

2M11. 2713. 3

Université de Montréal

Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la cytotoxicité causée

par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL)

par

Chantale Lapierre

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences biomédicales

octobre 1996

© Chantale Lapierre, 1996



W

4

458

1999

v.101

Université de Montréal

Rôle du myxovirus à bande (MVB) dans la cytolysé causée

par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL)

1

par

Charles Lefrançois

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en sciences (M.Sc.)

en sciences biomédicales

Canada 1999

© Université de Montréal, 1999



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la cytotoxicité causée par les
lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sur les cellules de lymphome de souris
(YAC-1)

présenté par :

Chantale Lapierre

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Pierre-Michel Huet Président du jury

Janos G. Filep Directeur de recherche

Marc Bilodeau Membre du jury

Mémoire accepté le

99.02.08

Sommaire

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont des cellules impliquées dans l'élimination des cellules tumorales, la défense de l'hôte, le rejet de greffe, la réaction du greffon contre l'hôte (GvH) et plusieurs immunopathologies. Les principaux mécanismes de lyse qui ont été acceptés jusqu'à maintenant soit perforine, granzymes et Fas n'explique pas toute la cytotoxicité observée en présence de CTL. Parmi les mécanismes candidats pour compléter le portrait, on retrouve le monoxyde d'azote(NO). Le NO est un gaz impliqué dans plusieurs phénomènes physiologiques dont la cytotoxicité des macrophages et des neutrophiles. La production accrue de NO et une expression augmentée de la NO synthase inducible (iNOS) ont été observées sur les sites de GvH. Le but de cette étude est de démontrer l'implication du NO dans la destruction des cellules tumorales YAC-1 (lymphome murin) par les CTL via l'apoptose. L'utilisation d'un inhibiteur de la NOS le N^G-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) à une concentration de 5 mmol/L lors d'essai de cytotoxicité nous a donné une diminution de la lyse spécifique de 15-22 % du témoin. La lyse causée par les CTL entraîne une relâche importante de ⁵¹Cr et de ¹²⁵I-déoxyuridine par les YAC-1, indiquant que lors de leur lyse, l'ADN de ces cellules, est fragmenté. L'analyse morphologique des cellules tumorales YAC-1 colorées avec un mélange de bromure d'éthidium et d'acridine orange a révélé que les CTL induisent une condensation et/ou une fragmentation de l'ADN typique de l'apoptose et qui est diminuée de 50-57% du témoin par le L-NAME. D'autre part, l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait des cellules cibles nous a donné un patron de fragmentation typique de l'apoptose. Enfin, on a mesuré une accumulation de NO dépendante du ratio effecteur:cible dans le milieu de culture après l'essai de cytotoxicité et observé l'expression d'une protéine ayant un poids moléculaire voisin celui de la NOS. Ces résultats suggèrent que les CTL produiraient du NO lorsqu'ils attaquent des cellules tumorales et que ce dernier serait impliqué à la fois dans la lyse et les dommages à l'ADN infligés à la cellule cible. Cette nouvelle information, qui éclaircit un peu plus le mécanisme d'action des CTL, pourrait permettre un meilleur contrôle de l'action des CTL par la modulation de la production de NO. La connaissance du mécanisme exact de l'action des CTL pourra nous aider à combattre les maladies causées par un dérèglement des CTL ou encore aider l'organisme dans sa lutte contre les tumeurs et différents microbes.

Table des matières

Sommaire	i
Table des matières	ii
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Liste des abréviations	vi
Introduction	1
1. Revue de la littérature	1
1.1. Le monoxyde d'azote (NO) et la monoxyde d'azote synthase (NOS)	1
1.1.1. Le monoxyde d'azote	1
1.1.2. Les NOS	2
1.1.2.1. Régulation des NO synthases	4
1.1.2.1.1. Niveau transcriptionnel	4
1.1.2.1.2. Niveau post-transcriptionnel et traductionnel	5
1.1.2.1.3. Niveau post-traductionnel	5
1.1.2.2. Les inhibiteurs des NO synthases	6
1.1.2.3. Rôle physiologique du NO	8
1.1.2.4. Toxicité du NO	9
1.1.3. Cibles moléculaires du NO	10
1.1.4. Le NO et les radicaux libres	13
1.1.4.1. Les interactions entre radicaux	14
1.1.4.2. Effets des radicaux libres oxygénés	15
1.2. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL)	16
1.2.1. Mécanismes de lyse des CTL	17
1.2.2. Activation des lymphocytes T cytotoxiques	20
1.2.3. Lymphocytes et radicaux libres	20
1.3. Apoptose	22

1.3.1. Définition de l'apoptose	22
1.3.1.1. Facteurs influençant l'apoptose	23
1.3.2. Signalisation de l'apoptose	24
1.3.3. NO et apoptose	28
1.4. Hypothèse et objectifs	30
2. Matériel et méthodes	31
2.1. Animaux	31
2.2. Culture cellulaire	31
2.3. Culture mixte de lymphocytes (CML)	32
2.4. Cytotoxicité	33
2.4.1. Marquage des cellules cibles	33
2.4.2. Donneur de NO	33
2.4.3. Effet du L-NAME	33
2.4.4. Effet de la déplétion d'arginine	33
2.4.5. Calcul de la lyse spécifique	34
2.5. Fragmentation de l'ADN	34
2.5.1. Évolution dans le temps de la fragmentation de l'ADN et de la lyse cellulaire.	34
2.5.2. Calcul de la lyse spécifique et de la fragmentation de l'ADN	35
2.5.3. Analyse sur gel d'agarose	35
2.5.4. Analyse morphologique des cellules cibles	36
2.6. Dosage des nitrites	37
2.7. Démonstration de l'expression de la NOS	37
2.7.1. Transfert et révélation des protéines	38
2.8. Analyse statistique	38
3. Résultats	39
3.1. Effets du L-NAME sur la lyse cellulaire des YAC-1 par les lymphocytes T cytotoxiques	39
3.2. Production de nitrites	48
3.3. Cytotoxicité du monoxyde d'azote (NO)	48
3.4. Cytotoxicité et fragmentation de l'ADN par les CTL	51
3.5. Analyse de la morphologie des YAC-1 lysées par les CTL	53
3.6. Analyse sur gel de la fragmentation de l'ADN induite par les CTL	56
3.7. Induction d'une nouvelle protéine dans les lymphocytes T cytotoxiques	58
4. Discussion	60
5. Conclusion	75
6. Bibliographie	76

Liste des tableaux

Tableau 1. Sélectivité de quelques inhibiteurs des NO synthases	8
Tableau 2. Principales différences entre l'apoptose et la nécrose	24

Liste des figures

Figure 1. Synthèse du monoxyde d'azote par la NO synthase	3
Figure 2. Structure du complexe du TCR	17
Figure 3. Représentation schématique des mécanismes de lyse cellulaire par les CTL (Berke G. ,1994 et 1995).	19
Figure 4. Effet du L-NAME et du ratio effecteur: cible sur la lyse spécifique	40
Figure 5. Effet de la déplétion en arginine sur la lyse spécifique des CTL	42
Figure 6. Lyse spécifique des splénocytes	43
Figure 7. Phénotypes des populations CTL et splénocytes	47
Figure 8. Production de nitrites par les CTL	49
Figure 9. Courbes doses réponses de la lyse spécifique des YAC-1 pour le SNP	50
Figure 10. Évolution dans le temps de la lyse et de la fragmentation de l'ADN des cellules YAC-1 par les CTL	52
Figure 11. Morphologie des cellules YAC-1 après la réaction avec les CTL	54
Figure 12. Rôle du NO dans l'induction de l'apoptose dans les cellules YAC-1 par les CTL	55
Figure 13. Preuve moléculaire de l'apoptose	57
Figure 14. Induction d'une nouvelle protéine dans les CTL	59
Figure 15. Schéma des mécanismes suggérés de la lyse des cellules tumorales par les CTL	73

Liste des abréviations

CML	Culture mixte lymphocytaire
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
GvH	Réaction du greffon contre l'hôte
L-NAME	N ^G - nitro -L- arginine méthyl ester
NFκB	Facteur nucléaire kappa B
NK	Cellules tueuses naturelles (natural killers)
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PMA	Phorbol myristate acétate
TCR	Récepteur des lymphocytes T

Introduction

Les CTL sont impliqués dans plusieurs réactions immunitaires comme la réponse immune contre les virus et les tumeurs (Berke 1995a), le rejet de greffe (Kägi et al., 1995), la réaction du greffon contre l'hôte (Waldmann et al, 1994; Baker et al, 1996), les immunopathologies (Kägi et al, 1995) et diverses maladies auto-immunitaires (Zinkernagel, 1986).

Les macrophages et les neutrophiles activés produisent des radicaux libres pour éliminer les agents infectieux qui s'attaquent à la cellule tels que les bactéries ou les virus (Nathan, 1987). Il a été démontré que les lymphocytes T pour leur part utilisent entre autres des mécanismes impliquant la perforine, les granzymes et la molécule Fas (Clark et al, 1995; Griffiths, 1995; Berke, 1994; Kägi et al, 1994). Cependant au moins un type de cellules cytotoxiques, les lymphocytes d'exudat péritonéal (PEL), ne contiennent pas de granules cytoplasmiques et ont un niveau faible ou non détectable des autres granules, incluant la perforine (Berke et Rosen, 1988; Helgason et al, 1992; Berke et al, 1993; Clark et al, 1995). Les CTL primaires générés par culture mixte lymphocytaire (MLC) démontrent aussi des niveaux variables de perforine qui ne correspondent pas exactement avec l'activité cytotoxique totale (Dennart et al, 1987). Finalement, les lymphocytes de souris, déficients en perforine et ligand Fas fonctionnels démontrent encore une activité cytotoxique, indiquant que ces mécanismes ne sont pas les seuls impliqués (Braun et al., 1996).

Il a été démontré que la cytolysse par les CTL est accompagnée par la fragmentation de l'ADN dans les cellules cibles (Russell & Dobos, 1980; Russell et al., 1982). Cette fragmentation de l'ADN est considérée comme la marque de commerce de la lyse causée par les CTL. Les pores formés par la perforine dans la membrane cellulaire permettent aux granzymes d'entrer dans la cellule et de fragmenter l'ADN (Henkart,

1985; Podack et al, 1991). Cependant, la perforine purifiée peut causer la cytolyse dans certaines conditions mais n'occasionne pas l'apoptose, qui est caractéristique de l'attaque par les CTL (Duke et al, 1988; Duke et al, 1989). Le granzyme B, pour sa part, est nécessaire à l'induction rapide de l'apoptose. Des CTL provenant de souris déficientes en granzyme B causent une relâche normale de ^{51}Cr par les cellules cibles, alors que la fragmentation de l'ADN est affectée. On peut toutefois surmonter le problème de fragmentation en augmentant le ratio effecteur:cible ou encore le temps d'incubation (Shresta et al., 1995). Le fait que l'incapacité à fragmenter l'ADN des CTL déficientes en granzymes peut être renversée, en augmentant le temps d'incubation, suggère une voie d'élimination "tardive" dans ces cellules. C'est-à-dire une voie dont l'action ne se fait pas sentir au cours des premières secondes d'une interaction entre cellules, mais plutôt après quelques minutes.

La réaction du greffon contre l'hôte est la plus importante complication des greffes de moëlle osseuse et peut même être létale. Les lymphocytes T du donneur s'attaquent aux organes cibles du receveur comme la peau, le foie et l'intestin (Waldmann et al, 1994; Santos et al, 1985). La solution actuelle à ce problème consiste en la déplétion en cellules T de la moëlle du donneur, ce qui peut entraîner une rechute, surtout dans les cas de leucémie myéloïde chronique (Waldman et al, 1994). Dans le cas des rejets, les solutions les plus utilisées sont l'immunosuppression de l'hôte (cyclosporine, FK506), l'utilisation de cytokines comme l'IL-2 (Abraham et al, 1992; Sykes et al, 1993) et d'anticorps tolérants anti-CD3 (parfois administrés avec les antigènes du donneur) ou déplétants anti-CD3 (Waldmann et al., 1993). Une meilleure connaissance des mécanismes de cytotoxicité des CTL permettrait de mieux cibler cette dernière pour éliminer ses effets indésirables.

Une infiltration de CTL a été démontrée dans les cas de réaction du greffon contre l'hôte (Takata et al., 1993). On a aussi observé une augmentation de l'expression de la monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS) et de la production de monoxyde d'azote (NO) dans le sang d'animaux subissant une GvH (Drobyski et al., 1994). Ces observations soulèvent la question de la production du NO par les CTL.

Les lymphocytes de souris *lpr* (déficients en Fas) expriment constitutivement le ligand Fas (FasL) qui pourrait être responsable de la réaction du greffon contre l'hôte quand la moelle *lpr* est transférée dans une souris normale (Nagata et Goldstein, 1995). Les lymphocytes de souris avec la mutation *lpr* ont une expression de la iNOS et une production de NO augmentées (Weinberg et al, 1994).

Les mécanismes moléculaires de lyse démontrés jusqu'à maintenant n'expliquent pas entièrement la cytotoxicité des CTL. Il a été démontré que la L-arginine et le NO qui en dérive jouent un rôle important dans l'activité tumoricide et anti-microbienne des phagocytes mononucléaires (Stuehr et Marletta, 1987; Stuehr et Nathan, 1989). Il s'avère donc intéressant d'étudier le rôle du NO dans les fonctions des CTL, d'autant plus qu'il a été démontré récemment que le NO pourrait avoir un rôle dans la cytotoxicité des cellules NK (Xiao et al, 1995; Filep et al, 1996) qui utilisent les mêmes médiateurs cytotoxiques que les CTL. De plus, la détection des CTL, de la iNOS et de NO sur les sites de GvH, laissent croire que le NO pourrait provenir des CTL.

Les études précédentes sur la production de NO par les CTL sont plutôt contradictoires. Certaines concluent que les lymphocytes T ne produisent pas de NO (Keller et al., 1990; Thüring et al., 1995), d'autres, qu'ils en produisent (Kirk et al., 1990) ou encore, que certains sous-groupes (Th1) produisent du NO via la iNOS alors que d'autres (Th2) n'en produisent pas (Taylor-Robinson et al., 1994).

Le but de cette étude est d'évaluer l'implication du NO dans l'élimination des cellules murines YAC-1 orchestrée par les CTL au niveau de la lyse ainsi que de la fragmentation de l'ADN. Pour ce faire on utilisera entre autres des inhibiteurs de la NOS pour en vérifier l'effet sur la lyse spécifique, la fragmentation de l'ADN et la morphologie nucléaire des cellules cibles. La présence de NO sera détectée dans le milieu de culture et on tentera de démontrer l'expression de la iNOS lorsque les CTL sont mises en présence de cellules YAC-1.

1. Revue de la littérature

1.1. Le monoxyde d'azote (NO) et la monoxyde d'azote synthase (NOS)

1.1.1. Le monoxyde d'azote

Définition

Le monoxyde d'azote est la molécule active biologiquement ayant le plus petit poids moléculaire (30 Da) et ayant une lipophilicité élevée. Le NO est un gaz incolore qui, en absence d'oxygène, se dissout dans l'eau où il demeure stable. En phase gazeuse, le NO réagit avec l'oxygène pour former du dioxyde d'azote (NO₂). En présence d'oxygène dans une solution aqueuse, le NO réagit pour former des nitrates (NO₃⁻) et nitrites (NO₂⁻) (Marletta et al., 1988; Fukuto, 1995). Le NO réagit aussi avec les radicaux libres (voir section 1.1.4). La spécificité d'action du NO est très faible (Nathan, 1992), c'est-à-dire qu'il agit sur de multiples types cellulaires et sur de nombreuses cibles moléculaires lesquelles seront vues un peu plus loin. Les propriétés physico-chimiques du NO rendent inutiles un système de transport membranaire ou un système enzymatique pour terminer son action (Ignarro, 1991). Le NO diffuse très facilement à travers les membranes cellulaires et sa demi-vie est très courte, généralement de l'ordre des secondes, en raison de sa réactivité avec l'oxygène et dépend de la concentration initiale de NO (Stamler et al., 1992).

Rôle et sites de production

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule impliquée dans plusieurs phénomènes physiologiques et pathologiques. Le rôle qu'il joue dans l'homéostasie et la défense non spécifique de l'hôte est très important. Il est aussi impliqué dans les chocs septiques ainsi que dans l'inflammation (Ialenti et al, 1992). Le NO est synthétisé par une grande variété de cellules, entre autres les macrophages (Marletta et al, 1988; Stuehr et Nathan, 1989; Hibbs et al, 1988), les plaquettes (Radomski et al, 1990a), les cellules endothéliales

(Palmer et al, 1988), les neutrophiles (Wright et al, 1989; Salvemini et al, 1989), les cellules épithéliales bronchiques (Robbins et al., 1993), les astrocytes (Murphy et al, 1990), et des clones de lymphocytes T murins (Kirk et al., 1990), pour n'en nommer que quelques uns.

Domaines d'étude du NO

La recherche sur le NO s'est développée dans trois principaux champs d'études, soit la neurotransmission (Garthwaite et al., 1988; Gillepsie et al, 1989), le facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF) (Furchgott et Zawadski, 1980) et la réponse immunitaire cellulaire par les macrophages (Nathan et Hibbs, 1991). Ces fonctions, auxquelles prend part le NO, ont permis de suggérer des principes quant aux modes d'action et fonctions de ce dernier.

1.1.2. Les NOS

Description

Le NO est produit enzymatiquement par la monoxyde d'azote synthase (NOS) qui est une protéine homologue au cytochrome P450. La NOS est une des enzymes les plus grosses (300 KDa) et des plus complexes. Les NOS sont composées de monomères (150-160 kDa) comprenant deux enzymes fusionnées, une cytochrome réductase et un cytochrome. Les NOS requièrent la L-Arginine comme substrat et le NADPH, O₂ et FAD, FMN, calmoduline, tétrahydrobioptérine et hème comme cofacteurs (Nathan et Xie, 1994a; Marletta, 1994a). A partir de la L-arginine, on obtient comme produit le NO et la citrulline en quantités égales (figure 1). La réaction est décrite comme une oxydation impliquant cinq électrons.

Isoformes

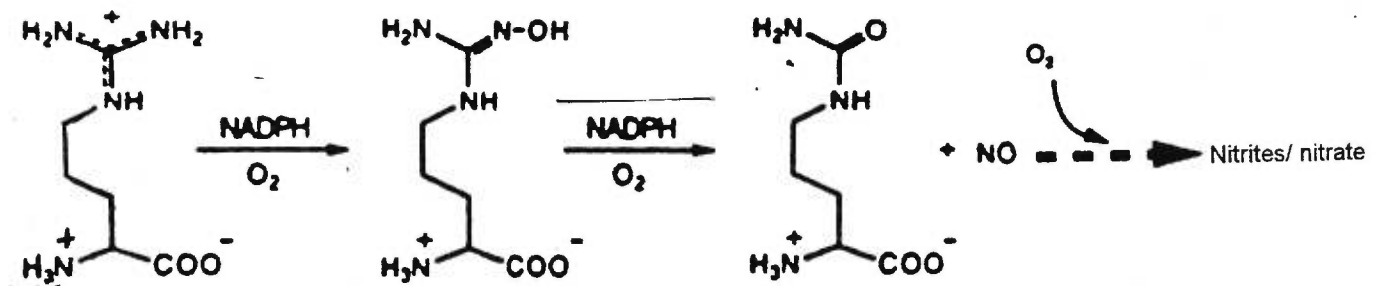
Plusieurs isoformes de la NOS ont été purifiés et clonés dans différents tissus dont les premières ont été la NOS neuronale (nNOS)(Purification: Bredt et Snyder, 1990 ; Mayer et al, 1990 ; Schmidt et Murad, 1991; Clonage: Bredt et al,1991), la NOS endothéliale (eNOS) (Purification: Pollock et al, 1991; Clonage: Lamas et al, 1992) et la NOS

inductible (iNOS) provenant des macrophages (Purification: Yui et al, 1991; Hevel et al, 1991; Stuehr et al, 1991; Clonage: Xie et al, 1992). Il existe trois formes de NOS (Nathan et Xie, 1994a):

Type I (nNOS), dont l'activité dépend d'une élévation de Ca^{2+} (>70-100 nM). Ce type a été identifié d'abord dans les neurones.

Type II (iNOS), dont l'activité est indépendante d'une élévation de Ca^{2+}

Type III (eNOS), dont l'activité dépend d'une élévation de Ca^{2+} . Ce type a d'abord été identifié dans les cellules endothéliales et par la suite dans plusieurs autres types cellulaires.



L-arginine N^G-hydroxy-L-arginine Citrulline + monoxyde d'azote

Figure 1. Synthèse du monoxyde d'azote par la NO synthase

(adapté de Marletta C., 1994)

Les formes I et III sont appelées constitutives alors que la forme II est appelée inductible. Les formes constitutives produisent un faible niveau basal de NO et lorsqu'elle est stimulée, la production de NO augmente pour une courte durée de temps (minutes). Elle est exprimée entre autres par l'endothélium et certains types de neurones (Kolb et Kolb-Bachofen, 1992). La NOS constitutive agit principalement dans les processus homéostatiques tels que la neurotransmission, le péristaltisme et la régulation ponctuelle

de la pression sanguine. Toutefois, dans certaines circonstances, comme la stimulation in vitro des neurones par le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), la forme neuronale peut aussi participer à la cytotoxicité (Dawson et al, 1991; Dawson et al, 1993).

La forme inductible, en réponse à un stimulus, produit une grande quantité de NO et l'effet du stimulus peut se faire sentir sur une plus longue période (heures) (Kolb et Kolb-Bachofen, 1992). La iNOS qui est exprimée dans les macrophages, les neutrophiles, les muscles lisses vasculaires, les neurones, les hépatocytes et l'endothélium entre autres. Elle agit principalement au niveau des infections, de l'inflammation et de la défense de l'hôte (Nathan et Xie, 1994a).

1.1.2.1. Régulation des NO synthases

Les NOS sont régulées à plusieurs niveaux: transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Nathan et Xie, 1994a; Nathan et Xie 1994b).

1.1.2.1.1. Niveau transcriptionnel

La régulation transcriptionnelle de la iNOS est hautement influencée par les cytokines, certaines favorisant et d'autres inhibant l'induction de l'enzyme. Les cytokines stimulantes comme IFN- γ et IL-1 augmentent la quantité d'ARNm de la NOS en conséquence de l'activation de la transcription (Nathan et Xie, 1994b). L'IFN- γ stabilise aussi l'ARNm de la NOS. La régulation des NOS par les cytokines constitue une régulation tissu-spécifique qui pourrait être utilisée comme base pour une manipulation thérapeutique (Moncada et Higgs, 1993). Une région promoteur a été isolée dans le gène de la iNOS de macrophage et elle contient des séquences consensus pour la liaison de plusieurs facteurs de transcription (Xie et al, 1993) comme par exemple NF- κ B dont nous reparlerons plus loin. Dans la liste suivante on retrouve quelques agents qui induisent l'expression de la iNOS souvent en synergie avec IFN- γ ou un agent l'induisant comme le LPS: l'acide piconilique (Melillo et al, 1993), les agents élevateurs d'AMPc (Hortelano et al., 1992), la lumière UV (Warren, 1994), l'ozone (Pendino et al., 1993), et les microbes sans LPS (Nathan & Xie, 1994b). Le fer cellulaire régule et est régulé par la iNOS en

même temps qu'il sert de cible importante pour le NO (Nathan et Xie, 1994b). Du côté de la NOS endothéliale, des sites consensus pour la régulation par la protéine activatrice-1, la protéine activatrice-2, le facteur nucléaire-1, des réactifs de phase aiguë et le stress de cisaillement ont été trouvés (Nathan et Xie, 1994b). Différents transcrits de la NOS neuronale ont été trouvés dans différents tissus. L'hétérogénéité transcriptionnelle pourrait dépendre de l'accessibilité des différents promoteurs à des facteurs de transcriptions qui sont activés dans différents tissus à différents moments (Nathan et Xie, 1994b).

1.1.2.1.2.Niveau post-transcriptionnel et traductionnel

Au niveau de la régulation post-transcriptionnelle et traductionnelle, le TGF- β déstabilise l'ARNm et diminue sa traduction (Nathan et Xie, 1994b). La dexaméthasone cause une inhibition post-transcriptionnelle de la iNOS (Cetkovic-Cvrlje et al., 1993) par l'intermédiaire de NF- κ B. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF-1) et la thrombine suppriment la iNOS dans les muscles lisses vasculaires (Schini et al, 1994). IL-4 et de faibles doses de LPS causent une diminution d'ARNm de la iNOS mais il n'est pas encore déterminé si le mécanisme est transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel. (Nathan et Xie, 1994b). L'ARNm de la NOS endothéliale est déstabilisé par le TNF α (Nathan et Xie, 1994b). Enfin, la NOS neuronale est régulée au niveau de l'épissage alternatif chez l'humain et la souris (Nathan et Xie, 1994b).

1.1.2.1.3.Niveau post-traductionnel

Le contrôle post-traductionnel se fait par plusieurs facteurs soit: la stabilité de la protéine (TGF- β accélère sa dégradation), la liaison de la calmoduline, la phosphorylation de la protéine, la disponibilité de la L-arginine et la présence de ses analogues, la tétrahydrobioptérine et finalement les produits de l'enzyme elle-même. Il a été démontré que le NO exogène régule l'expression de la NOS induite par IFN- γ + LPS dans les macrophages de souris (Sheffler et al, 1995). Le NO a donc des effets autorégulateurs

qui pourraient contrôler l'étendue et la durée de l'expression de la iNOS induite par les cytokines et/ou les endotoxines dans les macrophages.

Les formes constitutives et inductible de la NOS ne sont pas confinées à des types cellulaires différents mais peuvent se retrouver dans la même cellule. Par exemple, on peut, dans certaines circonstances dépendamment de l'activation des cellules et/ou la présence de dommages, faire exprimer la forme inductible par les cellules endothéliales (Moncada et al., 1991) et les macrophages pourraient exprimer un peu de NOS calcium dépendante (Hiki et al., 1992).

1.1.2.2. Les inhibiteurs des NO synthases

Les produits inhibant la synthèse du NO se divisent en plusieurs catégories, entre autres, les analogues de la L-arginine, les ligands du groupement hème et les hormones stéroïdes.

Parmi les analogues de la L-arginine, on retrouve, la N^G-méthyl-L-arginine (L-NMA) (Hibbs et al, 1987) la N^G-nitro-L-arginine (L-NNA) (Gross et al, 1990), la N^G-amino-L-arginine (L-NAA) (Gross et al., 1990; Fukuto et al, 1990), le N^G-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), et la N-iminoéthyl-ornithine (L-NIO) (Rees et al, 1990) qui peuvent inhiber les formes constitutives et inductible (Marletta, 1994b). Leur mécanisme est une inhibition compétitive. La puissance des inhibiteurs des NOS varie entre eux selon les différents tissus et les stimulations utilisées.

Les NOS contiennent un groupement hème ce qui permet de les inhiber avec des composés qui lient l'hème (Marletta, 1994b). Comme exemple de ces ligands on retrouve l'aminoguanidine et les molécules ayant une groupe thiourée. Des études ont démontré que l'aminoguanidine inhibait avec une certaine sélectivité la iNOS (Misko et al., 1993; Griffiths et al, 1993). Ses propriétés inhibitrices sont dues à son habileté à se coordonner avec l'hème mais la guanidine elle-même n'inhibe pas l'enzyme (Misko et al, 1993). L'atome de soufre des groupements thiourée interagirait avec le fer hémique de la NOS et réduirait son potentiel de réduction, rendant le transfert d'électrons des flavines vers l'hème moins favorable.

Les glucocorticoïdes inhibent l'induction de la iNOS dans plusieurs tissus après stimulation avec des endotoxines ou cytokines, mais n'affectent pas l'isoforme constitutif (Radomski et al, 1990). Le récepteur des glucocorticoïdes activé (i.e. lié à un glucocorticoïde) interfère en bloquant la liaison du facteur de transcription NF- κ B à son élément cis sur l'ADN, supprimant ainsi l'induction de la transcription de la iNOS (Kleinert et al, 1996). L'interférence se fait via la sous-unité p65 de NF- κ B qui se lierait au récepteur activé empêchant NF- κ B de se lier à l'ADN.

Le NO peut aussi influencer le rôle de NF- κ B dans la synthèse de la NOS. En effet, il peut l'inhiber en stabilisant la liaison entre la protéine NF- κ B et la sous-unité I- κ B α et en augmentant l'expression d'ARNm de I- κ B α dans le cytoplasme (Peng et al, 1995). Pour la translocation dans le noyau, le facteur de transcription doit être libéré de la sous-unité inhibitrice. Les radicaux, incluant le NO, causent la dissociation de NF- κ B de sa sous-unité inhibitrice (I κ B) ce qui lui permet de faire une translocation dans le noyau et de se lier à l'ADN pour activer la transcription de certains gènes comme démontré dans les cellules mononucléaires (Lander et al., 1993a). De plus, l'activation de NF- κ B par tous les stimuli connus incluant les cytokines, les phorbolesters ou lipopolysaccharides est inhibée par les antioxydants. Il est vraisemblable que selon les conditions, le NO joue un rôle sur sa propre synthèse (via la régulation de la transcription de l'enzyme le produisant).

La capacité d'inhiber les NO synthases des différents inhibiteurs varie selon l'isoforme. Quelques inhibiteurs et leur sélectivité sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 1. Sélectivité de quelques inhibiteurs des NO synthases

Inhibiteur	Groupe	Sélectivité
L-NMMA	Analogue de la L-arginine	eNOS> iNOS
L-NAME	Analogue de la L-arginine	eNOS>iNOS
L-NAA	Analogue de la L-arginine	eNOS>iNOS
L-NNA	Analogue de la L-arginine	eNOS>iNOS
Aminoguanidine	Guanidine	iNOS>eNOS
S-éthyl-isothio-urée	Isothiourée	iNOS>eNOS

(Adapté de Thiernemann, 1995)

1.1.2.3. Rôle physiologique du NO

Le NO joue un rôle dans plusieurs systèmes chez les mammifères, tels les systèmes nerveux central et périphérique, cardio-vasculaire, rénal, pulmonaire, endocrinien ainsi qu'immunitaire et inflammatoire.

