aronoff SC. Reduced interleukin-8 production by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20 :1073-80.
189. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, et al. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med*. 1989;170 :1627-33.
190. Konstan MW, Walenga RW, Hilliard KA, Hilliard JB. Leukotriene B4 markedly elevated in the epithelial lining fluid of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1993 ;148(4 Pt 1):896-901.
191. Rigas B, Korenberg JR, Merrill WW, Levine L. Prostaglandins E2 and E2 alpha are elevated in saliva of cystic fibrosis patients. *Am J Gastroenterol*. 1989 ;84 :1408-12.
192. Chen J, Jiang XH, Chen H, Guo JH, Tsang LL, Yu MK, Xu WM, Chan HC. CFTR negatively regulates cyclooxygenase-2-PGE(2) positive feedback loop in inflammation. *J Cell Physiol*. 2012 ;227 :2759-66.
193. Carlstedt-Duke J, Brönnegård M, Strandvik B. Pathological regulation of arachidonic acid release in cystic fibrosis: the putative basic defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 ;83 :9202-6.
194. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr*(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 :13995-4000.
195. Farrell PM, Mischler EH, Engle MJ, Brown DJ, Lau SM. Fatty acid abnormalities in cystic fibrosis. *Pediatr Res*. 1985 ;19 :104-9.
196. Carlstedt-Duke J, Brönnegård M, Strandvik B. Pathological regulation of arachidonic acid release in cystic fibrosis: the putative basic defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 ;83 :9202-6.
197. Alonso, F., Henson, P. M, and Leslie, C. C A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biophys. Acta*. 1986; 878, 273–80.
198. Riendeau D, Guay J, Weech PK, Laliberté F, Yergey J, Li C, Desmarais S, Perrier H, Liu S, Nicoll-Griffith D, et al. Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A2, blocks production of arachidonate and 12 hydroxyeicosa-tetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. *J Biol Chem*. 1994 ;269 :15619-24.
199. Miele L, Cordella-Miele E, Xing M, Frizzell R, Mukherjee AB. Cystic fibrosis gene mutation (deltaF508) is associated with an intrinsic abnormality in Ca²⁺-induced arachidonic acid release by epithelial cells. *DNA Cell Biol*. 1997; 16 :749-59.
200. Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, Vane JR. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol*. 1994;113 :1008-14.
201. Kammouni W, Moreau B, Becq F, Saleh A, Pavirani A, Figarella C, and Marc D. Merten . A Cystic Fibrosis Tracheal Gland Cell Line, CF-KM4. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1999; 20: 684-691.

202. Anjaparavanda P, Naren, Bryan Cobb, Chunying Li, Koushik Roy, David Nelson, Ghanshyam D. Heda, Jie Liao, Kevin L. Kirk, Eric J. Sorscher, John Hanrahan, and John P. Clancy. A macromolecular complex of β 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA . PNAS, 2003; 100: 1342-6.
203. Pamela B Davis PB, Shelhamer JR, Kaliner M. Abnormal adrenergic and cholinergic sensitivity in cystic fibrosis. N Eng J Med 1980; 302:1453-6.
204. Pippig S, Andexinger S, Daniel K, Puzicha M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ. Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. J Biol Chem. 1993;268 :3201-8.
205. Schlador ML, Nathanson NM. Synergistic regulation of m2 muscarinic acetylcholine receptor desensitization and sequestration by G protein-coupled receptor kinase-2 and beta-arrestin-1. J Biol Chem. 1997;272:18882-90.
206. Diviani D, Lattion AL, Larbi N, Kunapuli P, Pronin A, Benovic JL, Cotecchia S. Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. J Biol Chem. 1996;271 :5049-58.
207. Haga K, Kameyama K, Haga T, Kikkawa U, Shiozaki K, Uchiyama H. Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. J Biol Chem. 1996 Feb 2;271(5):2776-82.
208. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. Science. 1990;248: 1547-50.
209. Medjane S., Raymond B, Wu Y., Touqui L. Impact of CFTR Δ F508 mutation on prostaglandin E2 production and type IIA phospholipase A2 expression by pulmonary epithelial cells. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 2005; 289.
210. Kiss Z, Tomono M. Compound D609 inhibits phorbol ester stimulated phospholipase D activity and phospholipase C-mediated phosphatidylethanolamine hydrolysis. Biochim Biophys Acta. 1995; 26;1259 :105-8.
211. Agro A, Langdon C, Smith F, Richards CD. Prostaglandin E2 enhances interleukin 8 (IL-8) and IL-6 but inhibits GM-CSF production by IL-1 stimulated human synovial fibroblasts in vitro. J Rheumatol. 1996 ;23 :862-8.
212. Berger UV, Hediger MA. Distribution of peptide transporter PEPT2 mRNA in the rat nervous system. Anat Embryol (Berl) 1999 ; 199:439–9.
213. Groneberg DA, Doring F, Theis S, Nickolaus M, Fischer A, Daniel H. Peptide transport in the mammary gland: Expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002; 282:E1172–9.
214. Lu H, Klaassen C. Tissue distribution and thyroid hormone regulation of PepT1 and Pept2 mRNA in rodents. Peptides. 2006 ; 27:850–7.

215. Zhu T, Chen XZ, Steel A, Hediger MA, Smith DE. Differential recognition of ACE inhibitors in *Xenopus laevis* oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2. *Pharm Res.* 2000; 17:526–2.
216. Yang CY, Dantzig AH, Pidgeon C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm Res.* 1999; 16:1331–43.
217. Groneberg DA, Fischer A, Chung KF, Daniel H. Molecular mechanisms of pulmonary peptidomimetic drug and peptide transport. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 30:251–260.
218. Brandsch M, Knütter I, Bosse-Doenecke E. Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters. *J Pharm Pharmacol.* 2008. 60:543-85
219. Daniel H, Kottra G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch.* 2004;447:610-8.
220. Döring F, Dorn D, Bachfischer U, Amasheh S, Herget M, Daniel H. Functional analysis of a chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J Physiol.* 1996;497:773-9.
221. Fei YJ, Liu JC, Fujita T, Liang R, Ganapathy V, Leibach FH. Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporters PEPT1 and PEPT2 using PEPT1-PEPT2 and PEPT2-PEPT1 chimeras. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246 :39-44.
222. Terada T, Saito H, Sawada K, Hashimoto Y, Inui K. N-terminal halves of rat H⁺/peptide transporters are responsible for their substrate recognition. *Pharm Res.* 2000 ;17 :15-20.
223. Newstead S, Drew D, Cameron AD, Postis VL, Xia X, Fowler PW, Ingram JC, Carpenter EP, Sansom MS, McPherson MJ, Baldwin SA, Iwata S. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO J.* 2011. 30:417-26
224. Meredith D, Price RA. Molecular modeling of PepT1--towards a structure. *J Membr Biol.* 2006; 213 :79-88.
225. Meredith D. and Boyd C. A. R. Oligopeptide transport by epithelial cells. *J. Memb.Biol.* 1995; 145:1–12.
226. Daniel H. First insights into the operational mode of epithelial peptide transporters. *J. Physiol.* 1997; 498: 561.
227. Temple C. S., Bronk J. R., Bailey P. D. and Boyd C. A. R. Substrate-charge dependence of stoichiometry shows membrane potential is the driving force for proton-peptide cotransport in rat renal cortex. *Pflugers Arch.* 1995; 430: 825–9.
228. Fei Y. J., Nara E., Liu J. C., Boyd C. A. R., Ganapathy V. and Leibach F. Preferential recognition of zwitterionic dipeptides as transportable substrates by the high affinity peptide transporter PEPT2. *H.Biochim. Biophys.* 1999; *Acta* 1418: 344–51.
229. Boll M, Herget M, Wagener M, Weber WM, Markovich. D, Biber J, Clauss W, Murer H, Daniel H. Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton- coupled peptide transporter. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:284–289.

230. Döring F, Walter J, Will J, Föcking M, Boll M, Amasheh S, Clauss W, Daniel H. Deltaaminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2761–67.
231. Lu H, Klaassen C. Tissue distribution and thyroid hormone regulation of PepT1 and Pept2 mRNA in rodents. *Peptides.* 2006; 27:850–7.
232. Rubio-Aliaga I, Boll M, Daniel H. Cloning and characterization of the gene encoding the mouse peptide transporter PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000. 276 : 734-41.
233. Søndergaard HB, Brodin B, Nielsen CU. hPEPT1 is responsible for uptake and transport of Gly-Sar in the human bronchial airway epithelial cell-line Calu-3. *Pflugers Arch.* 2008; 456:611–2.
234. Si Endtera,b, D Francombea, C Ehrhardt b and M Gumbleton. RT-PCR analysis of ABC, SLC and SLCO drug transporters in human lung epithelial cell models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2009, 61: 583–591.
235. Bleasby K et al. Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* 2006; 36: 963–88.
236. Saito H, Terada T, Okuda M, Sasaki S, Inui K. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim Biophys Acta.* 1996. 1280:173–7.
237. Groneberg DA, Eynott PR, Döring F, Dinh QT, Oates T, Barnes PJ, Chung KF, Daniel H, Fischer A. Distribution and function of the peptide transporter PEPT2 in normal and cystic fibrosis human lung. *Thorax.* 2002; 57:55–60.
238. S. Ayyadurai, M. A Charania, B Xiao, E. Viennois and, Di Merlin. PepT1 expressed in immune cells has an important role in promoting the immune response during experimentally induced colitis. *Laboratory Investigation.* 2013;93, 888–899.
239. You-Jun Fei, Yoshikatsu Kanai, Stephan Nussberger, Vadivel Ganapathy, Frederick H. Leibach, Michael F. Romero, Satish K. Singh, Walter F. Boron & Matthias A. Hediger. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. 1994. *Nature* 368, 563 – 566.
240. P. Luckner, M. Brandsch. Interaction of 31 β -lactam antibiotics with the H⁺/peptide symporter PEPT2: analysis of affinity constants and comparison with PEPT1. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2005;59: 17–24.
241. Müns G, Vishwanatha JK, Rubinstein. Regulation of angiotensin I-converting enzyme in cultured bovine bronchial epithelial cells. *J Cell Biochem.* 1993 ;53 : 352-9.
242. Kammouni W, Figarella C, Marchand S, Merten M. Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells. *Infect Immun.* 1997; 65 :5176-83.
243. Kammouni W, Naïmi D, Renaud W, Bianco N, Figarella C, Merten MD. High lysosomal activities in cystic fibrosis tracheal gland cells corrected by adenovirus-mediated CFTR gene transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1453 :14-22.

