

UNIVERSITE MONTPELLIER 2 SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Discipline : Chimie

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques

présentée et soutenue publiquement par

Amélie PEQUIGNOT

le 16 décembre 2010

**Modulation par des extraits de Gui (*Viscum album L.*) fermentés,
de sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α
après stimulation *in vitro* de macrophages murins**

JURY

Dr S. KAVERI	Directeur de Recherche INSERM, Paris	Rapporteur
Dr G. PUZO	Directeur de Recherche CNRS, Toulouse	Rapporteur
Dr R. DIERDORF	Directeur de la Recherche, Lab. Weleda, Arlesheim	Examineur
Dr M. FOLLMER	Pharmacien Responsable, Lab. Weleda, Huningue	Examineur
Pr J.L. MONTERO	Professeur, Université Montpellier 2	Directeur de thèse
Pr J. GIAIMIS	Professeur, Université Montpellier 1	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE MONTPELLIER 2 SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Discipline : Chimie

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques

présentée et soutenue publiquement par

Amélie PEQUIGNOT

le 16 décembre 2010

**Modulation par des extraits de Gui (*Viscum album L.*) fermentés,
de sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α
après stimulation *in vitro* de macrophages murins**

JURY

Dr S. KAVERI	Directeur de Recherche INSERM, Paris	Rapporteur
Dr G. PUZO	Directeur de Recherche CNRS, Toulouse	Rapporteur
Dr R. DIERDORF	Directeur de la Recherche, Lab. Weleda, Arlesheim	Examineur
Dr M. FOLLMER	Pharmacien Responsable, Lab. Weleda, Huningue	Examineur
Pr J.L. MONTERO	Professeur, Université Montpellier 2	Directeur de thèse
Pr J. GIAIMIS	Professeur, Université Montpellier 1	Co-directeur de thèse

Je voudrais exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur le Docteur Germain Puzo pour avoir accepté de prendre part au jury de thèse, et de juger ce travail.

J'adresse mes profonds remerciements à Monsieur le Docteur Srini Kaveri pour avoir accepté de faire partie du jury et d'évaluer cette étude en tant que rapporteur.

Toute ma gratitude va également à Monsieur le Professeur Jean-Louis Montero, dont le soutien et l'engagement, tout au long de cette étude, ont permis sa réalisation.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Docteur Marc Follmer, personnellement et en tant que Pharmacien Responsable des Laboratoires WELEDA, pour le soutien et la bienveillance qu'il a toujours manifestés à l'égard de ce travail.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Docteur Rainier Dierdorf, à titre personnel et en sa qualité de Responsable Scientifique des Laboratoires WELEDA, pour la confiance qu'il a, dès le début, accordée à ce travail.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean Giaimis. Durant toutes ces années, il a eu à cœur de me laisser la plus grande liberté dans le travail expérimental, tout en me guidant et en m'encourageant par ses conseils précieux.

Je remercie également Monsieur le Docteur Frédéric Boudard pour son implication dans cette étude, ses conseils et ses questions toujours à-propos.

Je tiens à remercier Monsieur Bernard Casolari pour ses remarques pertinentes, son sens de l'organisation, et son aide dans la réalisation de cette étude.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Docteur Michel Vidal, pour son accueil au sein de son laboratoire, sa contribution à cette étude, et sa grande disponibilité.

Je voudrais aussi remercier Monsieur le Docteur Didier Tusch pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail ainsi que ses remarques avisées.

Mes remerciements vont à tous ceux qui ont apporté leur aide à la réalisation de ce travail. Je pense notamment à Madame Nelly Ségur-Fantino, Madame Catherine Zann, Madame Cyrille-Anne Curat, Mademoiselle Emilie Bony, ainsi que Madame Valérie Bernard.

Enfin, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance envers ma famille et mes amis. J'espère leur amener ne serait-ce qu'une infime partie de l'amour et de la force qu'ils m'offrent.

Chacun d'entre eux a participé à la réalisation de cette thèse.

Table des matières

INTRODUCTION	15
1. Les extraits de Gui	18
1.1. Les aspects botaniques du Gui européen (<i>Viscum album</i> L.)	18
1.1.1. Taxonomie	18
1.1.2. Morphologie du <i>Viscum album</i> L.	18
1.1.2.1. La partie aérienne	18
1.1.2.2. Le système endophytique	19
1.1.3. Cycle biologique du <i>Viscum album</i> L.	19
1.1.3.1. Les premières années de développement d'un buisson de <i>Viscum album</i> L.	19
1.1.3.2. Le cycle végétatif annuel	20
1.2. Les extraits de Gui européen	21
1.2.1. La préparation des extraits Iscador®	21
1.2.2. D'autres extraits de Gui	22
1.3. La composition des extraits de Gui	23
1.3.1. Les lectines	23
1.3.1.1. Aspects physico-chimiques	23
1.3.1.2. Trafic intracellulaire des MLs	24
1.3.2. Les viscotoxines	27
1.3.3. Les autres substances entrant dans la composition des extraits de Gui	27
1.3.4. Facteurs influençant la composition des extraits de Gui Iscador®	28
1.3.4.1. L'influence de la saison de récolte	28
1.3.4.2. L'influence de l'arbre hôte	28
1.3.4.3. L'influence de la fermentation	29
1.4. Les études cliniques sur l'emploi des extraits de Gui dans le cadre de thérapies anti-tumorales	29
1.4.1. L'évaluation de la sécurité d'emploi des extraits de Gui	30
1.4.2. L'évaluation de l'efficacité du traitement par les extraits de Gui dans un contexte tumoral	30
1.4.3. Considérations critiques au sujet des études cliniques sur les extraits de Gui	31
1.5. Les propriétés biologiques des extraits de Gui, des lectines et des viscotoxines	31
2. Les propriétés cytostatiques et cytotoxiques des extraits de Gui	31
2.1. Les propriétés cytostatiques des extraits de Gui	31
2.2. Les propriétés cytotoxiques des extraits de Gui	32
2.2.1. Les différents types de mort cellulaire	32
2.2.1.1. La mort par apoptose	33
2.2.1.2. La mort par nécrose	35
2.2.1.3. L'autophagie et la mort cellulaire	36

2.2.2. Les propriétés cytotoxiques des extraits de Gui	39
2.2.2.1. Cytotoxicité vis-à-vis des différents types cellulaires	39
2.2.2.2. Type de mort induit par les extraits de Gui ou leurs composants, les MLs et les VTs	40
2.2.3. Les facteurs faisant varier les propriétés cytostatique et cytotoxique des extraits de Gui	41
2.2.3.1. Variations en fonction du type cellulaire	42
2.2.3.2. Variations en fonction du type d'extrait, relation avec la teneur en MLs ou en VTs	42
2.2.3. La combinaison des extraits de Gui avec d'autres traitements anti-tumoraux	44
3. Les propriétés immuno-modulatrices	44
3.1. Le développement d'une réaction immunitaire	44
3.1.1. La mise en œuvre de l'immunité innée	45
3.1.1.1. Les phénomènes précoces	45
3.1.1.2. Les phénomènes inductibles de l'immunité innée	45
3.1.2. La mise en œuvre de l'immunité adaptative	47
3.1.2.1. L'apprêtement de l'Ag par les CPAg et la présentation des peptides antigéniques aux LT	48
3.1.2.2. L'activation des LT naïfs	49
3.1.2.3. L'activation des LB naïfs	51
3.2. L'immunité anti-tumorale	51
3.2.1. Immunité spécifique anti-tumorale	51
3.2.2. Le rôle de l'inflammation dans le développement d'une tumeur	52
3.2.2.1. Le microenvironnement tumoral	52
3.2.2.2. L'inflammation et l'initiation de la tumeur	53
3.2.2.3. L'inflammation et la promotion de la tumeur	53
3.2.2.4. L'inflammation et la dissémination métastatique	54
3.2.2.5. Une inflammation anti-tumorale ?	55
3.3. Modulation de la réponse immunitaire par les extraits de Gui	55
3.3.1. Modulation de la réponse immunitaire adaptative	55
3.3.2. L'influence des extraits de Gui sur l'immunité innée	56
3.3.2.1. L'activation des CPAg	56
3.3.2.2. L'influence des extraits de Gui sur les cellules NK	56
3.3.2.3. L'induction de la sécrétion de cytokines par les extraits de Gui	56
4. L'IL-1β, un membre de la famille de l'IL-1	57
4.1 Les propriétés biologiques de l'IL-1 β	57
4.1.1. Les récepteurs de l'IL-1 β	58
4.1.2. Le rôle de l'IL-1 β dans l'inflammation	58
4.1.3. D'autres protéines de la famille de l'IL-1 β participant à son activité biologique	59
4.1.3.1. L'IL-1 α	59
4.1.3.2. L'antagoniste du récepteur de l'IL-1	59

4.1.4. Le rôle de l'IL-1 β dans le développement de tumeurs	60
4.2. Synthèse et sécrétion d'IL-1 β	62
4.2.1. La synthèse de la pro-IL-1 β	62
4.2.2. L'activation de la pro-IL-1 β en IL-1 β	62
4.2.3. Les inflammasomes	63
4.2.3.1. Les inflammasomes formés autour des NLRs	63
4.2.3.2. L'inflammasome de type NLRP3	65
4.2.4. Les voies de sécrétion de l'IL-1 β	69
4.3. Induction de la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par les extraits de Gui ou leurs composants	70
4.3.1. Induction de la sécrétion de TNF- α	70
4.3.2. Induction de la sécrétion d'IL-1 β	71
MATERIELS ET METHODES	73
1. Réactifs	73
2. Culture cellulaire	75
2.1. Entretien des cultures	75
2.2. Obtention des cellules et mise en culture dans des puits	76
3. Mesure de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion du bleu Trypan après traitement par les VAFs	76
4. Mesure de l'activité métabolique et/ou viabilité cellulaire par le test au MTS	77
4.1. Principe du test	77
4.2. Réalisation du test	77
4.3. Détermination du nombre cellules à déposer par puits	77
5. Mesure de la cytotoxicité par dosage de la LDH	78
5.1. Principe du dosage	78
5.2. Réalisation du dosage	79
5.3. Détermination de la zone de linéarité de l'absorbance en fonction de la quantité de LDH	79
6. Incubation des cellules pour les dosages des cytokines et de la LDH	80
7. Dosage des cytokines par ELISA	80
8. Immunoempreinte	81
9. Dosage des nitrites par la méthode de Griess	82
10. Statistique	82
RESULTATS	83
1. Evaluation de l'aptitude des cellules MAMI et des MØ E-clone à sécréter de l'IL-1β	83
1.1. Les MØ E-clone et les cellules MAMI sécrètent de l'IL-1 β en réponse aux stimulations par le LPS puis par l'ATP	84
1.2. Les MØ E-clone, mais non les cellules MAMI sécrètent de l'IL-1 β en réponse à la stimulation par l'imiquimod	89