Dans les systèmes nerveux le NO sert de neurotransmetteur (Snyder et Bredt, 1991) et il serait le responsable de la neurotoxicité due au glutamate (Dawson et al., 1991). Dans le système cardio-vasculaire, le NO avait d'abord été identifié comme le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) qui a comme rôle la régulation du tonus et de la perméabilité vasculaire, de l'agrégation des plaquettes et du débit sanguin (Moncada et al, 1991). Dans le système rénal, le NO agirait sur la relâche de rénine ainsi que le volume et la pression intravasculaires en régulant le diamètre des artérioles du rein (Wilcox et al,1992). Au niveau des poumons, le NO participe à la régulation de la ventilation-perfusion et l'accroissement de la résistance vasculaire pulmonaire induite par l'hypoxie (Persson et al, 1990). Dans le système endocrinien, le NO joue un rôle sur la sécrétion d'insuline. Enfin, dans le système immunitaire, le NO a des fonctions anti-tumorales, anti-bactériennes et antivirales. Il régule aussi la prolifération des

lymphocytes. En effet, il a la capacité d'inhiber leur prolifération (à fortes concentrations) et de la stimuler (à faibles concentrations) (Kondo et al., 1993; Liew, 1995). Il a été démontré récemment que des souris mutantes pour le gène de la NOS avaient une réponse immunitaire altérée (Wei et al., 1995). Le NO a aussi des propriétés pro et anti-inflammatoires. Le NO joue un rôle immunosuppresseur dans la réaction du greffon contre l'hôte (Hoffmann et al, 1993a). Finalement, le NO contrôle de façon différentielle la production de cytokines (IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-6, TNF α , IFN- γ) (Marcinkiewicz et Chain, 1993; Marcinkiewicz et Chain 1995; Taylor-Robinson et al, 1994) et de médiateurs de l'inflammation comme les prostaglandines (Stadler et al, 1993; Salvemini, 1993). Le NO joue aussi un rôle dans l'apoptose et les dommages cellulaires causés par les espèces réactives oxygénées. Ces deux sujets seront abordés plus loin.

De façon générale on peut dire que les cNOS comprennent les voies à faible production de NO qui sont impliquées dans les processus homéostatiques tel que la neurotransmission, le péristaltisme et la régulation de la pression sanguine. Alors que d'autre part la iNOS est impliquée dans les cas d'infection ou d'inflammation afin de défendre l'hôte et qui nécessitent un apport élevé de NO (Nathan et Xie, 1994a). Il existe bien sûr des cas d'exception qui alimentent la controverse sur les rôles spécifiques de chacune des voies de production de NO

1.1.2.4.Toxicité du NO

Une production excessive de NO est associée aux dommages tissulaires dans l'arthrite (McCartney-Fancis et al, 1993), la glomérulonéphrite (Narita et al., 1995), le diabète (Corbett et al., 1993; Suarez-Pinzon et al., 1994), les chocs septiques (Evans et al., 1993), l'hypotension observée lors d'endotoxémie et sepsie (Yoshida et al, 1994) ainsi que les encéphalites virales et auto-immunes. Enfin, le NO contribue à l'induction de l'apoptose (Albina et al., 1993; Shimaoka et al, 1995) et à la mutagenèse (Wink et al.,1991). En effet, le NO, en présence d'oxygène peut également causer des dommages à l'ADN ainsi que des mutations (Moncada et al, 1992; Wink et al., 1991). Il accélère la déamination des déoxynucléotides, des déoxynucléosides et de l'ADN intact à pH physiologique, in vitro (Wink et al., 1991) et cause des changements génétiques liés à la déamination dans les cellules vivantes. La cytotoxicité et la mutagénicité associées aux

processus inflammatoires pourraient être dues aux radicaux de l'oxyde d'azote en plus des réactions des (ou avec les) radicaux oxygénés (Nguyen et al, 1992; Wink et al, 1991) et à la formation de *N*-nitrosamines carcinogènes (Marletta, 1993).

Les effets apparemment paradoxaux du NO pourraient être dus à la forme sous laquelle le NO est livré et transporté (Stamler et al. 1992). Les centres Fe-S nitrosylés ont été proposés comme candidats pour l'emmagasinage du NO. La stabilité des S-nitrosothiols (RS-NO où RS est un groupe thiol) implique le manque de réactivité du NO envers les espèces oxygénées, limitant ainsi la génération d'oxydes d'azote toxiques (Stamler et al., 1992). La formation de RS-NO pourrait être un moyen de contrôler la cytotoxicité du NO. L'emballage du NO pourrait servir à prolonger sa vie dans le sang et les tissus, cibler sa livraison aux effecteurs spécifiques et atténuer son potentiel cytotoxique (Stamler et al., 1992).

1.1.3.Cibles moléculaires du NO

Pour accomplir son travail le NO s'attaque à un large éventail de cibles moléculaires, telles que les hémoprotéines, les protéines contenant des thiols, le métabolisme énergétique, la synthèse de l'ADN et la libération de fer. L'analyse de ces cibles a permis de faire la lumière sur certains des mécanismes d'action du NO. Les cibles du NO sont variées et vont de la molécule de faible poids moléculaire à la macromolécule. Le NO peut avoir un rôle stimulateur ou inhibiteur sur ses cibles.

Hémoprotéines

Le NO active la guanylyl cyclase et la cyclooxygénase, inhibe le cytochrome P450 (Khatsen, 1993), la lipoxygénase (Nakatsuka, 1994), la thromboxane synthétase, la catalase et la peroxydase. L'hémoglobine et myoglobine servent à désarmer le NO en le trappant.

La liaison du NO à l'hème de la guanylyl cyclase élimine la coordination entre le fer hémique et la chaîne protéinique de la guanylate cyclase, imitant donc l'interaction qui a lieu lors de la liaison avec la protoporphyrin IX (Ignarro, 1984; Wollin, 1982; Stone, 1994). Certaines réponses au NO comme l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et la

relaxation des muscles lisses se font par le cGMP (Moncada et al, 1991;Ignarro, 1991). En effet, le NO aurait la capacité d'activer la guanylate cyclase. Le NO modifie la conformation de l'hème en enlevant le Fe^{2+} de l'enzyme la rendant ainsi plus active. Le GMPc est un messager important puisqu'il est présent dans toutes les cellules. Les effets du GMPc sont dus à la régulation de protéines kinases GMP-dépendantes, de canaux ioniques couplés au GMPc et au nucléotide phosphodiesterase cycliques régulée par le GMP. Ces cibles du GMPc représentent un groupe croissant de protéines régulatrices (Schmidt et Walter, 1994).

Le NO a aussi le potentiel de moduler le métabolisme l'acide arachidonique et d'inhiber plusieurs processus médiés par le cytochrome P450, incluant le métabolisme des hormones et des xénobiotiques. Bien que ce ne soit pas encore prouvé, les actions de NO pourraient originer d'une réaction directe entre NO et le Fe^{2+} hème au site actif de l'enzyme (Gross et Wolin. 1995).

Protéines contenant des thiols

La nitrosation des thiols des protéines pourrait être fondamentale pour la transduction du signal (Gaston B, 1994; Stamler et al, 1992). Les molécules pouvant être régulées par la nitrosation des thiols incluent les protéines qui sont elles-mêmes impliquées dans la transduction du signal, les récepteurs (Bolotina et al., 1994; Lei, 1992), les protéines G (Lander et al, 1993), les protéine kinases (Gopalakrishna et al, 1993; Pendino, 1993), les protéines phosphatases (Lander et al, 1993) les facteur d'activation de la transcription (Haby , 1994; Lander et al., 1993; Pendino 1993; Peunova et Enikopolov, 1993) et les protéases (Devi, 1994).

Une stimulation excessive des récepteurs NMDA résulte en une neurotoxicité causée par la production simultanée de NO et O_2^- qui forment le ONOO⁻ (Lei, 1992; Lipton 1993) et le OH[•] associé (Hammer, 1993). Même si le NO participe directement à la neurotoxicité des récepteurs NMDA, la nitrosation d'un thiol critique sur le récepteur par un dérivé du NO cause la désensibilisation et une neuroprotection par un mécanisme qui semble impliquer la génération d'un lien disulfide dans la protéine (Lei, 1992; Lipton 1993).

Le NO active directement les protéines G, $G_{i\alpha}$ et $p21^{ras}$ en association avec une augmentation de l'activité GTPase (Lander, 1993). Les tyrosine kinases de la famille src sont activé par les donneurs de NO dans le sang périphérique humains alors que l'activité tyrosine phosphatase est inhibée (Lander, 1993). La kinase -C peut aussi être inhibée par le NO (Gopalakrishna, 1993). Il semblerait donc que le NO peut influencer l'activité de plusieurs protéines en altérant leur état de phosphorylation. Le NO et les donneurs de NO dérangent aussi les courant ioniques à travers les canaux potassium (Bolotina, 1994; Robertson, 1993), les canaux calcium sensibles au voltage dans les muscles lisses vasculaires (Blatter, 1994) et les canaux non sélectif couplés à une protéines kinase dépendante du GMPc (Pineda et al., 1996).

Au niveau de la transcription, le NO cause la translocation de NF- κ B (Lander, 1993), induit l'expression des sous unités de AP-1, c-fos et jun B (Haby, 1994) et active CREB (cAMP responsive element binding factor) (Peunova et Enikopolov, 1993).

Métabolisme énergétique

Le NO endogène est un inhibiteur de la respiration mitochondriale et du métabolisme de l'énergie (Stuehr et Nathan, 1989). Le NO inhibe l'aconitase, une enzyme importante du cycle de Krebs et la NADH ubiquinone oxido-réductase (complexe I) et la succinate ubiquinone oxydo-réductase (complexe II) dans la chaîne de transport des électrons (Stuehr et Nathan, 1989). La glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase est aussi inhibé par le NO (Mohrs, 1994; Molina y Vedia, 1992). Le NO peut aussi priver la cellule de ses réserves d'énergie par l'activation de la poly (ADP-ribose) polymérase (Zhang et al, 1994).

Synthèse de l'ADN

La ribonucléotide réductase (RR) est une enzyme très régulée qui comporte deux sous-unités, qui contiennent chacune des espèces au site actif qui peuvent réagir avec le NO. (Kwon, 1992; Lepoivre, 1990). La RR est un hétérodimère composé d'une grosse sous-unité R1 qui se lie à des effecteurs allostériques et qui contient des résidus cystéine et une sous-unité R2 qui contient des radicaux tyrosyl qui sont critiques pour l'activité

catalytiques, ainsi qu'un centre de fer bi-nucléaire qui est responsable de la production et de la stabilisation du radical tyrosyl (Elledge, 1992; Fontecave, 1992). R2 serait la cible de choix (Lepoivre, 1990). L'attaque des radicaux tyrosyl par NO pourrait être due à une interaction directe ou à la nitrosation du groupe Fe-Fe de R2 avec la déstabilisation conséquente du radical.

Libération de fer

Il semble que la réaction du NO avec le Fe^{2+} hème ou non-hème prédominerait toutes autres réaction possibles lorsque le NO est produit à des niveau physiologiques faibles (1-50 nM) dans un environnement pauvre en anion superoxyde. Quand le NO est produit en excès, surtout dans un milieu riche en superoxyde, le métabolisme du fer peut être modifié à la fois dans les cellules productrices et les cellules cibles du NO conduisant à un perte importante de fer intracellulaire (Gross et Wolin, 1995).

1.1.4. Le NO et les radicaux libres

Dans les phagocytes, des radicaux libres oxygénés sont produits par l'activation de la NADPH oxydase, de la myéloperoxydase et des NO synthases. Ils sont produits dans les peroxysomes, au niveau des membranes des phagosomes et sur la membrane plasmique. Les radicaux libres oxygénés représentent une voie finale commune à un grand nombre d'agressions. Ils ont un rôle fondamental dans l'inflammation, les immunopathologies et le vieillissement cellulaire. La survie des cellules dépend de l'efficacité des mécanismes de défense anti-radicalaire. Les principaux mécanismes de protection ou systèmes pièges de RLO ("scavengers") sont le glutathion réduit (GSH) dans le cytoplasme et la vitamine E dans les membranes. Les RLO, responsables d'effets toxiques, sont des médiateurs intracellulaires importants dans la transduction des étapes initiales de l'activation des lymphocytes T (Révillard, 1995).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques réactives qui possèdent des électrons non pairés, qui sont capables d'arracher des électrons aux autres molécules. Les radicaux libres peuvent interagir entre eux soit pour former des espèces plus toxiques, soit pour se désactiver. La prochaine section a pour but de donner un aperçu des

réactions entre radicaux libres, en particulier celles impliquant le NO qui est en lui-même un radical libre, puisqu'il possède un électron non païré.

1.1.4.1. Les interactions entre radicaux

Le NO peut réagir avec l'oxygène, le superoxyde et les métaux de transitions (Stamler, 1994). Dans ce chapitre nous aborderons principalement la réaction avec le superoxyde

L'une des réactions les plus complexes et qui est encore débattue actuellement est la formation de peroxyde de nitrite à partir du NO. Le peroxyde de nitrite n'est pas un radical, puisque les électrons libres du NO et de O_2^- se sont combinés pour former le nouveau lien N-O (Beckman et al., 1994b). La réaction du NO avec le superoxyde est plus rapide ($6.7 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) que la dismutation ($2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) de ce dernier. La concentration du superoxyde dans le milieu a donc un rôle très important dans la détermination de l'action du NO (Nathan et Xie, 1994). L'effet inhibiteur de la superoxyde dismutase sur la cytotoxicité causée par le NO suggère que le peroxyde de nitrite pourrait contribuer aux effets biologiques du NO (Lin et al., 1995). Troy et al. (1996) ont démontré que la régulation à la baisse de la SOD causait une mort cellulaire qui nécessite la formation de peroxyde de nitrite à partir de NO et de superoxyde. Le peroxyde de nitrite oxyde les sulfhydryls 10^3 fois plus rapidement que le peroxyde d'hydrogène, il est proposé que cette réaction est un mécanisme important de la cytotoxicité causée par les radicaux oxygénés (Radi R. et al, 1991). La génération *in vivo* de peroxyde de nitrite, dans des conditions particulières impliquant la constante de vitesse de la réaction, a été démontrée (Squadrito et Pryor, 1995). Le rôle du peroxyde de nitrite dans l'inflammation est supporté par la détection de nitrotyrosine sur les protéines aux sites d'inflammation (Beckman et al, 1994a). D'autre part, le peroxyde de nitrite peut à son tour se dégrader en dioxyde d'azote et radical hydroxyl (Beckman et al, 1990) qui est considéré comme l'oxydant le plus fort dans les systèmes biologiques. Toutefois, il a été suggéré que le radical hydroxyl ne serait pas responsable des dommages causés par le peroxyde de nitrite car sa concentration serait beaucoup trop faible (Pou et al., 1995). D'autre part, un intermédiaire relié de près à l'état de transition de l'isomérisation de ONOOH en HONO2 pourrait être l'intermédiaire fortement oxydant responsable des oxydations similaires à celles causées par le radical hydroxyl médiées par le ONOOH (Koppenol et al., 1992). Cet isomère de l'acide peroxyde de nitrique 'HOONO*' peut être formé dans un

état stationnaire. Le mécanisme du HOONO* pourrait expliquer l'incapacité des "scavenger" de radical hydroxyl à bloquer complètement les effets du peroxy-nitrite (Pryor et Squadrito, 1995).

Le monoxyde d'azote peut aussi inactiver le superoxyde dans différentes conditions par exemple, le superoxyde est produit par des ultra sons en milieu aqueux est inactivé par le donneur de NO SIN-1 (Robbak et Gryglewski, 1991), le NO en solution aqueuse "scavenge" le superoxyde produit par les leucocytes activés (Rubanyi et al., 1991) et l'interaction directe du NO avec les radicaux alkoxyl et peroxy lors la peroxydation des lipides induite par le superoxyde, dans ce système, l'effet pro ou antioxydant du NO dépend de la concentration individuelle de chaque radical (Rubbo et al, 1994). Le peroxy-nitrite déränge les fonctions de signalement du NO et est lui-même directement cytotoxique (Beckman, 1991) car il cause la nitration des tyrosines (Beckman et al, 1994; Squadrito et Pryor, 1995). D'autre part, il a été suggéré qu'en anaérobie et dans les solvants organiques, le NO réagirait avec le peroxyde d'hydrogène pour produire de l'oxygène singulet, une forme très réactive d'oxygène (Noronha-Dutra et al., 1993). D'autre part, le NO diminuerait la formation de superoxyde par les macrophages activés possiblement via l'ADP-ribosylation (Jun et al, 1994).

1.1.4.2.Effets des radicaux libres oxygénés

Les RLO exercent leurs effets toxiques directement en altérant des glycanes, des protéines et des acides nucléiques et en causant la peroxydation des lipides. Ils ont aussi une toxicité indirecte qui consiste à amplifier les réactions inflammatoires et les lésions cellulaires: stimuler la synthèse des médiateurs lipidiques (prostaglandines et leucotriènes), activer certains facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1) et induire la production d'IL-1 et de TNF α , des protéines du choc thermique (hsp), diminuer Bcl-2 et déclencher la mort cellulaire. Ils entraînent également la synthèse de dérivés toxiques formylés ou aldéhydés (Révillard, 1995). Il a été démontré que les radicaux libres oxygénés induisaient l'expression des cytokines, des molécules d'adhésion et des proto-oncogènes (Los et al., 1995). L'expression de ces molécules en réponse aux RLO peut être attribuée à l'activation de certains facteurs de transcription comme NF- κ B et AP-1 (Los et al., 1995).

1.2. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL)

Les lymphocytes T sont impliqués dans la surveillance des tumeurs et des cellules infectées par un virus et les immunopathologies (Berke, 1995a). Ils sont aussi impliqués dans le rejet de greffe et la réaction du greffon contre l'hôte (GvH) (Waldmann et al, 1994).

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus où ils subissent le processus de sélection positive (conservation des cellules qui reconnaissent un complexe molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-peptide) et négative (délétion des cellules qui reconnaissent des complexes molécules du CMH - peptide du soi). Les lymphocytes vont se différencier en cellules T productrices de cytokines ($CD4^+$, Th0, Th1, Th2, $CD8^+$) ou en lymphocytes T cytotoxiques ($CD4^+$, pour la plupart $CD8^+$). Les $CD4^+$ reconnaissent les antigènes associés à des molécules du CMH de classe II alors que les $CD8^+$ reconnaissent l'association antigène-CMH de classe I. Les molécules du CMH sont présentes entre autres à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et leur rôle consiste à présenter l'antigène au récepteur des cellules T (TCR). Les molécules de classe I présentent des peptides de 8-11 acides aminés, alors que les molécules de classe II présentent des peptides de 13-34 acides aminés.

La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T est restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), c'est-à-dire qu'un peptide doit être associé à une molécule du CMH pour être reconnu par le récepteur du lymphocyte T. Les TCR sont composés de deux chaînes ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) liées par un pont disulfure et qui sont associées de façon non covalente au complexe CD3 (Figure 2). Le complexe CD3 est nécessaire pour l'expression en surface des TCR. Son rôle est d'assurer la transduction du signal par l'interaction du TCR avec l'antigène. Le complexe CD3 est composé de 5 chaînes polypeptidiques, γ , δ , ϵ qui comprennent un domaine extracellulaire de type immunoglobuline et η et ζ qui ont un court segment extracellulaire, les deux dernières peuvent s'associer sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Les parties cytoplasmiques de ces chaînes interagissent avec des protéines tyrosine kinases. Les chaînes du TCR ont aussi une structure semblable à celle des immunoglobulines et

comme ces dernières, elles peuvent subir des réarrangements (au niveau génique) permettant aux lymphocytes T de reconnaître une infinité de peptides.

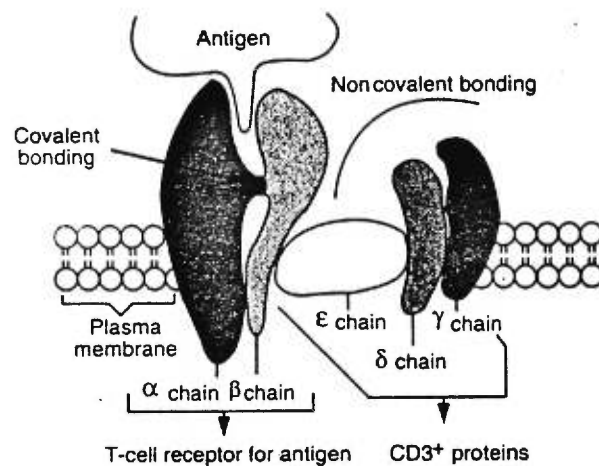


Fig 1. Structure of the T-cell receptor complex for antigen.

Figure 2. Structure du complexe du TCR

1.2.1. Mécanismes de lyse des CTL

Le processus lytique des CTL peut se décomposer en six étapes (Mescher, 1995):

- 1) le contact initial
- 2) l'engagement du TCR
- 3) la liaison "activée"
- 4) signalement co-stimulateur
- 5) livraison du "coup léthal"
- 6) recyclage de la cellule effectrice et cytolyse de la cellule cible

Lors du contact initial, entre la cible et la cellule effectrice l'interaction est faible. Cette étape est renforcée par des interactions impliquant des molécules d'adhésion/accessoires générales comme LFA-1 (CD11b/CD18, membre de la famille $\beta 2$ des intégrines). Si l'antigène est absent, l'adhésion demeure faible et les cellules se dissocient en peu de temps. Si l'antigène est présent, le TCR est engagé et livre les

signaux pour augmenter l'adhésion par CD8, LFA-1 et VLA (membre de la famille β 1 des intégrines). L'augmentation de l'adhésion va augmenter l'engagement du TCR qui va à son tour augmenter encore l'adhésion menant à la formation d'un conjugué fort. Vient ensuite le déclenchement de l'appareil cytolytique, processus qui requiert du calcium. Les co-récepteurs génèrent alors des signaux transmembranaires, les protéines tyrosine kinases (PTK) et la voie du phosphatidyl inositol (PI) sont activées, générant une élévation de calcium intracellulaire et l'activation de PTK pour initier la dégranulation. Ces signaux peuvent être amplifiés ou prolongés par des interactions récepteur-ligand supplémentaires (fibronectine et LFA-1 respectivement). Pour la libération des granules, Mescher (1995) suggère une étape intermédiaire où l'adhésion est maintenue pendant que le contact dans une région centrale diminue, créant un genre d'espace scellé dans lequel le contenu des granules peut être libéré. La dégranulation s'ensuit avec la relâche des facteurs cytolytiques dans l'espace intercellulaire. Après la dégranulation, les cellules CTL se recyclent pour répéter ce processus, alors que la cible est lysée.

Tous les joueurs impliqués dans la cytotoxicité des CTL ne sont pas encore identifiés. Les deux principaux mécanismes démontrés à ce jour sont le système perforine/granzymes et le système Fas - ligand Fas (figure 3). La perforine, une glycoprotéine lytique dépendante du calcium, induit la formation de pores dans la membrane cellulaire de la cible, ce qui permet aux granzymes de pénétrer la cellule (Berke, 1994 et 1995b). La perforine présente des similarités structurales avec les composantes C6-C9 du complément. Pour leur part, les granzymes sont des protéines de la famille des sérines protéases exprimant l'activité estérase. Chez la souris, sept protéases ont été caractérisées et nommées granzymes A-G. Le granzyme B est responsable de la fragmentation rapide de l'ADN caractéristique de l'élimination par les CTL (Shresta et al, 1995).

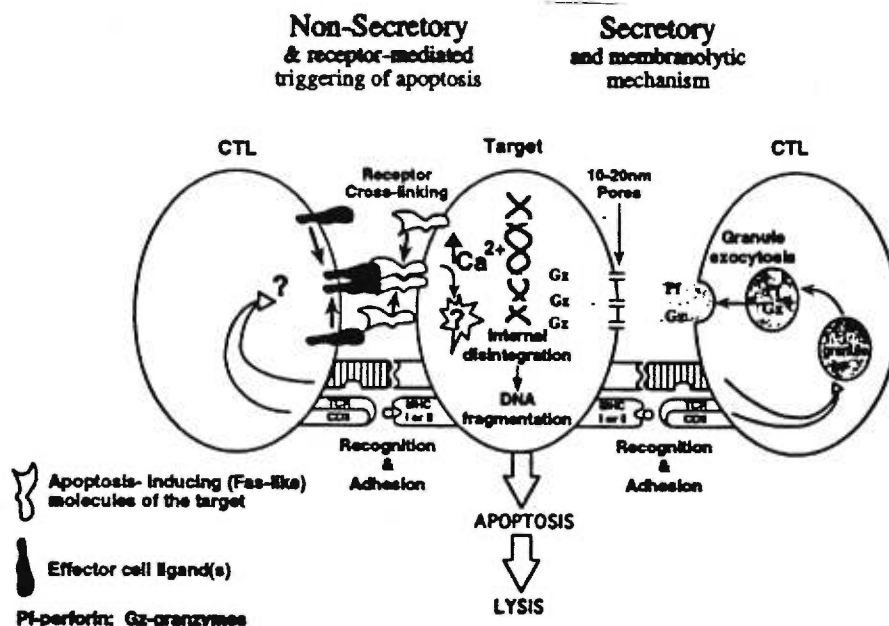


Figure 3. Représentation schématique des mécanismes de lyse cellulaire par les CTL (Berke G. ,1994 et 1995).

La liaison de la molécule Fas à son ligand (soluble ou à la surface d'un lymphocyte) déclenche une cascade d'événements qui mènent à la mort par apoptose de la cellule exprimant la molécule Fas. Fas est un récepteur d'environ 48 kDa et il appartient à la superfamille des récepteurs NGF (facteur de croissance des nerfs)/TNF (facteur de nécrose des tumeurs) (Oehm et al., 1992). L'activation, par des anticorps agonistes comme anti-Fas ou par les ligands naturels, du récepteur induit l'apoptose dans les cellules l'exprimant et ayant une voie de signalisation sensible. Fas est exprimé sur plusieurs mais pas toutes les cellules, lymphoïdes ou non lymphoïdes (Krammer et al., 1994).

La liaison du TCR à la cellule cible résulte en une augmentation du calcium intracellulaire et l'exocytose des granules (Griffiths, 1995). La capacité des CTL à tuer via la molécule Fas est aussi contrôlée par le TCR puisque l'expression du ligand Fas à la surface des CTL est induite par une signalisation par le TCR. Toutefois la mort cellulaire causée par la molécule Fas est indépendante du calcium (Berke, 1994). La séquence des derniers événements pourrait être la même pour les deux voies lytiques.

L'exocytose de granules semble être le mécanisme le plus impliqué dans la lyse cellulaire par les lymphocytes. La sécrétion de lymphokines cytotoxiques peut expliquer quelques effets plus lents des lymphocytes mais n'explique pas la lyse observée in vitro.

1.2.2. Activation des lymphocytes T cytotoxiques

Les précurseurs des cellules T cytotoxiques au repos ont besoin d'au moins deux signaux pour se développer en Tc matures. Le premier, venant de la réaction croisée du récepteur des cellules T (TCR) et de molécules co-stimulatrices, cause l'activation des pré-Tc (pTc) et l'expression des récepteurs pour l'IL-2. Lorsque l'IL-2 (le second signal) est fourni au pTc, elles prolifèrent et mûrissent en Tc effectrices sous l'influence de facteurs de différenciation éventuels. Il a été démontré que les cellules T CD4⁺ sont nécessaires ou influencent à la hausse l'activation des CD8⁺. Il a été aussi démontré que les NK sont des cellules accessoires essentielles pour le développement de la réponse des Tc CD8⁺ restreinte par le CMH de classe 1 (Kos et Engleman, 1995). Le NO joue aussi un rôle dans la régulation de la prolifération des CTL (Kondo, 1993; Liew, 1995).

1.2.3. Lymphocytes et radicaux libres

Production de radicaux libre par les lymphocytes.

Il a été démontré que les lymphocytes T pouvaient produire des radicaux libres: H₂O₂ (Thorne et al., 1980), radicaux oxygénés (Benichou et al., 1989) et NO (Hoffman et al., 1993b).

Effet des radicaux libres sur les lymphocytes.

Le développement des splénocytes en CTL est influencé négativement par le NO (Langrehr et al., 1991). L'utilisation d'un inhibiteur de la production de NO sur des splénocytes de rats agit de manière dose dépendante sur la prolifération (augmentation), le développement des CTL (augmentation) et la production de NO (diminution) (Langrehr et al., 1991). Dans certaines conditions le NO peut faciliter la prolifération des lymphocytes (Liew, 1995). Le NO peut aussi influencer les fonctions des CTL en diminuant l'expression des molécules de classe II sur les cellules présentatrices d'antigènes (Sicher et al., 1994). Les radicaux libres oxygénés (RLO) agiraient comme

signaux sur les lymphocytes T pour induire l'expression précoce des gènes ainsi que la prolifération cellulaire (Los et al., 1995). Le H_2O_2 serait un activateur des fonctions des lymphocytes T (Los et al., 1995). Des indications suggèrent un rôle pour les RLO dans l'activation des lymphocytes, entre autres, la molécule CD28 (Los et al., 1994). Cette molécule cause l'activation en impliquant un signal oxydatif et son effet est inhibé par les antioxydants. D'autre part, la réponse proliférative dans les cultures mixtes (MLC) ou IL-2 dépendante est inhibée par les pro-oxydants et promue par les antioxydants et thiols exogènes (Dornand et Gerber, 1989; Smyth, 1992; Los et al, 1995) . Il semble donc que certaines fonctions des lymphocytes sont favorisées dans des conditions prooxydantes alors que d'autres sont inhibées, suggérant la nécessité d'une balance rédox délicate.

1.3. Apoptose

1.3.1. Définition de l'apoptose

Une cellule peut mourir selon deux mécanismes différents, soit l'apoptose et la nécrose. Les deux modes de mort cellulaire présentent des caractéristiques morphologiques et biochimiques qui permettent de les distinguer (tableau 2).

Une distinction doit être apportée entre les phénomènes de mort cellulaire programmée et d'apoptose. La mort cellulaire programmée fait référence à une situation où les cellules sont programmées pour mourir à un moment précis. Elles portent une horloge génétique qui décide du moment de leur mort. L'apoptose est aussi un programme génétique mais qui décide plutôt la manière dont la cellule va mourir et non le moment. Dans la plupart des cas, la mort cellulaire programmée a lieu par apoptose mais parfois ce n'est pas le cas, comme par exemple la mort des spermatocytes et spermatides lors de la spermatogenèse (Majno et Joris, 1995).