244. El-Chemaly S, Ali-Rachedi R, Gerson C, Cobas MA, Forteza R, Salathe M, Conner GE. Lactoperoxidase and human airway host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 ;29 :206-12.
245. Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med*. 2013;368 :149-60.
246. T Robak, A Gladalska, H Stepień, and E Robak. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 1998;7(5): 347–353.
247. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*. 1997; 1; 12-26.
248. Xi- MI, F-q ZENG1. Hypomethylation of interleukin-4 and -6 promoters in T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008. 29 (1): 105-2.
249. Joseph E. De Larco B, Beverly R. K. Wuertz , Douglas Yee , Brenda L. Rickert , and Leo T.Furcht. Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *PNAS*.; 2003; 100:24: 13988-93.
250. Z-H Lucy Zhou, Priya Chaturvedi, Yu-long Han, Sumer Aras, Yi-shuan Li, Pappachan E. Kolattukudy, Dongsheng Ping\$, Jeremy M. Boss\$ and Richard M. *IFN-* Induction of the Human Monocyte Chemoattractant Protein (hMCP)-1 Gene in Astrocytoma Cells: Functional Interaction Between an IFN- - Activated Site and a GC-Rich Element1. Ransohoff. *The Journal of Immunology*, 1998 ;160: 3908-162,
251. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340:115-26.
252. Hofmann, MA, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest*. 2001; 107: 675-83.
253. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slaterry T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999; 25; 97(7):889-901.
254. Wheatley C. The return of the Scarlet Pimpernel: cobalamin in inflammation II -cobalamins can both selectively promote all three nitric oxide synthases (NOS), particularly iNOS and eNOS, and, as needed, selectively inhibit iNOS and nNOS. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*; 2007; 181 – 211.
255. Biolo G, Toigo G, Ciochi B, et al. Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. *Nutrition*. 1997; 13: 52–57.
256. Obled C, Papet I, Breuille D. Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002; 5: 189–97.
257. Reeds PJ, Jahoor F. (2001). The amino acid requirements of disease. *Clin Nutr*; 20:15–22.
258. Storch KJ, Wagner DA, Burke JF, Young VR. Quantitative study in vivo of methionine cycle in humans using [methyl-2H3]- and [1-13C]methionine. *Am J Physiol*; 1988; 255:322–331.
259. Haley, J.T. Compositions de cobalamine et procedes destines au traitement ou a la prevention de la mucosite. *brevet n° : WO/2007/142973*. 2007
260. Shin, B.C.I et coll. Compositions pour application externe contenant de l'adenosyl cobalamine, destinees au traitement des maladies de la peau. *brevet n° : WO/2007/066889*. 2007.

261. Nilsson K., Hultberg B., Gustafson L. Lack of Association between Plasma Homocysteine and Inflammation in Psychogeriatric Patients. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2002; 14 : 151-5.
262. Stuart, D.M. Method for treating generalized and focal peripheral neuropathies locales. Brevet W0/2008/021404. 2008..
263. Funada U, Wada M, Kawata T, Tanaka N, Tadokoro T, Maekawa A . Effect of cobalamin on the allergic response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000; 64 : 2053-58.
264. Wang J., Homer, ,R.J. Chen,Q., and. Elias J.A. Endogenous and Exogenous IL- 6 Inhibit Aeroallergen- Induced Th2 Inflammation. *J. Immunol.*, 2000; 165 : 4051–61.
265. B. H. Thuesen, L. L. N. Husemoen, L. Ovesen, T. Jørgensen, M. Fenger, G. Gilderson, A. Linneberg. Atopy, asthma, and lung function in relation to folate and vitamin B12 in adults. *Allergy* 2010; 65: 1446–54.
266. Hodge S, Hodge G, Holmes M, Flower R, Scicchitano R. Interleukin-4 and tumour necrosis factor-alpha inhibit transforming growth factor-beta production in a human bronchial epithelial cell line: possible relevance to inflammatory mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2001; 6 :205-11.
267. Takizawa H, Ohtoshi T, Kikutani T, Okazaki H, Akiyama N, Sato M, Shoji S, Ito K. Histamine activates bronchial epithelial cells to release inflammatory cytokines in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;108 :260-7.
268. Aoki Y, Qiu D, Zhao GH, Kao PN. Leukotriene B4 mediates histamine induction of NF-kappaB and IL-8 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol*. 1998 ; 274 : 1030-9.
269. Yuai Li,1 Luqi Chi,1 Daniel J. Stechschulte, and Kottarappat N. Dileepan. Histamine-Induced Production of Interleukin-6 and Interleukin-8 by Human Coronary Artery Endothelial Cells Is Enhanced by Endotoxin and Tumor Necrosis Factor-a. *Microvascular Research* 2001; 61, 253–62.
270. Lee SW, Tsou AP, Chan H, Thomas J, Petrie K, Eugui EM, Allison AC. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 β gene and decrease the stability of interleukin 1 β mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:1204–08.
271. Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC. Dex-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. *J Immunol* . 1984; 133:273–6.
272. Mukaida N, Gussella GL, Kasahara T, Ko Y, Zachariae CO, Kawai T, Matsushima K. Molecular analysis of the inhibition of interleukin-8 production by dexamethasone in a human fibrosarcoma cell line. *Immunology*. 1992; 75:674–679.
273. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem*. 1994; 269:13289–95.
274. Ray A, LaForge KS, Sehgal PB. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol*. 1990;10 :5736-46.

275. So AY, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet.* 2007; 3 : 94.
276. Eickelberg O, Roth M, Lörx R, Bruce V, Rüdiger J, Johnson M, Block LH. Ligand-independent Activation of the Glucocorticoid Receptor by β_2 -Adrenergic Receptor Agonists in Primary Human Lung Fibroblasts and Vascular Smooth Muscle Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 1999; 1005-10.
277. K. De Bosscher and G. Haegeman. *Molecular Endocrinology.* Minireview: Latest Perspectives on Antiinflammatory Actions of Glucocorticoids. 2009 ; 23 : 281-29.
278. Webster, J. C., Jewell, C. M., Bodwell, J. E., Munck, A., Sar, M., and Cidlowski, J. A Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 9287–93.
279. Blind, R. D., and Garabedian, M. J. Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2008. 109, 150–157.
280. Chen, W., Dang, T., Blind, R. D., Wang, Z., Cavasotto, C. N., Hittelman, A. B., Rogatsky, I., Logan, S. K., and Garabedian. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *M. J. Mol. Endocrinol.* 2008; 22, 1754–66.
281. Wang Z, Chen W, Kono E, Dang T, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol Endocrinol.* 2007;21:625-34.
282. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008; USA 105, 10762–67. Rao, K. V., and Fox, C. F. (1987) Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of human glucocorticoid receptor in cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 512–519.
283. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, Martinez-Fong D, Daval JL, Guéant JL. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009.106:21930-5.
284. Kobayashi Y, Mercado N, Barnes PJ, Ito K. Defects of protein phosphatase 2A causes corticosteroid insensitivity in severe asthma. *PLoS One.* 2011. 6:27627.
285. Ronacher K, Hadley K, Avenant C, Stubbsrud E, Simons SS Jr, Louw A, Hapgood JP. Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;299:219-31.
286. Chen AH, Innis SM, Davidson AG, James SJ. Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine excretion is increased in children with cystic fibrosis and is associated with plasma homocysteine, S-adenosylhomocysteine, and S-adenosylmethionine. *Am J Clin Nutr.* 2005 ;81 :686-91.
287. Marguerite V, Gkikopoulou E, Alberto JM, Guéant JL, Merten M., Phospholipase D activation mediates cobalamin-induced downregulation of Multidrug Resistance-1 gene and increase in sensitivity to vinblastine in HepG2 cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45 :213-20.

288. Gkikopoulou, E, Guéant JL, Merten, AKT/pp2A and Cox-2 signaling mediates cobalamin-induced inhibition of MDR-1 gene expression in HepG2 cells.

Fiches techniques

**Modèles d'étude : Les cellules trachéales glandulaires humaines.
(Lignées : MM39, MM39 (cftr-), CF-KM4 et 16HBE).**

Nous avons travaillé sur quatre lignées cellulaires humaines.

MM39 et CF-KM4 (figure) ont été obtenues au laboratoire (178) à partir de cultures primaires provenant de bronches de donneurs et receveurs au cours de transplantations bi-pulmonaires. Malgré leur transformation avec une souche sauvage du virus SV40, ces lignées ont conservé toutes leurs caractéristiques épithéliales et sécrétoires des cellules d'origine, c'est-à-dire une sécrétion constitutive et régulée de protéines sécrétées spécifiques des glandes séreuses (lysozymes, lactoférine, défensine et SLPI).

La lignée non CF appelée MM39 (246) exprime fortement CFTR et conserve la capacité à sécréter à un taux similaires les protéines et les cytokines que les cellules secrétaient avant transformation. Les réponses aux neurotransmetteurs sont aussi conservées. En particulier, les cellules ont conservé leur aptitudes à répondre aux agonistes cholinergiques, adrénergiques et purinergiques par une simulation de la sécrétion.

La lignée CF MM39-CFTR(-/-) a été obtenue par la transfection d'un antisens CFTR dans la lignée MM39. Un clone stable a été isolé. Il a été montré que celui-ci n'exprimait plus le gène cftr et ne produisait plus la protéine CFTR. De plus, des caractéristiques sécrétoires dysfonctionnelles ont aussi été mises en évidence comme l'absence de réponse beta-adrénergiques ainsi qu'une synthèse constitutive accrue de cytokines, comme pour les cellules CF-KM4. Cette lignée possède bien des caractéristiques CF, et est homologue des cellules MM39.

La lignée cellulaire CF-KM4 a été obtenue par transformation de cellules trachéales glandulaires humaines séreuses mucoviscidosique (Kammouni W and al., 1999). Elle conserve une morphologie épithéliales et la présence de cytokératines. Elle porte la double mutation $\Delta F508$. Tout comme les cellules d'origine, les cellules CF-KM4 ne répondent pas au carbachol ni à l'isoprotérenol. Par contre, elles répondent à l'ATP.

La lignée cellulaire 16HBE a été obtenue à partir de culture de cellules épithéliales bronchiques de surface provenant d'un patient qui a subi une double greffe coeur-poumon (A.

L. Cozens and al., 1994). Ces cellules ont été transformées par transfection avec le plasmide-pSVori et avec un gène codant pour le grand antigène T de SV 40. Cette lignée cellulaire conserve des caractéristiques épithéliales de jonctions serrées et de transports vectorielles d'ion in vitro. En plus, lorsque les cellules sont cultivées sur une interface air / liquide, elles développent des cils et gardent les mêmes caractéristiques morphologiques des cellules épithéliales. Les cellules 16HBE ne sont pas commercialisées. Elles ont été fournies par le Dr Jean Marie Zahm de l'unité mixte de Recherche-Santé 903. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Reims. France.

Les conditions de culture de ces trois lignées ainsi que le milieu utilisé sont décrits en annexe1. Les cellules MM39 et CF-KM4 sont maintenues dans du milieu de culture à 50% de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) et 50% de milieu Ham's F12 supplémenté avec 0,1 % d'UtroserG, 5% de sérum de bœuf, 5g/l de glucose, 0,1 g/l de pyruvate, 3µM d'épinephrine permettant d'optimiser la croissance et la différenciation [Merten, MD et l., 1993], ainsi que des antibiotiques et antifongiques. Pour avoir des résultats cohérents et reproductibles lors de mesures de la sécrétion, les récepteurs cholinergiques, adrénergiques et purinergiques des cellules MM39 et CF-KM4 doivent être stimulées plusieurs fois avec les agonistes suivants : le carbachol et l'isoprotérénol afin d'être opérationnelles. Cela va durer environ 2 semaines.

La lignée 16HBE ont été mises en culture dans un milieu DMEM 4.5 g/L de glucose (voir composition annexe), 10% SVF et 1% de mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (Pénicilline et Streptomycine).

Les cellules poussent sur des plaques Falcon sur lesquelles est déposé un film de collagène1. Elles sont incubées avec les différents agents testées quand elles atteignent 80% de confluence. Les cellules sont repiquées et congelées régulièrement, et conservées dans l'azote liquide. Après décongélation, les cellules sont testées pour la contamination éventuelle de mycoplasmes, et contrôlées une fois par mois et traitées s'il y a contamination. Les cellules sont utilisées 8 jours après confluence, au moment où elles sont au stade de différenciation [Merten, M, 1996]. Après incubations avec différents agents pharmacologiques utilisés, la viabilité cellulaire est testée en mesurant l'activité de la déshydrogénase mitochondriale avec la technique du MTT.