2. Etude de l'aptitude des VAFs à induire les synthèses et/ou sécrétions d'IL-1β et de TNF-α	91
2.1. Evaluation de l'induction des sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α en réponse à des incubations prolongées en présence de VAFs	91
2.2. Des traitements prolongés par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFs ne conduisent pas à la sécrétion d'IL-1 β	97
2.3. Les VAFs utilisés à concentrations sub-cytotoxiques ne peuvent induire la sécrétion d'IL-1 β , quelle que soit la durée de stimulation	99
3. Etude de l'aptitude des VAFs à moduler les sécrétions d'IL-1β et de TNF-α	101
3.1. Un prétraitement par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFP amplifie la sécrétion d'IL-1 β induite par les stimulations par le LPS puis l'ATP	101
3.1.1. Détermination des conditions optimales de stimulation par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFP et par le LPS et l'ATP	103
3.1.1.1. Détermination du temps de prétraitement nécessaire pour que le VAFP amplifie la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP	104
3.1.1.2. Caractérisation de la sécrétion d'IL-1 β lorsque les stimulations induites par le LPS et les VAFs surviennent de manière simultanée	104
3.1.1.3. L'effet amplificateur de la sécrétion d'IL-1 β est maintenu lorsque le VAFP est ajouté après stimulation par le LPS	106
3.1.2. La sécrétion d'IL-1 β induite par le prétraitement par le LPS est amplifiée en réponse à une brève stimulation par les trois VAFs	107
3.1.3. Mécanismes impliqués dans l'amplification, par les VAFs, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP	108
3.1.3.1. Implication de la synthèse protéique et de NF- κ B dans la modulation, par le VAFP, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP	108
3.1.3.2. La stimulation par le VAFP induit un mécanisme qui accélère la sécrétion d'IL-1 β	111
3.1.3.3. Implication des ROS dans la modulation, par le VAFP, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP	112
3.2. Les VAFs modulent la sécrétion d'IL-1 β induite par l'imiquimod	114
DISCUSSION	117
Sécrétion de cytokines en réponse à des traitements prolongés en présence de VAFs	118
Sécrétion de cytokines en réponse à des traitements brefs en présence de VAFs	120
BIBLIOGRAPHIE	123

Sommaire des figures

Figure 1. Cycle biologique du <i>Viscum album</i> L. ssp <i>abietis</i> .	20
Figure 2. Le trafic intracellulaire de la ricine	26
Figure 3. L'apoptose	35
Figure 4. Formation de la membrane de l'autophagosome impliquant le complexe Beclin-1-PI3K	38
Figure 5. Synthèse de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires à partir des phospholipides membranaires	46
Figure 6. L'activation des LT par les CPAg	50
Figure 7. Activation de l'inflammasome de type NLRP3 par l'efflux de K ⁺	67
Figure 8. Activation de l'inflammasome de type NLRP3 par déstabilisation de la membrane lysosomale	67
Figure 9. Activation de l'inflammasome de type NLRP3 par les ROS	68
Figure 10. Mécanismes de sécrétion de l'IL-1 β par les monocytes, les M \emptyset ou les CD après stimulation par le LPS et l'ATP	70
Figure 11. Variation de l'absorbance en fonction du nombre de cellules déposé par puits	78
Figure 12. Variation de l'absorbance en fonction du nombre de cellules déposé par puits	80
Figure 13. Les M \emptyset E-clone sécrètent de l'IL-1 β en réponse aux stimulations par le LPS puis l'ATP	87
Figure 14. Induction de la sécrétion d'IL-1 β après stimulation des M \emptyset E-clone par le TNF- α puis l'ATP	88
Figure 15. Les cellules MAMI sécrètent de l'IL-1 β en réponse aux stimulations par le LPS puis l'ATP	89
Figure 16. Les M \emptyset E-clone sécrètent de l'IL-1 β et des dérivés nitrés en réponse à la stimulation par l'imiquimod	90
Figure 17. Les cellules MAMI ne peuvent pas sécréter d'IL-1 β en réponse à la stimulation par l'imiquimod	91
Figure 18. Les cellules MAMI sécrètent du TNF- α mais non de l'IL-1 β après traitement prolongé par les VAFs	92
Figure 19. Les M \emptyset E-clone sécrètent de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du TNF- α mais non de l'IL-10 après traitement prolongé par les VAFs	94
Figure 20. Mise en évidence après traitements prolongés par les VAFs des activités cytotoxiques développées au niveau des M \emptyset E-clone	96
Figure 21. Sécrétion d'IL-1 β par les cellules MAMI traitées par les VAFs et l'ATP	98
Figure 22. Sécrétion d'IL-1 β par les M \emptyset E-clone traités par les VAFs et l'ATP	99
Figure 23. Les VAFs appliqués à concentrations sub-cytotoxiques ne supportent pas la sécrétion d'IL-1 β chez les M \emptyset E-clone, quelle que soit la durée de stimulation	100
Figure 24. Une pré-stimulation par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFP amplifie la sécrétion d'IL-1 β induite par la stimulation par le LPS et l'ATP	102
Figure 25. Modulation, par les VAFM et VAFQ, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP	103
Figure 26. L'effet du VAFP persiste même en absence de phase de prétraitement	104
Figure 27. Analyse cinétique des sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α induites en réponse à la stimulation simultanée par le LPS et le VAFP	105
Figure 28. Analyse cinétique de la sécrétion d'IL-1 β induite en réponse à la stimulation simultanée par le VAFM ou le VAFQ et le LPS	106

Figure 29. L'effet du VAFP persiste même pour de courtes durées de traitement après pré-stimulation par le LPS	107
Figure 30. Appliqués après pré-stimulation par le LPS, les trois VAFs amplifient la sécrétion d'IL-1 β après ajout d'ATP	108
Figure 31. Le Bay11-7082, mais non le cycloheximide, inhibe l'amplification de la sécrétion d'IL-1 β induite par le VAFP	110
Figure 32. Le VAFP accélère la sécrétion d'IL-1 β induite en réponse à la stimulation par le LPS et l'ATP	112
Figure 33. Contribution des ROS dans la modulation, par le VAFP, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP	113
Figure 34. La co-stimulation par les VAFs amplifie la sécrétion d'IL-1 β induite par l'imiquimod	115

Sommaire des tableaux

Tableau 1. Arbres hôtes et sous-espèces de Gui qu'ils hébergent	18
Tableau 2. Poids moléculaires, nombres d'acides aminés et de chaînes des MLs	24
Tableau 3. Spécificités de reconnaissance des MLs	24
Tableau 4. Profil de composition en VTs selon l'arbre hôte	29
Tableau 5. Les différents types de mort et leurs principales caractéristiques morphologiques et biochimiques	32

Liste des abréviations (par ordre alphabétique de l'abréviation)

Ac : anticorps

Ag : antigène

APAF1 : apoptotic protease activating factor 1

ARNr : ARN ribosomal

ASC : apoptosis speck like containing a CARD

Atg : autophagy related genes

Bcl-2 : B cell lymphoma protein 2

BH3 only proteins : protéines de la famille Bcl-2 présentant des domaines d'homologie Bcl-2 de type 3

CARD : domaine de recrutement de caspase

CD : cellule dendritique

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Cox : cyclooxygénases

CPAg : cellules présentatrices d'antigènes

CSC : cellules sanguines circulantes

Cyt c : cytochrome c

DISC: death inducing signalling complex

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

ERAD : endoplasmic Réticulum-associate protein Dégradation

FADD : Fas associated death domain

FasL : Fas ligand

HMGB : high mobility group box

IL : interleukine

IFN : interféron

iNOS : NO synthase inductible

IRF : IFN regulatory factor

LAMP2 : Lysosome Associated Membrane Protein-2

LB : lymphocyte B

LDH : lactate déshydrogénase

LPS : lipopolysaccharide

LRR : domaine riche en répétition de leucine

LT : lymphocyte T

MAT : macrophages associés aux tumeurs

MDP : muramyl dipeptide

MEC : matrice extracellulaire

ML : lectines de Gui

MMP : matrix metalloproteinases

MØ: macrophage

mTOR: mamalian target of rapamycin

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NK : natural killer
NLR : récepteur de type NOD
NOD : domaine d'oligomérisation de nucléotides
Nox : NADPH oxydase
PARP : poly ADP ribose polymérase
PE : phosphatidyl-éthanolamine
PGE2 : prostaglandine E2
PI : iodure de propidium
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase
PIR : protéine inhibitrice des ribosomes
PNN : polynucléaires neutrophiles
PS : phosphatidylsérine
PYD : domaine de type pyrine
RE : réticulum endoplasmique
RM : récepteur du mannose
ROS : dérivés réactifs de l'oxygène
RNS : dérivés de l'oxyde nitrique
SVF : sérum de veau fœtal
SOD : superoxyde dismutase
STAT : Signal Transducers and Activators of Tanscription
TIR : Toll/IL-1 récepteur
TGF: transforming growth factor
TLR : récepteur de type Toll
TNF: tumor necrosis factor
TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand
Treg : lymphocyte T régulateur
TXNIP : protéine interagissant avec la thiorédoxine
VAF: *Viscum album* fermenté
VEGF: vascular endothelial cell growth factor
VT : viscotoxine

INTRODUCTION

Ces dernières années, la contribution de l'immunité innée est apparue comme essentielle dans le développement d'une réponse immunitaire spécifique. Les cellules de l'immunité innée sont dotées de récepteurs reconnaissant des motifs fréquemment exposés par les micro-organismes, mais non par nos cellules [1]. Ces récepteurs, tels que les récepteurs de type Toll (TLR), génèrent des signaux au niveau de la cellule, supportant la production et la libération de nombreuses molécules, dont les cytokines et les chémokines, qui favorisent le développement d'une réponse spécifique adaptée au micro-organisme rencontré. Ce concept s'étend également à l'immunité anti-tumorale. En effet, dans ce contexte, de nombreuses molécules endogènes ont été décrites comme ligands des TLRs, parmi lesquelles figurent des composants de la matrice extracellulaire, ou la protéine high mobility group box (HMGB)1. Des études ont montré que le développement d'une réaction immunitaire anti-tumorale spécifique repose sur la reconnaissance de tels signaux, par les cellules dendritiques (CD). Toutefois, ceux-ci ne suffisent pas à la mise en place d'une telle réponse. Récemment, il est apparu que la sécrétion d'interleukine (IL)-1 β par les CD constitue un élément indispensable à la mise en place de cette réponse [2].

Une telle découverte vient *a priori* à l'encontre de la notion généralement admise, selon laquelle l'inflammation, chronique en particulier, participe grandement au développement d'une tumeur.

En effet, l'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire majeure. Sa synthèse, principalement assurée par les phagocytes mononucléés, est finement régulée, impliquant dans la plupart des cas, deux variétés de signaux [3]. Le premier d'entre eux consiste en l'activation du facteur de transcription NF- κ B, et est délivré après reconnaissance de produits microbiens, comme le lipopolysaccharide (LPS), par les TLRs, ou de cytokines, tel que le facteur de nécrose des tumeurs (TNF)- α [4]. Ce signal provoque d'une part la synthèse de pro-IL-1 β qui s'accumule au niveau du cytosol, mais conditionne aussi l'expression de récepteurs de motifs cytosoliques impliqués dans la deuxième étape de cette synthèse, les récepteurs de types NOD (NLR), en particulier le NLRP3 [5]. Les conditions de développement du second signal sont alors réunies, lorsque d'une part le premier a été délivré, et que d'autre part les NLR perçoivent un signal reflétant une lésion tissulaire, tel que l'ATP extracellulaire. Ce deuxième signal assure l'activation de la pro-caspase-1 en caspase-1, enzyme qui clive alors la pro-IL-1 β en IL-1 β qui est rapidement sécrétée. Par ailleurs, certaines substances, notamment l'imiquimod [6], sont à même d'induire par elles-mêmes la synthèse et sécrétion d'IL-1 β .

Le TNF- α est une autre cytokine pro-inflammatoire de premier ordre, dont la synthèse est également sous le contrôle du facteur NF- κ B. Cette cytokine possède un peptide signal qui lui permet d'emprunter la voie classique de sécrétion des protéines ; l'IL-1 β en est quant à elle dépourvue, et sa voie de sécrétion reste partiellement comprise [7].

Les extraits de Gui (*Viscum album* L.) sont depuis longtemps employés comme adjuvants dans un contexte de thérapies anti-tumorales. Leurs propriétés reposent principalement sur les lectines (ML)-I, -II et -III ou les viscotoxines (VT) qu'ils contiennent.