L'apoptose est reliée à plusieurs états physiologiques et pathologiques tels la sélection de thymocytes (Von Boehmer, 1992; Krammer et al., 1994; Broussard-Diehl et al., 1996), les chocs thermiques (Perotti et al, 1990), le développement du système nerveux (Raff et al, 1993), le développement et le fonctionnement du système immunitaire (Goldstein et al, 1991; Williams, 1994) et les maladies auto-immunitaire (Watanabe-Fukunaga et al, 1992). Elle est impliquée dans l'action des médicaments anticancéreux (Lowe et al., 1993), des oxydants (Ueda et Shah, 1992; Hockenbery et al, 1993) et des stéroïdes (Cohen et Duke, 1984). L'incapacité ou la suppression de l'apoptose contribuent vraisemblablement au développement initial du cancer et à l'apparition de tumeurs résistantes au traitement cytotoxique (Williams, 1991). D'autre part, l'activation inappropriée de l'apoptose peut causer une immunodéficience, comme le SIDA (Banda et al, 1992; Ueda et Shah, 1994; Thompson ,1995)

Dans l'apoptose causée par les lymphocytes T cytotoxiques, l'étape du cycle mitotique de la cellule cible au moment de l'attaque influence le destin de la cellule. Ainsi, une cellule

quiescente (G0) sera résistante à la fragmentation de l'ADN médiée par les CTL alors que les cellules en G1 y sont sensibles (Nishioka et Welsh, 1994).

1.3.1.1.Facteurs influençant l'apoptose

L'initiation de l'apoptose est régulée de façon rigoureuse. Plusieurs facteurs, originant de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule influencent la décision de la cellule de mourir ou de survivre. L'apoptose peut donc être influencée (induite ou inhibée) par des facteurs physiques comme les radiations UV (Martin et Cotter, 1991) et Gamma (Sellins et Cohen, 1987), l'hyperthermie (Takano et al., 1991), l'exposition à des oxydant comme le peroxyde d'hydrogène (Buttke et Sandstrom, 1994), les cytokines (TNF, TGF β , IL-2) (Boise et al., 1993; Colotta et al., 1992; Nunez et al., 1990; Oltvai et al., 1993), les infection virales (Banda et al., 1992), les mécanismes de défenses immunologiques entre autres les CTL et les NK (Cotter et al., 1990; Cohen et al., 1992), certains gènes comme plusieurs membres de la famille *Bcl-2* (Oltvai et al, 1993; Boise et al, 1993; Hockenbery et al., 1993), p53 (Lowe et al., 1993), *c-myc* (Shi et al., 1992), *nur77* (Liu et al., 1994; Woronicz et al., 1994), *pim-1* (Möröy et al., 1993), le gène codant Fas (Oehm et al., 1992) , et les glucocorticoïdes (Raff et al., 1993; Steller, 1995; Liles et al., 1995). Ces signaux suppriment ou activent le programme de mort cellulaire, et le même signal peut avoir des effets différents sur différentes cellules.

Tableau 2. Principales différences entre l'apoptose et la nécrose

APOPTOSE	NÉCROSE
Affecte les cellules individuellement	Affecte les cellules voisines
Phase de retard (minutes-heures)	Pas de phase de retard
Le volume du cytoplasme et de la cellule diminue	Le volume du cytoplasme et de la cellule augmente
L'intégrité de la membrane est maintenue pour un temps	Lyse de la cellule
Condensation de la chromatine	Kariocytose
La chromatine forme un croissant	La chromatine forme de petits agrégats
L'ADN se fragmente en une échelle (200pb)	Patron diffus de l'ADN
Cytoplasme: [Ca ²⁺] ↑, endonucléase ↑ transglutaminase ↑ p53 ↑, bcl-2 ↓, c-myc ↑	Rupture des lysosomes
Les organelles maintiennent leur intégrité	Les organelles se gonflent (mitochondrie, reticulum endoplasmique)
La cellule se brise en petits fragments	La cellule se rompt
Les fragments sont phagocytés	Le contenu cellulaire est libéré
Pas d'inflammation	Inflammation importante

(Adapté de Ueda et Shah, 1994).

1.3.2. Signalisation de l'apoptose

Les mécanismes contrôlant l'apoptose reliés à un récepteur membranaire, agissent souvent via un système de transduction du signal qui implique la stimulation du récepteur, l'activation d'une cascade protéine kinase/phosphatase et la libération d'un second messager qui augmente ou supprime la transcription d'un gène (Hale et al., 1996). Plusieurs indices suggèrent que les différentes voies de signalement convergent vers une ou quelques voies finales communes. La grande variété de systèmes

apoptotiques impliquant Bcl-2 suggèrent que cette dernière serait une de ces voies (Hale et al., 1996).

Parmi les molécules qui jouent un rôle dans la signalisation, on retrouve des membres de la famille NGF/TNF, des protéines kinases, Ras, les céramides, les radicaux oxygénés, le NO, les protéases, la famille Bcl-2, p53, c-myc, c-fos et c-jun.

Certains membres de la famille NGF/TNF permettent la survie des cellules, alors que certains autres particulièrement Fas (APO-1/CD95) et TNF-R1 sont largement associés à l'induction de l'apoptose. Cette induction de l'apoptose est particulièrement importante dans la régulation du système immunitaire (Nagata et Goldstein, 1995).

Les différentes protéines kinases, jouent un rôle dans la transmission du signal apoptotique. Les protéines tyrosine kinase (PTK) peuvent s'oligodimériser avec les récepteur des cytokines et déclencher la cascade de phosphorylation. Parmi ces PTK on retrouve la famille src et la famille de kinase Janus (JAK). Cette dernière a été associée à plusieurs voie de signalement contrôlant l'apoptose comme l'interféron, l'IL-3, le facteur d'inhibition de la leucémie (LIF) (Ziemiecki et al., 1994) et GM-CSF (Yousefi et al., 1994). Les radiations ionisantes favorisent l'activation de la PTK nécessaire à l'apoptose dans les cellules B (Uckun et al., 1992) et la stimulation de l'apoptose par l'engagement du TCR implique la PTK p56^{lck} (Somma et al., 1995). Notons que le mauvais fonctionnement des PTK peut provoquer l'arrêt du cycle cellulaire et la mort par apoptose (Chen et Rosenberg, 1992). La fragmentation de l'ADN peut être empêchée par le blocage de la sérine/thréonine kinase p34^{cdc2} (Shi et al., 1994). La protéine kinase C (PKC) joue des rôles contradictoires dans l'apoptose. En effet, les inhibiteurs de la PKC comme la staurosporine peuvent induire l'apoptose (Jacobson et al., 1993) et protéger contre celle induite par les esters de phorbol (Munn et al, 1995). Les activateurs de PKC pour leur part inhibe l'apoptose causée par les céramides (Hannun et Obeid, 1995) et le NO (Meßmer et al., 1995).

Les protéines Ras ont un rôle central dans la transduction du signal, reliant les tyrosine kinases aux sérine/thréonine kinases, incluant la protéine kinase activée par les mitogènes (MAP). Le système Ras/Raf/MAP kinase a un rôle dans l'inhibition de

l'apoptose. Par exemple, Raf-1 favorise la prolifération des cellules myéloïde dépendante de IL-3 et supprime l'apoptose causée par le retrait de l'IL-3 (Cleveland, 1994).

Les céramides sont un second messager qui active une cascade impliquant les sérine/thréonine kinase et les protéines tyrosine kinase (Hannun et Obeid, 1995). La production insuffisante de céramides est impliquée dans la résistance à certain type d'apoptose (Gottschalk et al., 1995).

L'AMPc agit principalement à travers des protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique (Spaulding, 1993). Les facteurs éleveurs d'AMPc stimulent la fragmentation de l'ADN via des protéines kinases dépendantes du calcium, bien qu'il y ait des exemples de cas où l'AMPc inhibe l'apoptose (McConkey et Orrenius, 1994). L'apoptose induite par l'AMPc, le dexaméthasone et les radiations ionisantes se fondent en une voie commune avant le point où Bcl-2 peut exercer son effet protecteur (Flomerfelt et Miesfeld, 1994).

Il est suggéré que les espèces oxygénées réactives sont impliquées dans l'apoptose (Hockenbery et al., 1993; Slater et al., 1995). Cependant, il existe aussi des preuves, obtenues par des expériences en milieux hautement hypoxiques, que les radicaux oxygénés ne sont pas généralement requis pour l'apoptose (Jacobson et Raff, 1995; Muschel et al., 1995).

Plusieurs protéases sont impliquées dans l'induction de l'apoptose comme l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 β (ICE) et ses homologues (ex. CPP32, Nedd2/Ich-1_L, Tx ICE rel II/Ich-2, ICE rel III, Mch 2) la fragmentine, les granzymes, les sérine protéases, les calpaines et ubiquitine (Patel T et al., 1996). Les cibles de ces protéases sont les lamines, la poly ADP-ribose polymérase, le polypeptide de 70kD de la sous-unité U1 de la petite ribonucléoprotéine nucléaire (snRNP), des endonucléases et les histones (Patel et al., 1996).

La famille Bcl-2 comprend les gènes *Bcl-2*, *Bax* et *Bcl-x*. Le produit du gène *bcl-2* prévient l'induction de l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (Jacobson et al., 1993) par divers stress oxydatifs, incluant les radiations ionisantes, le choc thermique ou l'inhibition de la synthèse de la GSH. L'apoptose induite par les glucocorticoïdes dans les

thymocytes peut être prévenue par Bcl-2 (Sentman et al., 1991). Bcl-2 ne prévient cependant pas toujours l'apoptose, par exemple après le retrait d'IL-3, IL-4 ou GM-CSF dans des lignées dépendantes de ces cytokines (Nunez et al., 1990), ou l'apoptose causée par le TNF- α et le ligand Fas (Itoh et al., 1993). Le gène *Bax* code une protéine qui forme des hétérodimères avec la protéine Bcl-2 (Oltvai, 1993). Bax peut selon les circonstances contribuer à la mort ou la survie des cellules (Middleton et al., 1996). *Bcl-x* est identifié comme un gène codant une protéine homologue à Bcl-2 (Boise et al, 1993). Sa forme longue (*Bcl-x_L*) protège les cellules de l'apoptose alors que la forme courte (*Bcl-x_S*) antagonise la protection offerte par Bcl-2. Des expériences en anaérobiose ont démontré que l'apoptose pouvait avoir lieu et être inhibée par Bcl-2 et *Bcl-x_L* (Jacobson et Raff, 1995), Bcl-2 n'agirait donc pas comme un antioxidant comme il avait été suggéré auparavant (Hockenbery et al, 1993). Il serait possible que Bcl-2 agisse directement sur la chromatine pour prévenir sa fragmentation, car une association a été démontrée entre Bcl-2 et la chromatine condensée lors de la mitose (Lu et al, 1994). Il est aussi suggéré que Bcl-2 bloque l'apoptose en empêchant Bax de l'induire, en se dimérisant à ce dernier (Yin et al., 1994), ou encore que Bcl-2 régule le calcium (McConkey et al., 1990).

La protéine p53 est un régulateur du cycle cellulaire qui peut également dans certaines conditions induire l'apoptose. Son expression est induite principalement par les événements susceptibles de causer des dommages à l'ADN (Lu et Lane, 1993) mais aussi parfois par le manque de facteurs de croissances (Colombel et al, 1992). Son rôle dans ce cas est de bloquer la transition G1/S afin de permettre la réparation de l'ADN et, si la tentative de réparation échoue, de déclencher l'apoptose (Chang et al., 1993). Ce blocage est indirect car, en effet, la protéine p53 est un facteur de transcription du gène WAF-1 dont le produit, la protéine Cip1, est un puissant inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines de la phase G1 (Harrison et al, 1995). La protéine p53 est aussi un régulateur positif de Bax et négatif de Bcl-2 (Miyashita et al, 1994; Selvakumaran et al, 1994). D'autre part, la surexpression de Bcl-2 peut bloquer ou retarder l'apoptose dépendante de p53 (Chiou et al., 1994).

Les proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun* qui forment le facteur de transcription AP-1 régulent la transcription et participent à la prolifération cellulaire. Elles sont exprimées à la suite de

l'activation cellulaire et sont aussi impliquées dans la régulation de l'apoptose (Colotta et al., 1992). La surexpression de c-fos et c-jun est associées à l'apoptose, après le retrait des interleukines, des CTL dépendants de ces dernières (Evan et al., 1992; Walker et al., 1993).

Le facteur de transcription c-myc joue un rôle important dans la prolifération des cellules mais aussi l'apoptose. La présence de c-myc lorsque la croissance cellulaire est arrêtée va conduire à une apoptose qui dépend de p53 (Evan et al., 1992) puisque c-myc est un activateur transcriptionnel de p53. (Reisnau et al., 1993). C-myc n'est toutefois pas requis pour toutes les formes d'apoptose, il n'est pas nécessaire pour l'apoptose induite par les glucocorticoïdes et TGF- β (Shi et al., 1992). Les proto-oncogènes de la famille Rel qui incluent NF- κ B régulent l'expression de c-myc et peuvent servir à promouvoir ou inhiber l'apoptose (Hale et al., 1996).

1.3.3. NO et apoptose

Le NO est une molécule oxydante importante dans l'induction de l'apoptose et ce dans différents types cellulaires et chez différentes espèces. Les différents auteurs suggèrent qu'il pourrait soit être la cause de l'apoptose ou simplement un second messager dans l'exécution de celle-ci. Il a été démontré que le NO déclenchait l'apoptose entre autres dans les chondrocytes (Blanco et al., 1995), les macrophages (Albina et al., 1993; Shimakoa et al., 1995; Meßmer et al., 1995), les cellules tumorales humaines comme par exemple, les adénocarcinomes, carcinomes hépatiques, néoplasme du côlon (Ho et al., 1996) et de souris (Cui et al., 1994) et les cellules musculaires lisses (Fukuto et al., 1996; Nishio et al., 1996).

D'autre part, le NO aurait également des propriétés protectrices contre l'apoptose (Matthys et al., 1995; Martin-Sanz et al., 1996; Bohlinger et al., 1995; Genaro et al., 1995). Par exemple, dans le cas des lymphocytes B de faibles concentrations de NO bloque l'apoptose (Baixeras et al., 1994) Il semblerait que ce blocage vient d'un niveau constant de bcl-2 pendant une longue période de 4 à 8 heures (Genaro et al., 1995). Une protection du NO contre l'apoptose a aussi été observé sur les neurones (Lipton et al., 1993).

Il semblerait que le NO agisse à la fois directement et via des intermédiaires. Beaucoup de molécules impliquées dans l'activation ou l'inhibition de l'apoptose sont elles-mêmes d'une manière ou d'une autre, influencées par le NO. Par exemple, NF- κ B, c-fos, c-jun, la PARP, p53, Fas et bcl-2. D'autre part, la déamination des purines et pyrimidine cause une augmentation des bris à l'ADN et des mutations (Nguyen et al. ,1992).

De façon plus détaillée, la translocation de la protéine NF- κ B est augmentée par le NO (Lander,1993). Ce facteur, comme mentionné plus haut, participe à la transcription des gènes de la mort ("death genes") comme par exemple *c-myc*.

Les protéines c-fos et c-junB sont aussi augmentées par le NO mais de manière non directe contrairement à NF- κ B. L'augmentation de l'expression de ces protéines serait plutôt due à l'activation de la voie du GMPC par le NO (Haby, 1994).

Le NO a la capacité d'activer la PARP (via des dommages à l'ADN causés par l'activation d'endonucléases) qui est une très grande consommatrice d'ATP et ainsi épuiser les réserves d'énergie de la cellule (Zhang et al, 1994). Dans le même ordre d'idée, l'inhibition, par le NO, de l'aconitase dans le cycle de Krebs serait aussi une cause d'apoptose (Albina et al, 1993) pour les cellules qui dépendent de la glycolyse.

L'expression du gène supresseur de tumeur *p53* peut être augmenté par le NO. Il a récemment été démontré qu'après exposition au NO, l'expression de p53 et de p21/WAF1/Cip1 est élevée dans les cellules cancéreuses (Ho et al, 1996). Le NO cause une accumulation de la protéine p53 dose et temps-dépendante. Meßmer et al. (1996), ont montré que le niveau de p53 reflète les dommages à l'ADN causés par le NO.

Le NO peut aussi augmenter l'expression de la molécule Fas (Fukuto et al., 1996) et la liaison de Fas avec son ligand déclenche une cascade d'événements menant à l'apoptose.

En conclusion, le rôle précis du NO dans l'apoptose n'est pas encore connu, mais il apparaît déjà qu'il est très complexe. Le NO peut activer simultanément une ou plusieurs des voies énoncées plus haut et ainsi causer la mort par apoptose de la cellule cible.

1.4. Hypothèse et objectifs

Hypothèse

Les CTL produisent du NO lorsqu'ils induisent la mort par apoptose des cellules de lymphome de souris YAC-1.

Objectifs

- Démontrer la production de NO par les CTL lors de la lyse des cellules tumorales.
- Démontrer et caractériser la fragmentation de l'ADN des cellules cibles.
- Démontrer l'expression de la iNOS lors de la rencontre CTL-YAC-1.
- Démontrer l'effet du NO exogène.

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux

Les expériences ont été effectuées avec des souris mâles C57BL/6j (haplotype H-2^b) (Jackson Laboratory) , âgées de 6 à 12 semaines. Les animaux étaient gardés dans une animalerie où les conditions de température et d'humidité étaient stables et où ils avaient de la nourriture et de l'eau à volonté.

2.2. Culture cellulaire

La lignée cellulaire YAC-1 (American Type Culture Collection) ,un sous-clone de la tumeur induite par un virus de leucémie Moloney dans une souris A/Sn (haplotype H-2^a), a été maintenue en culture en suspension dans un milieu RPMI 1640 (GIBCO) (contenant les 20 acides aminés essentiels, des vitamines, des minéraux, du glucose et du rouge phénol) auquel on a ajouté 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (Hyclone) , 2 mmol/L glutamine (GIBCO), 100U/ml pénicilline (GIBCO) et 100 µg/ml streptomycine (GIBCO). La concentration en arginine de ce milieu était de 1.1 mM.

Les YAC-1 expriment les molécules du CMH de classe I, H-2D^d et H-2K^k (Petersson et al, 1987; Yamasaki et al, 1988). Les YAC-1 nous permettent d'étudier la cytotoxicité des CTL sur une lignée sensible aux cellules tueuses naturelles (NK). La plupart des études sur les CTL sont faites avec des cellules cibles résistantes aux NK. L'utilisation de YAC-1 nous permettra d'établir la cytotoxicité des CTL sur des cellules sensibles aux NK (la lyse que nous observons n'est pas médiée par les NK). De plus, notre laboratoire a effectué dans le passé une étude semblable avec des cellules NK comme effecteurs et l'utilisation d'une même cible permettra éventuellement de mieux établir des parallèles entre les deux types de cellules cytotoxiques.

2.3.Culture mixte de lymphocytes (CML)

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, la rate est prélevée stérilement et déposée dans un petit pétri contenant du RPMI-1640 très froid. Les cellules sont mises en suspension par dilacération et transférées dans un tube. Après une centrifugation à 300 g pendant 10 minutes, les globules rouges sont lysés avec du 0,15 M NH_4Cl dans du tampon Tris et la réaction est arrêtée en ajoutant du RPMI-1640 (GIBCO). On centrifuge à 300 g pendant 10 minutes et on fait un deuxième lavage. Pendant la préparation des splénocytes, on irradie des cellules YAC-1 avec des rayons γ à 446 rad pendant 60 minutes (environ 25 000 rad au total). Les cellules sont resuspendues dans un milieu RPMI contenant 5% de sérum de veau foetal décomplémenté (Hyclone), 2mM de glutamine (GIBCO), 100U/ml pénicilline (GIBCO), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycine (GIBCO), 1mmol/L de pyruvate de sodium (GIBCO) et 5×10^{-5} mol/L de β -mercaptoéthanol. Les concentrations sont ajustées à 5×10^6 cellules/ml pour les cellules spléniques et 2.5×10^6 cellules/ml pour les YAC-1 (ratio de deux splénocytes pour un YAC-1). Les cellules sont mises en co-culture et conservées pendant cinq jours à 37°C, 5% CO_2 . Les contrôles négatifs étaient des cellules sans anticorps, on obtenait ainsi une fluorescence de base (bruit de fond) exprimée en pourcentage des cellules. Pour déterminer le pourcentage de CD8a^+ et de NK1.1^+ dans nos préparations on a soustrait du pourcentage de cellules positives pour l'anticorps, le pourcentage du bruit de fond.

Pour exclure de façon plus certaine la présence de cellules NK, qui peuvent elles aussi produire du NO en présence de YAC-1 (Filep et al., 1996), et déterminer la proportion de lymphocytes T cytotoxiques dans notre préparation de CTL, nous avons marqué nos populations de CTL et de splénocytes. Pour ce faire, on a utilisé un anticorps monoclonal anti-NK1.1 couplé à la phycoérythrine (Pharmingen, clone 2B4, isotype IgG2b) 1 $\mu\text{g}/10^6$ cellules et un anticorps monoclonal anti-CD8a couplé à la phycoérythrine (PE) (Pharmingen, clone 53-6.7, isotype IgG2a de rat). Les anticorps ont été utilisés en parallèle dans différents échantillons de la même population. Les anticorps étaient couplés à la phycoérythrine (PE), une molécule fluorescente excitable à 488 nm (longueur d'onde d'émission du laser du FACS). Ce marquage nous a permis d'évaluer le

pourcentage de CD8a⁺ et de NK dans nos deux populations. Le contrôle positif pour les NK a été obtenu au cours d'une expérience séparée effectuée quelques semaines auparavant avec le même lot d'anticorps (figure 7 B). Dans cet exemple on a obtenu 7,88% de cellules NK, après le traitement des souris au poly I;poly C (un activateur des cellules NK) et après le retrait des cellules adhérentes (monocytes/macrophages).

2.4.Cyotoxicité

2.4.1. Marquage des cellules cibles

Le cytoplasme des cellules YAC-1 est marqué au ⁵¹Cr en incubant les cellules avec 100 µCi de Na [⁵¹Cr]O₄ (ICN) à 37°C pendant 90 minutes en agitant le tube aux 15 minutes. Après le marquage, les cellules ont été lavées trois fois avec le milieu de culture.

2.4.2. Donneur de NO

L'effet du NO exogène a été évalué en traitant les YAC-1 marquées avec du sodium nitroprusside (SNP)(Sigma), qui agit comme donneur de NO. Les cellules et les réactifs sont déposés dans les puits d'une plaque de 96 puits, centrifugées cinq minutes à 50 g et incubés à 37°C 5% CO₂ pendant quatre heures. Après l'incubation, les plaques sont centrifugées à nouveau à 50 g pendant cinq minutes.

2.4.3. Effet du L-NAME

Pour évaluer l'implication du NO dans la lyse des YAC-1 par les CTL, des dilutions sériées de cellules effectrices (CTL) en présence ou en absence de L-NAME (Sigma) 0,5, 1 et 5mmol/L, un inhibiteur de la NOS capable d'inhiber les deux isoformes, ce qui augmente nos chances d'avoir un effet puisque tous les isoformes de NOS seront affectés L'essai se déroule comme décrit précédemment.

2.4.4. Effet de la déplétion d'arginine

Dans les expériences où l'absence d'arginine était souhaitée, le RPMI a été préparé à partir de la trousse RPMI-1640 Select-Amine (Gibco) en omettant l'arginine. La culture mixte de lymphocytes a été effectuée dans un milieu déplété en arginine et les cellules

cibles YAC-1 lors du marquage étaient diluées et lavées avec du RPMI sans arginine. Le reste de l'essai était identique à ce qui est décrit précédemment.

2.4.5. Calcul de la lyse spécifique

Après la centrifugation, 100 μ l d'échantillon du milieu de culture est prélevé dans chaque puit et analysé par un compteur gamma. La radioactivité totale est obtenue en incubant les YAC-1 avec du HCl 0,1N et la libération spontanée en incubant les YAC-1 avec du milieu de culture. Le ^{51}Cr libéré permet de calculer le pourcentage de lyse spécifique avec la formule:

$$\left(\frac{\text{cpm échantillon} - \text{cpm libération spontanée}}{\text{cpm total} - \text{cpm libération spontanée}} \right) \times 100.$$

2.5. Fragmentation de l'ADN

2.5.1. Évolution dans le temps de la fragmentation de l'ADN et de la lyse cellulaire.

Lorsqu'il se fragmente, l'ADN peut soit rester dans le noyau ou s'en aller dans le cytoplasme. Afin d'évaluer l'étendue (proportion d'ADN fragmenté par rapport à l'ADN total) de la fragmentation de l'ADN ainsi que son évolution dans le temps, il fallait le marquer avec une molécule pouvant s'incorporer à lui. La déoxyuridine peut se substituer à la thymidine dans l'ADN cellulaire. L'ADN des cellules cibles YAC-1 a donc été marqué à la [^{125}I] déoxyuridine ($^{125}\text{IUdR}$) par incubation des cellules 120 minutes à 37°C avec 10 μCi de $^{125}\text{IUdR}$ et le cytoplasme au ^{51}Cr (100 μCi). Le $\text{Na} [^{51}\text{Cr}] \text{O}_4$ a été ajouté pour les 90 dernières minutes d'incubation. Après le marquage, les cellules ont été lavées trois fois avec le milieu de culture. Les cellules ont ensuite été traitées pendant un, deux ou quatre heures avec des dilutions sériées de CTL en présence ou absence de L-NAME (5mmol/L). A la fin de l'incubation, les cellules sont centrifugées à 300 g et on récupère le milieu de culture (fraction 1). Les cellules sont alors lysées avec un tampon Tris (10mM)- Triton X-100 (0.2%)-EDTA (1mmol/L) pH 7.8 (Tampon TTE) et laissées sur glace pendant dix minutes. Par la suite, on centrifuge à 4°C pendant 15 minutes à 13 000 g et on sépare le surnageant (fraction 2) du culot d'ADN (fraction 3). Les fractions

milieu de culture (1) et surnageant 13 000 g (2) contiennent l'ADN fragmenté et la fraction culot (3) l'ADN intact contenu dans le noyau.

2.5.2. Calcul de la lyse spécifique et de la fragmentation de l'ADN

On mesure la radioactivité dans chacune des fractions pour la ^{125}I -déoxyuridine. Pour mesurer le ^{51}Cr et l' ^{125}I dans le même échantillon, un programme spécial est utilisé avec le compteur gamma (Wallac 1470 Wizard Automatic Gamma Counter). Ce dernier permet de mesurer simultanément la radioactivité dans les spectres d'émission respectifs de chaque isotope et élimine le chevauchement entre les canaux et entre les détecteurs. La radioactivité totale est obtenue en additionnant les trois fractions. La relâche spontanée est obtenue en incubant des cellules marquées seules. La relâche de [^{125}I]-déoxyuridine permet de calculer le pourcentage de fragmentation spécifique de l'ADN à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{(\text{cpm } (^{125}\text{I}) \text{ milieu de culture} + \text{cpm } (^{125}\text{I}) \text{ surnageant 13 000 g} - \text{cpm } (^{125}\text{I}) \text{ spontanée}) \times 100}{(\text{cpm } (^{125}\text{I}) \text{ total} - \text{cpm } (^{125}\text{I}) \text{ spontanée})}$$

et la relâche de ^{51}Cr , le pourcentage de lyse spécifique selon la formule:

$$\frac{(\text{cpm } (^{51}\text{Cr}) \text{ milieu de culture} - \text{cpm } (^{51}\text{Cr}) \text{ libération spontanée}) \times 100}{(\text{cpm } (^{51}\text{Cr}) \text{ total} - \text{cpm } (^{51}\text{Cr}) \text{ libération spontanée})}$$

2.5.3. Analyse sur gel d'agarose

Après une incubation de quatre heures des YAC-1 avec les CTL à différents ratios et en présence ou absence de L-NAME (5mmol/L), les cellules ont été lysées avec le tampon TTE (Tris - Triton X-100 -EDTA). L'ADN a été précipité à l'aide de NaCl 400 mM (final) et d'isopropanol 60 % (final) pendant 16 heures à -20°C . Il a été ensuite lavé à l'éthanol 75% avant d'être séché à l'air et resuspendu dans 10 μl du tampon TE 1X (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8) pendant 24h à 37°C . On a ensuite effectué l'électrophorèse des échantillons, des YAC-1 seules (2.5×10^4 , colonne 2) et CTL seuls (colonne 11) et d'un marqueur de poids moléculaire (colonne 1), sur un gel d'agarose

0.8% contenant du bromure d'éthidium (0,1 µg/ml) pendant 90 minutes à 100 V. Le tampon d'électrophorèse était composé de 40 mmol/L de Tris-HCl, 20 mmol/L d'acide acétique et 1 mmol/L EDTA. Les bandes ont été visualisées avec des rayons UV.

2.5.4. Analyse morphologique des cellules cibles

La morphologie des cellules est analysée grâce à des molécules qui pénètrent les cellules et les colorent. On peut ainsi distinguer la chromatine des cellules et déterminer sa morphologie (apoptotique ou normale). La couleur permet aussi de déterminer si la cellule est viable ou non. Après le traitement des CTL au L-NAME (5 mmol/L) et l'incubation de quatre heures avec les cellules cibles YAC-1 à différents ratios effecteur : cible comme dans les essais précédents, les cellules sont centrifugées pendant cinq minutes à 500 g. On enlève le surnageant et on prépare un colorant avec 100 µg/ml d'acridine orange et 100 µg/ml de bromure d'éthidium que l'on va ajouter (3µl) juste avant de regarder les cellules, entre lame et lamelle, au microscope à fluorescence. On différencie facilement les YAC et les CTL parce que les YAC (même condensées) sont plus grosses que les CTL. Les cellules observées peuvent être, vivantes ou mortes (vertes ou oranges) ainsi que normales (chromatine avec une structure organisée) ou apoptotiques (chromatine condensée et/ou fragmentée et diminution de la taille de la cellule). On dénombre donc 4 groupes de cellules soit les viables normales, viables apoptotiques, mortes normales et mortes apoptotiques. Le nombre de cellules dans chacun des groupes est comptabilisé et on établit le pourcentage de cellules mortes et le pourcentage de cellules apoptotiques. Environ 200 cellules ont été dénombrées pour chaque échantillon.

$$\% \text{ cellules mortes} = \frac{(\text{mortes normales} + \text{mortes apoptotique})}{\text{nombre total de cellules}} \times 100$$

$$\% \text{ cellules apoptotique} = \frac{(\text{apoptotique vivante} + \text{apoptotique mortes})}{\text{nombre total de cellules}} \times 100$$

2.6. Dosage des nitrites

Pour confirmer la production de NO lors de la lyse des YAC-1 par les CTL nous avons mesuré les nitrites présents dans le surnageant après un essai de quatre heures. Les CTL étaient à une concentration de 100×10^6 cellules/ml (ratio effecteur:cible (E:C) 200:1) et nous utilisons 100 μ l de suspension pour l'essai. Nous avons utilisé le réactif de Griess (Green et al., 1982) qui contient 0.1% de naphthyléthylènediaminedihydrochloride, 1% sulfanilamide et 5% acide phosphorique. Les échantillons sont mis en présence du réactif dans des proportions égales (v:v) et laissés dix minutes à la température de la pièce et on lit l'absorbance à 490 nm avec un lecteur de microplaques. La concentration de NO a été calculée à partir d'une courbe standard de NaNO_2 . La limite de détection de cet essai est de 0,1 nmol/puit. Le coefficient de variation intra-essai était de 4.4% et le coefficient de variation inter-essai était de 40%.