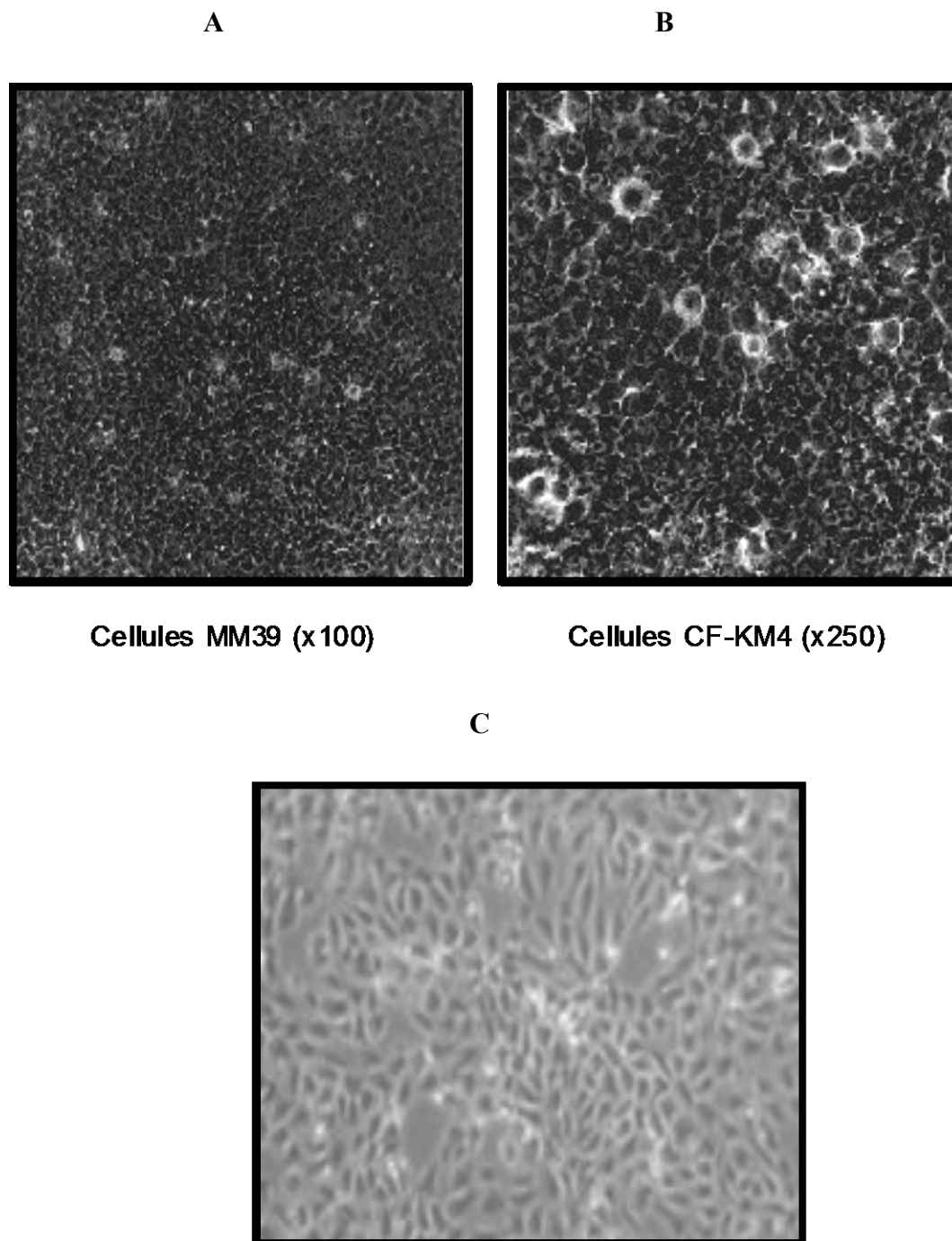


Figure 66: Lignées trachéales glandulaires humaines MM39 (A), CF-KM4 (B) et 16HBE (C). Cellules 16HBE 14o (x200)

Fiche n°1

Décomplémentation du Sérum Bovine Fœtal (SBF)

Principe/Intérêt :

La décomplémentation du SBF permet d'inactiver le complément.

Cette inactivation est nécessaire car le complément pourrait se lier à des anticorps du SBF pouvant reconnaître les cellules cultivées et finalement les détruire. (Activation de la voie biochimique classique du complément faisant partie du système immunitaire).

La décomplémentation permet également d'inactiver, dans une certaine mesure, des contaminants, tels que des mycoplasmes ou des agents infectieux, tels que des virus transmissibles à l'homme.

Protocole :

- Le SBF est fourni en flacon de 500 mL congelé à -20°C et conservé ainsi jusqu'à sa décomplémentation.
- Pour le décomplémenter, placer le flacon au bain marie pendant 30 minutes à 56°C.
- Réaliser par la suite (facultatif) une centrifugation, à température ambiante, 5 minutes à 1100 rpm, afin d'éliminer les éventuelles protéines dénaturées qui ont précipité.
- Aliquoter en 50 mL de façon stérile.
- Les aliquots sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.
- Le flacon de SBF vide est éliminé dans la poubelle à incinérer.

SBF, Sérum de boeuf foetal non décomplémenté, Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche n°2

Trypsination et Repiquage des cellules

Principe :

Décoller les cellules de leur support à l'aide d'une enzyme, la trypsine. Le succès de la technique repose sur l'élimination de toute trace de sérum et d'humidité dans la culture qui inhiberaient l'enzyme.

Protocole :

- Décongeler la trypsine. Aliquoter en tubes de 15 mL et recongeler (-20°C) jusqu'à utilisation.
- Éliminer le milieu de culture.
- Rincer deux fois le tapis cellulaire avec du PBS 1x stérile
- Incuber les cellules avec un fin film de trypsine à 37°C pendant 5 minutes.
- Vérifier au microscope que les cellules s'arrondissent et se décollent.
- Inhiber l'action de la trypsine par ajout de SBF.
- Agitation mécanique à la pipette afin de décoller toutes les cellules.
- Transfert de la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger.
- Centrifuger les cellules à 1000 *rpm* pendant 5 min.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 à 5 mL de milieu de culture correspondant au milieu dans lequel les cellules serontensemencées.
- Compter les cellules sur 2 grilles d'une cellule de Thoma³
- Faire la moyenne des 2 grilles, le nombre trouvé correspond à $N \cdot 10^4$ cellules/mL
- Pour l'entretien des cellules, ensemer à $1,5 \cdot 10^4$ cellule par cm^2

- 3 Cellule de Thoma : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France
- PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
- Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France

Fiche n°3

Congélation des cellules

Protocole :

Dans du DMSO (9% DMSO, 36%SVF, 55% DMEM) :

- Les cellules adhérentes contenues dans une flasque ou une boîte de Pétri sont trypsinées (un fin filme de trypsine couvre les cellules et agit 5 minutes à 37°C).
- Une centrifugation de 5 minutes à température ambiante à 1100 rpm permet d'éliminer toute trace de trypsine.
- Le culot cellulaire est ensuite repris dans 400 µL de milieu de culture utilisé pour ce type cellulaire.
- A cette suspension est ajouté goutte à goutte un mélange de 600 µL (500 µL de SVF et 100 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO)).
- Le mélange final est ensuite déposé dans un cryotube de 1 mL.
- Le cryotube est par la suite disposé dans une boîte de congélation permettant une diminution de la température de 1°C.min-1 jusqu'à -80°C.
- Plus de 24 heures après le cryotube est placé dans l'azote liquide (-196°C) et répertorié au cahier correspondant.

Dans du glycérol (10% glycérol, 30% SVF, 60% DMEM) :

- Préparer une solution stérile de glycérol à l'autoclave
- Préparer le milieu de congélation : 1 mL de glycérol, 2 mL de SVF, 2 mL de milieu de culture
- Préparer une suspension cellulaire de densité 4.10^6 cellules/mL dans le milieu de culture
- Déposer 0,5 mL de cette suspension dans des cryotubes¹. Soit 2.10^6 cellules /tube
- Ajouter 0,5 mL de milieu de congélation en agitant un peu le tube
- Placer les tubes dans la boîte de congélation²
- Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans l'azote liquide.

Référencer les tubes congelés dans les registres de cultures cellulaires !

- Boîte de congélation : Nalgène Cryo (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France)
dans laquelle l'alcool isopropylique permet une congélation progressive
- Cryotube : Nalgène ; VWR international, Fontenay-sous-Bois, France
- DMSO (Diméthylsulfoxyde) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche n°4

Décongélation des cellules

Protocole :

- Un cryotube de 1 mL, contenant des cellules stockées dans l'azote liquide, est rapidement décongelé par friction entre les mains.
- Après stérilisation externe du cryotube à l'éthanol 70% (v/v), la suspension cellulaire est diluée dans 12 mL de milieu de culture adapté à ce type cellulaire.
- L'ensemble est agité délicatement, puis centrifugé, à température ambiante, 5 min à 1100 *rpm*.
- Le surnageant est éliminé (élimination du DMSO cytotoxique).
- Les cellules seront mises en suspension dans du milieu de culture adapté, qui sera contenu par une flasque ou boîte de Pétri, placée dans l'incubateur.

Référencer les tubes décongelés dans les registres de cultures cellulaires !

Fiche n°5

Mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire par mesure de la réduction du MTT

L'effet des différents agents n'avait jamais été testé sur les cellules MM39 et CF-KM4 au laboratoire. Le premier paramètre à déterminer est donc de vérifier leur innocuité avant d'entreprendre leur utilisation. Pour cela nous avons utilisé la technique dite du MTT neutre. Cette méthode consiste à :

Suite à l'action des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) est réduit en cristaux bleus de formazan [Mosmann T., 1983].

- Le MTT est préparé à 5 mg/ml dans le tampon PBS
- stérilisé cette solution par passage au travers d'un filtre de 0,22 µm
- conserver la solution à +4°C à l'abri de la lumière.
- Après la période d'incubation des cellules en absence ou en présence d'effecteurs,
- Ajouter 10 µl de la solution stock de MTT pour 100 µl de milieu de culture dans chaque puits
- Incuber la plaque de culture est incubée pendant 4 heures à +37°C sous atmosphère humide et en présence de 5 % (v/v) de CO₂.
- Suivre la formation des cristaux bleus de formazan par observation sous microscope.
- Le milieu de culture est éliminé
 - Un même volume d'isopropanol est ajouté dans chaque puits
 - Mettre la plaque sous une forte agitation permettant la dissolution des cristaux.
- L'absorbance à 570 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque HTS 7000+.

Si l'absorbance mesurée est supérieure à une unité d'absorbance, la solution est diluée à l'aide d'isopropanol

Fiche n°6

Culture des cellules sur des inserts avec membrane PET (FALCON®, Réf : 3493⁽¹⁾) et étude du transport vectoriel

Pour l'étude du transport vectoriel, les cellules sont cultivées en système de double chambre donnant l'accès à la fois à leur pôle basolatéral et aussi à leur pôle apical.

- Ensemencer les cellules sur les inserts à raison de 10^3 à 10^5 cellules/cm²
- Mettre 1.5 ml de milieu de culture complet aux pôle apical et basolatéral
- Après confluence, vérifier l'étanchéité des inserts au microscope électronique mais aussi:
- Suivre la polarité des cellules quotidiennement avec un Ohmmètre (Millipore-ERS). (N.B : Après huit jours de confluence, la monocouche cellulaire présente une résistance de 250-1000 Ohms / cm²).
- Après confluence, enlever le milieu DMEM des deux compartiments, remettre du milieu DMEM/ F12 complet au pôle basolatéral et une solution de HBSS⁽²⁾ au pôle apical.
- Après 12h d'incubation, doser les protéines totales dans les deux compartiments avec la méthode de l'acide bicinchoninique (voir annexe).
- Le transport passif à travers la monocouche cellulaire est estimé en mesurant la fluorescence de la Dextran-fluorescéine (100 µg/puits) déposée au pôle basolatéral. Celle-ci est habituellement < à 1% (au pôle apical) après 24 heures de contact.