Parmi les mécanismes d'action envisageables pour ces préparations, figurent des propriétés cytostatique et cytotoxique sur des cellules tumorales, ou non [8-13]. La mort des cellules tumorales, mais également celle des cellules endothéliales [14, 15] pourrait contribuer aux propriétés anti-tumorales de ces préparations. De plus, le type de mort induit par les extraits, à savoir l'apoptose, pourrait par ailleurs contribuer à leurs propriétés immuno-modulatrices, autre composante essentielle des propriétés biologiques de ces extraits. Ainsi, les extraits de Gui peuvent induire l'expression de molécules de co-stimulation [16], ou réguler la sécrétion de diverses cytokines, parmi lesquelles l'IL-1 β ou le TNF- α . Des travaux réalisés soit avec les extraits [10, 17, 18], soit avec les MLs [12, 13], ont mis en évidence la sécrétion d'IL-1 β par les cellules mononucléées circulantes, notamment les monocytes. D'autres études n'ont cependant pas détecté de libération de cette cytokine, aussi bien avec les extraits [19], qu'avec les MLs [20]. L'induction de la sécrétion de TNF- α par les monocytes a également été rapportée pour les extraits [10, 18, 21], ou les MLs [10, 12, 22]. Toutefois, certains travaux n'ont pas détecté la sécrétion de TNF- α après stimulation par les extraits [19, 20, 23].

Considérant l'importance de l'IL-1 β dans le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale, les travaux réalisés sur l'induction de la sécrétion de cette cytokine par les extraits, ainsi que les données actuellement disponibles sur sa biologie, l'aptitude des extraits de Gui fermentés (VAFs) issus de Pin (VAFP), de Pommier (VAFM) ou de Chêne (VAFQ) à induire ou moduler les synthèse et/ou sécrétion de pro-IL-1 β et d'IL-1 β a été explorée, au niveau de macrophages (M \emptyset) murins. La sécrétion de TNF- α a été également étudiée.

1. Les extraits de Gui

Les extraits de Gui Iscador[®] sont obtenus à partir du Gui européen (*Viscum album* L.). Ils sont employés depuis de nombreuses années en tant que traitement adjuvant dans un contexte de pathologie tumorale.

1.1. Les aspects botaniques du Gui européen (*Viscum album* L.) [24]

Viscum album L. est un sous-arbrisseau épiphyte hémiparasite. En effet, il est capable de réaliser sa propre photosynthèse, mais il est dépendant de l'arbre hôte sur lequel il se développe pour trouver l'eau et les sels minéraux qui lui sont nécessaires.

1.1.1. Taxonomie

Le genre *Viscum*, de la famille des Viscaceae et de l'ordre des Santalales, présente une centaine de membres répartis essentiellement en Afrique et dans le sud de l'Asie. En Europe, le Gui européen, *Viscum album* L., se différencie en trois principales sous-espèces, qui colonisent différents arbres hôtes (Tableau 1). Au niveau morphologique, ces sous-espèces se distinguent par leur fruit mûr.

Tableau 1. Arbres hôtes et sous-espèces de Gui qu'ils hébergent. D'après [24].

Arbre hôte	Sous espèce de <i>Viscum album</i>
Pin	ssp. <i>austriacum</i>
Sapin	ssp. <i>abietis</i>
Arbres dicotylédones (Pommier, Chêne...)	ssp. <i>Album</i>

1.1.2. Morphologie du *Viscum album* L.

1.1.2.1. La partie aérienne

Viscum album L. est un buisson toujours vert, d'aspect sphérique, pouvant atteindre 150 cm de diamètre. Ses feuilles chlorophylliennes sont alternes, oblongues, vert jaunâtre, cireuses et mesurent entre 2 et 8 cm. Elles présentent de 3 à 5 nervures parallèles ; les stomates sont remarquablement répartis sur leurs deux faces. Les fleurs, petites, sessiles, de couleur vert jaunâtre, sont constituées de 4 tépales insérés sur deux spirales. *Viscum album* L. est une espèce dioïque, c'est-à-dire que les fleurs mâles et les fleurs femelles sont situées sur des pieds différents. Les fleurs mâles sont plus grandes que les fleurs femelles.

Le fruit est une pseudo-baie sphérique ou piriforme, de 6-10 mm de diamètre, blanche ou plus rarement jaunâtre. La disparation des quatre tépales et du stigmate laisse des cicatrices noires au sommet du fruit. Le fruit renferme une pseudo-graine consistant en un embryon auquel adhère un endocarpe très fin. Le tout est noyé dans une pulpe visqueuse appelée viscine.

1.1.2.2. Le système endophytique

Le système endophytique est composé de deux parties. Le suçoir primaire croît de manière radiale pour atteindre le cambium de l'hôte et y puiser eau et sels minéraux. Des ramifications corticales évoluent dans les tissus superficiels de l'hôte, assurant la propagation latérale de l'hémiparasite. Le caractère chlorophyllien de ces structures rend possible la régénération du buisson si celui-ci est sectionné. De ces ramifications, naissent des suçoirs secondaires qui pénètrent verticalement dans le cambium de l'hôte, permettant l'apparition de buissons secondaires.

1.1.3. Cycle biologique du *Viscum album* L.

Viscum album L. se caractérise par un rythme de développement très lent. Le cycle présenté décrit celui de la sous-espèce *abietis* (Fig. 1).

1.1.3.1. Les premières années de développement d'un buisson de *Viscum album* L.

Contrairement à la majorité des plantes, la pseudo-graine du *Viscum album* L. ne germe pas sur la terre, mais sur le tronc de son hôte. La première année, la pseudo-graine engluée dans la viscine germe de mars à avril, émettant un prolongement. Celui-ci est muni, au niveau de l'hypocotyle, d'un disque de fixation qui adhère au tronc de l'arbre hôte. A partir de ce moment-là, se développe le suçoir primaire. L'épicotyle reste dans la pseudo-graine. La plantule entre en dormance pendant l'hiver. La deuxième année, l'hypocotyle et le système endophytique croissent, la première paire de feuilles se forme en position décussée par rapport aux cotylédons. La troisième année, une deuxième paire de feuilles apparaît, décussée par rapport à la première. Les ramifications corticales sont mises en place et le suçoir primaire commence à puiser l'eau et les sels minéraux à partir des vaisseaux de xylème de l'hôte. La première ramification dichotomique apparaît la quatrième année. La floraison débute vers la cinquième année, et avec elle la reproduction sexuée de la plante.

1.1.3.2. Le cycle végétatif annuel

Les fleurs sont formées en début d'été mais ne s'ouvrent pas avant le printemps suivant. La pollinisation a lieu pendant l'été, essentiellement par des mouches. Les fruits mûrissent au cours de l'hiver, puis sont disséminés principalement par les oiseaux qui s'en nourrissent. Contrairement à une notion répandue, le passage digestif n'est pas nécessaire à la germination de la pseudo-graine. Celle-ci se déroule au printemps suivant.

En ce qui concerne le système endophytique, les ramifications secondaires croissent de manière continue et indépendamment de la croissance de l'hôte. Les suçoirs adaptent leur croissance à celle de l'hôte. En effet, la multiplication des cellules de leur cambium se synchronise à celle des cellules du cambium de l'hôte, évitant ainsi la séparation de ces tissus.

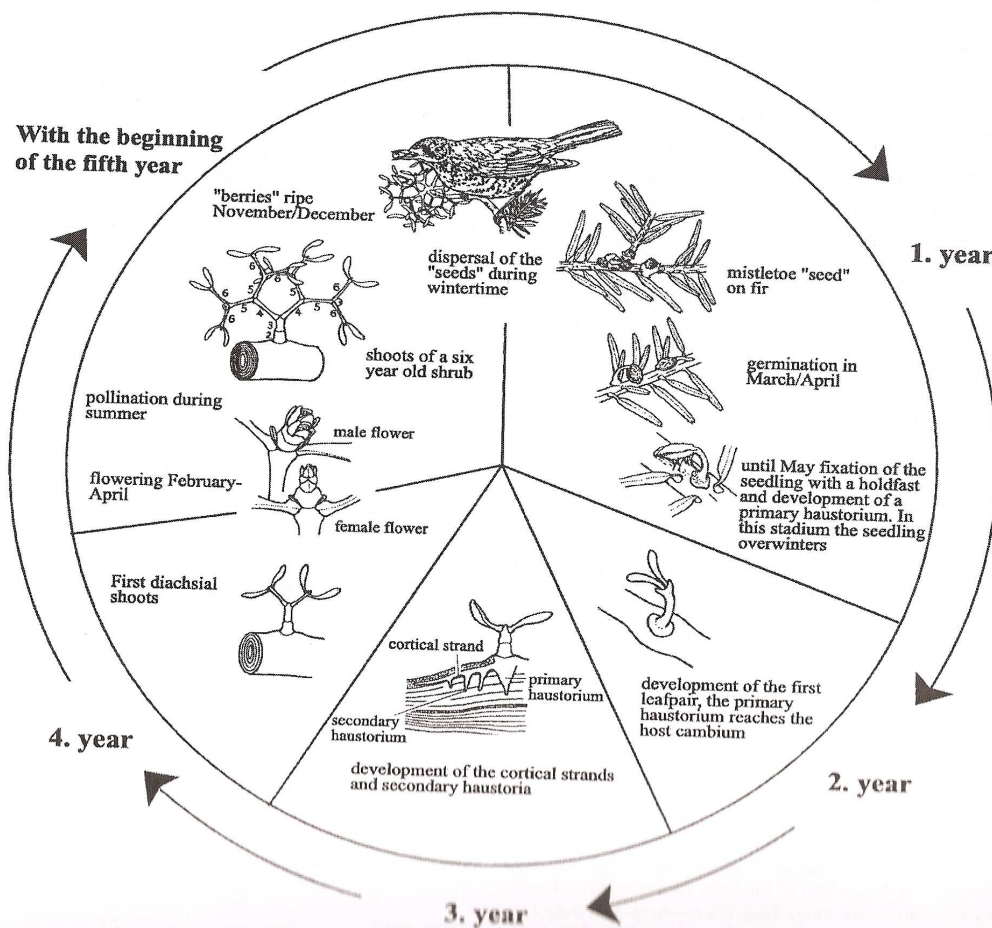


Figure 1. Cycle biologique du *Viscum album L. ssp. abietis*. La première année, la pseudo-graine germe sur l'écorce de l'arbre hôte aux mois de mars à avril. Le suçoir primaire débute son développement. La plantule entre en dormance pour l'hiver. La deuxième année, apparaît la première paire de feuilles tandis que le suçoir gagne le cambium de l'hôte. Au cours de la troisième année, une autre paire de feuilles est formée et des ramifications corticales sont mises en place. La première ramification dichotomique apparaît la quatrième année. La cinquième année, les premières fleurs, mâles ou femelles, se forment dès le mois de février et jusqu'au mois d'avril, permettant le début de la reproduction sexuée. La pollinisation a lieu au cours de l'été et les fruits sont mûrs aux mois de novembre/décembre. D'après [24].

1.2. Les extraits de Gui européen

1.2.1. La préparation des extraits Iscador®

Les extraits Iscador® sont élaborés à partir des différentes variétés de *Viscum album* L..

Le principe qui préside à la fabrication de ces spécialités est d'élaborer une préparation nouvelle à partir de différents composants, à savoir les jus d'hiver et les jus d'été, et ce grâce à un traitement particulier.