2.7. Démonstration de l'expression de la NOS

Les protéines totales des CTL sont extraites à l'aide du tampon RIPA composé de PBS, 1% Triton X-100, 0.1% SDS (Bio-Rad) et 0.5% déoxycholate de sodium et contenant les inhibiteurs de protéases suivants: 100 mM d'orthoVanadate de sodium (Sigma), 30 μ l/ml d'aprotinine (Sigma) et 10 mg/ml PMSF (Sigma). Après une incubation de 30 minutes sur glace, les cellules sont passées dans une aiguille de 21 g et soniquées 30 secondes. On ajoute ensuite du PMSF (10mg/ml) avant d'incuber encore 30 minutes sur glace. Finalement, on centrifuge le tout à 15 000 g à 4°C pendant 20 minutes. On conserve le surnageant qui contient les protéines. Les échantillons ont été concentrés avec un concentrateur Centricon 30 (Amicon). 20 μ l de protéines à 2 mg/ml ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire ont été chargés sur un gel de polyacrylamide (Bio-Rad) 7.5% dans lequel on a fait passer un courant de 200 volts pendant 45 minutes. Les protéines contenues dans le gel ont été colorées à l'argent avec la trousse de Bio-Rad.

2.7.1. Transfert et révélation des protéines

Les protéines contenues dans le gel ont été transférées dans une membrane Zeta-Probe (Bio-Rad) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (Bio-Rad) pendant 20 minutes à 20 volts. La membrane a été bloquée dans une solution TBS-5% lait écrémé pendant une heure à 4°C. La membrane a ensuite été incubée avec un anticorps de lapin anti-iNOS de macrophages de souris soit dirigé contre la partie C terminale (Santa Cruz) ou contre la partie N terminale (Pharmingen) de la protéine, dilué (1 µg/ml) dans TBS-Tween-5% lait écrémé pendant 45 minutes à 4°C. La membrane a ensuite été lavée trois fois pendant dix minutes avec du TBS-Tween (Bio-Rad) à 4°C. On a ajouté le deuxième anticorps (chèvre anti-lapin) couplé à la peroxydase (Bio-Rad) et on a incubé pendant 30 minutes à 4°C. La membrane a encore été lavée trois fois dix minutes avec du TBS-Tween (Bio-Rad) et une fois avec du TBS toujours à 4°C. Le mélange réactionnel pour la peroxydase contenant 30 mg de 4-chloronaphtol, 30 ml méthanol, 40 ml TBS et 30 µl a ensuite été ajouté et incubé 30 minutes à température de la pièce.

2.8. Analyse statistique

Les valeurs illustrées sont la moyenne \pm l'erreur-type de n expériences. Une analyse de variance à deux critères de classification (two way ANOVA) a été faite sur les résultats de la figure 4. L'analyse statistique des données a été faite avec les tests non paramétriques de Freidman lorsque les échantillons étaient dépendant ou encore le test de Kruskal-Wallis (pour échantillons indépendants) suivi du test de Dunn de comparaison multiples, pour localiser les différences ou finalement le test de Wilcoxon pour les comparaisons pairées de deux groupes. Une valeur de P plus petite que 0.05 a été considérée comme significative pour tous les tests.

3.Résultats

3.1.Effets du L-NAME sur la lyse cellulaire des YAC-1 par les lymphocytes T cytotoxiques

Pour vérifier si le NO joue un rôle dans la lyse spécifique des YAC-1 par les CTL et par la même occasion vérifier la présence d'une monoxyde d'azote synthase chez les CTL, nous avons utilisé l'analogue de la L-arginine, le L-N^G-nitro-arginine-méthyl ester (L-NAME) pour bloquer l'enzyme NO synthase. Cet inhibiteur, malgré sa sélectivité pour la eNOS, agit également sur la iNOS et est largement utilisé comme inhibiteur non spécifique des NOS. Pour déterminer la concentration optimale de L-NAME à utiliser dans l'ensemble de nos essais, différentes concentrations de ce dernier ont été utilisées soit 0,5, 1 et 5 mmol/L, des concentrations qui ne sont pas toxiques pour les CTL (données non montrées). Nous avons observé à presque tous les ratios une diminution de la lyse spécifique en présence de 5 mmol/L de L-NAME alors que les concentrations 0,5 et 1 mmol/L n'avaient que des effets variables sur la lyse. La figure 4 nous montre en exemple la lyse spécifique des YAC-1 en présence de différentes concentrations de L-NAME et différents ratios effecteur : cible. La concentration de 5 mmol/L nous donnait l'effet optimal et une diminution significative (pour les trois premiers ratios) lorsque comparée au milieu sans inhibiteur alors que les autres concentrations ne donnait aucun résultat significatif. Seuls les trois premiers ratios sont illustrés pour la concentration 0,5 mmol/L car les essais ont donné des résultats inutilisables pour les plus petits ratios, de même seules deux expériences sur quatre ont pu être utilisées pour le ratio 200 : 1 et trois pour le ratio 100:1. La concentration de 10 mmol/L a aussi été essayée mais sans effet supplémentaire (données non montrées). Les essais subséquents seront donc effectués avec la concentration 5 mmol/L de L-NAME.

Les CTL lysent les cellules YAC-1 d'une manière qui dépend du ratio effecteur:cible, voir figure 4. En effet, la lyse spécifique augmente avec le ratio passant de 8 % au ratio 6:1 à 39% au ratio 200:1. Le L-NAME à la concentration 5 mmol/L cause une diminution de la lyse à tous les ratios (sauf 6:1). L'analyse des variances à deux critères de classification

démontre que le ration a un effet très significatif sur la lyse spécifique ($P < 0.0001$) et aussi que la concentration de L-NAME influence la lyse spécifique ($P < 0.0001$).

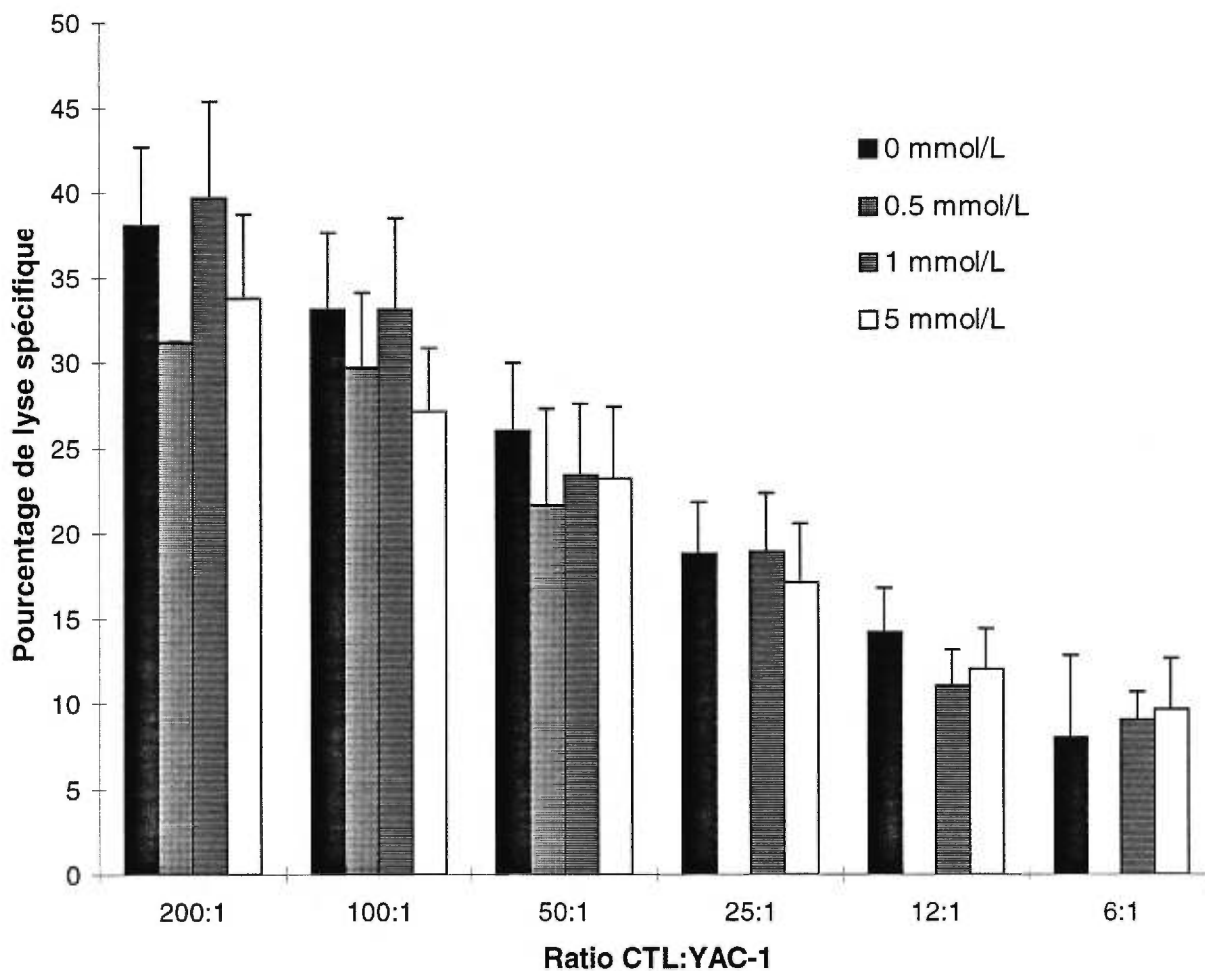


Figure 4. Effet du L-NAME et du ratio effecteur: cible sur la lyse spécifique

Les YAC-1 marquées au ^{51}Cr ont été incubées pendant quatre heures en présence (0.5, 1 ou 5 mmol/L) ou absence (0 mmol/L) de L-NAME et à différents ratios effecteurs: cibles. Les résultats sont la moyenne \pm erreur - type de cinq expériences (sauf 0.5 n=2,3 et 4) effectuées en triplicatas. Une analyse de variance à deux critères de classification (two way ANOVA) a révélé que le ratio avait un effet très significatif sur la lyse $P < 0.0001$ et que la concentration de L-NAME avait aussi un rôle significatif $P < 0.0001$.

Pour confirmer l'implication du monoxyde d'azote dans notre système, nous avons privé la NO synthase de son substrat soit la L-arginine au cours de la génération des CTL et aussi pendant l'essai de cytotoxicité. Pour ce faire nous avons utilisé du RPMI-1640 (Select Amine) auquel on pouvait ajouter sélectivement tous les acides aminés habituels tout en omettant l'arginine. Il est à noter que le RPMI-1640 ne contient pas d'ornithine ou de citrulline, les acides aminés à partir desquels il est possible à la cellule de synthétiser de la L-arginine. La seule L-arginine présente dans le milieu provenait donc du sérum de veau ajouté au milieu. On obtenait ainsi, une concentration de 10 $\mu\text{mol/L}$ de L-arginine. Ce même milieu a été utilisé durant les essais de cytotoxicité afin de maintenir la déplétion d'arginine. Le milieu déplété en arginine contenait 100 fois moins d'arginine que le milieu original (1.1 mmol/L).

La survie des CTL ne semblait pas affectée par la déplétion de L-arginine bien que leur prolifération ait été moins grande. En effet, la quantité de cellules recueillies après la culture dans le milieu déplété était moins grande (15-20 millions comparé à 25-30 millions dans le milieu complet), toutefois, la proportion de cellules colorées au bleu de trypan demeurait la même (moins que 5%) qu'avec les cellules cultivées dans un milieu de culture complet. Cette observation pourrait être liée au fait que dans certains cas le NO peut favoriser la prolifération des lymphocytes (Liew, 1995). La faible concentration de L-arginine pourrait aussi influencer à la baisse la croissance cellulaire, puisque cet acide aminé est impliqué dans plusieurs processus biochimiques, parmi lesquels le cycle de l'urée, la biosynthèse d'autres acides aminés et des polyamines. Le cycle de l'urée contient des enzymes capables de convertir la L-citrulline et la L-ornithine en L-arginine, mais ces réactions sont peu probables étant donné que le milieu utilisé ne contient aucun de ces acides aminés. La concentration en arginine du milieu n'est donc pas augmentée par le métabolisme des CTL. Au niveau fonctionnel, seule la cytotoxicité a été évaluée (figure 5).

Les CTL cultivés dans un milieu déplété en L-arginine démontrent une cytotoxicité moins importante que les CTL contrôles (figure 5) ayant un pourcentage de lyse spécifique de 25 % au ratio 200:1 comparé à 38 % pour le contrôle. Cette lyse spécifique est aussi inférieure à ce qu'on obtient avec les CTL en présence de L-NAME soit 33 % ($P < 0.05$),

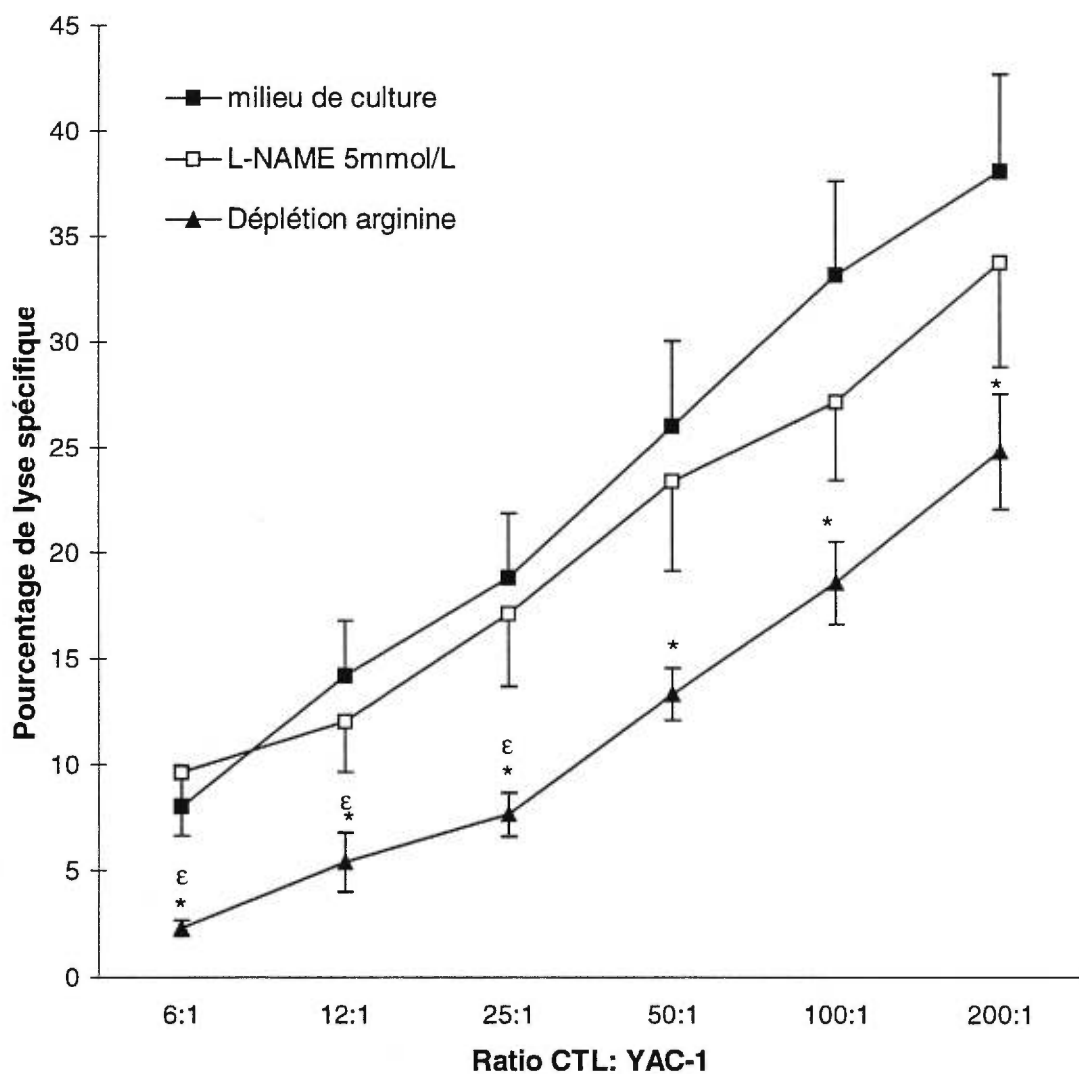


Figure 5. Effet de la déplétion en arginine sur la lyse spécifique des CTL

Les cellules YAC-1 marquées au ^{51}Cr ont été mises en contact pendant 4 heures avec des splénocytes incubés cinq jours, en absence ou présence de L-arginine, et avec des YAC-1 irradiées. Les résultats présentés sont la moyenne \pm erreur type de six expériences effectuées en triplicata. Le test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn a été réalisé. * $p < 0.05$ pour déplétion arginine comparé au contrôle (milieu de culture) et $\epsilon < 0.05$ comparé à 5 mmol/L L-NAME.

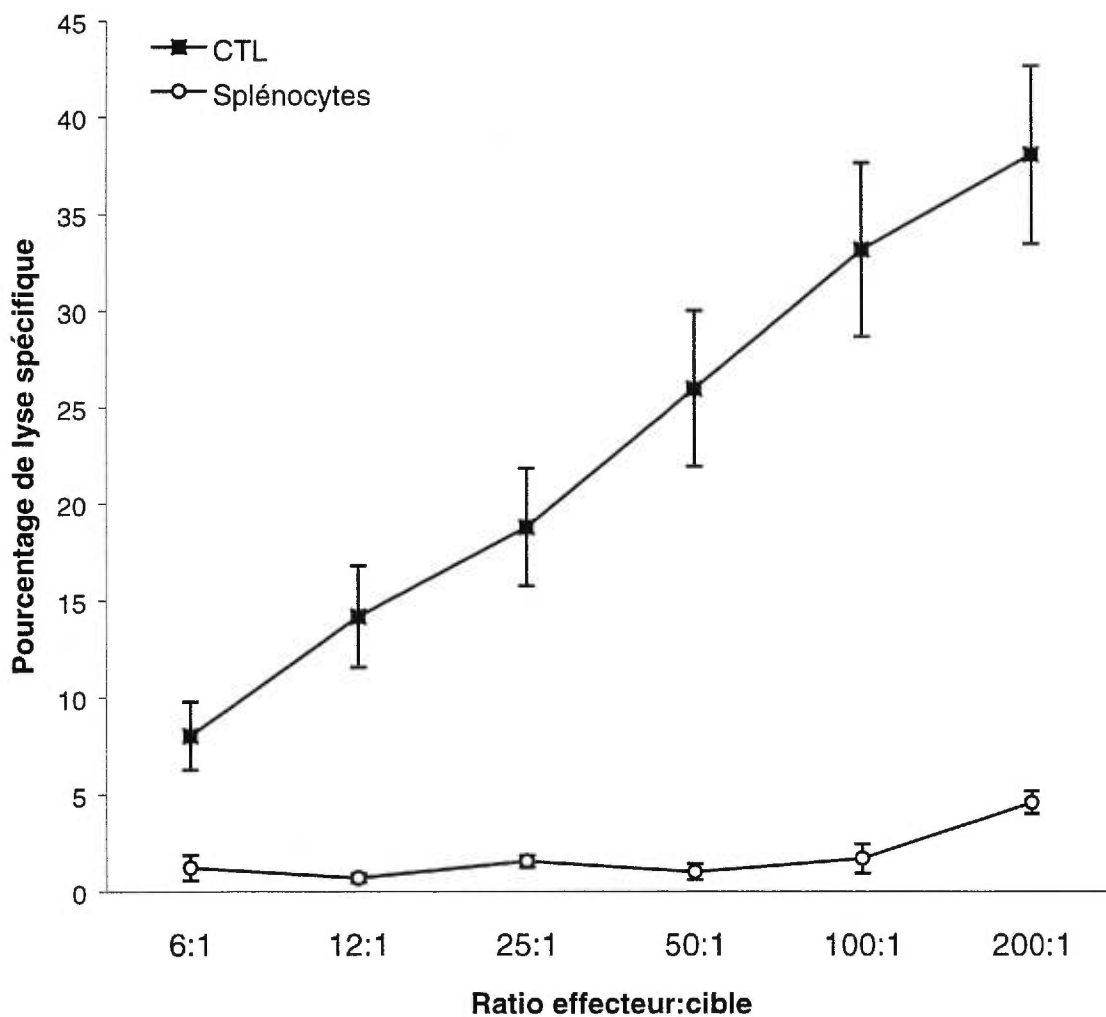


Figure 6. Lyse spécifique des splénocytes

Les YAC-1 marquées au ^{51}Cr ont été utilisées pour un essai CTL standard avec des splénocytes qui ont été cultivés cinq jours en absence de cellules stimulantes irradiées YAC-1. Les résultats sont la moyenne \pm erreur-type de six expériences effectuées en triplicata, $p < 0.01$ à tous les ratios selon le test de Mann-Whitney.

indiquant que la transformation de la L-arginine par la NOS est nécessaire à la cytotoxicité des CTL et aussi que l'inhibition de la NOS par 5mmol/L de L-NAME n'est pas complète. A tous les ratios le test de Kruskal-Wallis donnait un $p < 0.05$ et le test de comparaison multiple de Dunn donnait $p < 0.05$ pour le milieu déplété en arginine comparé au milieu contrôle. Une différence significative ($p < 0.05$) était notée entre 5 mmol/L de L-NAME et le milieu déplété en arginine seulement au ratio CTL: YAC de 25:1 et moins. Il est aussi à noter que la relation entre le ratio effecteur:cible et la lyse spécifique est maintenue, c'est-à-dire que la lyse augmente avec le ratio effecteur:cible.

La rate étant un organe gorgé de sang, elle peut contenir les différentes cellules sanguines par exemple les NK, monocytes/macrophages, neutrophiles ou lymphocytes T ou B. Pour exclure la possibilité que la cytotoxicité observée était due à un autre type de cellules cytotoxiques qui pourraient survivre à une culture de cinq jours, nous avons cultivé des splénocytes dans des conditions non stimulantes ne permettant pas la génération de CTL spécifiques aux YAC-1, c'est-à-dire en absence de cellules stimulantes. La génération de CTL nécessite la présence d'un antigène étranger et la culture de cellules de rate seules nous donnera donc après cinq jours, des splénocytes (contenant les mêmes cellules que la préparation de CTL) mais pas de CTL contre les YAC-1 puisqu'aucun antigène de ces derniers n'était présent. Nous obtiendrons ainsi la lyse spécifique qui n'est pas due aux CTL. Nous savons que notre préparation ne contient pas de monocytes/macrophages puisque ces dernières adhèrent au plastique des flasques de culture et que nous ne récupérons pas les cellules adhérentes. De plus, il est peu probable que ces cellules survivent cinq jours en culture puisqu'en général elles ne survivent pas plus de 24 à 48 heures en culture (Adams, 1979). Notons également qu'elles seraient facilement détectables au microscope en raison de leur grande taille et de leurs granules, si elles étaient présentes. Les cellules survivantes (viabilité évaluée au bleu de trypan) après l'incubation de 5 jours ont été utilisées pour faire un essai de cytotoxicité standard. Les pourcentages de lyse spécifique obtenus avec ces cellules (0,7 à 2,3 %) sont négligeables comparés à ceux obtenus avec les CTL (figure 6), confirmant ainsi que notre cytotoxicité est bel et bien due aux CTL et non aux autres cellules (lymphocytes T CD4, lymphocytes B par exemple) présentes dans la préparation.

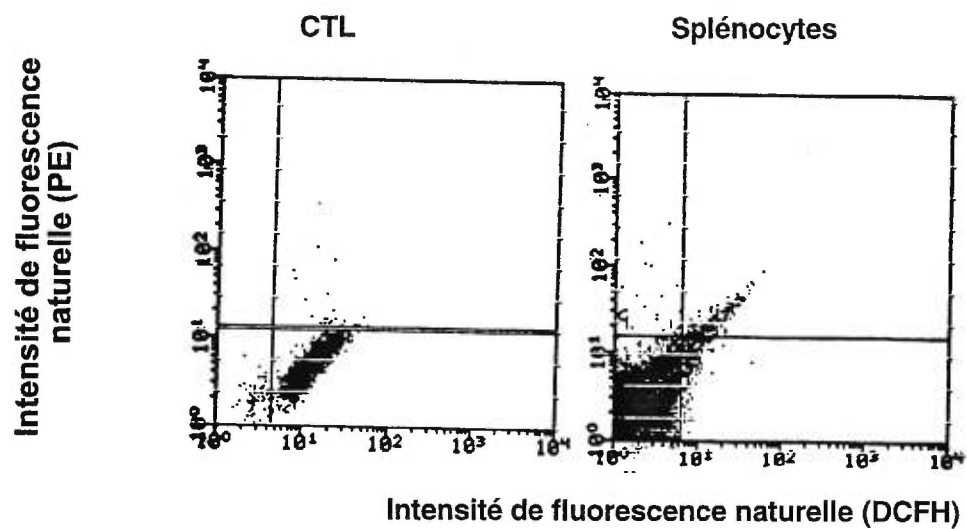
La population de cellules qui a été cultivée en présence de YAC-1 pendant cinq jours (CTL) contient 47,6 % de cellules CD8a⁺ et 0 % de cellules NK1.1⁺ (figure 7 C). La population cultivée en absence de YAC-1 pendant cinq jours (splénocytes) contient pour sa part 20,1 % de CD8a⁺ et 0,6 % de NK1.1⁺ (figure 7 C).

Les figures 7A et 7B présentent l'ajustement de l'appareil. Pour la figure 7A, l'appareil étant calibré pour lire la fluorescence du DCFH et du PE, la fluorescence naturelle des cellules non marquées avec un de ces colorants a été mesurée (abscisse: DCFH; ordonnée: PE). *Note: les CTL utilisé pour le contrôle étaient marqués avec DCFH. La figure 7B présente un contrôle positif pour la présence de NK.*

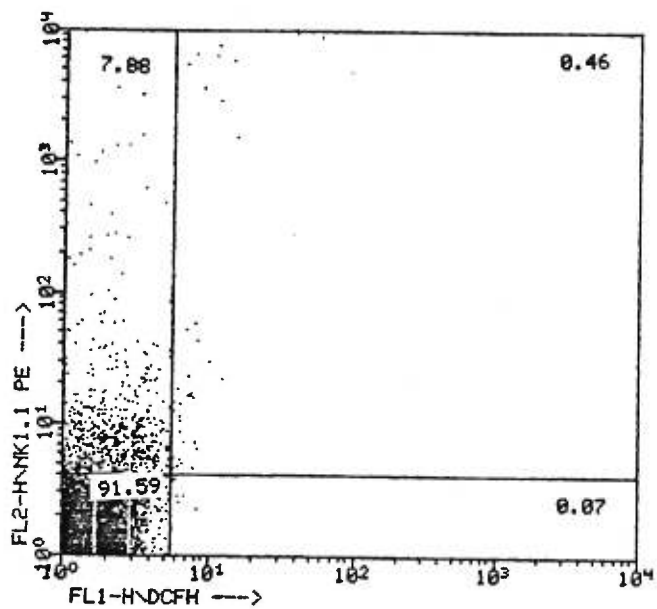
La population de CD8a⁺ contenue dans les splénocytes n'est cependant pas spécifique contre les YAC-1 car, premièrement ces cellules n'ont jamais été en contact avec des YAC-1 et deuxièmement lors de l'essai de cytotoxicité la lyse obtenue avec ces cellules est presque nulle (figure 6). On peut aussi observer par l'augmentation des pourcentages de cellules CD8a⁺ que la présence de cellules stimulantes lors de la culture de cinq jours favorise la différenciation et la prolifération des CTL. En effet, dans l'expérience présentée les CD8a⁺ passent de 20.1% dans les splénocytes à 47.6% dans les CTL.

Ces données avec celles de l'expérience précédente, nous permettent de conclure que l'activité cytotoxique observée avec notre préparation de cellules est due aux lymphocytes T cytotoxiques et non aux cellules NK ou autres cellules présentes dans la préparation.