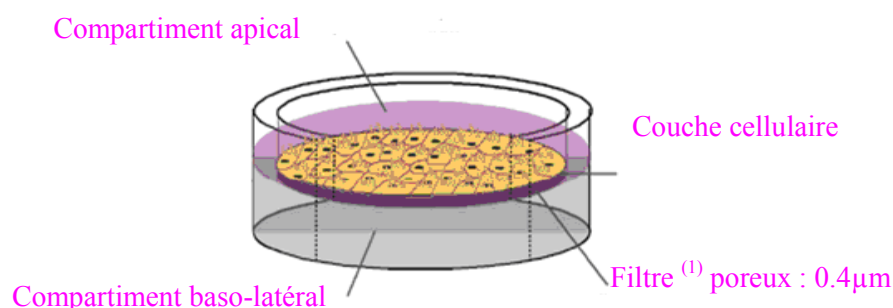


Figure 12 : Représentation des inserts utilisés pour l'étude du transport vectoriel.

L'étude de l'activité des Transporteurs PEPT1 et PEPT2 sur les cellules s'effectue en ajoutant un substrat spécifique des transporteurs : D-Ala-(L)-Lys-N-7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic-acid (D-Ala-Lys-AMCA)⁽³⁾ à pH et une température constante durant toutes les expériences : T=37°C, pH=7.4 l'ajustement du pH se fait avec du Hcl ou du NaOH.

① PETE polyethylene terephthalate (Falcon, France)

② HBSS : (0.137 M NaCl 5.4 mM KCl 0.25 mM Na₂HPO₄ 0.1 g glucose 0.44 mM KH₂PO₄ 1.3 mM CaCl₂ 1.0 mM MgSO₄ 4.2 mM NaHCO₃).

③ (BP0352. Biotrend, France)

Fiche n°7

Quantification des phospholipides membranaires PE et PC.

La méthode du dosage du phosphate repose sur la formation d'un complexe avec le molybdate d'ammonium décrite par Murphy et Riley (1962). La réaction du molybdate d'ammonium et des phosphates produit quantitativement un complexe bleu.

- Gratter les cellules et récupérer les extraits dans du PBS.
- Centrifuger les cellules récupérées pendant 5 min à 2500 rpm.
- Le culot est repris dans 1ml de PBS.
- Conserver un aliquot des échantillons à -20°C pour le dosage protéiques.
- 2.5 ml de méthanol sont ajoutées sur les culots.
- Soniquer pendant 1 min.
- Les lipides sont extrait et redissous dans du Chloroforme.
- 30µg de lipides sont déposés sur une plaque de Silice. (merck, darmstadt, Allemagne)
- La migration se fait dans une phase composée de chloroforme, méthanol, ammoniacque et de l'eau (30/13.5/1/1.5 ; V/V/V/V) ;
- Une fois la migration finie, révéler les phospholipides avec la Rhodamine B.
- Gratter les PE et PC et doser les phosphates avec la technique Murphy et Riley (1962)
- Préparer 10 mL d'acide sulfurique à 50% avec 50 mL d'eau dans la glace.
- Rajouter 1 g de molybdate d'ammonium et 40 mg de tartrate double d'antimoine et de potassium, l'antimoine catalysant la formation du phospho-molybdate. Qsp 100 ml avec de l'eau. Cette solution préparée est la solution A.
- Préparer en même temps 100 mL d'une solution d'acide ascorbique à 20 g.L⁻¹.
- Mélanger 15 ml d'échantillon additionné de 1 ml d'acide ascorbique et de 4 ml de la solution A.laisser agir 30 min à Température ambiante.
- Rq : La gamme étalon est fabriquée par dilution d'une solution mère de phosphate de sodium.
- Rajouter 2 ml d'eau et 5ml d'acide nitrique concentré. Chauffer à ébullition jusqu'à ce que tout l'échantillon soit en solution, puis rajouter de l'eau qsp 100 mL.
- Mesurer à 885 nm, la coloration bleue du phospho-molybdate d'ammonium.

Fiche n°8

Mesure du relargage de l'acide arachidonique tritiée

Le principe de l'expérience du relargage de l'acide arachidonique repose sur l'incubation des cellules avec de l'acide arachidonique tritiée qui sera incorporé par les cellules dans les phospholipides membranaires et relargué après action des phospholipases en fonction des différentes stimulations et traitements.

- Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence sur des plaques de 24 puits.
- Préparer une solution **A** de milieu de culture complet avec 0.5 μ Ci d'acide arachidonique tritiée par ml.
- Changer le milieu des cellules et incuber les cellules 24h avec 400 μ l de la solution **A**.
- Préparer une solution **B** avec du milieu de culture sans sérum avec 0.5 μ Ci/ml.
- Laver les cellules 2X avec du milieu sans sérum.
- Ajouter 400 μ l de la solution **B** et laisser incuber pendant 4h.
- Avant le traitement avec les différents effecteurs :
- Laver les cellules 2X avec du milieu sans sérum.
- Incuber les cellules avec les différents effecteurs (inhibiteurs ou activateurs de phospholipases).
- Prélever 50 μ l du surnageant des cellules et ajouter 4 ml de Scintillant Picot-fluor 40 de Perkin Elmer.
- Lire la scintillation sur un Automate Packard^①

① Packard A Canberra Company (1900 CA Tri-Carb Liqui scintillation analyser).

Fiche n°9

Stimulation des cellules MM39 et CF-KM4

A. Stimulation à blanc

Pour avoir des résultats cohérents et reproductibles lors de mesures de la sécrétion, les récepteurs cholinergiques, adrénergiques et purinergiques des cellules MM39 et CF-KM4 doivent être stimulés plusieurs fois afin d'être opérationnels. Cela va durer environ 2 semaines.

- Les cellules sontensemencées sur des plaques 24 puits, été utilisées à confluence (10 jours)
- Laver 2X les cellules avec du PBS
- Incuber les cellules pendant 4h minimum avec du milieu sans sérum afin de libérer les récepteurs (chasse).
- Préparer un mélange d'agonistes pour la stimulation à 0.1 mM dans du milieu SS :
Solution stock à 10mM d'ATP⁽¹⁾, Carb⁽¹⁾ et Iso⁽¹⁾
- Laver 1X avec du PBS
- Déposer le mélange sur les cellules
- Incuber 30 à 45 min à 37°C
- Retour en milieu complet

B. Stimulation réelle en vue d'un dosage ELISA

Les cellules glandulaires trachéales sécrètent du SLPI, que nous utilisons comme marqueur de sécrétion, et que nous qualifierons par dosage ELISA. Pour que les cellules MM39 et CF-KM4 sécrètent, il faut stimuler leurs récepteurs adrénergiques, cholinergiques et/ou purinergiques.

- Laver les cellules 3X avec du PBS
- Faire une chasse de 4h minimum avec du milieu sans sérum
- Préparer une plaque de 96 puits vierge non stérile pour dosage ELISA⁽²⁾ pour congeler les surnageants, en déposant 20 µl de sérum de lapin sur la plaque
- Préparer les produits à utiliser pour faire de la stimulation
A la fin des 4 heures :
- Laver les cellules 1X avec du PBS
- Déposer 250 µl des agonistes à 0.1 mM final préparer, dans les puits correspondants
- incubé 45 min à 37°C
- Récupérer 180 µl de surnageant des cellules stimulées et les déposer sur la plaque 96 puits
- Congeler à -20°C jusqu'au dosage ELISA
Ne pas oublier de marquer toutes les références sur la plaque

① PBS CaCl₂, MgCl₂, glucose (d'après DULBECCO)

② ATP, Carbachol, Isoprotérénol : Sigma, St Louis, USA.

Fiche n°10

DOSAGE ELISA du SLPI

Le SLPI est utilisé comme marqueur de sécrétion des cellules MM39 et CF-kM4. L'augmentation de la concentration de SLPI est mesurée par un dosage immunoenzymatique (1) par double capture (dosage ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) en phase solide de type sandwich sur microplaque (2).

A. préparation d'une plaque 96 puits pour le dosage ELISA ⁽²⁾ coatée avec les anticorps primaires :

- Peser 1 mg d'anticorps primaire anti SLPI lyophilisés ⁽³⁾ dilués dans 100 ml de tampon P 0,1 M pH 7,2 ⁽⁴⁾.
- Déposer 100 µl par puits.
- Incuber 2h à 37°C ou une nuit à température ambiante pour permettre l'adsorption des anticorps.

B. Dépôt du surnagent contenant le SLPI

- Préparer 20 ml de tampon Phosphate ⁽⁴⁾ contenant 10% de sérum de lapin ⁽⁵⁾.
- Les anticorps non fixés sont éliminés par 3 lavages à l'eau et un à l'eau distillé. La plaque est bien séchée.
- Déposer 160 µl par puits du sérum de lapin à 10% permettant de bloquer les liaisons aspécifiques.
- Rajouter 40 µl dans chaque puits de gamme étalon ⁽⁶⁾ et des échantillons à doser.
- Incuber 2h à 37°C ou la nuit à température ambiante afin que les protéines se fixent aux anticorps.

C. Dépôt de l'Anticorps secondaire ⁽⁷⁾ conjuguées à la peroxydase

- Mettre 10µl d'anticorps conjugué dans 20ml de tampon Phosphate ⁽³⁾ contenant 10% de sérum de lapin ⁽⁴⁾.
- Les protéines non fixées sont éliminées par 3 lavages à l'eau et un à l'eau distillée. Déposer 200 µl par puits. Incuber 2h à 37°C afin que les anticorps secondaire se fixent à la protéine.

D. Réaction enzymatique avec l'OPD ⁽⁸⁾

- Sortir l'OPD du congélateur et le laisser dégeler à l'obscurité.
- Peser 80 mg d'OPD
- Diluer dans 20 ml de tampon Citrate 0,1 M pH 5,5 ⁽⁹⁾ contenant 20µl d'H₂O₂ extemporanément.
- Préparer 10 ml d'acide sulfurique H₂SO₄ à 2N.
- L'excès d'anticorps conjugué est éliminé par 3 lavages à l'eau et un à l'eau distillée.
- Déposer 150 µl de tampon citrate ⁽⁹⁾ contenant le substrat à l'intervalle régulier.
- Déposer 100µl d'acide H₂SO₄ pour arrêter la réaction en gardant le même intervalle que précédemment

L'activité enzymatique est mesurée grâce à un substrat chromogène : l'Orthophényle diamine en présence d'eau oxygénée. L'intensité de la coloration ($\lambda = 492$), déterminée par un lecteur de microplaques (Victor Wallac Multilabel, Perkin Elmer), après arrêt de la réaction avec H_2SO_4 2N, est proportionnelle à la concentration en SLPI. Les concentrations de SLPI dans els échantillons sont déterminées par comparaison avec une courbe d'étalonnage qui contient des concentrations de SLPI de 3 à 100 $\mu\text{g/l}$.