La récolte du Gui et le traitement de la matière végétale

Les feuilles, les tiges et les bourgeons âgés de un à deux ans, sont récoltés en été. En hiver, viennent s'ajouter les baies mures. Il y a donc deux périodes de récolte, qui donneront deux fractions distinctes. Après récolte et le plus rapidement possible, le Gui est broyé pour favoriser l'extraction des substances qu'il contient.

L'extraction et la fermentation lactique

Le Gui broyé est mis à macérer dans un milieu composé d'eau purifiée, de saccharose et de bactéries *Lactobacillus plantarum*, afin d'extraire les principes actifs contenus dans les tissus de la plante. La fermentation de 72 h, initiée par l'ajout des lactobacilles, assure une meilleure stabilité des extraits, favorisant leur conservation. Au bout des 72 h, l'extrait de Gui fermenté est pressé pour le débarrasser des grosses particules insolubles.

Cette fermentation est menée en hiver et en été, indépendamment pour chacun des broyats issus de chacune des variétés de *Viscum album* L.. En hiver, les récoltes de baies d'une part et celles de tiges, de bourgeons et de feuilles d'autre part sont traitées séparément.

L'assemblage des fractions d'été et des fractions d'hiver

Les fractions hivernale (obtenue après mélange des extraits issus de baies et de ceux issus des autres parties de la plante) et estivale, sont assemblées au printemps et en automne, selon un procédé particulier aux extraits Iscador®. Pour cela, une machine a été spécialement mise au point, consistant en un disque de titane (1 m de diamètre), mis en rotation à la vitesse de 10000 tours/min. Les jus d'hiver sont amenés au centre du disque, tandis que ceux d'été sont déposés à la périphérie, par 12 distributeurs. La rotation du disque conduit à la diffusion des jus d'hiver vers la périphérie, où ils vont s'unir aux jus d'été.

Le produit ainsi obtenu constitue l'extrait Iscador®.

La dilution et la stérilisation

L'extrait précédemment obtenu peut maintenant être dilué dans une solution isotonique de NaCl. Vu la sensibilité des substances contenues dans les extraits, une stérilisation par la chaleur n'est pas envisageable. Le procédé de stérilisation par filtration stérile est donc adopté. Les extraits Iscador® sont ensuite conditionnés de manière aseptique en ampoules injectables de 1 ml (à administrer par voie sous-cutanée). Ce procédé permet de réduire au maximum les risques de contamination des extraits par des particules ou des germes.

Par ailleurs, la conformité du produit fini quant à la valeur du pH, à l'absence de particules et à la stérilité est contrôlée. De surcroît, les principales substances des extraits, à savoir les MLs et les VTs sont dosées en tant que marqueurs qualitatifs. Le dosage des VTs est effectué par chromatographie en phase liquide haute performance, par rapport à des standards de VTs A1, A2, A3 et B. Les MLs sont dosées par la méthode ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), dans laquelle les MLs sont reconnues par un anticorps (Ac) monoclonal de capture puis par un Ac monoclonal de détection, couplé à la peroxydase. Les Ac employés reconnaissent les trois types de MLs (ML-I, ML-II et ML-III). Le dosage est réalisé grâce à une gamme étalon de ML-II, et la teneur globale en MLs est exprimée en ML-II.

Par ailleurs, comme tout extrait végétal, les extraits de Gui présentent des teneurs variables en leurs différents principes actifs. Ceci a conduit à mettre en place une démarche de standardisation tout au long du procédé de fabrication.

1.2.2. D'autres extraits de Gui

Les autres types d'extraits de Gui diffèrent selon leur procédé d'extraction. Les extraits Abnoba sont, par exemple, issus de la macération en milieu aqueux des plantes fraîches. Les extraits Helixor ou Isorel sont obtenus par extraction à l'eau froide, tandis que les préparations Eurixor et Lectinol proviennent de l'extraction en milieu aqueux de plantes fraîches cueillies en hiver sur des peupliers. Les produits Iscucin sont obtenus selon les recommandations de la pharmacopée homéopathique allemande [25].

1.3. La composition des extraits de Gui

L'étude de la composition des extraits de Gui a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs types de protéines, les MLs et les VTs, mais également celle de diverses autres substances.

1.3.1. Les lectines

Les MLs (ML-I, ML-II et ML-III), tout comme la ricine ou l'abrine, issues respectivement de *Ricinus communis* L. et *Abrus precatorius* L., appartiennent à la famille des protéines inhibitrices des ribosomes (PIR). Ces protéines sont en général produites au niveau de la graine, mais les MLs le sont au niveau des feuilles du *Viscum album* L.. Les PIRs sont subdivisées en deux groupes selon leur structure [26] :

- les PIR-1, qui ne disposent que d'une chaîne A douée des propriétés inhibitrices des ribosomes ;
- les PIR-2, qui disposent en plus de la chaîne A, d'une chaîne B permettant la reconnaissance de structures osidiques présentes au niveau des cellules cibles. Ces toxines sont les plus toxiques puisqu'elles peuvent lier leurs cellules cibles. Les MLs font partie de cette catégorie.

1.3.1.1. Aspects physico-chimiques

Les trois types de MLs connus à ce jour se distinguent selon leur poids moléculaire ainsi que leur spécificité de reconnaissance de motifs osidiques.

(1) Structure

Comme indiqué précédemment, les MLs sont composées de deux chaînes, A et B [27], reliées entre elles par un pont disulfure [28]. Les structures primaires et tertiaires de la ML-I [29-31] et de la ML-III [32, 33] ont été déterminées. Les MLs sont très similaires quant à leur nombre d'acide aminés et leur séquence peptidique. Selon la ML considérée, le nombre de chaînes et donc leur poids moléculaire peut toutefois varier (Tableau 2) [32, 34]. Ainsi, lorsque la ML-I est présente en grande quantité, elle peut former des dimères de paires de chaîne A et de chaîne B, conduisant donc à un tétramère [28].

Tableau 2. Poids moléculaires, nombres d'acides aminés et de chaînes des MLs. D'après [32, 34].

ML	Nombre d'acides aminés (chaîne A ; chaîne B)	Poids moléculaire (Da)	Nombre de chaînes	Poids moléculaires des chaînes (A ; B) (Da)
I	254 ; 264	115 000	4	29 000 ; 34 000
II		60 000	2	27 000 ; 32 000
III	254 ; 262	50 000	2	25 000 ; 30 000

(2) Spécificités de reconnaissance

Etant donné la forte homologie de structure des MLs entre elles, la variabilité observée dans leur spécificité de reconnaissance, ainsi que leur différence de poids moléculaire, ont longtemps été attribuées à des modifications post-traductionnelles de la ML-I, et en particulier à des glycosylations [32]. Récemment, les gènes codant la ML-I et la ML-III ont été clonés [29, 35-37]. Une équipe a par ailleurs isolé 3 clones (*ml1p*, *ml2p* et *ml3p*) et proposé que ceux-ci codent respectivement la ML-I, la ML-II ou la ML-III [38]. Par ailleurs, d'autres études [39] ont montré que les spécificités de reconnaissances différentes des MLs, peuvent être attribuées à des différences au niveau de la séquence d'acides aminés de leur chaîne B, localisées en particulier au niveau des sites de liaison des sucres.

Les MLs présentent deux spécificités de reconnaissance (Tableau 3), définissant trois types de MLs. Ces spécificités ont été déterminées sur la base de l'inhibition, par des sucres, de leurs propriétés cytotoxiques ou d'agglutination. Ces sucres sont le D-galactose et le N-acétyl-D-galactosamine [34]. Dernièrement, des travaux ont montré, pour la ML-I, une spécificité de reconnaissance de dérivés osidiques sialylés présentés par des gangliosides [40].

Tableau 3. Spécificités de reconnaissance des MLs. D'après [34].

ML	Spécificité de reconnaissance des sucres
I	D-galactose
II	D-galactose et N-acétyl-D-galactosamine
III	N-acétyl-D-galactosamine

1.3.1.2. Trafic intracellulaire des MLs

D'une manière générale, le transit des toxines PIR-2 est motivé par la nécessité d'atteindre une structure leur permettant de franchir les membranes lipidiques, et d'accéder au cytosol pour y exercer leur activité inhibitrice de la synthèse de protéines [26]. Vu la similitude entre

les MLs et la ricine, le trafic intracellulaire des MLs, notamment de la ML-I, est généralement assimilé à celui de la ricine. C'est donc celui-ci qui va être décrit (Fig. 2).

Après reconnaissance de récepteurs à la surface des cellules cibles, la ricine est endocytée et conduite vers des structures vésiculaires appelées endosomes précoces. A partir de cette localisation, une grande partie de la toxine est redirigée vers la membrane par des endosomes de recyclage, tandis qu'une autre gagne des endosomes tardifs pour finalement être libérée dans les lysosomes, où elle est dégradée. Pour gagner le cytosol, la ricine doit continuer sa progression vers l'appareil de Golgi, la ricine ne pouvant pas transloquer directement des endosomes/lysosomes dans le cytosol de manière consécutive à la diminution du pH au sein de ces structures [41]. La sulfatation d'une ricine recombinante indique que cette toxine transiterait par le Golgi, lieu d'une telle modification biochimique [42]. Enfin, cette toxine a été mise en évidence au niveau du réseau trans-golgien [43]. Les voies empruntées par la ricine pour transiter des compartiments endosomaux vers le Golgi sont certainement multiples. Il semble toutefois que les endosomes tardifs ne soient pas impliqués, comme en atteste, entre autre, l'insensibilité de la ricine au pH, dont la diminution est nécessaire au transfert des endosomes précoces vers les endosomes tardifs [44, 45]. Par la suite, la ricine est convoyée vers le réticulum endoplasmique (RE). Bien que cette toxine n'ait jamais été visualisée dans ce compartiment, divers éléments témoignent d'un tel trajet. Outre le fait que le RE constitue la seule structure intracellulaire disposant de transporteurs peptidiques ou de translocases protéiques, telles que Sec61, offrant un accès au cytosol, le plus convainquant d'entre eux réside dans la glycosylation intracellulaire d'une forme de ricine non glycosylée. Or, le RE constitue le seul organite intracellulaire disposant d'une activité enzymatique à même d'assurer cette modification [42]. De plus, la détection de la chaîne A glycosylée de la ricine dans une fraction cytosolique montre que la translocation dans le cytosol n'advient qu'après passage par le RE [42]. En outre, le couplage de la chaîne A à une séquence qui l'oriente vers le RE, appelée séquence KDEL, augmente la toxicité de la ricine [46, 47]. Dans ce contexte, la ricine ne disposant pas elle-même d'une telle séquence, elle pourrait interagir avec une protéine la présentant et faisant la navette entre le Golgi et le RE, telle la calréticuline [48]. Une fois parvenue au RE, les deux chaînes de la ricine se dissocient, la chaîne A gagnant le cytosol. Il semble que la chaîne A détourne un système normalement dévolu à la dégradation protéolytique des protéines aberrantes ou non fonctionnelles, le système ERAD (Endoplasmic Reticulum-associate protein Dégradation) [49]. Ce système assure la translocation des protéines dans le cytosol, localisation où elles sont ensuite

dégradées [50]. Pour être prise en charge par celui-ci, la chaîne A devrait subir une déconformation. Une telle stratégie est très périlleuse, dans la mesure où le devenir naturel des protéines entraînées dans ce système ERAD est la dégradation rapide et totale. Néanmoins, la comparaison des chaînes A des toxines inhibitrices des ribosomes met en évidence un taux de lysine étonnamment faible, qui protégerait celles-ci d'une telle dégradation [51, 52]. Enfin, la chaîne A s'appuierait sur sa cible même, le ribosome, en tant que protéine chaperonne, pour retrouver sa conformation originale [53].