A. Bruit de fond



B. Contrôle positif pour les NK



C. Phénotype

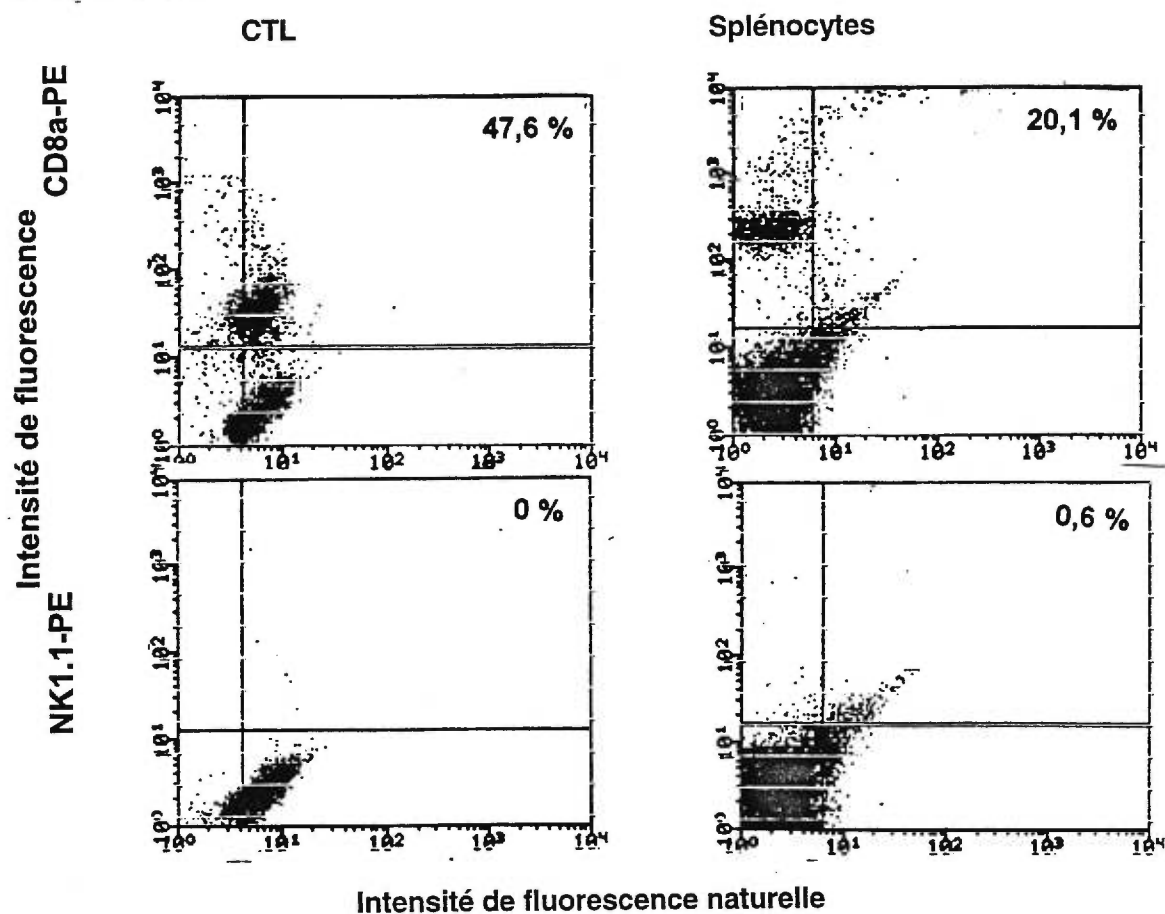


Figure 7. Phénotypes des populations CTL et splénocytes

A. Les CTL et les splénocytes à 10^6 millions/ml sans anticorps. **B.** Les NK proviennent de souris traitées au poly I:poly C et les cellules adhérentes sont été enlevées de la préparation. $300\mu\text{l}$ de NK ($10^6/\text{ml}$) ont été incubés avec $300\mu\text{l}$ de milieu de culture et $10\mu\text{l}$ d'anticorps NK1.1-PE. **C.** Les populations de cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-CD8a-PE ou anti-NK1.1-PE et analysées au FacScan. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences. Le terme "Fluorescence naturelle" représente la fluorescence émise par les cellules sans qu'elles soient marquées avec une molécule fluorescente, donc la fluorescence qu'elles émettent naturellement.

3.2. Production de nitrites

La figure 8 montre la production de nitrites par les CTL lors de l'attaque des cellules tumorales YAC-1. La mesure des nitrites est une méthode indirecte pour évaluer le NO puisque ces derniers sont les produits finaux de la réaction du NO avec l'oxygène. Comme contrôle, des YAC-1 ont été utilisés. La limite de détection de ce test était de 1 nmol/ puit. On a calculé des concentrations de NO de $0,54 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ au ratio effecteur:cible 200:1 (10×10^6 cellules), $0,32 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ au ratio 100:1, $0,14 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$ au ratio 50:1. La concentration de NO qui augmente avec le ratio effecteur:cible correspond avec l'augmentation de la cytotoxicité avec le ratio. Il y a en effet corrélation entre les deux car le r de Spearman est égal à 1 avec un $P=0.0004$. Ces données nous donnent un indice d'un rôle pour le NO dans la cytolyse des YAC-1 par les CTL. La courbe de la production de NO en fonction du ratio semble suivre plutôt bien une courbe logarithmique ($R^2=0.9584$). Il y aurait donc un lien entre le ratio, la production de NO et le taux de cytotoxicité des CTL.

3.3. Cytotoxicité du monoxyde d'azote (NO)

Nous avons évalué l'effet in vitro du NO généré chimiquement sur les cellules tumorales YAC-1 au niveau de la lyse spécifique. Pour ce faire, nous avons utilisé le nitroprusside de sodium (SNP), un composé chimique qui, lorsqu'il est dissout dans l'eau, libère du monoxyde d'azote (NO), qui deviendra des nitrites, et du ferricyanure. Nous avons établi une courbe dose-réponse de la cytotoxicité du NO sur les YAC-1. La figure 9 nous montre que la lyse spécifique des cellules YAC-1 causée par le NO est dose dépendante pour atteindre $32 \pm 1 \%$ à la concentration de SNP 50 mmol/L. L'utilisation du NaNO_2 et du $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ comme contrôles pour les nitrites et le ferricyanure nous démontre que la lyse causée par le SNP est bien due au NO et non aux autres produits de décomposition puisque ces derniers ne causent pas de lyse significative à toutes les doses.

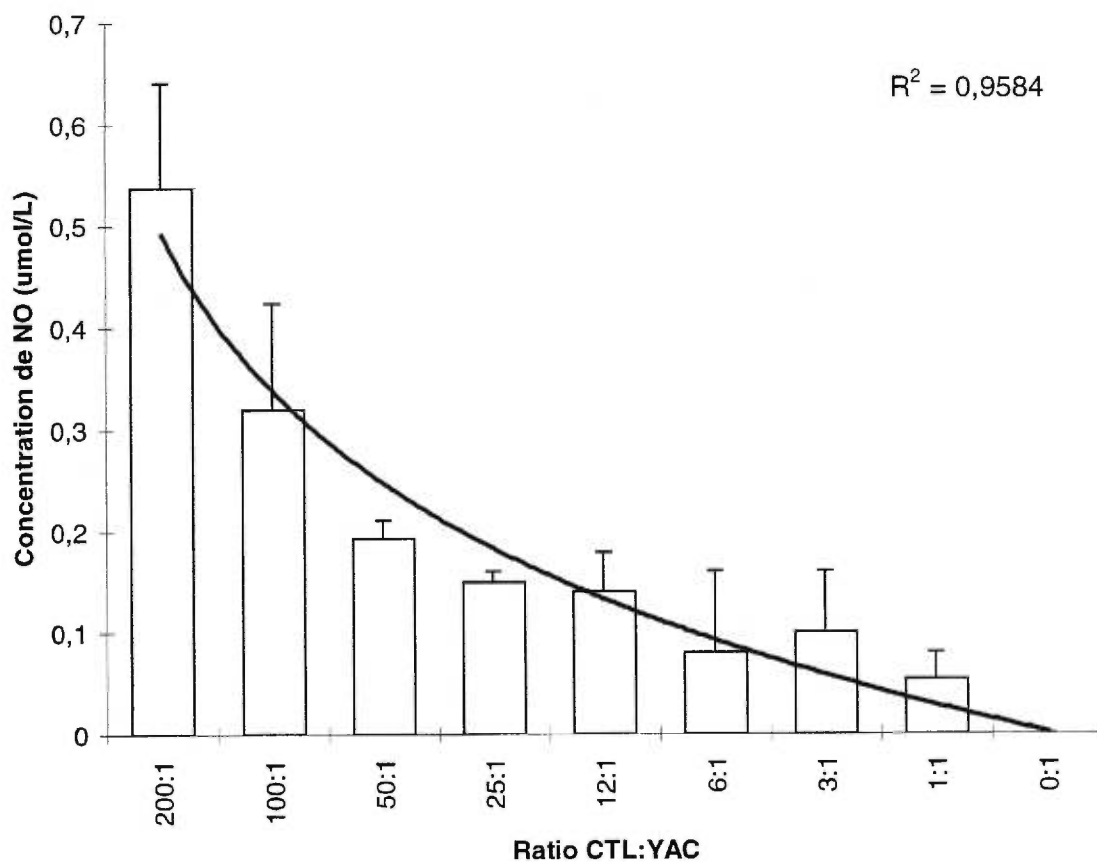


Figure 8. Production de nitrites par les CTL

Le NO produit par les CTL après l'incubation de quatre heures avec les YAC-1 à différents ratios ont été mesurés par la méthode de Griess. Les résultats sont la moyenne \pm erreur-type de deux à quatre expériences. La limite de détection est 1 nmol/puit. Le test de Spearman a été effectué avec un R^2 de 0.9584 et un $p < 0.01$.

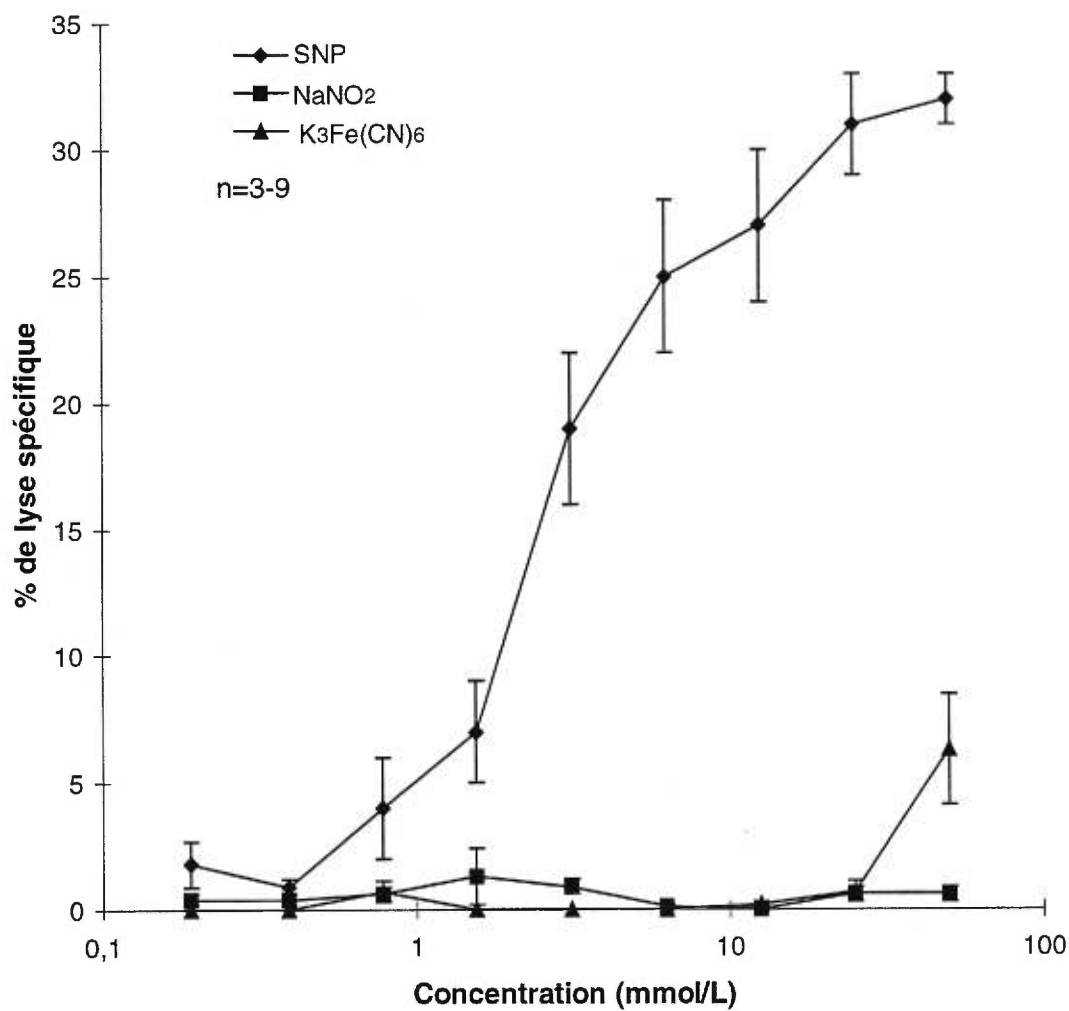


Figure 9. Courbes doses réponses de la lyse spécifique des YAC-1 pour le SNP
 Les cellules YAC-1 (2.5×10^6 /puit) marquées au ^{51}Cr ont été traitées avec des concentrations de nitroprusside de sodium, NaNO_2 ou $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ variant de 0,19 à 50 mmol/L. Les valeurs sont la moyenne \pm écart-type de trois-neuf expériences en triplicata .

3.4. Cytotoxicité et fragmentation de l'ADN par les CTL

Il est déjà connu que les CTL induisent la mort par apoptose de leurs cellules cibles (Berke 1994; Berke 1995). Il est aussi connu que le NO peut induire l'apoptose dans des cellules (Albina et al, 1993; Shimakoa et al., 1995, Cui et al., 1994 etc.). Pour vérifier si le NO joue un rôle dans l'apoptose induite par les CTL, nous avons mesuré dans le temps la fragmentation induite par les CTL en présence ou absence d'un inhibiteur de la NO synthase. Les expériences précédentes nous indiquent que le NO pourrait être produit par les CTL. Toutefois, elles n'indiquent pas à quel moment les effets du NO se font sentir puisque les données sont prises à un seul temps soit 4 heures. L'évolution dans le temps nous permettra de déterminer si les effets du NO sont plutôt précoces ou tardifs.

La figure 10 montre que la lyse et la fragmentation de l'ADN des YAC-1, aux ratios effecteur:cible 50:1, augmente avec le temps. Ce résultat est représentatif de tous les ratios. De plus, le pourcentage de fragmentation de l'ADN augmente avec le ratio effecteur:cible, passant de $45 \pm 5\%$ au ratio 6:1 à $73 \pm 2\%$ au ratio 200:1 (non montré). Notons qu'en tout temps et à tous les ratios effecteur:cible, pendant l'attaque des YAC-1 par les CTL, le pourcentage de fragmentation de l'ADN est plus grand que le pourcentage de lyse spécifique. De plus, la fragmentation de l'ADN a lieu à une vitesse plus grande que la lyse. Ces observations sont caractéristiques de la lyse cellulaire par les CTL (Duke et Cohen, 1986). On observe aussi que la fragmentation suit le patron typique de la fragmentation par les CTL, c'est-à-dire avec une augmentation rapide dès le début de la réaction pour ralentir par la suite. L'expérience a aussi démontré que le L-NAME (5mmol/L) diminue la lyse et la fragmentation de l'ADN, mais cette diminution n'est significative ($*p < 0.05$) qu'aux ratios 50:1 à 12:1 après 2 et 4 heures et au ratio 6:1 après 4 heures (résultats non montrés). Dans la plupart des cas, l'effet du L-NAME s'accroît avec le temps ce qui suggère que la cytotoxicité du NO est un événement relativement tardif de l'élimination par les CTL.

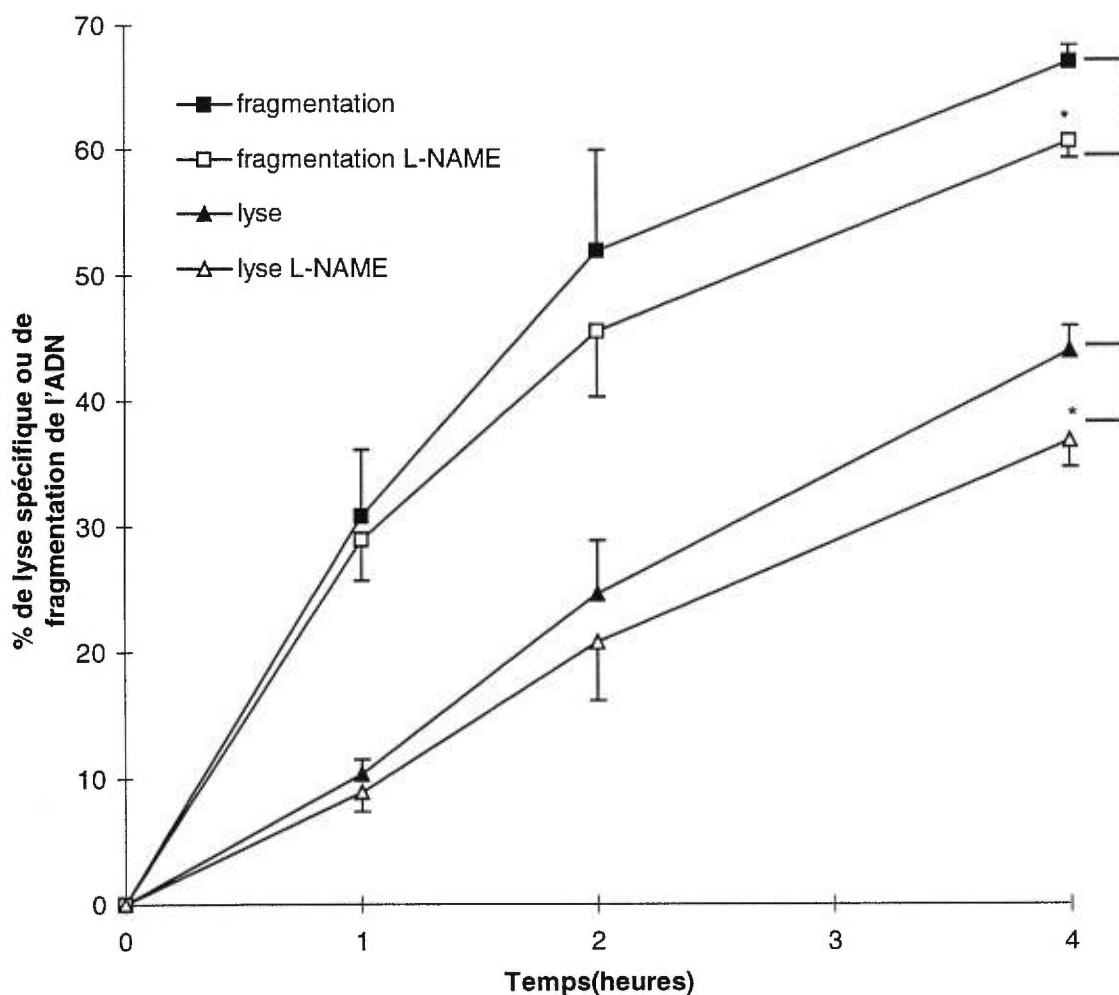


Figure 10. Évolution dans le temps de la lyse et de la fragmentation de l'ADN des cellules YAC-1 par les CTL

Les cellules ont été incubées pendant le temps indiqué aux différents ratios avec ou sans L-NAME 5 mmol/L. Les résultats présentés sont la moyenne \pm erreur-type de sept expériences effectuées en triplicata au ratio CTL: YAC 50:1. Le test de Wilcoxon a été réalisé * $p < 0.05$ comparé aux cellules non traitées. ■ Fragmentation de l'ADN,

□ Fragmentation avec L-NAME, ▲ Lyse spécifique, Δ Lyse spécifique avec L-NAME.

3.5. Analyse de la morphologie des YAC-1 lysées par les CTL

Pour s'assurer que la fragmentation de l'ADN des cellules cibles observées précédemment était de nature apoptotique, nous avons analysé la morphologie de ces dernières. Les cellules colorées avec un mélange d'acridine orange et de bromure d'éthidium ont été classifiées selon la morphologie de leur chromatine et leur viabilité. Les effecteurs et les cibles étaient différenciables grâce à leur taille, les YAC-1 étant plus grosses (même condensées) que les CTL. Les ratios 12:1 à 1:1 ont été utilisés dans cette expérience car avec les ratios plus élevés, il devenait plus difficile d'évaluer la morphologie des cellules car il y en avait trop et celles-ci s'empilaient. Cependant seuls les ratios 12:1 et 6:1 sont vraiment utiles car l'effet du L-NAME, sur la fragmentation et la lyse, à ces ratios a été démontré dans la section 3.4. La figure 11 montre des cellules typiques représentant les différentes morphologies observées. Il est à noter que ces photos ne sont pas des résultats expérimentaux mais des exemples des différentes morphologies observées.

La figure 12 nous montre qu'on obtient des pourcentages d'apoptose qui varient de 12 ± 5 % au ratio effecteur:cible 1:1 à 17 ± 4 % au ratio 12:1. On observe également, à tous les ratios utilisés, une diminution significative de l'apoptose (5 ± 1 et 8 ± 1 pour ratio 1:1 et 12:1 respectivement) par l'utilisation de l'inhibiteur de la NOS le L-NAME à la concentration 5 mmol/L. En ce qui concerne la lyse cellulaire, on obtient des pourcentages qui varient de 31 ± 15 au ratio 1:1 à 36 ± 10 % au ratio 12:1. La réduction de la mort cellulaire et de l'apoptose est significative ($p < 0.05$) aux ratios 6:1 et 3:1 lorsqu'on utilise le L-NAME. Il semble donc que les CTL induisent l'apoptose dans les cellules tumorales YAC-1 et que le NO joue un rôle dans cette induction. Les cellules YAC-1 incubées seules démontraient une mortalité et une morphologie apoptotique nettement inférieures aux cellules incubées en présence de CTL, de plus le L-NAME n'a eu aucun effet sur ces cellules. Il est à noter qu'on observe des pourcentages d'apoptose beaucoup plus faible que les pourcentages de fragmentation de l'ADN obtenus précédemment et que contrairement à l'étude précédente (où la fragmentation était plus grande que la lyse), le nombre de cellules mortes est supérieur au nombre de cellules apoptotiques. Nous expliquerons cette discordance dans la discussion.

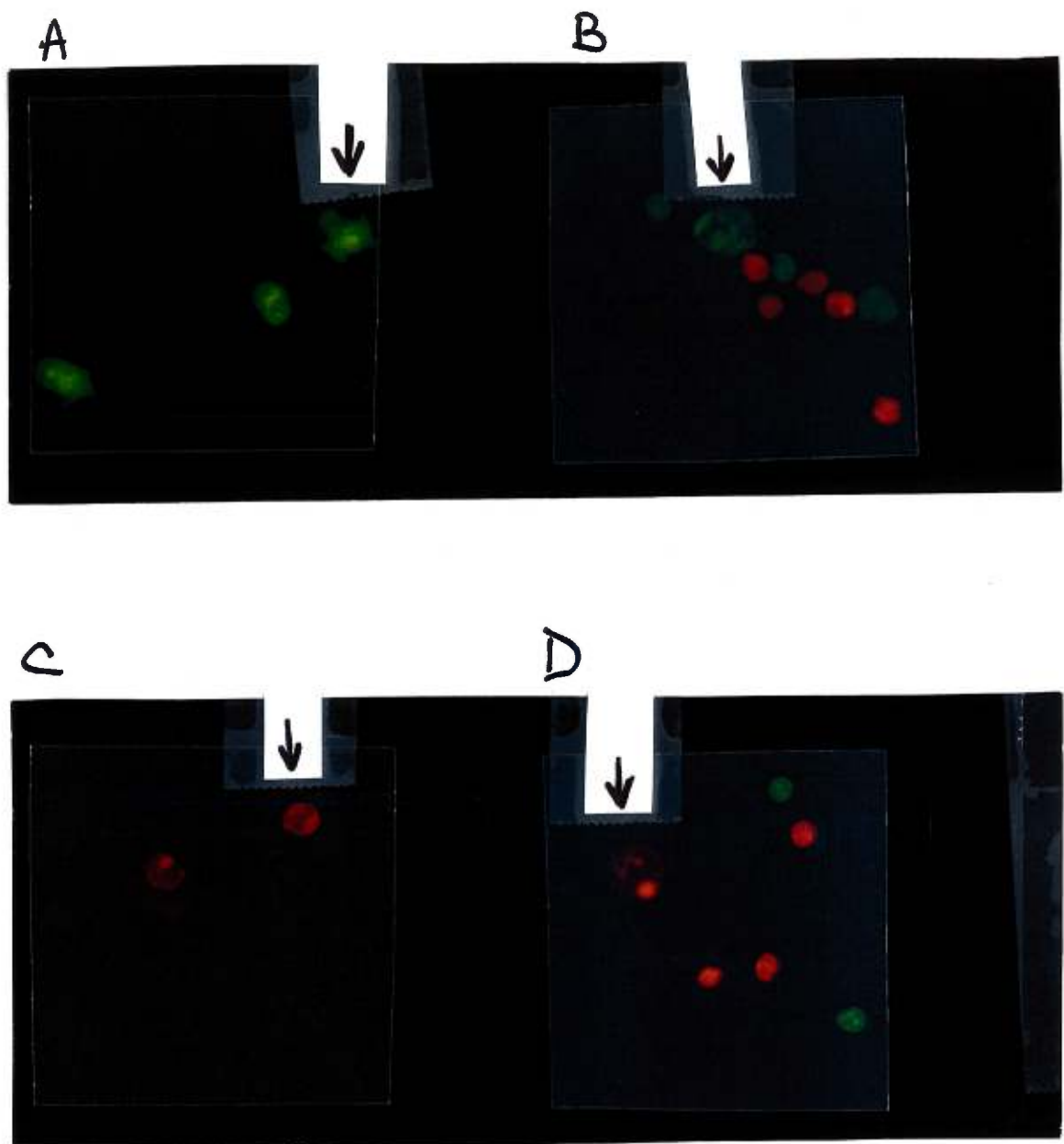


Figure 11. Morphologie des cellules YAC-1 après la réaction avec les CTL

Les YAC-1 et les CTL ont été incubés pendant quatre heures. Après centrifugation, les cellules ont été colorées avec un mélange d'acridine orange et de bromure d'éthidium. A. YAC-1 vivante apoptotique, B. YAC-1 vivante normale, C. YAC-1 morte normale D. YAC-1 morte apoptotique.

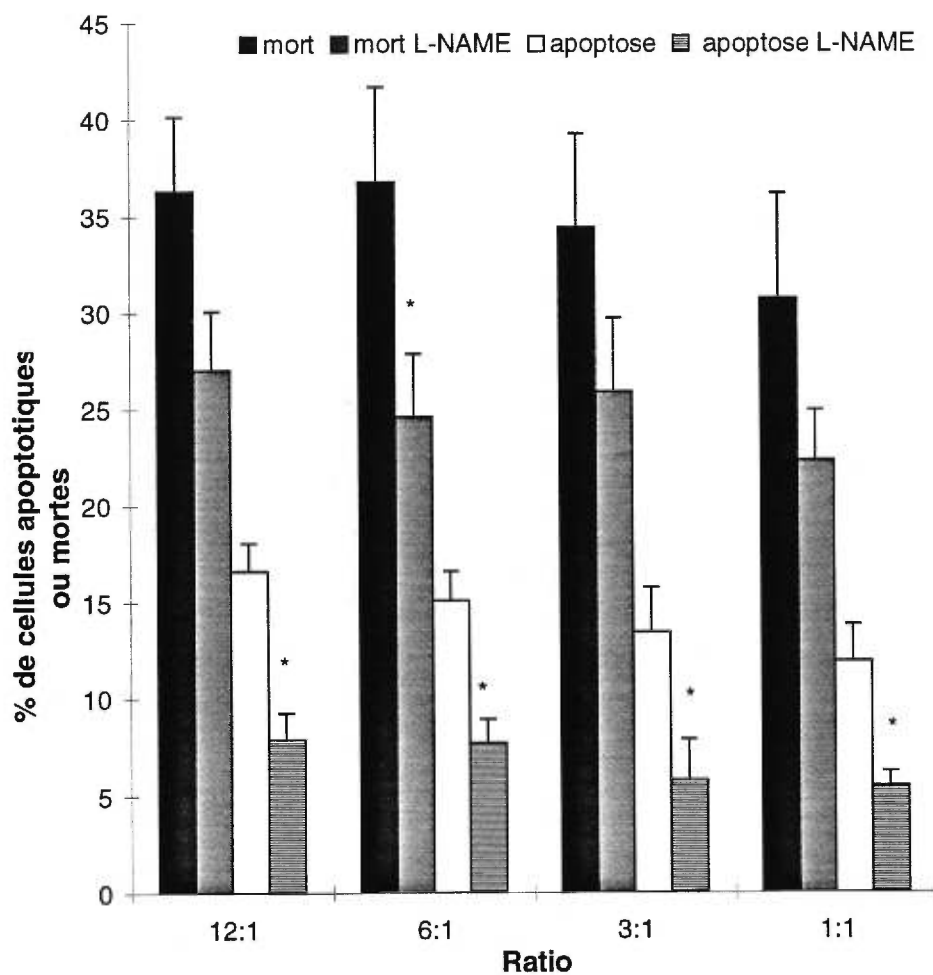


Figure 12. Rôle du NO dans l'induction de l'apoptose dans les cellules YAC-1 par les CTL

Les cellules YAC-1 et les CTL ont été incubées pendant quatre heures et aux ratios indiqués avec ou sans L-NAME 5mM. Les cellules ont été comptées selon leur morphologie au microscope à fluorescence. Les résultats présentés sont la moyenne \pm erreur-type de six expériences en duplicata. Le test de Wilcoxon a été réalisé * $p < 0.05$.

3.6. Analyse sur gel de la fragmentation de l'ADN induite par les CTL

Comme preuve supplémentaire pour supporter les résultats indiquant que la fragmentation de l'ADN dans notre système est de type apoptotique, une électrophorèse sur gel a été effectuée. L'ADN contenu dans le surnageant après la centrifugation de 13 000 g a été précipité et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. La présence d'une échelle de fragments ayant des longueurs multiples de 200 paires de bases sur le gel est un indice d'apoptose. Dans la figure 13 on observe que les YAC-1 (5×10^4 /puit) incubées seules ne montrent pas de fragmentation alors qu'on observe à tous les ratios utilisés, une fragmentation de l'ADN de type apoptotique. La colonne CTL montre l'ADN des lymphocytes incubés seuls pendant le même temps. Ces résultats s'expliqueraient par le fait que les CTL étaient activées par l'incubation de cinq jours, et la production de médiateurs toxiques auraient causé leur mort. Le L-NAME semble avoir un effet sur la fragmentation, mais l'évaluation de cet effet est difficile à évaluer précisément dans ces conditions.