-
- ① Tournier et al ; 1983. ② Anticorps primaire anti SLPI lyophilisés ③ Tampon Phosphate 0,1 M pH 7.2 : Acide : NaH_2PO_4 0,1 M
Base : Na_2HPO_4 0,1 M
Pour diluer 1 litre de tampon : peser 35.5 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
Diluer la base dans 800 ml d'eau MQ et rajouter l'acide. Ajuster à pH 7,2 et compléter avec de l'eau à 1l.
- ⑥ Gamme étalon de concentrations de SLPI croissantes de 3 à 100 $\mu\text{g/ml}$.
- ⑦ Anticorps secondaire conjuguée à la peroxydase.
- ⑧ OPD (OrthoPhénylène Diamine) Sigma
- ⑨ Tampon citrate 0.1 M pH 5.5 : Acide : citrate 44m Base : Na_2HPO_4 0.1M
Pour 500ml de tampon : Peser 4.6g de citrate- H_2O 6.8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Diluer la base dans 400 ml d'eau MQ et rajouter l'acide. Ajuster à pH 5.5 et compléter à 500ml

Fiche n°11
Dosage ELISA de l'IL-6, IL-8 et GM-CSF

- Coater la plaque de 96 puits avec une concentration d'Anticorps primaires de lapin (Anti-IL-6 ou IL-8 ou GM-CSF) final de 0,5 µg/ml diluée dans le PBS.
 - Déposer 100µl de cette solution par puit. Couvrir avec un plastique adhésif et laisser incuber toute la nuit à 4°C.
 - Enlever la solution en retournant la plaque.
 - Laver les puits avec de l'eau distillée
 - Ajouter 100 µl de la solution de blocage
 - Incuber 1h à température ambiante.
 - Vider les puits sans les laver
 - Ajouter 50µl des échantillons et du control négatif dilués dans le PBST dans les puits
Laisser incuber 1h à température ambiante.
 - Laver les puits 4X avec du PBST.
 - Diluer l'anticorps secondaire dans le PBST⁽¹⁾ à raison de 2µg/ml.
 - Ajouter 50µl de l'anticorps secondaire dans les puits et incuber 1h a température ambiante
 - laver les puits 4X avec du PBST.
 - Diluer les anticorps IgG conjugués à la HRP ⁽²⁾ (1 :5000) dans le PBST.
Ajouter 50 µl de cette solution dans chaque puit et laisser incuber 1h à température ambiante.
 - Laver les puits 4X avec du PBST.
 - Ajouter 50 µl par puit d'une solution de TMB⁽³⁾ (1µg/ml) préparée dans un tampon citrate/ phosphate de sodium disodique.
 - Arrêter la réaction avec l'ajout de 50 µl d'une solution de H₂O₂ (1.2mM).
 - Mesurer l'absorbance à 450 nm avec un spectrofluoromètre.
- La concentration des cytokines dosées par ELISA est déterminée à partir d'une gamme étalon réalisée avec une solution standard de notre cytokine d'intérêt.

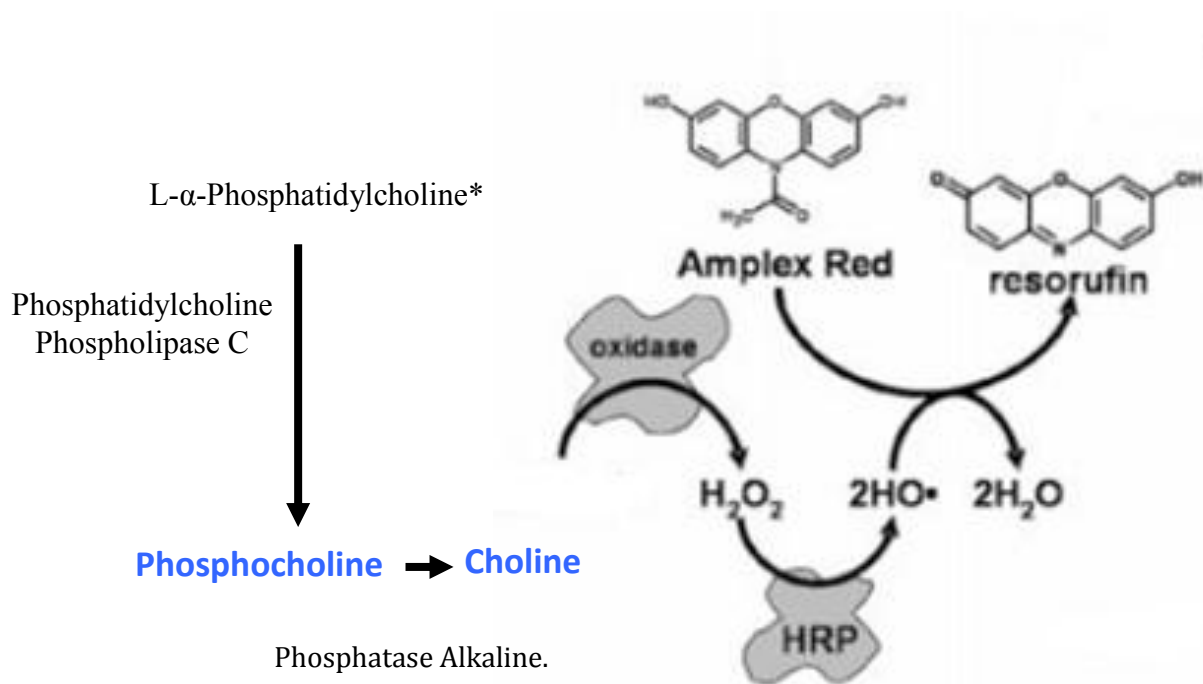
① PBST : PBS-Tween (1X PBS, 0.1% Tween)

② HRP : horseradish peroxidase, (12-349, Millipore)

③ TMB : 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (00-2023, Invitrogen, France)

Fiche n°12

Principe du dosage de l'activité PC-PLC avec le Kit Amplex® Red (Molecular Probes, Invitrogen, ref : A12218)



Méthode de quantification de l'activité de Phosphatidylcholine phospholipase C par le Kit « Amplex Red phosphatidylcholine phospholipase C assay » (Molecular Probes). Les lysats protéiques sont incubés selon le protocole correspondant avec une solution de phosphatidylcholine, de la choline oxydase, de la peroxydase et du 10-acetyl-3,7-dihydrophenoxazine (Amplex Red reagent). La présence d'une PC-PLC active dans les lysats cellulaires va induire une cascade de réaction enzymatiques schématisée dans la figure et aboutissant à la formation de la resorufine. Cette substance émet de la fluorescence à 640 nm après excitation à 530 nm. *Produits fournis dans le kit.

Fiche n°13

Extraction des ARN avec le Kit RNeasy

Ce kit est utilisé pour extraire les ARN servant à la RT-PCR. Avec la procédure RNease toutes les molécules d'ARN d'une taille supérieure à 200 nucléotides sont isolées. Par conséquent les ARNr 5,8S ; 5S, et les ARNt, sont exclus (15-20% des ARN totaux). Toutes les étapes du protocole RNeasy devront être accomplies à température ambiante. Pendant la procédure, il faut travailler rapidement. Toutes les étapes de centrifugation sont menées à 20-25°C. Ne pas utiliser la centrifugeuse si elle est en dessous de 20°C.

Mode opératoire :

- Lysér les cellules poussant sur des plaques de diamètre <6 cm avec 350 µL RLT/β-mercaptoéthanol directement dans la plaque de culture après avoir aspiré complètement le milieu
- Récupérer le lysat cellulaire dans un tube de 1,5 mL
- Passer le lysat au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free (A cette étape, les échantillons peuvent être placés à -80°C et être utilisés après plusieurs mois. Pour traiter les lysats congelés, décongeler les échantillons pendant 15-20 min à 37°C dans un bain-marie pour diluer les sels. Si du matériel insoluble est visible, centrifuger pendant 5 min à 3000-5000 g. Transférer le surnageant dans un nouveau tube.)
- Ajouter 1 volume d'éthanol 70% (RNase-free) et bien mélanger en pipetant. Ne pas centrifuger.
- Déposer jusqu'à 700 µl de l'échantillon sur une mini-colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 15 s à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat. Si le volume excède 700 µl, charger les aliquots successivement sur la colonne RNeasy et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat après chaque étape de centrifugation.
- Laver avec 350 µL de tampon RW1, et centrifuger pendant 15 s à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Laver la colonne avec 500 µL de tampon RPE et centrifuger à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat.
- Ajouter encore 500 µL de tampon RPE à la colonne. Centrifuger pendant 2 min à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat et ré-centrifuger 1 min pour sécher la membrane.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 30-50 µL d'eau RNasefree sur la membrane. Centrifuger à ≥ 8000 g pour éluer.
- Si le taux d'ARN attendu est >30 µg, répéter l'étape d'élution avec un second volume d'eau. Éluer dans le même tube collecteur.

-
- Rneasy Mini Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France
 - Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 µl de β-mercaptoéthanol par ml de tampon RLT.
 - Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% Rnase-free dans les 1 l ml de tampon RPE

Fiche n°14

Test de qualité et de quantification de l'ARN extrait

Test de qualité

- Électrophorèse

On effectue une migration sur un gel d'agarose à 1%. Le gel est donc composé de 30 mL de tampon TBE 1x auquel on rajoute 0,3 g d'agarose. Suite au chauffage de ce mélange, nous rajoutons 1 goutte de BET (fluorescent toxique et mutagène qui s'intercale entre les différentes bases azotées de l'ADN), puis on laisse solidifier le tout dans le moule prévu à cet effet.

On effectue ensuite des dépôts de 12 µL, contenant chacun 1 µL d'ARN précédemment extrait, additionné de 9 µL d'eau ultra pure et de 2 µL de tampon de charge. Le gel est enfin soumis à un champ électrique de 80V, pendant 50 minutes.

Une révélation est effectuée à la suite de cette migration, afin d'obtenir les résultats. Si un « smear » des bandes apparaît, ceci indique que l'ARN extrait est dégradé !

- Spectrophotométrie

Un second test de qualité est réalisé sur les ARN extraits, et ce, grâce à la lecture de la densité optique aux longueurs d'ondes de 260 et 280 nm, après dilution des échantillons au 1/40^{ème}. Les valeurs obtenues permettent de conclure sur la pureté de l'ARN. Effectivement, nous calculons le rapport A260nm/A280nm, et celui-ci doit absolument être compris entre 1,6 et 2 pour en conclure à une pureté de l'ARN extrait.

Notons que la présence d'un pic d'absorbance à 260 nm indique la présence d'acides nucléiques et que l'observation du même phénomène à 280 nm indique quant à elle la présence de protéines. Si le rapport est inférieur à 1,6, cela confirme une contamination par les protéines. A contrario, si le rapport est supérieur à 2, cela indique une dégradation des acides nucléiques.

Quantification d'ARN

Pour pouvoir faire une transcription inverse et amplification par réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR), il faut avoir 1 µg d'ARN. Pour cela nous réalisons une dilution au 1/40^e.

Dans ce cas, on mélange 2 µL d'ARN obtenu précédemment à 78 µL d'eau ultra pure.

La lecture de la densité optique à 260 nm par spectrophotométrie est effectuée, nous indiquant ainsi la concentration d'ARN dans l'échantillon en ng/µL (car 1 U.A. correspond à 40 µg/mL d'ARN).