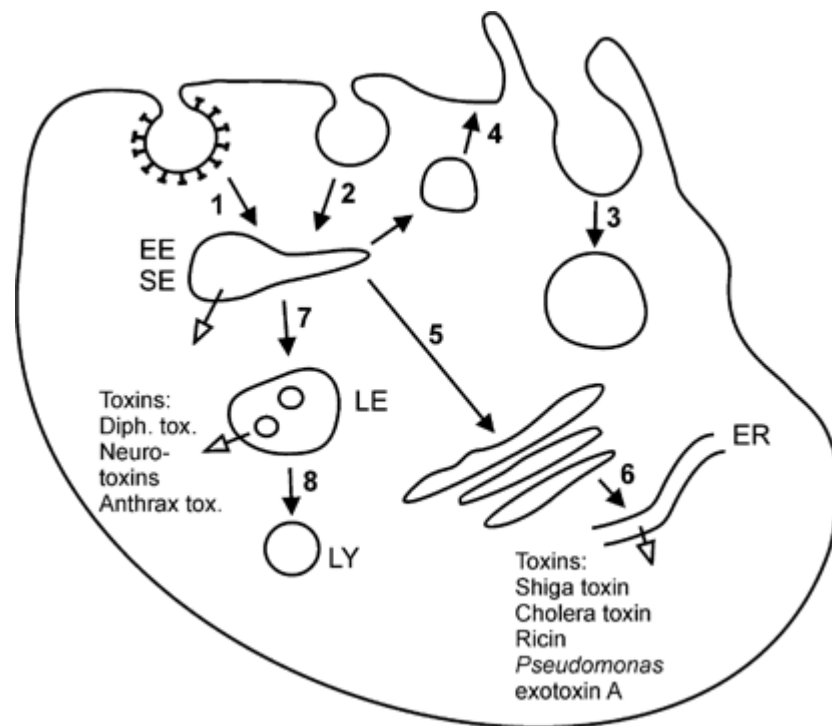


Figure 2. Le trafic intracellulaire de la ricine. Après internalisation (1, 2, 3), la ricine peut être soit recyclée vers la membrane cytoplasmique (4), soit dirigée vers des endosomes précoces (EE) à partir desquels elle peut gagner l'appareil de Golgi (5) et atteindre le réticulum endoplasmique (ER, 6). A partir de cet organite, les deux chaînes se dissocient et la chaîne A accède au cytosol où elle exerce ses propriétés inhibitrices des ribosomes. Une partie de la ricine présente dans les EE peut aussi rejoindre les endosomes tardifs (LE, 7), qui fusionnent ensuite avec les lysosomes (LY, 8) dans lesquels elle pourrait être dégradée. D'après [54].

Bien que le trafic intracellulaire des MLs soit assimilé à celui de la ricine, il faut toutefois souligner des travaux qui l'ont étudié de manière plus détaillée. Une étude menée sur des cellules fibroblastiques de type 3T3 a comparé microscopiquement les trafics intracellulaires de la ML-I et de la ricine. Pour ce faire, les toxines ont été couplées à des fluorochromes distincts, permettant un suivi individuel de leur trafic intracellulaire [55]. Cette étude montre que ces deux protéines sont internalisées à partir de domaines de la membrane cytoplasmique différents, sans qu'il n'y ait de compétition entre elles pour les sites de liaison aux cellules.

Outre des motifs galactose et N-acétyl-D-galactosamine, un nouveau type de récepteurs de haute affinité, les gangliosides CD-75, a été découvert pour les MLs [40]. Les deux toxines sont alors retrouvées, 5 minutes après internalisation, dans des vésicules présentant ou non des caractéristiques d'endosomes précoces. Tandis que la ricine est localisée dans des structures de la zone périnucléaire, la ML-I est quant à elle préférentiellement localisée au niveau de la périphérie cellulaire. Après 1 heure, ces toxines sont retrouvées, soit colocalisées dans des compartiments vésiculaires communs, soit localisées dans des compartiments distincts. Quoiqu'il en soit, aucun de ces compartiments vésiculaires n'a pu être rattaché soit au Golgi, soit aux lysosomes, comme en attestent les marquages aux céramides ou à LAMP2 (Lysosome Associated Membrane Protein-2) respectivement. Ces résultats suggèrent que les deux toxines seraient liées à des structures membranaires au niveau des vésicules intracellulaires, et qu'elles pourraient être prises en charge de manière distincte par les cellules [55].

1.3.2. Les viscotoxines

Les VTs sont de petites protéines basiques de 46 acides aminés, de faible poids moléculaire (5 KDa) apparentées aux thionines. Plusieurs formes ont été décrites (VT A1, A2, A3, B, 1-PS et U-PS) , et les structures primaires et tridimensionnelles de certaines d'entre elles ont été déterminées [56-60]. L'analyse de leur structure laisse apparaître une forte homologie de séquence d'acides aminés. Leurs structures tridimensionnelles sont également très proches, comportant trois ponts disulfures qui assurent leur stabilité tridimensionnelle. Toutefois, quelques particularités ont été mises en évidence, qui influent sur leurs propriétés biologiques [56, 57]. Parmi celles-ci, figurent des propriétés cytotoxiques, qui sont différentes d'une VT à l'autre. Comparée à celles de la VT A3 et de la VT A2, l'activité cytotoxique de la VT B est la plus faible [61]. Cette différence a été attribuée à la présence d'un motif arginine au niveau de la VT B, qui réduirait la capacité de cette VT à interagir avec la membrane plasmique [57].

1.3.3. Les autres substances entrant dans la composition des extraits de Gui

Diverses autres substances ont été mises en évidence dans les extraits de Gui. Parmi celles-ci, figurent des peptides, des acides triterpéniques [62], une agglutinine liant la chitine [63], ainsi que des oligo et des polysaccharides [64, 65]. Ainsi, les galacturonanes estérifiés sont prédominants dans les parties vertes du Gui, tandis que les baies contiennent surtout des arabinogalactanes [66].

1.3.4. Facteurs influençant la composition des extraits de *Gui Iscador*[®]

Les variations observées dans la composition des extraits de Gui sont principalement attribuables à l'origine des buissons de Gui, à la saison de récolte, mais également au procédé pharmaceutique qui leur est appliqué [67].

1.3.4.1. L'influence de la saison de récolte

Le suivi des teneurs en MLs et en VTs des feuilles de Gui poussant sur un Pommier, le long de leur période de développement (à partir de leur formation en avril, jusqu'à leur dépérissement l'année suivante), a montré qu'elles varient au cours de l'année. Ainsi, la concentration en VTs est maximale pendant l'été (25 mg/g de plante sèche), et plus particulièrement au mois de juin. Elle chute ensuite rapidement pour atteindre un plateau en hiver (< 10 mg/g de plante sèche), puis, à partir du mois d'avril de l'année suivante, diminue à nouveau brutalement, jusqu'à pratiquement disparaître. Au contraire, la teneur en MLs augmente au cours de l'été pour atteindre son maximum au mois de décembre (2 mg/g de plante sèche). A partir de ce moment-là, la teneur en MLs chute rapidement jusqu'au mois de mai, où elle se stabilise alors (< 0,5 mg/ml).

1.3.4.2. L'influence de l'arbre hôte

Des études ont montré que l'arbre hôte dont est issu le buisson de Gui influence la teneur en MLs [11] et en VTs [61, 67] de la plante et des extraits qui sont préparés à partir d'elle. En effet, les extraits de Gui des sous-espèces *abies* et *album* ont les plus hautes teneurs en VTs. Parmi les extraits issus de la sous-espèce *album*, ceux issus de Gui de Chêne contiennent deux fois plus de VTs que ceux issus de Gui de Pommier, qui ont une teneur similaire aux extraits de Gui de la sous-espèce *austriacum*, présente au niveau du Pin.

Les MLs ont été dosées notamment dans les extraits issus de Gui de Chêne, de Pommier ou de Pin. Les MLs, en particulier la ML-I, sont fortement concentrées dans les extraits issus de Gui de Chêne et de Pommier. Les extraits de Gui issus de Pin contiennent de faibles concentrations de MLs, et la ML-III est majoritaire.

D'autre part, le profil d'expression de VTs s'avère caractéristique de la sous-espèce de Gui, et donc de l'arbre hôte qui l'héberge (Tableau 4).

Tableau 4. Profil de composition en VTs selon l'arbre hôte. D'après [61, 67].

Arbre hôte	Sous espèce de Gui	Profil de VTs
Pin	<i>austriacum</i>	1-PS, U-PS, pas de A1
Sapin	<i>abietis</i>	A3, 1-PS, très peu de A2
Pommier, Chêne, Orme	<i>album</i>	A1, A2, A3, pas de 1-PS

1.3.4.3. L'influence de la fermentation

Au cours de la fermentation, une diminution du pH de la solution s'opère pendant les premières 36 h pour atteindre le pH définitif de 3,8. Par ailleurs, les protéines contenues dans les tissus végétaux (VTs et MLs) sont libérées dans la fraction soluble. Ainsi, la teneur en VTs augmente légèrement au cours des premières heures de ce processus, puis se stabilise. Après une brève augmentation (les 9 premières heures), celle en MLs décroît lors des 36 premières heures (d'environ 220 µg de ML/ml de fraction soluble à 50 µg/ml), pour atteindre un plateau, en même temps que le pH se stabilise.

La grande variabilité de la composition des extraits inhérente à l'ensemble des facteurs ci-dessus mentionnés, souligne la nécessité de suivre un protocole de fabrication de manière rigoureuse, afin de réduire au maximum ces variations. Dans cette optique, une démarche de standardisation a été développée. Elle s'appuie sur la fixation des étapes essentielles du procédé de fabrication, à savoir la récolte (les parties de plantes récoltées, les périodes et les techniques de récoltes), l'assemblage des fractions d'extraits ainsi que le conditionnement et les contrôles de qualité finals.

1.4. Les études cliniques sur l'emploi des extraits de Gui dans le cadre de thérapies anti-tumorales

Les extraits de Gui ont été testés cliniquement dans le cadre d'atteintes tumorales. Les principaux paramètres liés à la pathologie cancéreuse évalués au cours de ces études sont la durée de survie ou la durée de vie sans rechute, l'évolution de la tumeur, la diminution des effets indésirables liés aux traitements conventionnels, et l'amélioration de la qualité de vie des patients. Par ailleurs, la sécurité du traitement par les extraits de Gui a été évaluée.

1.4.1. L'évaluation de la sécurité d'emploi des extraits de Gui

Bien que les extraits de Gui soient employés en tant que traitement adjuvant aux thérapies anti-tumorales conventionnelles, les études d'interaction pharmacologique entre ces drogues sont rares [68].

L'utilisation des extraits de Gui dans un contexte de pathologie tumorale est globalement sûre, dans la mesure où peu d'effets secondaires liés à ce traitement ont été reportés [68]. Le développement d'un angioedème constitue le seul effet secondaire sérieux reporté. Les effets secondaires fréquemment observés localement sont un prurit, un érythème et une induration ; au niveau systémique, peut apparaître un syndrome pseudo-grippal avec fièvre, fatigue, et céphalées. Il faut toutefois remarquer que la notion même d'effet secondaire est délicate à définir, dans la mesure où certaines manifestations secondaires aux extraits de Gui, locales notamment, peuvent être considérées comme témoignant de l'action de ceux-ci sur l'organisme. Dans ce contexte, de telles manifestations sont alors plutôt désirées. Il découle aussi de cela que l'appréciation des effets secondaires, et donc les données concernant leur incidence, sont très variables.