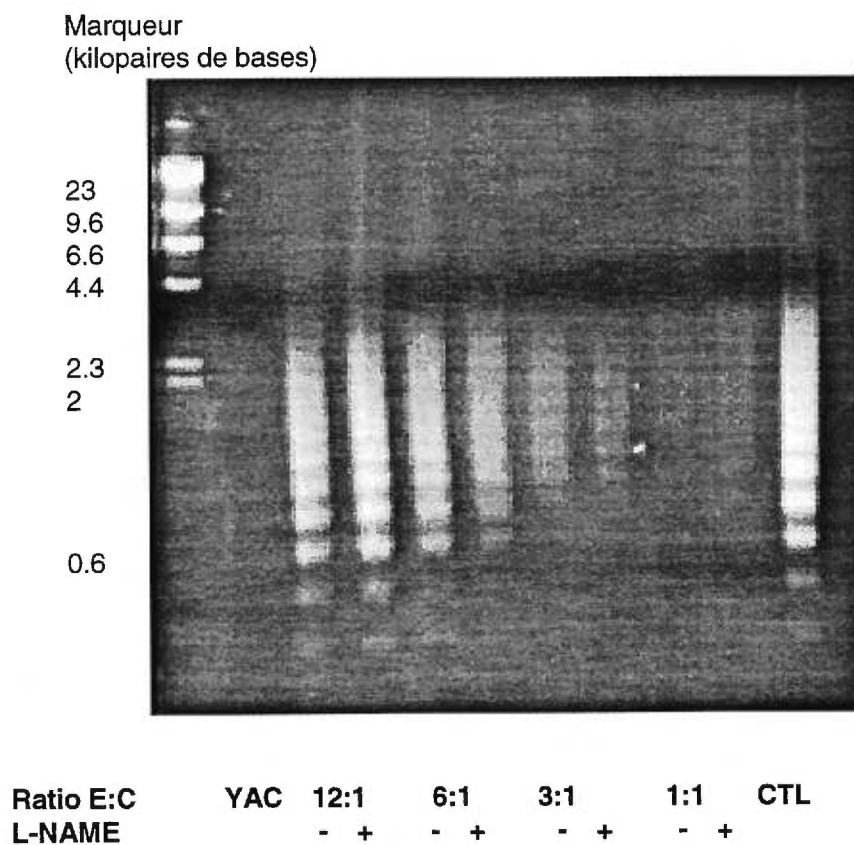


Figure 13. Preuve moléculaire de l'apoptose

Après une incubation des CTL avec des YAC en présence ou en absence de L-NAME (5 mmol/L), l'ADN précipité du surnageant de 13 000 g a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences.

3.7. Induction d'une nouvelle protéine dans les lymphocytes T cytotoxiques

Les expériences précédentes semblent indiquer un rôle du NO dans la lyse des YAC-1 par les CTL. La présence de NO implique une activation de la NOS. Dans notre système nous nous attendons à retrouver l'isoforme inducible. Pour apporter une preuve supplémentaire de l'induction de la iNOS lors de la lyse des YAC-1 par les CTL, nous avons tenté de démontrer sa présence par immunotransfert. Malheureusement, pour des raisons qui seront abordées dans la discussion, nous n'avons pu y parvenir avec la révélation par les anticorps. Nous avons toutefois pu démontrer l'induction d'une nouvelle protéine de poids moléculaire élevé lors de la réaction des CTL avec les YAC-1. Le poids moléculaire approximatif de cette protéine est de 160 kDa, un poids voisin de celui démontré des monomères de la NOS qui sont de 150 à 160 kDa. Cette protéine, absente des splénocytes, apparaît dans la préparation de CTL. La quantité de cette protéine semble toutefois assez faible comparé aux autres protéines si on en juge par l'intensité des bandes.

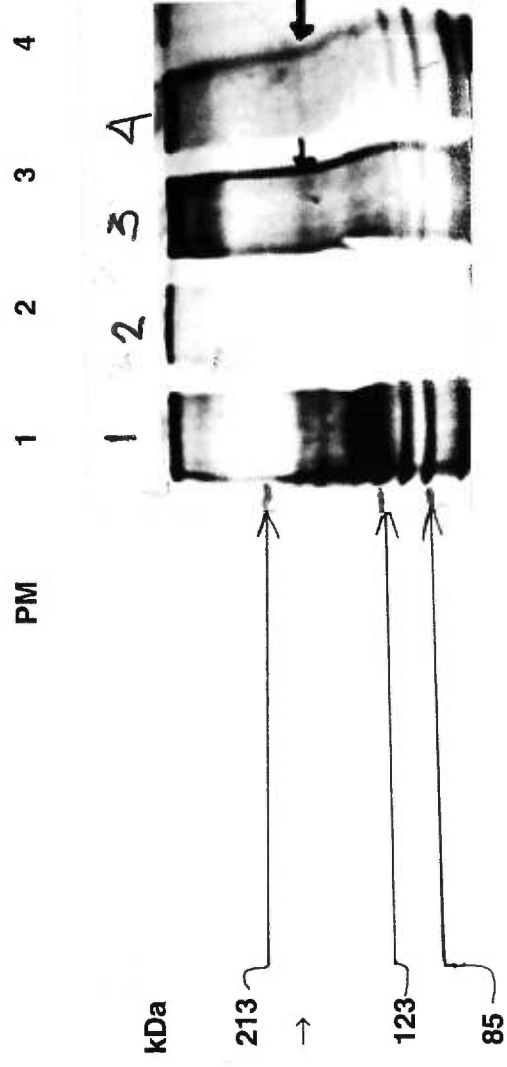


Figure 14. Induction d'une nouvelle protéine dans les CTL

Les protéines ont été extraites de cellules YAC-1 (1), de splénocytes (2), des CTL (3) ou de CTL après incubation de quatre heures avec les YAC-1(4). Les extraits ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant. → = nouvelle protéine induite. PM = marqueur de poids moléculaire (kDa).

4. Discussion

Les données présentées ici fournissent des preuves que le NO et la NO synthase pourraient avoir un rôle dans la lyse, la fragmentation de l'ADN et la mort par apoptose des cellules de lymphomes murins YAC-1 induites par les lymphocytes T cytotoxiques. Tout d'abord, l'utilisation d'un inhibiteur de la NO synthase diminue significativement la lyse et la fragmentation de l'ADN par les CTL (environ 15% en moyenne). Deuxièmement, on a mesuré une accumulation de NO dans le milieu de culture suivant un essai de cytotoxicité et le NO produit chimiquement induit la lyse des cellules YAC-1. La fragmentation de l'ADN des YAC-1 par les CTL est de nature apoptotique tel que montré par microscopie à fluorescence et électrophorèse sur gel d'agarose. Enfin, l'incubation de CTL en compagnie des cellules YAC-1 augmente l'expression d'une protéine d'un poids moléculaire voisin de celui de la NO synthase.

Les CTL lysent les YAC-1 d'une façon qui est reliée au ratio effecteur:cible. En effet, le pourcentage de lyse spécifique augmente lorsque le ratio effecteur:cible augmente. Lors de l'utilisation du L-NAME cette relation est maintenue et on observe à tous les ratios, sauf 6:1, une diminution de la lyse spécifique par rapport à l'essai ou le L-NAME est absent. Cette diminution est significative aux ratios 200:1, 100:1 et 50:1 seulement. Ce résultat pourrait peut-être s'expliquer par une utilisation différente, par les CTL, des différents mécanismes de lyse (NO, perforine, granzyme, Fas) dépendamment du ratio effecteur:cible. Afin, de confirmer l'implication du NO dans ce système, nous avons effectué des essais en déplaçant la L-arginine dans le milieu de culture. La lyse spécifique obtenue dans ces conditions est significativement inférieure (aux ratios effecteur:cible 100:1 à 12:1) à la lyse obtenue avec les CTL cultivés dans le milieu original. Le fait que la génération de CTL et l'essai de cytotoxicité dans un milieu déplété en L-arginine résultent en une diminution importante de la lyse spécifique par les CTL est conforme avec l'hypothèse que l'effet du L-NAME vient de l'inhibition de la NO synthase (Rees et al., 1990). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Xiao et al. (1995) et Filep et al. (1996), qui obtenaient une diminution significative de la lyse spécifique lors d'essais cytotoxiques avec des milieux déficients en L-arginine. Bien que ces derniers

étudiaient les cellules NK et non les CTL, la parallèle est intéressante puisque ces deux types de cellules sont impliqués souvent dans les mêmes réactions immunitaires et que leurs mécanismes d'action sont similaires (Granzyme, perforine, ligand Fas).

L'inhibition de la lyse est significative à tous les ratios effecteur:cible en déplaçant l'arginine alors qu'en utilisant le L-NAME seuls quelques ratios étaient inhibés (200:1 à 50:1). Pour les ratios de 25:1 et moins il y a aussi une différence significative entre les essais en présence de L-NAME (5 mmol/L) et les essais avec la déplétion en arginine. Plusieurs explications sont possibles pour ces observations. La première étant qu'en ayant beaucoup moins d'arginine dans le milieu l'inhibition de la NOS est plus complète et la lyse beaucoup moins qu'avec le L-NAME. Il est aussi possible que la déplétion en arginine, lors de la génération des CTL, ait influencé la croissance des CTL, car le NO peut influencer la prolifération des CTL (Liew et al., 1995). Suite à cette prolifération moins importante, la proportion de CTL dans la préparation cellulaire pourrait être moindre, expliquant la plus faible lyse obtenue. Il aurait été intelligent de vérifier cette hypothèse en passant un échantillon des CTL qui ont poussé en déplétion d'arginine dans le FACS avec l'anticorps anti CD8a afin de vérifier leur proportion dans la population de cellules. Il est aussi possible que la déplétion en arginine ait affecté d'autres fonctions (cycle de l'urée, synthèse de polyamines etc.) en plus de la synthèse de NO. La perturbation de ces fonctions pourrait expliquer que la diminution de la lyse est significative à tous les ratios alors qu'en utilisant le L-NAME seuls les trois plus gros ratios sont inhibés significativement. Toutefois, la viabilité des lymphocytes n'a pas été affectée par la déplétion en arginine puisque les décomptes au bleu de trypan ont donné des viabilités supérieures à 95% dans tous les cas. Il ne semble donc pas que des fonctions vitales pour les CTL aient été affectées par la déplétion en arginine. Il semblerait donc que la diminution de la lyse est due à l'inhibition de la NOS. De plus, il est peu probable que le manque d'arginine en lui-même ait causé du tort aux cellules YAC-1 puisque d'autres essais, où seule l'incubation de 4 heures avait lieu dans un milieu déplété en arginine, ont donné des résultats similaires aux essais qui avaient lieu dans le milieu normal. C'est donc sur les CTL que la déplétion en arginine a un effet, puisqu'ils ont été incubés pendant cinq jours dans ce milieu, et il est vraisemblable que la NOS soit impliquée.

Comme indice supplémentaire d'une implication du NO dans la cytotoxicité des CTL nous avons mesuré les nitrites dans notre milieu réactionnel. Les concentrations de nitrites diminuent lorsque nous diminuons le ratio effecteur :cible. La relation entre le NO produit et le nombre de CTL présentes semble suivre une équation du second degré puisqu'une régression non linéaire sur nos données nous donne un r très significatif. La relation n'est donc pas de type linéaire et la quantité de NO produit diminue rapidement avec le nombre de cellules. Les cellules YAC-1 elles-mêmes n'ont pas donné d'indice de production de NO, même si la production de NO par certaines cellules tumorales est documentée (Tucker et al., 1991; Fast et al., 1992; Konur et al., 1996). Le NO mesuré provient donc des CTL présentes dans l'essai. De plus, une corrélation importante entre le niveau de cytotoxicité et la concentration de NO a été calculée.

Si l'on compare la production de NO dans notre système avec un autre similaire mais impliquant les cellules NK, on remarque que ces dernières produisent des concentrations supérieures de NO (60 $\mu\text{mol/L}$) (Filep et al, 1996), de plus la diminution de la lyse spécifique par le L-NAME est de 24-36% comparée à 15-22% avec les CTL ce qui indiquerait une intensité plus grande de la voie lytique du NO dans les cellules NK que dans les CTL.

Pour confirmer que la lyse cellulaire des YAC-1 peut être induite par le NO nous avons utilisé une source chimique de NO, le nitroprusside de sodium (SNP), qui relâche du NO de façon continue une fois qu'il est dissous (Feelisch et Noack, 1987). Cette expérience nous a démontré que la lyse des YAC-1 par le NO après une incubation de 4 heures est dépendante de la dose de SNP utilisée. Cette expérience nous permet aussi de constater qu'une concentration plus élevée de NO généré chimiquement est nécessaire pour obtenir la même lyse spécifique due au NO que dans un essai CTL. Par exemple pour obtenir une lyse de 5-10% due au NO (différence 5-10% de lyse spécifique causée par le L-NAME), il faut utiliser une dose de SNP d'environ 1 mmol/L. A cette concentration le SNP libère 0,1 $\mu\text{mol/L/minute}$ de NO (Feelisch et Noack, 1987). On obtient donc au bout de 4 heures une concentration de 24 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu de culture. En comparaison, au ratio E:C 200:1, on a 5,7% de lyse attribuable au NO et à ce ratio, la concentration de NO dans le milieu après 4 heures est de $0,54 \pm 0,21 \mu\text{mol/L}$. Les CTL ont donc besoin

de 44 fois moins de NO pour obtenir une lyse cellulaire comparable. Une hypothèse pour expliquer cette différence est que la lyse par le NO se fait dans un espace scellé, créé par les molécules d'adhésion, entre le lymphocyte et la cellule cible comme par exemple, dans les mécanismes impliquant perforine, granzymes et Fas (voir section 1.2.1). Dans ce cas, les CTL libéreraient le NO d'une manière très concentrée et dirigée de façon très précise sur la cible (peut-être à l'aide de protéines transporteuses), alors que le SNP libère le NO d'une manière diffuse (dans toutes les directions). Lorsque les cellules se séparent après la lyse, les nitrites produits sont relâchés dans le milieu et de ce fait dilués, d'où la faible concentration mesurée lors de nos expériences. Ces résultats pour les CTL sont aussi différents des résultats obtenus avec les cellules NK, car la concentration nécessaire de NO chimique pour obtenir un effet donné était la même que celle mesurée dans le surnageant. Ceci suggère que l'amplitude des effets du NO est différente dans chacun des types cellulaires. Il est possible que le NO produit par les CTL serve de déclencheur pour une cascade amplificatrice, impliquant par exemple l'activation de kinases ou de l'expression de certains gènes, conduisant à la mort par apoptose. Ceci est d'autant plus plausible que plusieurs molécules influençant l'apoptose peuvent être régulées par le NO, ex. AP-1 (Colotta et al. 1992; Haby, 1994), les protéines kinases (Gopalakrishna et al., 1993; Pendino, 1993; Hale et al., 1996), p53 (Lowe et al., 1993; Meßmer et al., 1996) et Fas (Fukuto et al., 1996; Nagata et Goldstein, 1995; Oehm et al., 1992). Cette hypothèse est supportée par le fait que l'effet du NO se fait sentir tardivement.

Quelques équipes à ce jour ont mesuré le NO produit par des lymphocytes T. Par exemple, la lignée CTL-2 (lymphocytes T cytotoxiques de souris) synthétise une molécule ayant les propriétés biologiques du NO (Kirk et al, 1990), Langrehr et al. (1991) ont mesuré du NO dans une culture mixte de lymphocytes de rat. Kondo et al. (1993) ont mesuré du NO produit par des lymphocytes de rat stimulés à la concanavaleine A (ConA) pendant 3 jours. Les deux dernières équipes suggèrent que le NO inhibe la prolifération des lymphocytes. Dans d'autres expériences, avec les Th1 par exemple, l'inhibition de la synthèse de NO est en corrélation avec la diminution de la prolifération et de l'inflammation (Liew, 1994). D'autre part, Keller et al. (1990) et Thüring et al. (1995) ont conclu que les lymphocytes T, que ce soit des clones CD4⁺ ou CD8⁺ ne produisent pas

de NO après stimulation avec la ConA, anti-CD3 ou un antigène. Les différences entre ces études pourraient être attribuées aux conditions expérimentales comme le type de stimulation, les sous-populations de lymphocytes utilisées et le temps d'incubation en présence des stimulateurs. Aucune des ces équipes n'a cependant évoqué la possibilité que les CTL utilise une voie lytique dépendante du NO. Nos résultats sont en accord avec le premier groupe d'étude, parce qu'ils suggèrent eux aussi la biosynthèse de monoxyde d'azote par les lymphocytes T plus précisément par le sous-groupe cytotoxiques. La production de NO par les CTL concorde aussi avec le fait que dans les cas de réaction du greffon contre l'hôte on a une infiltration de CTL (Takata et al., 1993) et que d'autre part l'expression de la iNOS et la concentration de NO sont augmentées dans le sang d'animaux subissant une GvH (Drobyski et al., 1994). Nos résultats ne permettent cependant pas de déterminer si l'augmentation de la cytotoxicité est due à un effet direct du NO ou à un effet indirect passant par la stimulation de la prolifération des lymphocytes et la modulation de la synthèse de cytokines, inhibition de IL-2, IFN- γ et IL-3 ou stimulation de IL-1 α et TNF- α par les lymphocytes T (Marcinkiewicz et al, 1995). Il a aussi été démontré que le NO pouvait augmenter l'expression de la molécule Fas et, ce faisant, l'apoptose dans les muscles lisses vasculaire (Fukuto et al, 1996). Il serait donc possible que le rôle du NO produit par les CTL soit régulateur plutôt qu'effecteur. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant l'expression de la molécule Fas et les cytokines dans le milieu réactionnel.

Tel que montré par cytométrie en flux, notre préparation de cellules effectrices n'était pas composée à 100% de lymphocytes CD8⁺ (47-60% de CD8⁺), il y avait probablement des lymphocytes B, T CD4 etc. , nous ne pouvons cependant l'affirmer avec certitude puisque nous n'avons pas établi le phénotype complet de la population. Toutefois, la présence de cellules NK qui présentent une cytotoxicité importante à l'égard des YAC-1, a été exclue à l'aide d'un anticorps NK1.1 et de la cytométrie en flux. Il a été assumé que les monocytes/macrophages n'ont pas survécu à la culture de cinq jours, car ces derniers à moins de conditions très particulières ne survivent pas plus de 24-48 heures en culture (Adams, 1979). D'autre part, la cytotoxicité spontanée dans lymphocytes B et des T CD8 n'est pas assez important pour avoir influencé les résultats obtenus. Les interférences les

plus inquiétantes aurait pu provenir des monocytes et NK et l'absence de ces deux type a été vérifiée(indirectement pour les monocytes).

Dans l'essai montrant l'évolution dans le temps de la lyse spécifique et de la fragmentation de l'ADN nous pouvons observer l'augmentation rapide de la fragmentation de l'ADN qui est caractéristique de la fragmentation par les CTL (Duke et al, 1989). La libération du ^{51}Cr se fait de façon moins rapide et moins importante, ce qui indique que la fragmentation de l'ADN a lieu avant la lyse de la cellule cible. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Duke et al. (1986) qui démontraient les évolutions différentes de la lyse par les CTL et les NK sur une même cellule cible. On observe aussi que la différence entre la lyse et la fragmentation diminue lorsque le ratio effecteur:cible diminue. De plus, la forme générale des courbes de lyse et de fragmentation tend à se ressembler lorsque le ratio diminue, alors qu'aux ratios élevés la rapidité de la fragmentation par rapport à la lyse est évidente. La lyse (ratio 50:1 à 6:1) et la fragmentation (ratio 50:1 à 12:1) sont significativement modifiées par la présence de L-NAME au temps deux et quatre heures, et la diminution est la plus prononcée dans les deux cas après quatre heures d'incubation. Ceci suggère que la fragmentation et la lyse causées par le NO sont des événements tardifs de la l'élimination par les CTL. Ces données sont en accord avec celles de Shresta et al. (1995) qui ont démontré que le granzyme B est responsable de l'induction rapide de la fragmentation de l'ADN, et que le défaut de causer la fragmentation des CTL déficients en granzymes pouvait être compensé en augmentant le temps d'incubation des cellules effectrices avec leurs cibles, suggérant l'existence d'une voie lytique tardive. Nos résultats suggèrent que l'un des acteurs de cette voie tardive pourrait bien être le NO. Cela concorde avec les données de Filep et al. (1996) qui proposent, dans le cas de la cytotoxicité des cellules NK, que le NO serait un des joueurs de la cytotoxicité tardive. D'autre part, on remarque que la fragmentation est toujours plus élevée que la lyse spécifique lorsque les CTL attaquent les YAC-1. Cette observation pourrait indiquer que lorsque les CTL attaquent les YAC-1, la fragmentation de l'ADN précède la lyse de la cellule. Ce résultat est différent de celui obtenu avec les NK, où la fragmentation de l'ADN et la lyse spécifique sont à peu près similaires, et ce, à tous les temps (Filep et al, 1996). Cette observation

indique une différence dans les voies induisant la fragmentation de l'ADN chez les NK et les CTL.

Le pourcentage de lyse spécifique est similaire pour les NK et les CTL dirigées contre les YAC-1, et ce à tous les ratios. Par exemple au ratio effecteur:cible 200:1, 45% pour les NK (Filep et al., 1996) contre 38% pour les CTL (figure 7). Mentionnons toutefois que ce ratio (200:1) est considéré très élevé et qu'il est peu probable qu'un tel rapport effecteur:cible soit observé in vivo. Ceci est contraire aux résultats obtenus par Duke et al. (1986) qui obtenaient une lyse spécifique plus importante avec les CTL qu'avec les NK. Cette différence pourrait s'expliquer par les conditions différentes utilisées pour la génération de CTL. Le pourcentage de lyse spécifique des YAC-1 par les CTL obtenus dans cette étude est plus faible que celui obtenu dans certaines études où des CTL de souris C57Bl/6 ont été utilisées contre des YAC-1. Par exemple Duke et al. (1986), obtiennent 60% de lyse spécifique au ratio 50:1, en utilisant des cellules de souris A/J comme stimulantes, alors que nous obtenons 26% au même ratio. D'autre part, la lyse spécifique des YAC-1 par les CTL, en utilisant des cellules DBA/2 (H-2^d) comme stimulantes, est d'environ 10% au ratio E:C 50:1 (Susskind et al., 1990). Il est logique que notre pourcentage de lyse spécifique se situe entre ceux obtenus dans ces études parce que Duke et al., utilisent les cellules stimulantes présentant le plus d'antigènes de classe I (cellules de souris A/J d'où proviennent les YAC-1), nous utilisons des cellules stimulantes qui en expriment moins, alors que Susskind et al, ont des cellules stimulantes qui n'ont pas le même phénotypes que les YAC-1 (H-2^a). De plus, Susskind et al, utilisent comme cible une variante de la lignée YAC-1 qui n'expriment pas la molécule H-2D^d ce qui diminue encore plus ses chances d'être reconnue.

Le gel d'agarose nous montre la fragmentation de l'ADN des YAC-1 ayant été attaquées par les CTL. On remarque aussi que les CTL ont également un ADN fragmenté et que la fragmentation est de type apoptotique. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait qu'en incubant les lymphocytes avec les YAC-1 pour la génération de CTL, on active ces derniers. En présence de cibles, un CTL activé va s'attaquer à cette dernière. Toutefois, lorsqu'une cible n'est pas présente, le CTL activé va s'auto-détruire, probablement via la molécule Fas (Klas et al., 1993), qui est fortement exprimée sur les lymphocytes T

activés, car il est dangereux pour l'organe dans lequel il est présent. Ainsi, l'incubation de nos CTL seuls, causera leur mort par apoptose. Bien que les CTL subissent aussi l'apoptose on sait que l'ADN fragmenté observé dans les autres colonnes provient bien des YAC-1 parce que le marquage à la ^{125}I -déoxyuridine nous indique une fragmentation de l'ADN des YAC-1, dans cette expérience on n'observe pas la fragmentation des CTL car leur ADN n'est pas marqué radioactivement.

La fragmentation de l'ADN des YAC-1 causée par le NO est de type apoptotique comme le démontre le gel d'agarose illustrant la fragmentation en oligonucléosomes de l'ADN, ainsi que l'analyse par microscopie à fluorescence de la morphologie des YAC-1. Le NO ne serait, cependant pas le seul joueur, ni le plus important, dans l'induction de l'apoptose comme l'indique les patrons de fragmentation similaires en absence et présence de L-NAME. D'autre part, la morphologie d'apoptose ne disparaît pas totalement avec l'utilisation de L-NAME, indiquant la présence d'autres molécules effectrices. Cette idée est supportée par le fait qu'il a été démontré que les granzymes étaient nécessaires à l'induction rapide de la fragmentation de l'ADN (Shresta et al, 1995) et que cette fragmentation se fait de la longueur des oligonucléosomes (Russel, 1983; Trapani et Smyth, 1993). De plus, la liaison du ligand Fas à son récepteur, déclenche une cascade d'événements menant également à la mort par apoptose (Krammer et al, 1994). Il aurait toutefois été approprié de faire ces deux essais dans un milieu déplété en arginine, ce qui n'a malheureusement pas été fait. Ces essais en milieux déplétés nous auraient probablement permis d'observer un effet plus prononcé de l'inhibition de la NOS.

L'évaluation par microscopie à fluorescence de la morphologie cellulaire, démontre une diminution importante et significative du nombre de cellules apoptotiques lorsqu'on utilise le L-NAME, et ce à tous les ratios effecteur:cible utilisés. Cette évaluation nous montre également une diminution du nombre de cellules mortes lorsqu'on utilise le L-NAME, ce qui confirme les résultats obtenus par la mesure de la libération du ^{51}Cr . Les expériences de fragmentation dans le temps et de morphologie ne nous donnent pas des pourcentages de fragmentation de l'ADN et de cellules apoptotiques similaires. On observe en effet, un pourcentage plus important de fragmentation de l'ADN dans l'expérience d'évolution dans le temps après 4 heures d'incubation que de cellules

apoptotiques dans l'étude de la morphologie aussi le même temps d'incubation. De plus, l'effet du L-NAME est beaucoup prononcé sur l'apoptose que la fragmentation de l'ADN. Le nombre de cellules apoptotiques diminue d'environ la moitié lorsque le L-NAME est présent, alors que la fragmentation diminue seulement du quart. En ce qui concerne la lyse spécifique, les résultats sont comparables dans les deux expériences et la diminution causée par le L-NAME est semblable dans les deux cas, soit 26% et 33 %.

Le fait que l'évaluation des cellules apoptotiques ne correspond pas tout à fait bien avec la mesure de l'ADN fragmenté peut s'expliquer partiellement par le fait qu'il est possible que les critères utilisés pour définir une cellule subissant l'apoptose ait été appliqués trop sévèrement entraînant une sous évaluation de l'apoptose. Il est en effet possible que des cellules apoptotiques aient été classées comme normales, parce qu'elles ne répondaient pas exactement aux critères de la morphologie d'apoptose. Toutefois, puisque nous avons dénombrer au moins 200 cellules dans chaque échantillon, il est peu probable que la différence soit entièrement attribuable à une sous estimation. Il est aussi envisageable que la fragmentation de l'ADN soit un événement précoce de l'induction de l'apoptose. L'évolution dans le temps de la fragmentation de l'ADN et de la lyse a en effet démontré que la fragmentation était rapide. On peut donc supposer que la fragmentation a lieu avant l'apparition de la morphologie d'apoptose. Ainsi, au temps quatre heures, il y a plus de fragmentation de l'ADN que de cellules ayant la morphologie d'apoptose car cette dernière apparaît seulement plus tard. Il aurait pu être intéressant de faire une courbe dans le temps de l'apparition de la morphologie d'apoptose afin de vérifier cette théorie ou encore d'incuber les cellules plus longtemps pour voir si après un certain temps les pourcentages ne deviennent pas plus similaires. Il faut aussi considérer que la mesure de la fragmentation de l'ADN, est un pourcentage de l'ADN total présent dans les cellules et non nécessairement un pourcentage de cellule présentant un ADN fragmenté.

Il semble aussi que le NO a plus d'influence sur la morphologie d'apoptose que sur la fragmentation de l'ADN tel que démontré par l'utilisation de l'inhibiteur de la NOS L-NAME. Cela pourrait peut être s'expliquer par l'effet du NO sur l'expression du supresseur de tumeur p53 (Meßmer et al, 1994; 1996; Forrester et al, 1996; Ho et al, 1996), ce dernier est en effet responsable de l'apoptose causée par le NO dans certaines

circonstances. De plus, le NO peut aussi augmenter l'expression de Fas (Fukuo et al, 1996) qui entraîne aussi la mort par apoptose. L'inhibition de la iNOS entraînerait donc une diminution de l'expression de p53 et Fas dans la cellule cible causant ainsi une diminution de la morphologie d'apoptose. Le NO pourrait être impliqué dans la régulation des événements causant la fragmentation de l'ADN mais aussi dans une étape de l'apoptose qui suit cette dernière et qui serait probablement commune à toutes les voies lytiques. L'altération de cette voie empêcherait l'apoptose de faire suite à la fragmentation de l'ADN.

Pour confirmer que la NO synthase était bien activée par la rencontre des CTL avec les YAC-1 nous avons tenté de démontrer sa présence par immunotransfert (Western Blot). Malheureusement nous avons échoué dans notre tentative et plusieurs facteurs pourraient en être la cause. Premièrement, la NOS est une enzyme qui est très peu exprimée dans les cellules (moins que 1% des protéines totales). Nous avons utilisé 20×10^6 cellules pour faire nos extraits et après concentration on obtenait une concentration de 2 mg/ml de protéines (dans 200 μ l de tampon). Cependant, ce n'était pas l'extrait au complet qui était appliqué sur le gel, on pouvait appliquer sur le gel environ 20 μ l d'échantillon, soit une possibilité de 0,4 μ g de NOS, sans compter les pertes possibles au cours du transfert sur la membrane. Pour éviter que ce soit un problème nous avons utilisé une membrane qui a une grande capacité de liaison (Zeta Probe) qui nous permettait de fixer un maximum de protéines sur la membrane. Pour vérifier la qualité du transfert, le gel post-transfert a été coloré à l'argent et aucune trace de protéine n'était visible. Nous avons aussi essayé d'augmenter encore plus la concentration des protéines de haut poids moléculaire en passant l'extrait sur un tamis moléculaire et nous avons lyophilisé les fractions recueillies, soit celles ayant un poids moléculaire supérieur à environ 100 kDa. Ce faisant, nous avons pu déposer la presque totalité des protéines sur le gel et augmenté nos chances de révéler la iNOS. Malgré tout, nous avons été incapables de montrer la présence de la iNOS à l'aide de notre anticorps.