Fiche n°15

Retro-transcription des ARN avec le kit Quantitect® Reverse Transcription

Produits utilisés:

- Tampon gDNA Wipeout, 7x : Pour l'élimination de l'ADN génomique.
- Quantiscript Reverse Transcriptase : Pour l'utilisation de la RT-PCR en deux étapes. Contient un mélange des produits Qiagen Omniscript Reverse Transcriptase et Sensiscript Reverse Transcriptase, deux enzymes hétérodimériques exprimées chez *E.coli*. Contient des inhibiteurs des RNases.
- Quantiscript RT Buffer, 5x : Pour l'optimisation de la reverse transcription, contient Mg^{2+} et dNTPs.
- RT Primer Mix : Mélange d'oligo-dT et de random primers dissouts dans l'eau.
- RNase-Free Water : Eau ultra pure

- Le protocole est optimisé pour 10 pg à 1 µg d'ARN. Toutes les étapes doivent être réalisées dans la glace pour éviter la dégradation des ARN.
- Avant de commencer, dissoudre éventuellement les précipités qui peuvent se former dans le tampon gDNA Wipeout en vortexant ou en chauffant rapidement à 37°C jusqu'à disparition des précipités.

Procédure :

- Décongeler les échantillons d'ARN dans la glace, ainsi que le tampon gDNA Wipeout, le tampon Quantiscript RT, le mix RT Primer et l'eau.
- Sortir l'enzyme RT au dernier moment
- Étape d'élimination de l'ADN génomique

Produit	Volume/réaction	Concentration
finale		
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl	1x
Template RNA	Variable (1 µg)	
RNase-free water	Variable	
Volume total	14 µl	

- Homogénéiser à la pipette et centrifuger rapidement
- Mettre 9 min à 42°C au thermocycler
- Mettre les tubes rapidement dans la glace

- Étape de reverse transcription

Produit	Volume/réaction	Concentration
finale		
Reverse-transcription master mix		
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl	
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl	1x
RT Primer Mix	1 µl	
ARN	14 µl	
Total volume	20 µl	

- Homogénéiser à la pipette et centrifuger
- Mettre 15 min à 42°C puis 3 min à 95°C au thermocycler
- Mettre les tubes dans la glace
- Aliquoter les échantillons 2x10 µL et conserver les ADNc à -20°C

-
- Quantitect® Reverse Transcription Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France
 - Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeuf cedex)

Fiche n°16

RT-PCR semi-quantitative

La RT-PCR semi-quantitative permet de comparer les variations relatives d'expression des gènes d'intérêts en les comparant à l'expression d'un gène dont l'expression est constante dans le modèle cellulaire d'étude. Elle comporte deux étapes : une étape de transcription inverse (ou RT), permettant de synthétiser l'ADNc à partir des ARN totaux, et une étape d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR) de l'ADNc.

L'étude par RT-PCR de l'expression de gènes est réalisée à l'aide du kit RNeasy Mini Kit de Quiagen (Courtaboeuf, France), et d'un appareil GeneAmp® PCR System 2400. 10 ng d'ARN totaux de cellules cultivées sont utilisés ainsi que deux paires d'oligonucléotides pour chaque gène analysé dont les séquences sont données dans le tableau page suivante.

La transcription inverse est réalisée à +70°C pendant 15 min, suivie d'une incubation pendant deux minutes à +95°C permettant la dénaturation des hétéroduplexes ARN-ADN.

L'amplification est effectuée par une série d'incubations successives ou cycles :

- à +94°C pendant 30 sec pour la dénaturation des ADN double brin,
- à une Température (Tm) propre à chaque couple d'amorces pendant 20 sec pour l'appariement des oligonucléotides, soit : 57°C pour GR α et GR β , 60 °C pour PEPT1, IL-8, Cox-2 et GAPDH, 65°C pour PEPT2.
- à +72°C pendant 30 sec pour l'élongation des séquences.

Pour chaque gène étudié, le nombre de cycles est déterminé de manière à se situer dans la phase exponentielle de l'amplification par PCR, permettant ainsi l'analyse semi-quantitative de l'expression du gène, soit 40 cycles pour les gènes de la PEPT1 et PEPT2, 35 cycles pour les gènes d'IL-8 et GAPDH, 32 cycles pour celui de la Cox-2 et Cox-1. L'amplification est terminée par une étape supplémentaire d'élongation de sept minutes.

Les produits de RT-PCR ainsi obtenus sont séparés par PAGE (polyacrylamide 10 % (p/v), Tris 90 mM, acide borique 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0). Après migration (Tris 90 mM, acide borique 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0), ces produits sont visualisés à l'aide d'un agent intercalant fluorescent. Le gel est analysé après capture d'image en fluorescence à l'aide d'un appareil ImageMaster⁽¹⁾. L'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié présent. Les intensités de fluorescence sont rapportées à celle mesurée pour le gène domestique (GAPDH) permettant ainsi l'analyse semi-quantitative de l'expression des gènes dans les cellules en fonction des conditions de cultures.

(1) Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France.

Gène	Oligonucléotides	Taille du produit
<i>IL-8</i>	sens : 5'- GGC ACA AAC TTT CAG AGA CAG -3' antisens : 5'- ACA CAG AGC TGC AGA AAT CAG G -3'	150 pb
<i>PEPT1</i>	sens: 5'- ACA CAG TTT CTT TGG TTA TCC C -3' antisens: 5'- ATG AGA GCA GGA GGA ACC CCA A -3'	600 pb
<i>PEPT2</i>	sens: 5'- TCC CAT CCT GGG AGC AGC CAT -3' antisens: 5'- GGA CTT GAT CAC ATG GCC AAG CAC A-3'	100 pb
<i>Cox-2</i>	sens: 5'- CCT CCT GTG CCT GAT GAT TGC-3' antisens: 5'- CAT CAG ACC AGG CAC CAG ACC -3'	440 pb
<i>GRα</i>	sens: 5'- CTA TGC ATG AAG TGG TTG AAA-3' antisens: 5'- TTT CAG CTA ACA TCT CGG G -3'	100 pb
<i>GRβ</i>	sens: 5'- CAA GGA AAC TCC AGC CAG AA -3' antisens: 5'- CCA CAT AAC ATT TTC ATG CAT AGA -3'	80 pb
<i>GAPDH</i>	sens: 5'-AAC AGC GAC ACC CAC TCC TC-3' antisens: 5'-CAT ACC AGG AAA TGA GCT TGA CAA-3'.	85 pb

Fiche n°17

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)**Principe**

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) est une technique qui permet de mettre en évidence la fixation d'une protéine donnée sur une séquence spécifique de l'ADN *in vivo*. En bref, les cellules vivantes sont fixées par le formaldéhyde afin de lier les protéines à l'ADN (cross-linking). La chromatine est ensuite clivée et solubilisée par sonication [il s'agit alors du xChIP par opposition au nChIP (native ChIP) où l'on utilise la digestion enzymatique pour fragmenter l'ADN]. Cette étape est suivie par une immunoprécipitation sélective des complexes protéine-ADN à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt. Les « crosslinks » sont ensuite défaits et l'ADN immunoprécipité est analysé par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de la région à analyser (figure 3) (Yan *et al.*, 2004).

Conditions expérimentales

Toutes les expériences de ChIP ont été faites avec le kit Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay (Diagenode, France).

Les anticorps utilisés sont les suivants :

- Anticorps anti – GR α (origine : lapin) : abc3579.
- Anticorps anti-RNA Pol II (Millipore, France) : 17-620.
- IgG lapin (Sigma) : 2729.
-

Modalités de traitement

Les cellules ont été incubées en présence ou non de : 100 ng/mL Cbl pendant 24 h, 10ng/ml TNF pendant 8 h, 10 μ M Histamine pendant 12 h et 1 μ M Dex pendant 6h.

Préparation de l'extrait cellulaire

- Fixation des protéines à l'ADN (formation de cross-links) par incubation de $2,5 \times 10^6$ cellules vivantes dans le milieu de culture en présence de formaldéhyde à 1% pendant 10 min à 37°C.

- Stopper la réaction par ajout de glycine à une concentration finale de 125 mM, pendant 5 min à température ambiante suivie de 4 min de centrifugation à 2000 tours/min à 4°C.
- Laver 2X les cellules avec 5 mL de PBS froid avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 µg/mL aprotinine; 1 µg/mL pepstatine A ; 1 mM PMSF).
- Le culot cellulaire est remis en suspension dans 470 µL de tampon de lyse (1% SDS ; 10 mM EDTA ; 50 mM Tris-HCl pH 8,1) avec le cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 µg/mL aprotinine; 1 µg/mL pepstatine A ; 1 mM PMSF) et gardé 10 min dans la glace.
- Une étape de sonication dans la glace pendant 15 à 30s par impulsions de 5 s alternées avec 30s de pause pour éviter la surchauffe de l'ADN qui risquerait de le dégrader.
- Centrifuger les échantillons à 4°C pendant 10 min à 13000 tours/min.

Les conditions de sonication sont optimales quand les fragments d'ADN ont des tailles de 200 à 1000 pb. La validation de cette première étape est donc primordiale avant de poursuivre l'expérience.

- Ainsi, 20 µL du lysat cellulaire soniqué sont additionnés de 80 µL d'eau et 4 µL d'une solution de NaCl 5M puis chauffés à 65°C pendant 6 heures pour détacher les « cross-links ».
- Les protéines sont ensuite digérées en présence d'1 µL de protéinase K à 20 mg/mL (Euromedex, France) à 55°C pendant 1 à 2 heures.
- L'ADN est récupéré par une extraction au phénol-chloroforme: La solution d'ADN est mélangée à un même volume de phénol saturé de tampon Tris puis centrifugée pendant 5 min à 15500 g à température ambiante.
- La phase aqueuse est récupérée et additionnée d'un volume identique d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) (Euromedex, France).
- Après agitation du tube et centrifugation pendant 5 min à 15500 g à température ambiante, la phase aqueuse est recueillie et l'ADN précipité avec 2 volumes d'éthanol pur et 1/10e de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2, pendant une nuit à -20°C.
- Le précipité est lavé avec 1 mL d'éthanol à 70% puis repris dans 25 µL de tampon TE (10 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA). L'ADN est ensuite migré, en même temps qu'un marqueur de taille (1 Kb Plus DNA Ladder,

Invitrogen, France), sur un gel d'agarose à 1% supplémenté en bromure d'éthidium à 0,05 µg/mL, sous une tension de 80 V pendant 45 min pour détecter la taille des fragments d'ADN clivé.

Immunoprécipitation de la protéine d'intérêt

- 410 µL du lysat cellulaire clivé sont dilués 10 fois avec le tampon de dilution (0,01% SDS ; 1,1% Triton X-100 ; 1,2 mM EDTA ; 16,7 mM Tris-HCl pH 8,1 ; 167 mM NaCl) et avec le cocktail (1 µg/mL aprotinine; 1 µg/mL pepstatine A ; 1 mM PMSF).
- 20 µL de cette solution diluée sont ensuite recueillis (input). L'« input » est gardé à -80°C. Afin de réduire le bruit de fond résultant d'une fixation aspécifique, le reste de la solution (~4080 µL) est mis à agiter pendant une heure à 4°C, en présence de 164 µL d'une suspension de billes de protéine A/agarose/ADN de sperme de saumon. Les billes sont ensuite séparées du mélange par une brève centrifugation à 10000 g pendant 5 s et le surnageant récupéré.
- Le surnageant est divisé en deux fractions égales (200 µL) dans deux tubes différents. L'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt est ajouté (8 µg) dans le tube où aura lieu l'immunoprécipitation, alors que le deuxième tube servira de contrôle négatif et subira les mêmes traitements sans être supplémenté en anticorps.
- Les échantillons sont alors mis à agiter sur un rouleau à disque rotatif pendant une nuit à 4°C. 60 µL de la suspension de protéine A/agarose/ADN de sperme de saumon sont rajoutés aux échantillons pour recueillir les complexes immuns, après 1 heure de rotation à 4°C.
- Les billes sont alors collectées après une centrifugation d'une minute à 850 tours/min à 4°C. L'ADN et les protéines associés d'une façon non spécifique aux billes sont éliminés par 5 lavages, de 5 min chacun, avec les tampons de lavages fournis avec le Kit.
- Après le lavage, les billes sont recueillies par une centrifugation d'une minute à 850 tours/min à 4°C. A ce stade, les échantillons sont des complexes de protéine A-anticorps-protéine-ADN.
- Les complexes protéine-ADN sont élués après avoir incubé les billes avec 250 µL de tampon d'éluion (1% SDS ; 0,1 M NaHCO₃), pendant 15 min à température ambiante.
- Le surnageant est récupéré après 2 min de centrifugation à 1000 g à température ambiante et l'opération répétée encore une fois. Les 2 éluats sont ensuite combinés (~ 500 µL) dans le même tube.