1.4.2. L'évaluation de l'efficacité du traitement par les extraits de Gui dans un contexte tumoral

Les extraits de Gui ont été testés cliniquement dans le traitement de tumeurs solides, principalement localisées aux niveaux mammaire et colorectal, mais aussi broncho-pulmonaire, pancréatique, cutané, ou également à la tête et au cou ou à la vessie [68, 69].

Globalement, des revues systématiques de la littérature indiquent que l'effet des extraits de Gui le plus fréquemment reporté, réside en l'amélioration de la qualité de vie des patients, se traduisant par une amélioration du bien-être physique et psychique. Il est remarquable que cet effet soit constant pour plusieurs types de tumeurs. Par ailleurs, il n'est pas restreint à un type d'extraits en particulier, mais semble plutôt être attribuable à l'utilisation d'extraits de Gui de manière générale [68].

La diminution des effets secondaires liés aux traitements conventionnels, tels que la chimio- ou la radiothérapie, apparaît également de façon récurrente [68-70]. Concernant l'augmentation de la survie, l'effet du traitement par les extraits de Gui est davantage sujet à débat. En effet, certaines études concluent à l'absence d'effet de ces préparations sur ce paramètre [68, 70], tandis que d'autres considèrent leur influence comme plutôt favorable [25, 69]. Des conclusions similaires sont valables pour l'évolution de la tumeur, une régression de

la tumeur apparaissant par exemple lors de l'administration locale ou à forte dose des extraits, tandis qu'aucun effet anti-tumoral n'a pas été mis en évidence par ailleurs [68-70].

1.4.3. Considérations critiques au sujet des études cliniques sur les extraits de Gui

La majorité des auteurs de revues s'accordent sur la nécessité d'améliorer la qualité des études cliniques menées jusqu'ici et de les harmoniser [25, 68-70]. En effet, une grande partie des études a été réalisée il y a bien longtemps, et de ce fait ne répond pas aux exigences actuelles du domaine. Les évaluations plus récentes sont davantage satisfaisantes, mais restent peu nombreuses. La difficulté de mener des études en aveugle est également prise en compte, étant donné que l'administration des extraits est souvent suivie d'une réaction locale de l'organisme, qui constitue un obstacle majeur à la mise en place de telles études.

La mise en place d'études de niveau qualitatif conforme aux attentes actuelles, tout en tenant compte des difficultés inhérentes à la nature du traitement, est fortement encouragée.

1.5. Les propriétés biologiques des extraits de Gui, des lectines et des viscotoxines

Les études menées pour comprendre les mécanismes moléculaires pouvant supporter les effets des extraits de Gui ont révélé des propriétés cytotoxiques ainsi que des propriétés immuno-modulatrices qui vont maintenant être considérées.

2. Les propriétés cytostatiques et cytotoxiques des extraits de Gui

Les extraits de Gui peuvent ralentir *in vitro* la prolifération cellulaire (effet cytostatique) voire même induire la mort des cellules traitées (effet cytotoxique), selon différents processus de mort cellulaire.

2.1. Les propriétés cytostatiques des extraits de Gui

L'aptitude des extraits de Gui à bloquer l'évolution des cellules dans le cycle cellulaire a été démontré sur des lignées de cellules cancéreuses mammaires, pulmonaires ou de myélomes multiples, ainsi que sur des modèles de cellules de la peau ou de cellules endothéliales [9, 71-73]. Ceci suggère que les extraits induisent d'abord un ralentissement de la prolifération cellulaire, avant d'entraîner la mort de la cellule. En outre, des études réalisées *in vitro* ont

mis en évidence que de faibles concentrations d'extraits inhibent la prolifération, sans induire la mort de la cellule [8].

2.2. Les propriétés cytotoxiques des extraits de Gui

Les extraits de Gui peuvent induire la mort des cellules selon différentes voies. En effet, la mort cellulaire est un phénomène complexe, qui peut se dérouler selon différentes modalités.

2.2.1. Les différents types de mort cellulaire

Une cellule peut être considérée comme morte, quand au moins l'un des critères suivants est rempli :

- perte de l'intégrité membranaire, reflétée par l'incorporation *in vitro* de colorants vitaux de type iodure de propidium (PI) ;
- fragmentation de la cellule, noyau y compris, en petites structures appelées corps apoptotiques ;
- prise en charge de ces corps apoptotiques par les cellules adjacentes, *in vivo*.

Les différents types de mort cellulaire peuvent être distingués selon des critères morphologiques et biochimiques (Tableau 5), insuffisants en eux-mêmes mais qui doivent être considérés de manière coordonnée pour définir le type de mort observé [74].

Tableau 5. Les différents types de mort et leurs principales caractéristiques morphologiques et biochimiques. PS, phosphatidylsérine ; ROS, dérivés réactifs de l'oxygène ; ATP, adénosine triphosphate ; PARP, poly ADP ribose polymerase ; Atg, autophagy related genes ; Bcl-2, B cell lymphoma protein 2. Adapté d'après [74].

Type de mort cellulaire	Principales caractéristiques morphologiques	Principales caractéristiques biochimiques
Apoptose	Diminution de la taille des cellules et de leur noyau Rétraction des pseudopodes Arrondissement des cellules Fragmentation du noyau Maintien de l'intégrité membranaire Maintien des organites intracellulaires Bourgeoisement de la membrane plasmique Phagocytose <i>in vivo</i>	Activation des caspases Dissipation du potentiel de membrane mitochondrial Perméabilisation de la membrane mitochondriale Fragmentation de l'ADN oligonucléosomal Exposition de PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique Surproduction de ROS
Nécrose	Augmentation de la taille des cellules Modification morphologique des organites intracellulaires Perte de l'intégrité membranaire et fuite du contenu cytoplasmique Condensation modérée de la chromatine	Activation de calpaïnes Activation de cathepsines Augmentation du taux d'ATP Rupture de la membrane plasmique Profils de clivages spécifiques de PARP1 Surproduction de ROS
Autophagie	Formations vésiculaires avec une membrane double Vacuolisation massive du cytoplasme Peu ou pas de phagocytose <i>in vivo</i>	Dissociation de beclin-1 et Bcl-2/xl Conversion d'Atg8

2.2.1.1 La mort par apoptose

Le terme apoptose est dérivé du mot grec qui signifie « feuilles qui tombent des arbres ». L'apoptose joue un rôle primordial dans le développement des organismes vivants, mais également tout au long de la vie dans l'homéostasie, notamment dans le système immunitaire, ou dans l'élimination des cellules tumorales.

Au niveau morphologique, la cellule s'arrondit, ses pseudopodes se rétractent, son volume diminue, son noyau se fragmente tandis que la chromatine se condense. Les organites intracellulaires ne connaissent pas de modifications de leur structure. Bien que la membrane plasmique émette des bourgeonnements, son intégrité est maintenue jusqu'à un stade très avancé du processus. Finalement et *in vivo*, ces cellules sont éliminées par phagocytose [74].

Au niveau biochimique, les cellules en voie d'apoptose sont caractérisées, en particulier, par la transition de phosphatidylsérine (PS), du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe, l'augmentation de la production intracellulaire de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), la perte du potentiel de membrane mitochondrial, ainsi que l'activation de caspases ou de protéines pro-apoptotiques. Concernant ces dernières, deux voies d'activation, appelées intrinsèque et extrinsèque, sont décrites (Fig. 3).

(1) La voie intrinsèque

La voie intrinsèque est également appelée voie mitochondriale, car elle est engagée en réponse à la libération, de l'espace inter-membranaire des mitochondries vers le cytosol, d'un facteur pro-apoptotique, le cytochrome c (Cyt c). L'augmentation de la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie permet une telle libération, lorsque la cellule perçoit des signes de lésion cellulaire, tels que l'augmentation des ROS, des dommages de l'ADN ou la privation de facteurs de croissance [75]. La présence du Cyt c au niveau cytosolique permet alors la formation d'un complexe protéique, l'apoptosome. Il est composé, en plus du Cyt c, du facteur APAF1 (apoptotic protease activating factor 1) et permet le clivage et l'activation de la caspase-9.

En amont de la mitochondrie, cette voie est contrôlée par les protéines de la famille de Bcl-2 (B cell lymphoma protein 2), comprenant des membres soit pro-, soit anti-apoptotiques. Ainsi, les facteurs pro-apoptotiques BAX et BAK sont impliqués dans l'augmentation de la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie. Leur activité est réprimée par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl. L'inhibition exercée par ces dernières sur BAX et

BAK est levée par leur interaction avec des protéines de la famille Bcl-2, caractérisées par la présence unique de domaines d'homologie Bcl-2 de type 3 (BH3 only).

(2) La voie extrinsèque

Cette voie est initiée par la liaison de Fas ligand (FasL), du TNF ou de TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) à des récepteurs de mort (death receptors). Ceci induit la formation de complexes, appelés death inducing signalling complex (DISC), comprenant Fas, la protéine adaptatrice Fas associated death domain (FADD), et la pro-caspase 8, qui est alors activée.

L'activation de la voie extrinsèque peut également soutenir l'activation de la voie intrinsèque. En effet, la caspase-8 est capable d'activer le facteur tBID, qui lève l'inhibition exercée par Bcl-2 et Bcl-xl sur BAK et BAX.

Les deux voies initiatrices présentées ci-dessus convergent au niveau de la caspase-3, activée par les caspases-9 et -8, engageant alors la phase effectrice de l'apoptose. La caspase-3 clive d'autres substrats, comme les caspases-6 et -7, qui conduisent finalement à la mort de la cellule.

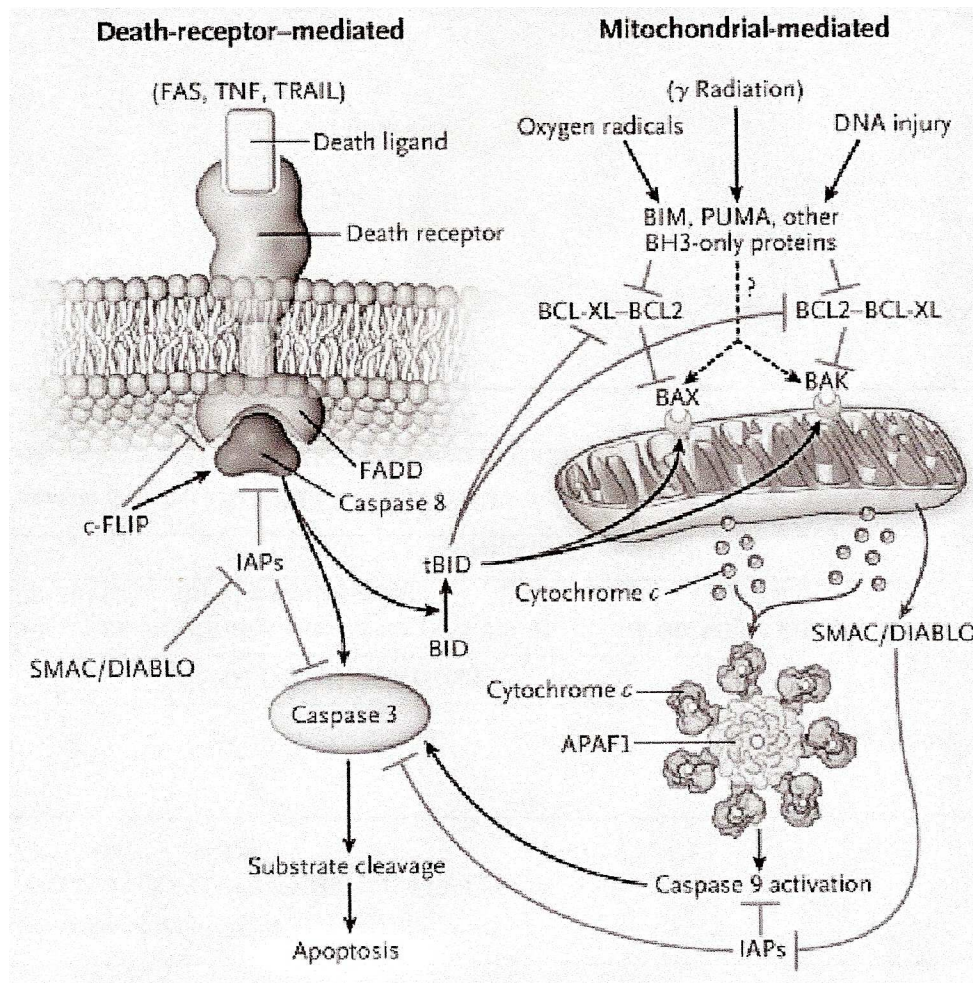


Figure 3. L'apoptose. La voie extrinsèque est initiée après liaison du TNF- α , de TRAIL ou de FasL à un récepteur de mort. Le complexe DISC se forme et active la caspase-8. La voie intrinsèque est engagée en réponse à un stress cellulaire, perçu par les protéines BH3 only, qui lève l'inhibition que les protéines Bcl-2 et Bcl-xl exercent sur les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK. Ces dernières déclenchent la libération du Cyt c de la mitochondrie dans le cytosol. Le Cyt c s'associe alors à APAF1 pour former l'apoptosome et activer la pro-caspase-9 en caspase-9. Les caspases-8 et -9 peuvent toutes deux activer la caspase-3, qui clive à son tour d'autres substrats, conduisant *in fine* à la mort de la cellule. D'après [75].