La qualité de l'anticorps utilisé a aussi pu influencé l'incapacité à reconnaître la iNOS. Nous avons utilisé, en parallèle, deux anticorps monoclonaux de lapin différents dirigés contre la NOS inductible de macrophage de souris. L'un était dirigé contre un peptide de

la partie C terminale et l'autre contre un peptide de la partie N terminale de la iNOS. Aucun de ces anticorps ne nous a permis de démontrer la présence de la iNOS. Rien ne nous permet cependant d'affirmer avec certitude que la NOS des lymphocytes T peut être reconnue par cet anticorps. Il est possible que les parties C et N terminal de protéine de lymphocytes soit très différentes de celles de la protéine de macrophages. De plus, la capacité de lier de cet anticorps n'était pas vérifiable puisqu'il n'y a pas sur le marché de NOS inducible de macrophages de souris purifiée que l'on aurait pu utiliser comme contrôle positif. Puisqu'on était dans l'incapacité de démontrer avec un anticorps l'induction de la iNOS, nous avons coloré à l'argent notre gel de polyacrylamide afin de vérifier si on pouvait remarquer un changement d'expression dans les protéines de poids moléculaires voisinant celui de la iNOS. Nous avons observé l'apparition dans les CTL d'une protéine d'environ 160 kDa qui est absente dans les splénocytes. Cette même protéine semble s'exprimer encore plus fortement dans les CTL qui ont été incubés pendant 4 heures avec la cible YAC-1. Il est possible que ce soit la iNOS car les poids moléculaires rapportés pour les monomères de NOS varient de 130 à 160 kDa (Nathan, 1992). Nous ne pouvons affirmer avec certitude qu'il s'agit bien de la iNOS, mais le patron d'expression i.e. pas d'expression dans les splénocytes et expression la plus forte dans CTL incubés avec YAC-1, et le poids moléculaire correspond à ce qu'on s'attend à voir avec la iNOS.

Nos résultats démontrent que le NO pourrait jouer un rôle dans la cytotoxicité médiée par les CTL et aussi que ce rôle ne soit pas de première importance. En effet, le NO serait responsable de moins que 20% de la lyse cellulaire et de la fragmentation de l'ADN au ratio effecteur:cible 200:1, ce qui est faible comparé à l'importance qu'il a dans les cellules NK où on peut observer une diminution de 40% (Filep et al., 1996) lorsqu'on utilise le L-NAME. Cette observation pourrait être un indice d'une différence intéressante dans les mécanismes de destruction par les NK et les CTL, d'autant plus que les NK produisent des concentrations de NO cent fois plus élevées que les CTL. Le NO des CTL contrairement à celui des macrophages et des NK jouerait un rôle indirect et serait plutôt un acteur dans une cascade amplificatrice (impliquant des facteurs de transcription ou des kinases par exemple). Il serait intéressant d'enquêter sur la véritable implication du NO dans la lyse par les CTL soit directe (dommages oxydatifs aux protéines et à

l'ADN) ou indirecte via la régulation de l'expression de certains gènes ou encore une combinaison des deux. L'effet du NO sur le facteur de transcription NF- κ B dans ce système serait pertinent, car le NO peut inactiver l'inhibiteur I κ B (Lander et al., 1993b) et ainsi favoriser l'expression des protéines qui ont un site de liaison pour le facteur NF- κ B dans leur promoteur telles TNF- α , IL-6 (Rensing-Ehl et al., 1996) et NOS (Nathan et Xie, 1994b) et qui pourraient jouer un rôle dans l'apoptose. Cette hypothèse est supportée par le fait que le NO produit par les macrophages augmente la relâche de TNF- α et de IL-1 par ces derniers (Marcinkiewicz et al, 1995), il est donc très probable que les CTL fassent de même. D'autant plus qu'il y a une synergie entre le récepteur d'IL-1 et le TCR pour activer la transcription impliquant NF- κ B (McKean et al., 1995). Le NO peut aussi stabiliser le complexe NF- κ B-I κ B (Peng et al., 1995), cette stabilisation pourrait servir à fermer la machinerie lytique lorsqu'elle n'est plus nécessaire et ainsi empêcher la synthèse inutile de médiateurs et de causer des dommages inutiles aux tissus.

Il a aussi été démontré que le NO pouvait augmenter l'expression de la molécule Fas (Fukuto et al., 1996). Il serait intéressant de vérifier si dans notre système l'augmentation de l'apoptose ne serait pas due à une augmentation de l'expression de Fas. Un des effet de Fas pourrait être une activation de NF- κ B (Rensing-Ehl et al., 1996) qui par la suite favoriserait la synthèse de médiateurs de l'apoptose.

L'expression de la protéine p53 serait aussi intéressante à évaluer puisque cette dernière joue un rôle important dans l'apoptose et qu'elle peut aussi être influencée à la hausse par le NO via les dommages causés à l'ADN. Il semble donc qu'en plus de la perforine, des granzymes et du ligand Fas, les CTL utilisent la synthèse de NO pour détruire les cellules tumorales. Il agirait autant sur la cellule effectrice que sur la cellule cible. Il est en effet possible que le NO agisse sur la prolifération des CTL tout en causant des dommages aux cellules tumorales soit directement(dommages oxydatifs) soit indirectement(en activant divers facteurs).

Le NO a aussi un effet important sur le métabolisme énergétique des cellules. En effet, le NO peut inhiber la respiration cellulaire, en bloquant des enzymes mitochondriales

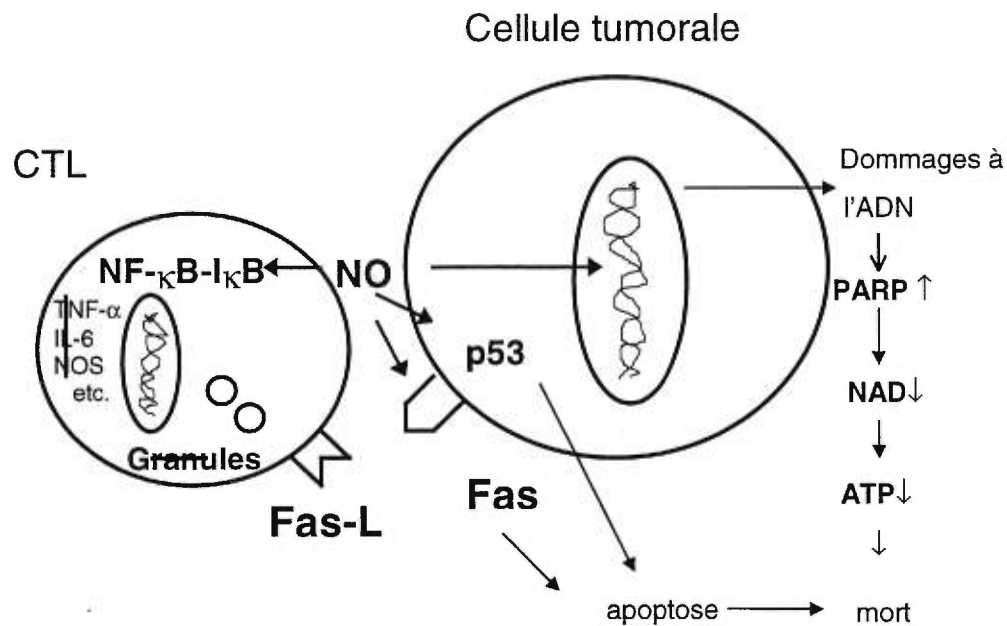
(Stuerh et Nathan, 1989; Mohrs, 1994; Molina y Vedia, 1992). D'autre part, les dommages à l'ADN causés par le NO peut entraîner l'activation d'une enzyme de réparation de l'ADN la poly (ADP-ribose) polymérase (Zhang et al, 1994). Cette enzyme consomme le NAD^+ comme cofacteur en quantité très importante et la cellule doit transformer son ATP en NAD^+ pour suffire à la demande de l'enzyme. En bout de ligne, la réserve énergétique de la cellule est épuisée et la cellule meurt.

Le mécanisme précis des réactions médiées par le NO dans cette cytotoxicité n'est pas encore connu, mais les candidats pouvant participer à ce mécanisme sont nombreux. Seulement quelques uns de ces derniers ont été nommés ici. La figure 16 résume quelques uns des mécanismes suggérés de l'apoptose causée par les CTL. La survie ou la mort de la cellule sont probablement décidées par une balance précise entre tous ces éléments. On ne sait pas si c'est la somme de ces événements ou une combinaison bien particulière que mène à l'apoptose. Il reste encore beaucoup d'élément à examiner dans ce domaine.

Les ratios effecteur : cible très élevés comme 200:1 et 100:1 sont invraisemblables physiologiquement. Les résultats des ratios plus petits pourraient s'avérer beaucoup plus intéressants car ils se rapprochent sans doute plus de la réalité bien qu'il n'existe aucune données sur le ratio physiologique de ces réaction immunitaires. Les études subséquentes devraient se concentrer sur le plus petits ratios afin d'être plus représentatifs.

Le NO semble donc une molécule importante pour la cytotoxicité de plusieurs cellules du système immunitaire, macrophages, neutrophiles, NK et enfin CTL. Toutes ces cellules peuvent produire du NO et de plus possèdent des voies pouvant être régulées positivement ou négativement par lui. Il est probable que in vivo, les cellules aient la possibilité de s'activer et de s'inhiber entre elles via cette molécule.

Figure 15. Schéma des mécanismes suggérés de la lyse des cellules tumorales par les CTL



Granules = perforine et granzymes
 PARP = poly (ADP-ribose) polymérase

Cette étude nous a permis de faire un pas de plus vers une meilleure compréhension des mécanismes de cytotoxicité cellulaire. Une connaissance précise des mécanismes de cytotoxicité des lymphocytes T cytotoxiques permettra de mieux contrôler les situations où ces derniers sont impliqués. L'utilisation d'inhibiteurs de la NO synthase permettrait entre autres de bloquer une partie de la cytotoxicité dans les pathologies où les CTL sont impliqués comme par exemple les réactions de la greffe contre l'hôte ou les maladies auto-immunitaire. Un blocage spécifique des CTL ou de certaines fonctions des CTL permettrait d'éviter l'immunosuppression non spécifique du patient dans les cas où les

problèmes sont principalement liés à l'activité des CTL (comme les rejets de greffe) et permettrait d'éviter les infections opportunistes et autres problèmes reliés à l'utilisation d'immunosuppresseurs. D'autre part, dans les cas où l'activité cytotoxique des CTL est favorable au patient (destruction des tumeurs, infections), la connaissance des mécanismes précis impliqués dans la destruction des tumeurs et des virus, permettrait de les activer afin d'accélérer le processus d'élimination de ces derniers. Il sera sans doute possible d'avoir plus d'effets bénéfiques que d'effets secondaires ce qui serait nettement avantageux pour le patient.

Des expériences similaires à celles de ce projet avec des animaux déficients en perforine, granzymes ou Fas permettraient de mieux apprécier l'importance de cette voie lytique et peut être de savoir si cette voie peut servir de dépannage quand l'une des autres voies est déficiente.

En conclusion, les résultats présentés ici suggèrent que les CTL produisent du monoxyde d'azote lorsqu'ils détruisent les cellules tumorales YAC-1. La mort des cellules tumorales se produirait par apoptose et l'effet du NO tant au niveau de la lyse que de l'apoptose se ferait sentir de façon plutôt tardive.

5. Conclusion

Les résultats présentés dans ce mémoire nous donne des indices que le NO pourrait jouer un rôle dans la cytotoxicité des lymphocytes T cytotoxiques à l'égard des cellules tumorales YAC-1 et induire la mort par apoptose dans ces dernières puisque:

- 1) Le L-NAME a un effet inhibiteur sur la lyse et la fragmentation de l'ADN des YAC-1 médiées par les CTL;
- 2) On mesure du NO dans le milieu de culture lors de la lyse des YAC-1 par les CTL, de plus la concentration du NO mesuré varie avec le nombre de CTL présentes avec les YAC-1 ;
- 3) La variation dans le temps de lyse et de fragmentation de l'ADN des YAC-1 par les CTL indique que le NO agit tardivement tant pour induire la fragmentation que la lyse;
- 4) Les YAC-1 éliminées par les CTL ont une morphologie d'apoptose dont le pourcentage diminue en présence de L-NAME et leur ADN présente le patron de fragmentation typique de l'apoptose et
- 5) l'incubation des CTL avec les cellules YAC-1 induit l'expression d'une nouvelle protéine dans les CTL ayant un poids moléculaire voisin de celui de la NOS.

Enfin, le NO jouerait un rôle plutôt tardif car la diminution de lyse cellulaire et de fragmentation de l'ADN causée par le L-NAME se fait sentir de façon plus importante après quatre heures d'incubation seulement.

6. Bibliographie

Abraham V.S., Sachs D.H., Sykes M., Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3+CD4-CD8- cell population, *J. Immunol.* 148, 3746-3752 (1992).

Adams D.O. in *Methods in enzymology LVIII* (W.B. Jakoby & I.H. Pastan eds), Academic Press, New York, 1979, p.494.

Albina J.E., Cui S., Mateo R.B. & Reichner J.S., Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages, *J. Immunol* 150, 5080-5085 (1993).

Baixeras E., Lisbardo B., Stauber C., Gonzalez A., Carrera A.C. Gonzalo A. & Martinez-A. C., From apoptosis to autoimmunity: insights from the signaling pathways leading to proliferation or to programmed cell death, *Immunological Reviews* 142, 55-91 (1994).

Banda N.K., Bernier J., Kurahamra D.K., Kurrle R., Haigwood N., Sekaly R.P. & Finkel T.H., Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis, *J. Exp. Med.* 176, 1099-1106 (1992).

Baker M.B., Altmann N.H., Podack E.R. & Levy R.B., The role of cell mediated cytotoxicity in acute GvHD after MHC0matched allogeneic bone marrow transplantation in mice, *J. Exp. Med.* 183, 2645-2656 (1996).

Beauvais F., Michel L. & Dubertret L, Nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils, *FEBS Lett.* 361, 229-232 (1995).

Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. & Freeman B.A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620-1624 (1990).

Beckman J.S. , The double-edge role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury, *J. Dev. Phys.* 15, 53-59 (1991).

Beckman J.S., Ye Y.Z., Anderson P.G., Chen J., Accavitti M.A., Tarpey M.M. & White C.R. , Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375, 81-88 (1994a).

Beckman J.S., Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide dependant cerebral injury, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 738,69-75 (1994b).

Benichou G., Kanellopoulos J.M., Mitenne F. & Galanaud P., T-cell chemiluminescence, *Scand. J. Immunol.* 30, 265-269 (1989).

Berke G., Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity: functional cytotoxic T cells lacking perforin and granzyme, *Immunology* 78, 105-112 (1993).

Berke G., The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects, *Ann. Rev. Immunol.* 12, 735-773 (1994).

Berke G., The CTL's kiss of death, *Cell* 81, 9-12 (1995a).

Berke G., Unlocking the secrets of CTL and NK cells, *Immunol. Today* 16 (7), 343-346 (1995b).

Berke G. & Rosen D., Highly lytic in vivo primed cytotoxic T lymphocytes devoid of lytic granules and BLT-esterase activity acquire these constituents in the presence of T cell growth factors upon blast transformation in vitro, *J. Immunol.* 141, 1429-1436 (1988).

Blanco F.J., Ochs R.L. Schwartz H. & Lotz M., Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am. J. Pathol* 146, 75-85 (1995).

Blatter L.A., Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current, *Cell calcium* 15, 122-131 (1994).

Bohlinger I, Leist M., Bansig J., Uhlig S., Tiegs G., Wendel A., Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor α -induced liver injury through distinct pathway, *Hepatology* 22, 1826-1837 (1995).

Boise L.H., Gonzalez G., Postema C.E., Ding L., Lindston T., Turka L.A., Mao X., Nunez G. & Thompson C.B., bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death, *Cell* 74, 597-608 (1993).

Bolotina V.M., Najibi S., Palacino J.J., Pangano P.J. & Cohen R.A., Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle, *Nature* 368, 850-853 (1994).

Braun M.Y., Lowin B., French L., Acha-Orbea & Tschopp J., Cytotoxic T cells deficient in both functional Fas ligand and perforin show residual activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease, *J. Exp. Med.* 183, 657-661 (1996).

Braun M. & Schrör K., Prostaglandin D_2 relaxes bovine coronary arteries by endothelium-dependent nitric oxide-mediated cGMP formation, *Crit. Care. Res.* 71, 1305-1313 (1992).

Bredt D.S. & Snyder S.H., Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 682-685 (1990).

Bredt D.S., Hwang P.M. Glatt C.E., Lowenstein C. Reed R.R. & Snyder S.H., Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome p450 reductase, *Nature* 351, 714-718 (1991).

Broussard-Diehl C., Bauer S.R. & Scheuermann, A role for *c-myc* in the regulation of thymocyte differentiation and possibly positive selection, *J. Immunol* 156, 3141-3150 (1996).

Buttke T.M. & Sandstrom P.A., Oxidative stress as a mediator of apoptosis, *Immunol. Today* 15, 7-10 (1994).

Cetkovic-Cvrlje M., Sander S. & Eizirik D.L., Nicotinamide and dexamethasone inhibit interleukin-1-induced nitric oxide production by R1Nm5F cells without decreasing messenger ribonucleic acid expression for nitric oxide synthase. *Endocrinol.* 133, 1739-1743 (1993).

Chang F., Syrjanen S. & Tervahauta K, Tumourigenesis associated with p53 tumour suppressor gene, *Br. J. Cancer* 68, 653-61 (1993).

Chen Y.Y. & Rosenberg N., Lymphoid cells transformed by Abelson virus require the v-abl protein-tyrosine kinase only during early G1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6682-6687 (1992).

Chiou S.K. , Rao L. & White E., Bcl-2 blocks p53-dependant apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* 14, 2556-2563 (1994).

Chiu V.K., Walsh C.M., Liu C.C., Reed J.C. & Clark W.R., Bcl-2 blocks degranulation but not Fas based cytotoxicity, *J Immunol.* 154 (5), 2023-32 (1995).

Clark W.R., Walsh C.M., Glass A.A. Hayashi F., Matloubian M. & Ahmed R., Molecular pathways of CTL-mediated cytotoxicity, *Immunol. Rev.* 146, 33-44 (1995).

Cleveland J.K., Troppmair J. , Packham G., Askew D.S., Hoyd P., Gonzalez-Garcia M., Nunez G. Ihle J.N. & Rapp U.R., v-raf supresses apoptosis and promotes growth of interleukin-3 dependant myeloid cells, *Oncogene* 9, 2217-2226 (1994).

Cohen J.J. et Duke R.C., Glucocorticoid activation of calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death, *J. Immunol* 132, 38-42 (1984).

Cohen J.J., Duke R.C., Fadok V.A. & Sellins K.S., Apoptosis and programmed cell death in immunity, *Ann. Rev. Immunol.* 10, 267-293 (1992).

Colombel M., Olsson C.A., Ng P.Y. & Buttyan R., Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle, *Cancer Res.* 52, 4313-4319 (1992).

Cotter T.G., Lennon S.V., Glynn J.G. & Martin S.J., Cell death via apoptosis and its relationship to growth development and differentiation of both tumour and normal cells, *Anticancer Res.* 10, 1153- 1159 (1990).

Colotta F., Polentarutti N., Sironi M. & Mantovani A., Expression and involvement of *c-fos* and *c-jun* protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines, *J. Biol. Chem.* 267, 18 278- 18 283 (1992).

Corbett J.A., Sweetland M.A., Wang J.L., Lancaster J.R. Jr, McDaniel M.L., Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans, Proc. Natl Acad. Sci USA 90, :1731-1735 (1993).

Cui S., Reichner J.S., Mateo R.B. & Albina J.E., Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms, Cancer Res. 54, 2462-2467 (1994).

Dawson V.L., London E.D., Brecht D.S. & Snyder S.H., Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures, Proc. Natl. Acad. of Sci. 88, 6368-6371 (1991).

Dawson V.L., Dawson T.M., Bartley D.A., Uhl G.R. & Snyder S.H., Mechanism of nitric-oxide mediated neurotoxicity in primary brain culture, J. Neurosciences 13, 2651-2661 (1993).

Dennart G., Anderson C.G. & Prochazka G., High activity of N^ε-benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester serine esterase and cytolytic perforin in cloned T cell lines is not demonstrable in *in vivo* -induced effector cells, Proc. Natl. Acad. of Sci. USA 84, 5004-5008 (1987).

Devi L., Petanceska S., Liu R., Arbabha B., Bansinath M., Garg U., Regulation of neuropeptide-processing enzymes by nitric oxide in cultured astrocytes, J. Neurochem 62, 2387-2393 (1994).

Dornand J & Gerber M., Inhibitory of murine T-cell response by anti-oxidants : the targets of lipoxygenase pathway inhibitors, Immunology 68, 384-391 (1989).

Drobyski W.R., Keever C.A., Hanson G.A., McAuliffe & Griffith O.W., Inhibition of nitric oxide production is associated with enhanced weight loss, decreased survival, and impaired alloengraftment in mice undergoing graft-versus-host disease after bone marrow transplantation, Blood 84, 2363-2373 (1994).

Duke R.C., Cohen J.J. & Chervenak R., Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells, J. Immunol. 137, 1442-1447 (1986).

Duke R.C., Sellins K.S., & Cohen J.J. Cytotoxic lymphocyte-derived lytic granules do not induce DNA fragmentation in target cells, J. Immunol. 141, 2191-2194 (1988).

Duke R.C., Perscheni P.M., Chang S., Lin C.C., Cohen J.J. & Young J.D.E., Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation, J Exp Med 170, 1451-1456 (1989).

Elledge S.J., Zhou Z., Allen J.B., Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation, Trends Biochem Sci 17, 119-128 (1992).

Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z. & Hancock D.C., Induction of apoptosis in fibroblast by c-myc protein, Cell 69, 119-128 (1992).

Evans T., Carpenter A., Kinderman H., Cohen J., Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. Circulatory Shock 41, 77-81 (1993).

Fast D.J., Lynch R.C., Leu R.W., Nitric oxide production by tumor targets in response to TNF: paradoxical correlation with susceptibility to TNF-mediated cytotoxicity without direct involvement in the cytotoxic mechanism, *J. Leuko. Biol.* 52, 255-261 (1992).

Feelisch M. & Noack E.A., Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase, *Eur. J Pharmacol* 139, 19-30 (1987).

Fehsel K., Kroncke K.D., Meyer K.L., Huber H., Wahn V. & Kolb-Bachofen V., Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes, *J. Immunol.* 155, 2858-2865 (1995).

Filep J.G., Baron C., Lachance S., Perreault C. & Chan J.S.D., Involvement of nitric oxide in target-cell lysis and DNA fragmentation induced by murine natural killer cells, *Blood* 87, 5136-5143 (1996).

Flomerfelt F.A. & Miesfeld R.L., Recessive mutations in a common pathway block thymocyte apoptosis induced by multiple signal, *J. Cell. Biol.* 127, 1729-1742 (1994).

Fontecave M., Nordlund P., Eklund H., Reichard P., The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli.*, *Adv. Enzym. & Rel. Areas of Molec. Biol.* 65, 147-183 (1992).

Forrester K., Ambs S., Lupold S.E., Kapust R.B., Spillare E.A., Weinberg W.C., Felley-Bosco E., Wang X.W., Geller D.A., Tzeng E., Billiar T.R., Harris C.C., Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 2442-2447 (1996).

Fukuto J.M., Wood K.S., Byrns R.E. & Ignarro L.J., NG-amino-L-arginine: a new potent antagonist of L-arginine-mediated endothelium dependent relaxation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 458-465 (1990).

Fukuto J.M., Chemistry of nitric oxide: biologically relevant aspects, *Adv. Pharmacol.* 34, 1-16 (1995).

Fukuto K., Hata S., Suhara T., Nakahashi T., Shinto Y., Tsujimoto Y., Morimoto S. & Ogihara T., Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle, *Hypertension* 27 (3 part 2), 823-826 (1996).

Furchgott R.F. & Zawadzki J.V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*, 373-376 (1980).

Garthwaite J., Charles S.L., & Chess-Williams R., Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain, *Nature* 336, 385-388 (1988).

Gaston B., Drazen J.M., Loscalzo J. & Stamler J.S., The biology of nitrogen oxides in the airways, *Am J. Resp. Crit. Care Med.* 149, 538-551 (1994).

Genaro A.M., Hortelano S., Alvarez A., Martinez A.C. & Bosca L., Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanism involving sustained Bcl-2 level, *J. Clin. Invest.* 95, 1884-1890 (1995).

Gillepsie J.S., Liu X. & Martin W., The effects of L-arginine and NG-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus to NANC nerve stimulation, *Br. J. Pharmacol.* 98, 1080-1082 (1989).

Goldstein P. Ojcius D.M. & Young J.D., Cell death mechanism and the immune system, *Immunol Rev.* 121, 29-65 (1991).

Gopalakrishna R., Chen Z.H. & Gundimeda U., Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding, *J. Biol. Chem.* 268, 27 180-185 (1993).

Gottschalk A.R., McShan C.L. Kilkus J., Dawson G. & Quintans J., Resistance to anti-IgM-induced apoptosis in a WEH1-231 subline is due to insufficient production of ceramide, *Eur. J. Immunol* 25, 1032-1038 (1995).

Green L.C., Wagner D.D.A., Glowgowski J., Skepper P.L., Wishnok J.S. & Tannenbaum S.R., Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids, *Anal Biochem* 124, 131-138 (1982).

Griffiths M.J.D., Messent M., MacAllister R.J. & Evans T.W., Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase, *Br. J. Pharmacol.* 233, 199-125 (1993).

Griffiths G.M., The cell biology of CTL killing, *Curr. Op. Immunol.* 7, 343-348 (1995).

Gryglewski R.J. et Robak J., Nitric oxide donors as generators and scavengers of superoxide anions, *Pol. J. Pharmacol.* 45 , 51-58 (1993).

Gross S.S., Stuehr D.J., Aisaka K., Jaffe E.A., Levi R. & Griffith O.W., Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by N^G-aminoarginine, N^G-nitroarginine and N^G-methylarginine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 96-103 (1990).

Gross S.S. & Wolin M.S., Nitric oxide pathophysiological mechanism, *Ann. Rev. Physiol* 57, 737-769 (1995).

Haby C., Lisovoski F., Aunis D. & Zwiller J., Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells. *J. Neurochem* 62, 496-501 (1994).

Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C., Stoneman V.E., Longthorne V.L., Culhane A.C. & Williams G.T., Apoptosis: molecular regulation of cell death., *Eur. J. Biochem* 236, 1-36 (1996).

Hammer B., Parker W.D. Jr & Bennett J.P. Jr, NMDA receptors increase OH radicals in vivo by using nitric oxide synthase and protein kinase C. *Neuroreport* 5, 72-74 (1993)

Hannun Y.A., & Obeid L.M., Ceramide: an intracellular signal for apoptosis, *Trends Biochem Sci* 20, 73-77 (1995).

Harrison D.J., Howie S.E.M. & Wyllie A.H., Lymphocytes death, p53 and the problem of the "Undead cell", *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.* 200, 123-135 (1995).

Helgason C.D., Prendergast J.A., Berke G. & Bleakley R.C., Peritoneal exudate lymphocyte and mixed lymphocyte culture hybridomas are cytolytic in the absence of cytotoxic cell proteinase and perforine, *Eur. J. Immunol.* 22, 3187-3190 (1992).

Helgason C.D., Atkinson E.A., Pinkoski M.J., Bleackley R.C., Proteinase are involved in both DNA fragmentation and membrane damage during CTL mediated target cell killing, *Exp. Cell Res.* 218, 50-56 (1995).

Henkart P.A., Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity, *Ann. Rev. Immunol.* 3, 31-58 (1985).

Hevel J.M., White K.A. & Marletta M.A., Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein, *J. Biol. Chem.* 266, 22 789- 22 791 (1991).

Hibbs J.B., Vavrin Z. & Taintor R.R., L-arginine is required for expression of the activated macrophages effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells, *J Immunol.* 138, 550-565 (1987).

Hibbs JB, Taintor R.R., Vavrin S. & Rachlin E.M., Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87-94 (1988).

Hiki K., Yui Y., Hattori R., Eizawa H., Kosuga K., Kawai C., Cytosolic and membrane-bound nitric oxide synthase. *Jpn J. Pharmacol* 56, 217-220 (1991).

Ho Y.-S., Wang Y.-J. & Lin J.-K., Induction of p53 and p21/WAF1/Cip1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells, *Molec. Carcin.* 16, 20-31 (1996).

Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Milliman C.L., Korsmeyer S.J., Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis, *Cell* 75, 241-251 (1993).

Hoffman R.A., Langrehr J.M., Wren S.M., Dull K.E., Ildstad P.J., McCarthy S.A. & Simmons R.L., Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide in graft vs host disease, *J Immunol.* 151, 1508-1515 (1993a)

Hoffman R.A., Langrehr J.M., Dull K.E. & Simmons R.L., Nitric oxide production by sponge matrix allograft-infiltrating cells, *Transplantation* 55, 591-596 (1993b).

Hortelano S., Bendro A.M. & Bosca L., J. Phorbol esters induce nitric oxide synthase activity in rat hepatocytes. Antagonism with the induction elicited by lipopolysaccharide. *Biol Chem* 267, 249377-24940 (1992).

Ialenti A., Moncada S. & DiRosa M., Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide, *Eur. J. Pharmacol* 211, 177-182 (1992).

Ignarro L.J., Wood K.S., Wolin M.S., Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. *Adv. Cycl Nucleotides. Res* 17, 267-274 (1984).