Extraction de l'ADN associé à la protéine immunoprécipitée

- Aux éluats on rajoute 20 µL de NaCl 5 M et on chauffe à 65°C pendant 6 heures afin de détacher les cross-links formés par le formaldéhyde. A cette étape, le volume de la fraction « input » est ajustée à 100 µL puis la solution est chauffée de la même manière en présence de 4 µL NaCl 5 M.
- Afin de purifier l'ADN des protéines, les échantillons immunoprécipités et les contrôles négatifs sont complétés avec 10 µL d'EDTA 0,5 M, 20 µL de Tris-HCl 1M pH 6,5 et 1,5 µL de protéinase K à 20 mg/mL. Les « Input » sont supplémentés en quantités proportionnelles des mêmes produits. Les tubes sont ainsi gardés à 55°C pendant 2 heures.

- L'ADN est recueilli par une extraction au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à 20°C pendant une nuit avec 3 volumes d'éthanol pur en présence de 20 µg de glycogène (Euromedex, France) comme entraîneur. L'ADN est ensuite lavé avec 1 mL d'éthanol 70% et repris dans 30 µL de tampon TE (10 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA).

Analyse par PCR de l'ADN immunoprécipité

L'ADN est analysé par PCR « classique » semi-quantitative. Toutes les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µL contenant : 0,2 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTP) (Invitrogen, France), 2 mM MgCl₂ (Invitrogen, France), 0,5 unité de Taq ADN polymérase recombinante (Invitrogen, France), le tampon de la Taq concentré une fois (Invitrogen, France), 5 µL de la solution d'ADN (diluée 8 fois pour les Input) et 1 µM de chacune des amorces sens et antisens.

Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADN est réalisé parallèlement aux échantillons pour vérifier l'absence de contamination. Les ADN amplifiés sont migrés sur un gel d'agarose à 2% contenant 0,05 µg/mL de bromure d'éthidium. Le gel est alors scanné. Les bandes ont été quantifiées par densitométrie et analysées avec le logiciel « Image J » développé par « National Institutes of Health ». L'enrichissement en ADN immunoprécipité (IP) est déterminé en divisant la densité des produits de PCR IP par celle des inputs (INP), pour les échantillons contrôles et traités puis en comparant le rapport entre les valeurs obtenues. La PCR est réalisée selon le protocole suivant : une incubation à 94°C pendant 3 min, 30 cycles d'amplification pour le promoteur d'IL-8 et 40 cycles d'amplification pour le promoteur d'IL-6: 94°C pendant 1 min (dénaturation), 58,5°C pendant 1 min (hybridation) et 72°C pendant 1 min (élongation) puis une incubation à 72°C pendant 10 min.

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

Pour le promoteur d'IL-8 :

Amorce sens : 5'- GGGCCATCAGTTGCAAATC -3'

Amorces antisens : 5'-TCCTTCCGGTGGTTTCTTC -3'

Pour le promoteur d'IL-6 :

Amorce sens : 5'- CCTAGTTGTGTCTTGCGATG-3'

Amorces antisens : 5'- GGAGGGGAGATAGAGCTTCT-3'

Fiche n°18
PCR quantitative en temps réel avec le kit Quantitect® SYBR®
Green PCR

Produits utilisés:

- HotStarTaq DNA Polymerase: forme modifiée de l'ADN polymerase recombinante (94kDa) isolée de *Thermus aquaticus* clonée chez *E.coli*. N'a pas d'activité enzymatique à température ambiante.
- QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: Contient Tris·HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, pH 8.7 (20°C)
- dNTP mix : Contient dATP, dCTP, dGTP, et dTTP/dUTP
- Fluorescent dyes : **SYBR Green I** émet de la fluorescence lorsqu'il se lie à l'ADN double brin (l'excitation du fluorophore s'effectue à 494 nm et l'émission à 521 nm et **ROX** émet la même fluorescence tout au long de la PCR, il sert de niveau de référence sur lequel tous les signaux fluorescents seront normalisés, il compense les différences de détection de fluorescence entre les puits dues aux faibles variations de volume réactionnel ou encore à la position des puits).
- RNase-free water : Eau ultra pure

Avant de commencer :

- La longueur de l'ADN à amplifier doit être idéalement comprise entre 100 et 150 pb
- Une étape initiale d'incubation de 15 min à 95°C est nécessaire pour activer l'ADN polymérase HotStar Taq
- Toujours commencer la réaction avec une concentration finale de MgCl₂ de 2,5 mM comme cela est fourni dans le tampon quantitect SYBR Green PCR Master Mix.

Procédure :

- Décongeler les échantillons dans la glace, le master mix, les amorces et l'eau
- Préparer un mix selon le tableau suivant :

	Par tube
SYBR-Green	10 µL
ADNc	1 µL
Amorces mix	1,2 µL (à 10µM)= 0.6sens+0.6AS
H2O Kit	7,8 µL
Volume total	20µL

- Dans les puits d'une plaque 96 puits, mettre 19 µL de mix
- Ajouter 1 µL d'ADNc de la dilution souhaitée soit pour la gamme étalon soit pour l'échantillon à quantifier relativement à la gamme
- Coller un film adhésif transparent sur la plaque en insistant bien sur les contours
- Programmer le bloc thermostaté pour un nombre de cycle compris entre 35 et 45 avec 3 étapes par cycle :
 - la dénaturation à 94°C pendant 30 s,
 - l'hybridation à 55-56°C (selon les amorces utilisées) pendant 30 s
 - l'élongation à 72°C pendant 30 s.
- Avant les 35-45 cycles, ajouter une étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 15 min et à la fin une élongation finale à 72°C pendant 7 min suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5s.
- Programmer ensuite la courbe de fusion en 50 cycles en augmentant la température de 65°C à 95°C à raison de 0,5°C par seconde.
- La plaque peut ensuite être conservée à -20°C pour la visualisation des ADN sur gel d'agarose.

Les amorces utilisées pour la qPCR :

Gène	Oligonucléotides	Taille du produit
IL-8	sens : 5'- GGC ACA AAC TTT CAG AGA CAG -3' antisens : 5'- ACA CAG AGC TGC AGA AAT CAG G -3	150 pb
IL-6	sens : 5'- GTA GCC GCC CCA CAC AGA 3' antisens : 5'- CAT GTC TCC TTT CTC AGG GCT G -3'	100 pb
GM-CSF	sens: 5'-CAC TGC TGC TGA GAT GAA TGA AA-3' antisens: 5'-GTC TGT AGG CAG GTC GGC TC-3'	80 pb

-
- Quantitect® SYBR® Green PCR Qiagen (Courtaboeuf, France)
 - ABgene® PCR Plates, Thermo-Fast® 96, Semi-Skirted, AB-0990, Thermo Scientific
 - iCycler™, Biorad

Fiche n°19

Analyse qualitative de l'ADN sur gel d'agarose

- Peser l'agarose afin de préparer un gel à 0,8-1% (p/v) selon la taille des ADN étudiés
- Dissoudre l'agarose dans du tampon TBE 1X (80-100 mL) par chauffage au four à micro-ondes jusqu'à un début d'ébullition puis laisser refroidir à ~50°C sur la paillasse
- Ajouter du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µg/mL et homogénéiser
- Verser délicatement la solution chaude d'agarose dans le support de gel et laisser polymériser pendant 15 min à température ambiante.
- Retirer le peigne et la plaque de son support puis placer le gel dans la cuve d'électrophorèse horizontale remplie avec du tampon TBE 1X
- Déposer dans les puits du gel, 10 µL de produits PCR mélangés à 2 µL de solution de dépôt ainsi que des marqueurs de taille
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu
- Faire migrer l'ADN sous une tension constante de 130 V pendant 50 min (18 V/cm)
- L'ADN contenu dans le gel est visualisé sur une plaque UV (312 nm) par Image MasterTM VDS.

-
- Agarose standard, Euromedex
 - Tampon TBE 10X: Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) 20 mM (pH8,0) Wide Mini-SubTM Cell (Bio-Rad Laboratories)
 - Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio
 - Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
 - Marqueurs de taille : φX174 RF DNA/*Hae*III Fragments : 72-1353 pb (11 bandes) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA)
 - pUC18/MspI : 26-501 (12 bandes) ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
 - 100 bp DNA Ladder : 100-1000 pb (11 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
 - 1 kb DNA Ladder : 250-10000 pb (14 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
 - SmartLadder : 200-10000 pb (14 bandes) marqueur de quantification (Eurogentec)

Fiche n°20

Extraction des protéines cytosoliques

- Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri (Ø mm) jusqu'à 80 % de confluence et ensuite en présence d'agents d'intérêt pendant 24 heures.

! Travailler sur la glace !

- Le tapis cellulaire est lavé 3 fois au PBS 1x froid.

- Aspirer soigneusement le dernier rinçage pour bien assécher la surface cellulaire (possibilité de congeler les boîtes à -80°C jusqu'au jour de l'extraction).

- Mettre 150 à 200 µL de tampon RIPA froid et bien remuer la boîte pour l'étaler sur toute la surface.

- Incuber 10 minutes sur glace, puis secouer dans tous les sens pour bien décoller le tapis cellulaire.

- Homogénéiser par 10-20 inspirations-expirations avec une seringue de 1 mL.

- Récupérer le lysat dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL.

- Effectuer 2 cycles de congélation-décongélation (Azote liquide-bain marie à 37°C).

- Centrifuger 30 minutes à 12000 g à 4°C.

- Récupérer le surnageant, puis stocker à -80°C ou réaliser un dosage des protéines.

Tampon RIPA :

NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 1,44g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L dans PBS sans CA²⁺ ni Mg²⁺, NP40 1 %, DOC 0,5 %, SDS 0,1 %

À ce tampon sont rajoutés :

10 µL PMSF (10 mg/mL d'éthanol) / mL de RIPA

10 µL Na₃VO₄ (100 mM ou 18,39 mg/mL d'H₂O) / mL de RIPA

14 µL de Cocktail antiprotéase / 10 mL de RIPA

Tampon de lyse
10 mM HEPES pH 7,2
1 mM EDTA
1x Solution d'inhibiteurs de protéases

Tampon de sucrose (filtrer de façon stérile, stocker à 4°C)
10 mM HEPES pH 7,2
500 mM Sucrose
1x solution d'inhibiteurs de protéases

1x Solution d'inhibiteurs de protéases (Stocker à -80°C)
1 µg/mL leupeptine
2 µg/mL aprotinine
50 µg/mL Pefabloc
121 µg/mL benzamidine
3,5 µg/mL E64

Fiche n°21

Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)Principe :

Le principe de cette méthode repose sur la réaction de Biuret consistant en une réduction par les protéines des ions cuivriques (Cu^{2+}) en ions cuivreux (Cu^+) en milieu alcalin. Le complexe hydrosoluble formé par l'interaction de 2 molécules d'acide bicinchoninique avec un ion Cu^+ produit une coloration pourpre, absorbant fortement à 562 nm selon la loi BEER-Lambert. Ce dosage est réalisé à l'aide du kit Pierce BCA protein Reagent.