2.2.1.2. La mort par nécrose

La mort par nécrose est caractérisée au niveau morphologique par une augmentation du volume de la cellule et de ses organites, une rupture précoce de la membrane cellulaire, conduisant à la fuite du contenu cellulaire dans le milieu. L'implication des mitochondries dans la réalisation de ce phénomène a été considérée, en particulier au travers de la production de ROS ou de la perméabilisation de leurs membranes. La rupture des lysosomes a également été évoquée pour conduire à la nécrose, par la libération d'enzymes protéolytiques lysosomales, ainsi que par la génération de ROS. D'autres modifications cellulaires interviennent également, notamment l'activation de poly ADP ribose polymérase (PARP), qui

peuvent épuiser les stocks d'ATP pour réparer un ADN altéré, mais aussi une altération lipidique ou l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} .

De manière générale, la nécrose est considérée comme une mort de type accidentel, secondaire à des agressions cellulaires trop intenses pour être surmontées (par exemple lors d'une ischémie ou de chocs mécaniques). Pourtant, de récentes découvertes montrent que le déroulement de la nécrose peut également reposer sur des processus cellulaires régulés, notamment dans le cas de nécroptose ou de la nécrose médiée par les PARPs [76].

2.2.1.3. L'autophagie et la mort cellulaire

L'autophagie, qui provient du grec « auto », soi-même et « phagein », manger, joue un rôle de premier ordre dans le maintien de l'homéostasie intracellulaire, en éliminant les organites et les protéines dégradés ou non fonctionnels. Elle peut également être déclenchée en réponse à une privation en ressources nutritives, assurant alors le recyclage d'organites non essentiels à la survie de la cellule et leur transformation en éléments essentiels. Ce processus (de macro-autophagie, à distinguer des autres types d'autophagie, à savoir la micro-autophagie et celle induite par des protéines chaperonnes) est caractérisé, au niveau morphologique, par la présence de formations vésiculaires, appelées autophagosomes, dotées d'une membrane double, et contenant des organites intracellulaires endommagés. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes, formant des autophagolysosomes dans lesquels les organites sont dégradés par les hydrolases lysosomales.

L'induction de l'autophagie est sous le contrôle de deux complexes, Beclin-1-phosphatidylinositol-3kinase (PI3K) et mTOR (mammalian target of rapamycin)-Atg1, vers lesquels convergent de nombreux signaux qui conduisent à ce processus. Le premier complexe répond à des signaux de stress, ou à la sollicitation de récepteurs de motifs par exemple. Le second intègre des signaux environnementaux, tels qu'un stress ou une carence nutritive [77].

La formation *de novo* des membranes de l'autophagosome est un processus complexe, contrôlé par un ensemble de protéines Atg (autophagy related genes) et qui comprend plusieurs étapes [78]. Le mécanisme décrit ci-après correspond à celui initié par le complexe Beclin-1-PI3K. Dans la première étape, la PI3K s'associe à Beclin-1 (ou Atg6) [79, 80]. Ensuite, l'élongation de la double membrane est assurée de manière conjointe par deux systèmes de conjugaison, qui interviennent au niveau des protéines Atg8 (aussi connu sous le

nom de LC3) et Atg12. Ces dernières appartiennent à la famille des protéines de type ubiquitine. Comme celle-ci, elles peuvent être liées de manière covalente à d'autres protéines pour en moduler les propriétés. Une telle liaison est assurée par des systèmes de conjugaison de type E1 et E2, par référence à ceux impliqués dans la conjugaison de l'ubiquitine. Ces systèmes forment une liaison entre un résidu glycine libre de l'ubiquitine et un résidu cystéine qu'ils présentent. Ils sont mis en œuvre de manière séquentielle, l'ubiquitine étant transférée de l'enzyme E1 à l'enzyme E2. Une enzyme de type E3 permet enfin la liaison de l'ubiquitine à la protéine cible à conjuguer, au niveau d'un résidu lysine [81].

Dans l'un de ces systèmes de conjugaison, Atg8 est clivé par Atg4, dévoilant ainsi un résidu glycine libre. Ce résidu est intégré à un groupe phosphatidyl-éthanolamine (PE) de la membrane en cours de formation, grâce à Atg7 et Atg3, les enzymes de type E1 et E2 respectivement. Le dimère Atg5-Atg12 joue ici le rôle de l'enzyme de type E3, transférant Atg8 au groupement PE. Dans l'autre système, le résidu glycine libre d'Atg12 est couplé à Atg5 par les enzymes de type E1 et E2 que sont respectivement Atg7 et Atg10. Le complexe Atg5-Atg12 se lie à Atg16, et l'ensemble va se fixer sur la face externe de la membrane, avant de s'en désolidariser. Ce système ne fait pas intervenir d'enzyme de type E3 (Fig. 4).

L'origine de la membrane de l'autophagosome a longtemps été considérée comme étant le RE [82]. Tout dernièrement, des travaux ont montré que la membrane externe de la mitochondrie pourrait également initier la formation de l'autophagosome dans des conditions de carence nutritionnelle [83].

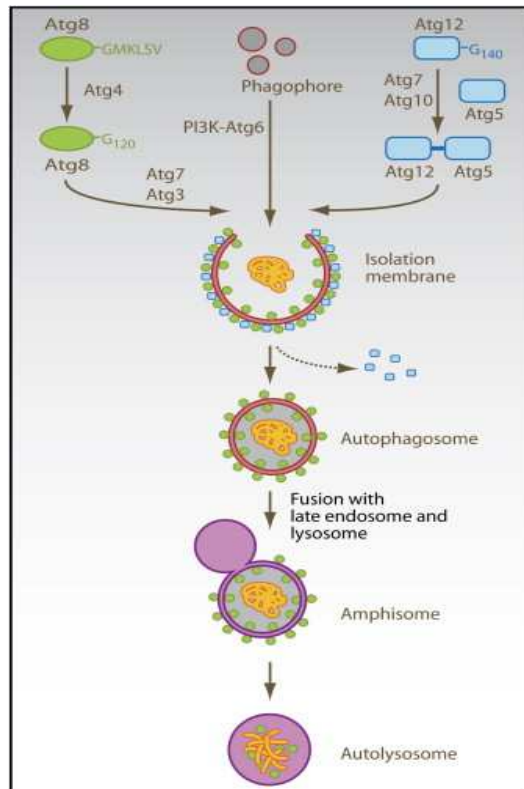


Figure 4. Formation de la membrane de l'autophagosome impliquant le complexe Beclin-1-PI3K. Les PI3K et Beclin-1 (Atg6) initient la formation de l'autophagosome. L'élongation est assurée par deux voies de type ubiquitine, faisant intervenir des protéines de type E1, E2 et pour l'une d'entre elles E3. La voie Atg7-Atg3, lie Atg8 à des groupes PE après qu'un résidu glycine a été dévoilé au niveau d'Atg8 par Atg4. L'autre voie, Atg7-Atg10, libère un résidu glycine permettant l'association d'Atg12 à Atg5. Ce complexe lie Atg16, et l'ensemble s'associe à la membrane en cours de formation. Ces deux voies fonctionnent de manière concertée et promeuvent toutes deux la liaison d'Atg8 à la membrane d'isolation de l'autophagosome, étape essentielle à son extension. D'après [78].

La mort de cellules présentant des caractéristiques morphologiques d'autophagie a été rapportée, mais cela ne veut pas pour autant dire que ce phénomène constitue en lui-même une voie de mort cellulaire. En effet, l'implication de l'autophagie dans la mort cellulaire n'a été démontrée que par l'inhibition de la dégradation des glandes salivaires, chez des drosophiles déficientes en gènes régulant cette voie. Toutefois, de nombreux éléments montrent qu'elle peut au contraire promouvoir la survie des cellules dans des conditions de stress. Ainsi, certains auteurs préfèrent employer le terme de « mort associée à l'autophagie ». Pourtant, il est vrai que l'autophagie peut elle-même conduire à la mort cellulaire lorsque l'apoptose est inhibée [74, 76, 84].

La complexité des mécanismes moléculaires assurant la mort cellulaire est encore amplifiée par les interconnexions existants entre eux. En effet, certains stimuli connus pour induire l'apoptose peuvent, dans certains cas, engendrer une mort cellulaire présentant les

caractéristiques morphologiques de nécrose. Par ailleurs, apoptose et autophagie sont régulées par des protéines communes à ces deux voies, comme Beclin-1, protéine de type BH3 only, qui peut inhiber Bcl-2 et Bcl-xl. De même, la voie extrinsèque d'apoptose et l'autophagie se recoupent, FADD ayant été impliqué dans l'autophagie et Atg5 dans l'apoptose [84].

2.2.2. Les propriétés cytotoxiques des extraits de Gui

Les propriétés cytotoxiques des extraits de Gui, des MLs et des VTs ont été démontrées *in vitro* et *in vivo*, sur des cellules tumorales ou d'autres types cellulaires, notamment les cellules endothéliales ou les cellules du système immunitaire.

2.2.2.1. Cytotoxicité vis-à-vis des différents types cellulaires

La cytotoxicité des extraits de Gui et des MLs a été démontrée *in vitro* sur des cellules tumorales mammaires [11, 71, 85, 86], cérébrales [87], vésicales [88], cutanées [89], pulmonaires [71] ou encore de myélomes multiples [9], d'origine murine ou humaine. Ces effets apparaissent pour des doses de l'ordre du mg/ml pour les extraits et du ng/ml pour les MLs. Des études menées *in vivo* sur des souris traitées avec des extraits de Gui ou la ML-I ont montré une diminution de la taille des tumeurs, une réduction de la dissémination métastatique, ainsi qu'une augmentation de la durée de vie [90-95]. L'activité cytotoxique de ces substances pourrait participer à la modification de ces paramètres. Pourtant, comme mentionné plus haut, les résultats des études cliniques ne sont pas concluants quant au bénéfice de l'application de ces substances sur la régression de la tumeur ou l'augmentation de la durée de vie.