- Ignarro L.J.**, Signal transduction mechanisms involving nitric oxide, *Biochem. Pharmacol.* 41, 485-490 (1991).
- Itoh N., Tsujimoto Y. & Nagata S.**, Effect of Bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death, *J. Immunol.* 151, 621-627 (1993).
- Jacobson M.D., Burne J.F., King M.P. Miyashita T., Reed J.C. & Raff M.C.**, Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA, *Nature* 361, 365-369 (1993).
- Jacobson M.D. & Raff M.C.**, Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen, *Nature* 374, 814-816 (1995).
- Jun C.-D., Lee J.-Y., Lee B.-S., Choi B.-M., Um J.-Y., Kwak H.J., Ji K.-Y., Kim H.-M. & Chung H.-T.**, Generation of nitric oxide inhibits formation of superoxide in macrophages during activation, *Biochem. Molec. Biol. Int.* 34, 1-8 (1994).
- Kägi D., Ledermann B., Bürki K., Zingernagel & Hengartner H.**, Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: mechanisms and significance, *Immunol. Rev.* 146, 95-115 (1995).
- Kägi D., Vignaux F., Lederman B., Burki K., Depraetere V., Nagata S., Hengartner H. & Goldstein P.**, Fas and perforine pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity, *Science* 265, 528-530 (1994).
- Keller R., Keist R., Erb P., Aebischer T., de Libero G., Balzer M., Groscurth P. & Keller H.U.**, Expression of cellular effector functions and production of reactive nitrogen intermediates: a comparative study including T lymphocytes, T-like cells, neutrophils, granulocytes and mononuclear phagocytes, *Cell Immunol.* 131, 398-403 (1990).
- Khatsenko O. & Kikkawa Y.**, Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1114-11151 (1993).
- Kirk S.J., Regan M.C. & Barbul A.**, Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 660-665 (1990).
- Klas C., Debatin K.-M., Jonker R.R., & Krammer P.H.**, Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells, *Int. Immunol.* 5, 625-630 (1993).
- Kleinert H., Euchenhoffer C. Ihrig-Biedert I & Förstermann U.**, Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down regulating cytokine induced activity of transcription factor nuclear factor κ B, *Molec. Pharmacol.* 49, 15-21 (1996).
- Kolb H. & Kolb-Bachofen V.**, Nitric oxide: a pathogenic factor in autoimmunity, *Immunol. Today* 13, 157-160 (1992).
- Kondo S., Ishiguro N., Iwata H., Nakashima I. & Isobe K.-I.**, The effects of nitric oxide on chondrocytes and lymphocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1431-1437 (1993).
- Kos F.J. & Engleman E.G.**, Requirement for natural killer cells in the induction of cytotoxic T cells, *J. Immunol.* 155, 578-584 (1995).

Krammer P., Behrman I., Daniel P., Dhein J. & Debatin K.-M., Regulation of apoptosis in the immune system, *Curr. Op. Immunol* 6, 279-289 (1994).

Kwon N.S, Stuehr D.J. & Nathan C.F., Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide., *J. Exp Med* 174, 761-767 (1991).

Konur A., Krause S.W., Rehli M., Kreutz M. & Andreesen R., Human monocytes induce a carcinoma cell line to secrete high amounts of nitric oxide, *J. Immunol.* 157, 2109-2115 (1996).

Lamas S., Marsden P.A., Li G.K, Tempst P & Michel T., Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform, *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 89, 6348-6352 (1992).

Lander H.M., Sehajpal P.K. & Novogrodsky A., Nitric oxide signaling: A possible role for G proteins, *J. Immunol.* 151, 7182-7187 (1993).

Lander H.M., Sehajpal P., Levine D.M., & Novogrodsky A., Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds, *J. Immunol.* 150, 1509 (1993b).

Langrehr J.M. , Hoffman R.A., Billiar T.R., Lee K.W.W., Schraut W.H. & Simmons R.L., Nitric oxide production regulates alloactivation in rat splenocyte mixed lymphocytes cultures, *Transp. Proc.* 23, 184-184 (1991).

Langrehr J.M., Dull K.E., Ochoa J.B., Billiar T.R., Ildstad S.T., Schraut W.H., Simmons R.L., & Hoffman R.A., Evidence that nitric oxide production by in vivo allosensitized cells inhibits the development of allospecific CTL, *Transplantation* 53, 632-640 (1992).

Laszlo F., Evans S.M. & Whittle B.J., Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo, *Eur. J. Pharmacol* 272, 169-175 (1995).

Lepoivre M. , Chenais B., Yapo A., Lemaire G., Thelander L. & Tenu J.P., Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells, *J. Biol. Chem.* 265, 14143-14149 (1990).

Liew F.Y., Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide, *Curr. Op. Immunol.* 7, 396-399 (1995).

Liles W.C., Cale D.C., Klebanoff S.J., Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils, *Blood* 86, 3181-3189 (1995).

Lin K.-T., Xue J.-Y., Nomen M., Spur B. & Wong P. Y.-K., Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 Cells, *J. Biol. Chem.* 270, 16487-16490 (1995).

Lipton S.A., Choi Y.B., Pan Z.H., Lei S.Z., Chen H.S., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel D.J. & Stamler J.S., A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds *Nature* 364, 626-632 (1993).

Liu Z.G., Smith S.W., Mclaughlin K.A., Schwartz L.M., Osborne B.A., Apoptotic signal delivered through the T-cell receptor of o T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur77*, *Nature* 367, 281-284 (1994).

Liu C.-C., Walsh C.M., Eto N., Clark W.R. & Young J. D.-E., Morphologic and functional characterization of perforine deficient lymphokine-activated killer cells, *J. Immunol.* 155, 602-608 (1995).

Los M., Dröge W. & Schulze-Osthoff K., Inhibition of activation of transcription factor AP-1 by CD28 signalling in human T-cells. *Biochem J.* 302, 119- (1994).

Los M., Dröge W., Stricker K., Baeuerle P.A. & Schulze-Osthoff K., Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocytes functions, *Eur. J. Immunol.* 25, 159-165 (1995).

Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., Housman D.E., p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell* 74, 957-967 (1993).

Lu X. & Lane D.P., Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defect in chromosome instability syndromes ?, *Cell* 75, 765-778 (1993).

Lu Q.L., Hanby A.M., Nasser Hajibagheri M.A., Gschmeissner S., Lu P.J., Taylor-Papadimitriou J., Krajewski S., Reed J.C. & Wright N.A., Bcl-2 protein localizes to the chromosomes of mitotic nuclei and is correlated with the cell cycle in cultured epithelial cell lines. *Journal of Cell Science* 107 (Pt 2):363-371 (1994).

Majno G. & Joris I., Apoptosis, oncosis and necrosis, *Am. J. Pathol.* 146 , 3-15 (1995).

Marcinkiewicz J., & Chain B.M., Differential regulation of cytokine production by nitric oxide, *Immunology* 80, 146-159 (1993).

Marcinkiewicz J., Grabowska A. & Chain B., Nitric oxide up-regulate the release of inflammatory mediators by mouse macrophages, *Eur. J. Immunol.* 25, 947-951 (1995).

Marletta M.A., Yoon P.S., Lyengar R., Leaf C.D. & Wishnok J.S., Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate, *Biochemistry* 21, 8706-8711 (1988).

Marletta M.A., Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J. Biol. Chem.* 268, 12231-12234 (1993).

Marletta M.A., Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and Catalysis, *Cell* 78, 927-930 (1994a).

Marletta M.A., Approaches toward selective inhibition of nitric oxide synthase, *J. Med. Chem.* 37, 1899-1907 (1994b).

Martin S.J. & Cotter T.G., Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis, *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 1001-1016 (1991).

Martin-Sanz P., Diaz Guerra M.J., Casado M. & Bosca L., Bacterial lipopolysaccharide antagonizes transforming growth factor- β -1-induced apoptosis in primary cultures of hepatocytes, *Hepatology* 23, 1200-1207 (1996).

Matthys P., Froyen G., Verdo L., Huag S., Sobis H., Vandamme J., Vray B., Aguet M. & Billiau A., IFN- γ receptor-deficient mice are hypersensitive to the anti-CD3-induced cytokine release syndrome and thymocytes apoptosis. Protective role of endogenous nitric oxide, *J. Immunol* 155, 3829-3829 (1995).

Mayer B, John M. & Bohme E, Purification of a Ca²⁺/calmoduline-dependant nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterine, *FEBS Lett.* 277, 215-219 (1990).

McCartney-Francis N., Allen J.B., Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med* 178, 749-754 (1993).

McConeky D.J., Nicotera P. & Orrenius S., Signaling and chromatin fragmentation in thymocyte apoptosis, *Immunol. Rev* 142, 343-363 (1994).

McKean D.J., Bell M., Huntoon C., Rastogi S., Van Norstrand M., Podzorski R., Nilson A. & Paya C., IL-1 receptor and TCR signals synergize to activate NF-kappa B-mediated gene transcription, *Int. Immunol.* 7, 9-20 (1995).

Melliolo G., Cox G.W., Radzioch D. & Varesio L., Picolinic acid, a catabolite of L-tryptophan, is a costimulus for the induction of reactive nitrogen intermediate production in murine macrophages. *J. Immunol* 150, 4031-4040 (1993).

Meßmer U.K., Lapetina E.O. & Brune B., Nitric oxide induced apoptosis in RAW-264.7 macrophages is antagonized by protein kinase-C and protein kinase A activating compound, *Mol Pharmacol* 47, 757-765 (1995).

Meßmer U.K. & Brüne B., Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 263.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD⁺ content and p53 accumulation, *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 1-10 (1996).

Mescher M.F., Molecular interactions in the activation of effector and precursor cytotoxic T lymphocytes, *Immunol. Rev.* 146, 177-210 (1995).

Middleton G., Nunez G. & Davies A.M., Bax promotes neuronal survival and antagonises the survival effects of neurotrophic factors, *Development* 122, 695-701 (1996).

Misko T.P., Moore W.M., Kasten T.P., Nickols G.A., Corbett J.A., Tilton R.G. McDaniel M.L., Williamson J.R. & Currie M.G., Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine, *Eur. J. Pharmacol.* 233, 119-125 (1993).

Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B & Reed J.C., Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo, *Oncogene* 9, 1799-1805 (1994).

Moncada S., Palmer R.M. & Higgs E.A., Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol.Rev* 43, 109-142 (1991).

Moncada S. & Higgs A., The L-Arginine- Nitric oxide Pathway, *N. Engl. J. Med.* 329, 2002-2012 (1993).

Molina y Vedia L., McDonald B., Reep B., Brune B., Di Silvio M., Billiar T.R. & Lapetina E.G., Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation *J. Biol. Chem* 267, 24929-24932 (1992).

Mohr S., Stamler J.S. & Brune B., Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents, *FEBS Lett.* 348, 223-227 (1994).

Möröy T., Grzeschiczek A., Petzold S., Hartmann K.U., Expression of a Pim-1 transgene accelerates lymphoproliferation and inhibits apoptosis in lpr/lpr mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10734-10738 (1993).

Munn D.H., Beall A.C., Song D., Wrenn R.W., & Throckmorton D.C., Activation induced apoptosis in human macrophages: developmental regulation of a novel cell-death pathway by macrophage-colony-stimulating factor and interferon gamma, *J. Exp Med.* 181, 127-136 (1995).

Muschel R.J., Bernhard E.J., Garza L., McKenna W.G. & Koch C.J., Induction of apoptosis at different oxygen tensions: evidence that oxygen radicals do not mediate signaling, *Cancer Res.* 55, 995-998 (1995).

Nagata S. & Goldstein P., The Fas death factor, *Science* 267, 1449-1455 (1995).

Nakatsuka M. & Osawa Y., Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets. *Biochem Biophys. Res Commun* 200, 1630-1634 (1994).

Narita I., Border W.A., Ketteler M., Noble N.A., Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis, *Laboratory Investigation* 72, 17-24 (1995)

Nathan C.F. Secretory products of macrophages., *J. Clin invest.* 79, 319- (1987).

Nathan C. & Hibbs J.B., Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity, *Curr. Opin. Immunol.* 3, 65-70 (1991).

Nathan C., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.* 6, 3051-3064 (1992).

Nathan C. & Xie Q.-W., Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls, *Cell* 78, 915-918 (1994a).

Nathan C. & Xie Q.-W., Regulation of biosynthesis of nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 269, 13725-13728 (1994b).

Nguyen T., Brunson D., Crespi C.L., Penman B.W. Wishnik J.S. & Tannenbaum S.R., DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3030-3034, (1992).

Nishio E., Fukushima K., Shiozaki M. & Watanabe Y., Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP independent mechanism, Biochem. Biophys. Res. Commun. 221, 163-168 (1996).

Nishioka W.K. & Welsh R.M., Susceptibility to cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis is a function of the proliferative status of the target, J. Exp. Med 179, 769-774 (1994).

Noronha-Dutra A.A., Epperlein M.M & Woolf N., Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing, FEBS Lett. 321, 59-62 (1993).

Nunez G., London L., Hockenbery D., Alexander M., McKearn J.P. & Korsmeyer S.J., Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines, J. Immunol. 144, 3602-3610 (1990).

Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C., Ponstingl H. & Krammer P.H., Purification and molecular cloning of the APO-1 antigen, a new member of the TNF/NGF receptor superfamily: sequence identity with the Fas antigen, J. Biol. Chem. 267, 10 709-10 715 (1992).

Oltvai Z.N., Milliman C. & Korsmeyer S.J., Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog Bax that accelerates programmed cell death, Cell 74, 609-619 (1993).

Palmer RMJ, Ashton DS & Moncada S., Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, Nature 333, 664-690 (1988).

Patel T., Gores G.J., & Kaufmann S.H., The role of protease during apoptosis, FASEB J. 10, 587-597 (1996).

Pendino K.J., Laskin J.D., Shulor R.L., Chitra J., Punjabi C.J. & Laskin D.L., Enhanced production of nitric oxide by rat alveolar macrophages after inhalation of a pulmonary irritant is associated with increased expression of nitric oxide synthase, J. Immunol 151, 7196-7205 (1993).

Peng H.-B., Libby P. & Liao J.K., Induction and stabilization of I κ B α by nitric oxide mediates inhibition of NF- κ B, J. Biol. Chem. 270, 14 214-14 219 (1995).

Perotti M., Toddei F., Mirabelli F., Vairetti M., Bellomo G., McConkey D.J. & Orrenius S., Calcium-dependent DNA fragmentation in human synovial cells exposed to cold shock, FEBS Lett. 259, 331-334 (1990).

Persson M.G., Gustaffson L.E., Wiklund N.P., Moncada S. & Hedqvist P., Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response *in vivo*, Acta Physiol. Scand. 140, 449-457 (1990).

Petersson M.G.E., Kärre K., Cochet M., Kourilsky P. & Kiessling R., An active T-cell-independent mechanism enhances MHC class I transcription and expression on a mouse T-cell lymphoma *in vivo*, *Cell. Immunol.* 108, 460-472 (1987).

Peunova N & Enikolopov G, Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells, *Nature* 364, 450-453 (1993).

Pineda J., Kogan J.H. & Aghjanian., G.K., Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP dependant-protein kinase: involvement of a non selective cationic channel, *J. Neurosci.* 16, 1389-1399 (1996).

Podack E.R., Hengartner H. & Lichtenheld M.G., A central role of perforine in cytolysis? *Ann. Rev. Immunol.* 9, 129-157 (1991).

Pollock J.S., Forstermann U., Mitchel J.A., Warner T.D., Schmidt H.H.H.W., Nakane M., & Murad F., Purification and characterization of particulate endothelium derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 10 480-10 484 (1991).

Pou S., Pou W.S., Bredt D.S., Snyder S.H. & Rosen G.M., Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 267 , 24 173-6 (1992).

Radi R., Beckman J.S., Bush K.M. & Freeman B.A., Peroxynitrite oxydation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 266, 4244-4250 (1991).

Radomski MW, Palmer R.M. & Moncada S., An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelet regulates aggregation, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 5193-5197 (1990a).

Radomski M.W., Palmer R.M. & Moncada S., Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 10 043-10 047 (1990b).

Raff M.C., Barres B.A., Burne J.F., Coles H.S. , Ishizaki Y. & Jacobson M.D., Programmed cell death and the control of cell survival, *Science* 262, 695-700 (1993).

Rao K.M.K., Padmanabhan J., Kilby D.L., Cohen H.J., Currie M.S. & Weinberg J.B., Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor, *J. Leukoc. Biol.* 51, 496-500 (1992).

Rees D.D., Palmer R.M., Schulz R., Hodson H.F. & Moncada S., Characterization of three inhibitors of macrophage nitric oxide synthase, *J. Med., Chem* 35, 1137-1144 (1990).

Reif D.W. & Simmons R.D., Nitric oxide mediates iron release from ferritin, *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 537-541 (1990).

Reisman D., Elkind N.B., Roy B., Beamon J. & Rotter V., c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif, *Cell Growth & Differentiation* 4 ,57-65 (1993).

Rensing-Ehl A., Hess S., Ziegler-Heitbrock H.W., Riethmuller G. & Engelmann H. Fas/Apo-1 activates nuclear factor kappa B and induces interleukin-6 production, *Journal of Inflammation* 45, 161-174 (1995).

Révillard J.-P., *Immunologie*, De Boeck Université, Bruxelles, 1995, 367 p.

Robak J. & Gryglewski R.J., The application of ultrasounds for detection of scavenging of superoxide anions by drugs, *Pol. J. Pharmacol. & Pharm.* 43, 135-44(1991).

Robbins R.A., Hamel F.G., Floreani A.A., Gossman G.L., Nelson K.J., Belenky S. & Rubinstein I., Bovine bronchial epithelial cells metabolize L-arginine to L-citrulline: possible role of nitric oxide synthase, *Life Sciences* 52, 709-716 (1993).

Robertson B.E., Schubert R., Hescheler J., Nelson M.T., cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J. Physiol* 265, C299-C303 (1993).

Rubanyi G.M., Ho E.H., Cantor E.H., Lumma W.C. & Botelho L.H.P., Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radical produced by human leukocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1392-1397 (1991).

Rubbo H., Radi R., Trujillo R., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M. & Freeman B.A., Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite dependent lipid peroxidation: formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives, *J. Biol. Chem.* 269, 26 066- 26 075 (1994).

Russell J.H. & Dobos C.B., Mechanisms of immune lysis 2. CTL-induced disintegration of the target begins within minutes of cell contact, *J. Immunol.* 125, 1256-1261 (1980).

Russell J.H., Masakowski V.R., Rucinsky T & Phillips G., Mechanism of immune lysis 3. Characterization of the nature and kinetics of the cytotoxic T lymphocyte-induced nuclear lesion in the target, *J. Immunol.* 128, 2087-2094 (1982).

Salvemini D., De Nucci G, Gryglewski R.J. & Vane J.R., Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 6328-6332 (1989).

Salvemini D., Misko T.P., Masferrer J.L., Seibert K., Currie M.G. & Needleman P., Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat Kupffer cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 7240-7244 (1993).

Santos G.W., Hess A.D. & Vogelsang G.B., Graft-versus-host reactions and disease, *Immunol. Rev.* 88, 169-214 (1985).

Schini V.B., Catovsky S., Schray-Utz B., Busse R. & Vanhoutte P.M., Insulin-like growth factor I inhibits induction of nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.* 74, 24-32 (1994).

Schmidt H.H.H.W. & Murad F., Purification and characterization of a human NO synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1372-1377 (1991).

Schmidt H.H.H.W. & Walter U., NO at work, *Cell* 78, 919-925 (1994).

Sellins K.S. & Cohen J.J., Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes, *J. Immunol.* 139, 3199- 3206 (1987).

Sellins K.S. & Cohen J.J., Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes, *Rad. Research* 126, 88-95 (1991).

Selvakumaran M., Lin H.K., Miyashita T., Wang H.G., Krajewski S., Reed J.C., Hoffman B. & Liebermann D., Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF β 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways, *Oncogen* 9, 1791-1798 (1994).

Sentman C.L., Shutter J.R., Hockenbery D., Kanagawa O. & Korsmeyer S.J., Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes, *Cell* 67, 879-888 (1991).

Sheffler L.A., Wink D.A., Melillo G. & Cox G.W., Exogenous nitric oxide regulates IFN- γ plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages, *J. Immunol.* 155, 886-894 (1995).

Shi Y., Glynn J.M., Guilber L.J., Cotter T.G., Bissonnette R.P. & Green D.R., Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas, *Science* 257, 212-224 (1992).

Shi L., Nishioka W.K., Th'ng J., Bradbury E.M., Litchfield D.W. & Greenberg A.H., Premature p34^{cdc2} activation required for apoptosis, *Science* 263, 1143-1145 (1994).

Shimaoka M., Iida T., Ohara A., Teanaka N., Mashimo T., Honda T. & Yoshiya I., NOC, a nitric oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 519-526 (1995).

Shresta S., MacIvor D.M., Heusel J.W., Russel J.H. & Ley T.J., Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cell, *Proc. Natl Acad. of Sci. USA* 92, 5679-5683 (1995).

Sicher S.C., Vazquez M.A. & Lu C.Y., Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide, *J. Immunol.* 153, 1293-1300 (1994).

Slater A.F.G., Nobel C.S.I., Maellaro E., Bustamante J., Kimland M & Orrenius S., Nitrogen spin trap and a nitroxide antioxidant inhibit a common pathway of thymocytes apoptosis, *Biochem J.* 306, 771-778 (1995).

Smyth M.J., Glutathione modulates activation-dependent proliferation of human peripheral blood lymphocyte population without regulating their activated function, *J. Immunol.* 146, 1921-1927 (1991).

Snyder S.H. & Brecht D.S., Nitric oxide as a neuronal messenger, *Trends Pharmacol Sci.* 12, 125-128 (1991).

Somma M.M.D., Nuti S., Telford J.L. & Baldari C.T., p56^{lck} plays a key role in transducing apoptotic signal in T cells, *FEBS Lett.* 363, 101-104 (1995).

Spaulding S.W., The ways in which hormones change cyclic adenosine 3'-5' monophosphate-dependant protein kinase subunits and how such changes affect cell behavior, *Endocrin. Rev.* 14, 632-650 (1993)

Squadrito G.L. & Pryor W.A., The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide, *Chemico-Biol. Inter.* 96, 203-206 (1995).

Stadler J., Harbrecht B.G., Di Silvio M., Curran R.D., Jordan M.L., Simmons R.R., & Billiar T.R., Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes, *J. Leukocy. Biol.* 53, 165-172 (1993).

Stamler J.S., Singel D.J. & Loscalzo J., Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science* 258, 1898-1902 (1992).

Steinman H.M., The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant, *J. Biol. Chem.* 270, 3487-3490 (1995).

Steller H., Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science* 267, 1445-1462 (1995).

Stone J.R. & Marletta M.A., B Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states, *Biochem* 33, 5636-5640 (1994).

Stuehr D.J. & Marletta M.A., Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection. Lymphokines, or interferon- γ , *J Immunol* 139, 518-25 (1987).

Stuehr D.J. & Nathan C.F., A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J Exp Med* 169, 1543- 1555 (1989).

Stuehr D.J., Gross S.S., Sakuma I., Levi R. & Nathan C.F., Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of EDRF and the chemical reactivity of nitric oxide, *J. Exp. Med.* 169, 1011-1020 (1989).

Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Weise M. & Nathan C.F., Purification and characterization of the cytokine induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN- containing flavoprotein, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 7773-7777, (1991).

Suarez-Pinzon W.L., Strynadka K., Schulz R. & Rabinovitch A., Mechanisms of cytokine-induced destruction of rat insulinoma cells: the role of nitric oxide, *Endocrinology* 134, 1006-1010 (1994).

Susskind B.M., Sekar J., Tandon P.M.N., Lind D.S. & Bear H.D., Differential sensitivity of cytotoxic T lymphocytes and lymphokine-activated killer cells to inhibition by L-ornithine, *Cell. Immunol.* 133, 41-54 (1991).

Sykes M., Abraham V.S., Harty M.W., Pearson D.A., Selective inhibition of CD4 graft-versus-host activity in IL-2-treated mice, *Transp. Proc.* 25(1 Pt 2), 1225-6 (1993).

Takano Y.S., Harmon B.V. & Kerr J.F.R., Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis, *J. Pathol.* 163, 329-336 (1991).

Takata M.I., Mai T. & Hirone T., Immunoelectron microscopy of acute graft versus host disease of the skin after allogeneic bone marrow transplantation, *J. Clin. Pathol.* 46, 801-5 (1993).

Taylor-Robinson A.W., Liew F.Y., Severn A., Xu D., McSorley S.J., Garside P., Padron J. & Phillips R.S., Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells, *Eur. J. Immunol.* 24, 980-984 (1994).

Thiemermann C., Inhibition des NO synthases dans la défaillance circulatoire: effet bénéfique ou délétère?. *Médecine/Sciences* 11, 1643-1651 (1995).

Thomson C.B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267, 1456-1462 (1995)

Thorne K.J.I., Svvennsen R.J. & Franks D., Role of hydrogen peroxide in the cytotoxic reaction of T lymphocytes, *Clin.Exp. Immunol.* 39, 486-495 (1980).

Thüring H., Stenger S., Gmehling D., Röllinghoff & Bogdan C., Lack of inducible nitric oxide synthase activity in T cell clones and T lymphocytes from naive and *Leishmania major*-infected mice, *Eur. J. Immunol.* 25, 3229-3234 (1995).

Trapani J.A. & Smyth M.J., Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation, *Immunol. & Cell Biol.* 71 (Pt 3), 201-208 (1993).

Troy C.M., Derossi D., Prochiantz A., Greene L.A., Shelanski M.L., Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway, *J. Neuroscience* 16,253-261 (1996).

Tucker S.D., Sivaramakrishnan M.R., Klostergaard J., Lopez-Berestein G., Independence of the pattern of early cytokine release from autoregulation by nitric oxide, *J. Leuko. Biol.* 50, 509-16 (1991).

Uckun F.M., Tuel-Ahlgren L., Song C.W., Waddick K., Myers D.E., Kirahara J., Ledbetter J.A. & Schieven G.L., Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein-kinases in human B lymphocytes precursors triggering apoptosis and clonogenic cell death, *Proc. Natl Acad. Sci* 89, 9005-9009 (1992).

Ueda N. et Shah S.V., Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells, *J. Clin. Invest* 90, 2593-2597 (1992).

Ueda N. & Shah S.V., Apoptosis, *J. Lab. Clin. Med.* 124, 169-177 (1994).

Von Boehmer H., Thymic selection: a matter of life and death, *Immunol Today* 13, 454-458 (1992).

Waldmann H., Cobbold S. & Hale G., What can be done to prevent graft versus host disease?, *Curr. Op. Immunol.* 6, 777-783 (1994).

Walker P.R., Kwast-Welfeld J., Gourdeau H., Leblanc J., Neugebauer W. & Sikorska M., Relationship between apoptosis and the cell cycle in lymphocytes: role of protein kinase C, tyrosine phosphorylation, and AP1, *Exp Cell Res* 207, 142-51 (1993).

Warren J.B., Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light. *FASEB J.* 8, 247-251 (1994).

Watanabe-Fukunaga R., Branna C.I., Copeland N.G. Jenkins N.A. et Nagata S., Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis, *Nature* 356, 314-317 (1992).

Wei X.-Q., Charles I.G., Smith A., Ure J., Feng G.-J., Huang F.-P., Xu D., Muller W., Moncada S. & Liew F.Y., Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase, *Nature* 375, 408-41 (1995).

Weinberg J.B., Granger D.L., Pisetsky D.S., Seldin M.F., Misukonis M.A., Mason S.N., Phippen A.M., Ruiz P., Wood E.R. & Gilkeson G.S, The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered NG-monomethyl arginine, *J. Exp. Med.* 179, 651-660 (1994).

Wilcox C.S., Schmidt H.H.H.W., Murad F., Gross S.S., Taylor G., Levi R. & Welch W.J., NO synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89 (24) 11 993-7 (1992).

Williams G.T., Programmed cell death : apoptosis and oncogenesis, *Cell* 65, 1097-1098 (1991).

Williams G.T., Apoptosis in the immune system, *J. Pathol* 173, 1-4 (1994).

Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K. Misra M., Dunams T.M., Cebula T.A., Koch W.H., Andrews A.W., Allen J.S. & Keefer L.K., DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors, *Science* 254. 1001-1003 (1991).

Wink D.A., Hanbauer I., Krishna M.C., DeGraff W., Gamson J. & Mitchell J.B., Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 9813-9817 (1993).

Wolff D.J., Lubeskie A., Aminoguanidine is an isoform-selective mechanism based inactivator of nitric oxide synthase, *Arch. Biochem & Biophys* 316, 290-301 (1995).

Wolin M.S., Wood K.S. & Ignarro L.J. Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme. *J. Biol. Chem.* 257, 13312-13320 (1982)

Woronicz J.D., Calnan B., Ngo V., Winoto A., Requirement for the orphan steroid receptor nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas, *Nature* 367, 277-281 (1994).

Wright CD, Mulsch A., Busse R. & Osswald H., Generation of nitric oxide by human neutrophils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 813-819, (1989).

Xiao L., Eneroth P.H.E. & Qureshi G.A., Nitric oxide synthase pathways may mediate human natural killer cell cytotoxicity, *Scand. J. Immunol.*, 42, 501-511 (1995).

Xie Q.-W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T. & Nathan C.F., Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages, *Science* 256, 225-228 (1992).

Xie Q.-W., Whishanth R. & Nathan C., Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide, *J. Exp. Med.* 177, 1779-1784 (1993).

Yamasaki T., Klein G., Ljunggren H.-G., Höglund P., Öhlen C., Petersson M.G.E. & Kärre K., Effects of dimethyl sulfoxide treatment on H-2 expression and susceptibility to NK- or cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of the YAC-1 lymphoma and its β 2-microglobuline-deficient variant, *J. Nat Cancer Inst.* 80, 263-269 (1988).

Yoshida M., Akaike T., Wada Y., Sato K., Ikeda K., Ueda S. & Maeda H., Therapeutic effects of imidazolineoxyl N-oxide against endotoxin shock through its direct nitric oxide-scavenging activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 202,923-930 (1994).

Yui Y., Hatori R., Kosuga K., Eizawa H., Hiki K. & Kawai C., Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages, *J. Biol. Chem.* 266, 12 544- 12 547 (1991).

Yin X.M., Oltval Z.N. & Korsmeyer S.J., BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax, *Nature* 369, 321-3233 (1994).

Zhang J., Dawson V.L., Dawson T.M. & Snyder S.H., Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity, *Science* 263, 687-689 (1994).

Zinkernagel R.M., Biological role of major transplantation antigen in T cell self recognition, *Experientia* 42, 970-972 (1986).

Remerciements

Je voudrais remercier la direction et le personnel du centre de recherche Guy-Bernier pour leur soutien ainsi que leur assistance technique, particulièrement le Dr Claude Perreault, le Dr John S.D. Chan, Silvana Lachance, Chantal Baron et Julie Jutras.

Merci au Docteur Filep pour m'avoir guidée au cours de ce projet.

Merci à Aline Delalandre, Micheline Beauchamps et Lise Normand pour l'agréable ambiance de travail.

Merci à ma mère qui m'a toujours encouragée à faire des études supérieures, qui m'a soutenue pendant toutes ces années et a toujours su trouver les paroles pour me motiver.

Merci au sport qui m'a permis d'évacuer les tensions et le stress.

Enfin, merci à mon merveilleux Benoit, compagnon de maîtrise et de vie pour son appui, sa présence ses encouragements, qui ont été très précieux pour l'accomplissement de ce travail.