Protocole :

- Préparer une gamme étalon (0, 20, 100, 250, 500, 750, 1000 et 2000 $\mu\text{g}/\text{Ml}$, en triple) à partir d'une solution stock de BSA, diluée dans le même tampon que les échantillons à doser.
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA) à 1 volume de réactif B (CuSO_4).
- Distribuer 25 μL de dilution de BSA ou d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits [échantillons + blancs (que du tampon de dilution) en duplicata].
- Ajouter 200 μL de réactif de travail par puit et agiter la plaque.
- Couvrir la plaque et la placer 30 minutes à 37°C.
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques à 570 nm.
- La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons déduite.
- La concentration en protéines est déterminée à partir de courbe étalon.

- Smith *et al.* (1985) *Anal. Biochem.*, 150 : 76-85

- Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN_3 à 0,05% (p/v)

- Réactif A : solution aqueuse contenant BCA- Na_2 1% (p/v), Na_2CO_3 2% (p/v), tartrate- Na_2 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO_3 0,95% (p/v) (pH 11,25)

- Réactif B : solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée

- Pierce, Rockford, IL, USA kit BCA Protein Assay® Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)

Fiche n°22

Electrophorèse analytique des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)

- Visser les plaques de verre séparées par des espaceurs sur leur support et fixer l'ensemble sur le socle de coulage
- Couler le gel de séparation selon le entre les plaques de verre, recouvrir sa surface avec de l'isopropanol
- Laisser polymériser pendant 20 min à température ambiante
- Aspirer l'isopropanol et rincer abondamment la surface du gel avec de l'eau distillée
- Eliminer toutes traces d'eau et couler le gel de concentration
- Positionner le peigne en Téflon® en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser à nouveau 20 min. La hauteur du gel de concentration est de 1 cm à partir du bas des puits de dépôt
- Retirer le peigne et rincer soigneusement chaque puits avec une pissette d'eau distillée afin de supprimer l'acrylamide non polymérisé. Éliminer l'eau restant dans les puits
- Former le réservoir de tampon cathodique en assemblant les 2 supports de gel sur le système central d'électrodes en forme de U
- Remplir ce réservoir central avec du tampon de migration et contrôler l'étanchéité
- Ajouter 1 volume de tampon de dépôt pour 1 volume d'échantillon
- Chauffer les échantillons à 100°C pendant 5 min, dans un bloc chauffant
- Charger les puits du gel avec les échantillons et les standards dénaturés
- Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu. La migration débute à 50 V constant (~10 mA) le temps que les protéines pénètrent dans le gel de concentration puis 120 V (25mA) jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel

-
- Appareil d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - Gel de séparation : 12% (p/v) acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories), tampon Tris-HCl 0,125M (pH 6,8) polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,05% (p/v) et TEMED 0,05% (v/v) ; Euromedex (France) et SDS 0,1% (Bio-Rad Laboratories)
 - Tampon de migration : Tris 25 mM contenant glycine 192 mM et SDS 0,1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)
 - Tampon Laemmli X2 ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
 - Marqueurs de poids moléculaires : *Low Molecular Weight* ; LMW - Amersham Pharmacia, UK

**Solution pour préparation des gels de concentration et de séparation
pour SDS-PAGE Tris/Glycine**

<i>Gel de séparation</i>		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%	H ₂ O MQ	2.7	5.3	8	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
	Acrylamide Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%	H ₂ O MQ	2.3	4.6	7	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
	Acrylamide Mix 29:1	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.4
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%	H ₂ O MQ	2	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20
	Acrylamide Mix 29:1	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.6
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

12%	H ₂ O MQ	1.7	3.3	5	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%	H ₂ O MQ	1.2	2.3	3.5	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
	Acrylamide Mix 29:1	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Gel de concentration		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Stacking	H ₂ O MQ	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
	Acrylamide Mix 29:1	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	01/07/ 09
	Tris 0.5M pH 6.8	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
	SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	APS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Fiche n°23

Coloration des protéines après électrophorèse sur gel de polyacrylamide

- **Coloration au bleu de Coomassie® R250**

- Dissoudre 2 g de bleu de Coomassie® R2501 dans 200 mL d'eau distillée et agiter pendant 5 à 10 min
- Filtrer la solution stock de colorant à 1% (p/v) sur filtre 0,45 µm et la stocker à température ambiante
- Pour la coloration d'un gel, préparer 50 mL une solution finale à 25% (p/v) en mélangeant 12,5 mL de solution stock à 5 mL d'acide acétique et à 25 mL de méthanol
- Incuber 15 à 20 min sous agitation légère et à température ambiante
- Vider la solution de colorant et décolorer le gel avec un mélange méthanol / acide acétique / eau distillée (4:1:5, v/v/v) renouvelé régulièrement

- **Révélation au nitrate d'argent**

- Préparer toutes les solutions avec de l'eau ultra pure
- Agiter légèrement le gel au cours des différentes étapes de la coloration
- Fixer le gel dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (4:1:5, v/v/v) pendant au moins 1 h
- Faire 3 lavages de 20 min chacun avec une solution d'éthanol à 30% (v/v)
- Incuber 1 min avec une solution de thiosulfate de sodium à 0,02% (p/v) (réduction)
- Laver 3 fois 20 sec le gel avec de l'eau ultra pure
- Incuber 20 min dans une solution de nitrate d'argent à 0,2% (p/v) et formaldéhyde (37%) à 0,02% (v/v) (extemporanée)
- Laver abondamment 3 fois 20 sec avec de l'eau ultra pure
- Développer le gel avec une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 3% (p/v), formaldéhyde à 0,05% (v/v) et thiosulfate de sodium à 0,0005% (p/v) (extemporanée)
- Laver le gel abondamment 2 fois 30 sec avec de l'eau ultra pure
- Arrêter la réaction de développement avec une solution de glycine à 0,5% (p/v)
- Laver 2 fois 30 min le gel dans de l'eau ultra pure

-
- Bleu de Coomassie® R250 : Bio-Rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France)
 - H2O Milli-Q® : Millipore (67120 Molsheim, France)

Fiche n°24

Transfert des protéines sur membrane de PVDF

- **Électro-transfert semi-sec**

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans le tampon de transfert
- Couper la membrane PVDF les immerger dans du méthanol, puis les tremper en même temps que les papiers filtre dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - un papier filtre Whatman® 3mm³
 - la membrane de PVDF
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre Whatman®3 mm³
- Expulser les bulles d'air à l'aide d'un rouleau
- Éponger l'excédent de tampon autour du sandwich
- Placer la plaque cathodique au sommet du montage et refermer l'appareil avec son capot
- Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10V pendant 45 min
- Démontez le sandwich et récupérer la membrane de PVDF
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S5 pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon. Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane.

-
- Tampon de transfert : Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20% (v/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)
 - Membrane polyvinylidène difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - Papier filtre Whatman ou blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA))
 - Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories)
 - Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis,USA)

- **Électro-transfert « liquide »**

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans le tampon de transfert à 4°C
- Couper la membrane de PVDF, les papiers filtres à la dimension du gel (~5×8 cm) et les immerger dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- Superposer les différents éléments du sandwich sur la partie transparente de la cassette du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - éponge
 - un papier filtre
 - la membrane de PVDF
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre
 - éponge
- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique, cassée en deux, sur le sandwich.
- Placer la cassette dans son socle en mettant bien la partie noire de la cassette contre la partie noire du socle et refermer l'appareil.
- Placer le montage dans la cuve remplie de tampon de transfert.
- Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 250 mA pendant 1h.
- Démonter le sandwich et récupérer la membrane PVDF.
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S5 pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon de papier.
- Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane.

-
- Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories)
 - Tampon de transfert : Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl)
 - Membrane polyvinylidene difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA))
 - Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis,USA).

Fiche n°25

Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité

Peroxidase

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane de nitrocellulose dans du tampon de blocage pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente.
 - Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée dans du tampon de blocage pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative lente, dans de petits sacs scellés.
 - Laver la membrane PVDF 4 fois 10 min avec le tampon de lavage.
 - Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxidase pendant 1 h sous agitation rotative lente à température ambiante (technique des sacs scellés).
 - Laver 4 fois 10 min la membrane avec du tampon de lavage.
 - L'activité peroxidase est révélée par chimiluminescence.
 - Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique
 - Appliquer le volume indiqué par le fournisseur de mélange réactionnel, puis recouvrir d'un film plastique.
 - Laisser 5 min, puis sécher la membrane.
 - Disposer la membrane entre 2 films plastique.
 - Mettre en contact la membrane ainsi protégée avec un film autoradiographique pendant 1 à 5 min.
 - Révélation du film autoradiographique dans un bain de développement jusqu'à apparition des premières bandes (~30 s).
 - Rinçage à l'eau.
 - Bain de fixation jusqu'à transparence du film (~2 min).
- N.B.* La révélation peut désormais se réaliser grâce à l'appareil FUSION FX7 7026WL/26MX.
- les bandes obtenues sont analysées par le logiciel ImageJ 1.43u.

-
- Tampon de blocage : Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M (TBS) contenant du Tween 20® à 0,3% (v/v) et 5% de lait en poudre écrémé
 - Tampon de lavage : TBS contenant Tween® 20 à 0,05% (v/v)
 - ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinique émettant une lumière intense
 - Saran®, filme plastique (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)
 - BIOMAX MR (Kodak Scientific Imaging Film, NY, USA)
 - Révélateur radio (LX24 – Kodak, France)
 - Fixateur radio (AL4 – Kodak, France)

Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Anticorps	Source	Dilution	Fournisseur
<i>Cox-1</i>	Souris	1/1000	abcam, Paris, France
<i>Cox-2</i>	Souris	1/1000	abcam, Paris, France
<i>Gapdh mmAb</i>	Souris	1/1000	Millipore, Molsheim, France

Anticorps	Source	Dilution	Fournisseur
<i>Horseradish Peroxidase conjugated anti-</i>	Souris	1/5000	Molecular Probes, Cergy- Pontoise (France)

Fiche n°26

Produits chimiques utilisés au cours des différentes expériences

Les différents produits utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le **Tableau**. Lorsque l'emploi d'un solvant organique (DMSO ou éthanol) est nécessaire à la préparation d'un produit, la concentration finale en solvant n'excède jamais 0.025% vol/vol.

Inhibiteur	Action	Concentration
n-butanol	Inhibiteur de la PLD	135 mM
Bromo-Enol-Lactone (BEL)	Inhibiteur de la iPLA2	1 μ M
tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609)	Inhibiteur de la PC-PLC	100 μ M
Calphostin C	Inhibiteur de la PKC	100 ng/ml
Arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF ₃)	Inhibiteur de la cPLA2	10 μ M
Oléate	Activateur de la PLD	20 μ M
Isoprotérénol	Agoniste adrénergique	100 μ M
RHC 80267	Inhibiteur de la DAG lipase	10 μ M
Carbachol	Agoniste cholinérgique	100 μ M
R59949	Inhibiteur de la DAG kinase	10 μ M
1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (DOG)	Activateur de la PKC	10 μ M
BAPTA/AM	Chélateur de calcium/ inhibiteur de la cPLA2	10 μ M
Ionomycine	Libérateur de Ca ⁺⁺ intracellulaire	1.5 mM

Tableau 6: Liste des différents agents dirigés contre les différentes voies de génération de l'AA.