Par ailleurs, les extraits de Gui conduisent à la mort des cellules endothéliales [14, 15, 71, 96]. Ceci pourrait participer à l'effet anti-tumoral de ces substances, en inhibant la néo-angiogénèse. En effet, la croissance tumorale requiert la disponibilité en abondance de nutriments, assurée par la néoformation locale de vaisseaux sanguins, phénomène appelé néo-angiogénèse.

Enfin, les extraits de Gui et les MLs exercent des propriétés cytotoxiques sur des cellules sanguines, en particulier les lymphocytes T (LT), les monocytes [10, 12, 97-101] ou les polynucléaires neutrophiles (PNN) [102-104]. Les lymphocytes B (LB) sont quant à eux beaucoup moins sensibles [8, 105, 106].

Une cytotoxicité des VTs a été reportée sur les lymphocytes humains et les granulocytes [107, 108], mais aussi sur une lignée cellulaire de sarcome, la lignée Yoshida [61].

De manière paradoxale, certaines études ont mis en évidence la capacité des extraits ou des MLs à favoriser la multiplication de cellules cancéreuses [109] ou non [10, 13], le plus souvent pour de faibles doses.

2.2.2.2. Type de mort induit par les extraits de Gui ou leurs composants, les MLs et les VTs

Parmi les substances contenues dans les extraits de Gui, des propriétés cytotoxiques ont essentiellement été rapportées pour les MLs et les VTs. De plus, ces deux types de substances supportent des processus de mort différents.

(1) L'apoptose

L'aptitude des MLs à induire la mort des cellules a été initialement attribuée aux propriétés inhibitrices de la synthèse protéique de leur chaîne A [28]. Cette activité, comme celles des chaînes des RIP-2 en général [110], repose sur le clivage d'une liaison N-glycosidique entre un résidu adénine et un ribose, au niveau de la sous-unité 28S de l'ARN ribosomal (ARNr), conduisant à sa dépurination. Ce site est localisé au sein de la séquence la plus conservée de la grande sous-unité de l'ARNr, et constitue le site de liaison du facteur d'élongation de la synthèse protéique des cellules eucaryotes et procaryotes [111]. L'importance de ce site est soulignée par le fait qu'il soit la cible de la ricine et de l'endoribonucléase α -sarcin, issue d'*Arpergillus giganteus* [112]. Ces deux drogues inhiberaient la synthèse des protéines en réduisant la flexibilité des ribosomes [113].

L'inhibition de la synthèse protéique conduisant à l'apoptose reste inconnue. Il est néanmoins admis que les MLs conduisent à une mort de type apoptotique, comme le montrent des approches à la fois morphologiques (aspects de la cellule et de son noyau) et biochimiques [71, 91, 97-99, 102-104, 114]. Parmi celles-ci, figurent les marquages à l'annexine-V, qui lie les groupes PS exposés à la face externe de la membrane plasmique des cellules en voie d'apoptose, et au PI, colorant vital qui n'est incorporé au niveau intracellulaire que par les cellules dont l'intégrité membranaire est altérée. Une autre méthode repose sur l'évaluation de la variation du potentiel de membrane mitochondrial. La détection du clivage des PARPs, ou encore l'étude de l'activation de caspases constituent d'autres techniques d'étude de la mort cellulaire (Tableau 5).

Des travaux ont montré que l'apoptose induite par les MLs peut emprunter la voie intrinsèque, notamment révélée par la libération du Cyt c, la variation du potentiel de membrane des mitochondries, ou l'activation de facteurs également recrutés par cette voie, tels que les caspase-9 ou APAF1 [106, 114, 115]. La voie extrinsèque a également été impliquée de manière controversée dans l'apoptose induite par les MLs. Ainsi, une étude a montré que les propriétés cytotoxiques de la ML-I sont neutralisées par le blocage du TNF- α [22]. Par ailleurs, les MLs induisent l'expression de FasL au niveau de lymphocytes, ce qui pourrait ainsi induire indirectement l'apoptose de cellules exprimant Fas [116]. D'un autre côté, le blocage de la voie intrinsèque chez des cellules Jurkat n'inhibe pas l'effet pro-apoptotique de la ML-I, suggérant que la voie extrinsèque pourrait être suffisante dans ce cas. Ces données n'excluent toutefois pas l'implication de la voie intrinsèque dans l'apoptose [106].

Le facteur p53 joue un rôle de première importance dans la régulation de l'apoptose. Il intervient comme facteur de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans l'apoptose, telles que les protéines pro-apoptotiques de type BH3 only. De plus, p53 pourrait lui-même avoir une activité similaire à celles-ci [117]. Des travaux ont montré que le facteur p53 ne contribue pas à l'apoptose induite par la ML-I [115, 118].

A plus fortes doses, de la nécrose a été décrite [14, 119], mais il faut garder à l'esprit le fait que les caractéristiques de ce type de mort, notamment la perméabilité au PI, peuvent apparaître en phase tardive de l'apoptose ; ce phénomène est appelé nécrose secondaire.

(2) La nécrose

Les VTs induisent une mort cellulaire qui serait plutôt de nature nécrotique, comme mis en évidence par approches morphologique ou biochimique [108, 120]. En effet, la mort des cellules parvient rapidement après application des VTs, impliquant la production de ROS [99, 108]. Cet effet proviendrait de l'aptitude des VTs à interagir avec les membranes lipidiques et à les déstabiliser [57, 121].

2.2.3. Les facteurs faisant varier les propriétés cytotatique et cytotoxique des extraits de Gui

Les effets cytotatiques et cytotoxiques des extraits ou des substances qu'ils contiennent sont variables, et ceci en particulier selon le type cellulaire considéré. L'arbre hôte dont est issu le Gui influence également ces propriétés.

2.2.3.1. Variations en fonction du type cellulaire

Des études menées avec diverses cellules traitées par un même extrait, ou un de ses composants, montrent que chacune d'entre elles a une sensibilité particulière vis-à-vis de ces substances [8, 72, 88, 122]. Par exemple, les LB se montrent particulièrement peu sensibles aux extraits de Gui, par rapport aux LT et aux monocytes [8, 105]. Cette faible sensibilité des LB est également retrouvée vis à vis de la ML-III, qui cible par ailleurs les LT CD8⁺, et parmi eux préférentiellement ceux ayant un phénotype de cellule mémoire (CD62^{L0}) [123].

De plus, au sein d'un même type cellulaire, des différences de sensibilités apparaissent entre lignées. Ainsi, la comparaison de la sensibilité de plusieurs lignées humaines de médulloblastome (Daoy, D342, D425 et UW 228-2) traitées par un extrait de Gui issu de Chêne montre un profil particulier pour chacune d'elles. La lignée UW 228-2 est la moins sensible, présentant l'activité mitochondriale la plus élevée. A forte concentration (0,1 mg/ml d'extrait), les lignées Daoy et D342 sont les plus sensibles, tandis qu'à plus faible concentration (0,001 mg/ml), ce sont les lignées D342 et D425 qui montrent les plus faibles activités mitochondriales [87]. Ainsi, bien que toutes issues de médulloblastomes, chacune de ces lignées cellulaires présente une sensibilité vis-à-vis des extraits de Gui qui lui est propre. De telles disparités pourraient provenir de l'expression, ou non, de récepteurs permettant aux substances actives contenues dans ces extraits (MLs ou VTs entre autres) de lier certaines de ces cellules.

Ces données montrent que les activités cytotatique et cytotoxique des extraits de Gui sont très variables en fonction du modèle cellulaire étudié. Ceci souligne l'importance de l'étude de la sensibilité du modèle choisi.

2.2.3.2. Variations en fonction du type d'extrait, relation avec la teneur en MLs ou en VTs

L'influence de l'arbre hôte dont est issu le Gui sur les propriétés cytotatiques et cytotoxiques des extraits a été rapportée à plusieurs reprises [8, 11, 97, 98, 124]. D'une manière générale, les extraits issus de Gui de Chêne disposent de l'activité cytotoxique la plus prononcée. Les extraits issus de Gui de Pin présentent l'activité la plus modérée, tandis que l'activité de ceux issus de Gui de Pommier se situe entre celle des extraits de Gui du Pin et celle des extraits de Gui du Chêne [8, 14]. En outre, les extraits de Gui non fermentés sont plus actifs que les extraits fermentés [14, 122]. Par ailleurs, le procédé pharmaceutique ainsi que la période de récolte du Gui constituent d'autres facteurs de variation des propriétés cytotoxiques de ces

extraits [97]. Une telle dépendance vis-à-vis de ces facteurs a conduit à mettre en place une démarche de standardisation du procédé de fabrication de ces extraits.

De telles variations peuvent être mises en parallèle avec les concentrations en MLs des extraits, celle-ci variant de façon superposable à cette activité. En effet, plusieurs études ont pu corréler les propriétés cytotoxiques et cytostatiques des extraits avec leur teneur en MLs [87, 97, 114]. La disparité des proportions relatives des trois MLs entre extraits, pourrait expliquer leurs différences d'activité cytotoxique. Ainsi, parmi les trois MLs identifiées jusqu'ici, la ML-III présente la plus forte activité cytotoxique. La ML-I a l'activité cytotoxique la plus faible, tandis que celle de la ML-II se situe entre celle de la ML-III et celle de la ML-I [12, 98, 125]. Des études ont montré, de façon controversée toutefois [13, 28], que les chaînes A ou B prises isolément, ne peuvent soutenir les propriétés cytotoxiques de la ML-I [35], et que la toxine dans son intégralité doit être internalisée pour permettre à la chaîne A d'exercer ses propriétés inhibitrices de la synthèse de protéines [126].

Cependant, la relation entre cytotoxicité et liaison des MLs aux cellules est délicate à établir. Une étude a montré que la sensibilité de LB à la ML-I qu'ils peuvent lier, est bien plus grande que celle à la ML-III qu'ils lient moins efficacement [127]. D'autre part, l'induction de l'apoptose sur les différentes populations lymphocytaires (LB, LT et cellules natural killer voudrais) correspond à la capacité de liaison de la ML-I à celles-ci [128]. D'autres travaux ont montré que l'expression de gangliosides sialylés par différentes lignées cellulaires (promyélocytes de la lignée HL-60, lignée cellulaire 5637 de cancer de la vessie ou encore lignée CHO-K1) est en corrélation avec la sensibilité de ces lignées à la ML-I [40]. Cependant, une autre étude menée sur différentes lignées cellulaires de mélanome n'a pas pu relever de relation entre la liaison de la ML-I à ces cellules, et l'inhibition de leur prolifération, tandis qu'une telle relation peut être établie pour la ML-II et la ML-III [89].

Bien que les MLs soient clairement impliquées dans ces propriétés cytotoxiques, d'autres substances pourraient y contribuer [18, 28, 114]. Ainsi, des extraits de Gui issus de Chêne ou de Sapin induisent une diminution de la viabilité cellulaire comparable. Pourtant, les premiers présentent de hautes teneurs en MLs, tandis que les seconds n'en contiennent que peu [11]. Les VTs sont envisagées pour rendre compte de ce fait. En effet, les extraits de Gui issus de Sapin ou de Pin sont tous deux pauvres en MLs. En revanche, ils diffèrent quant à leur teneur en VTs, celle des extraits de Gui issus de Sapin étant supérieure à celle des extraits de Gui

issus de Pin. En particulier, les extraits de Gui issus de Sapin sont les plus riches en VT A3 [61]. Par ailleurs, ce phénomène a été retrouvé par une équipe qui a observé une corrélation entre cytotoxicité et teneur en MLs pour les extraits de Gui issus d'arbres feuillus, mais non pour ceux issus de conifères [87].

D'autre part, des travaux menés sur une lignée de sarcome (lignée Yoshida) ont pu établir une relation entre l'inhibition de la prolifération de ces cellules, et la variation qualitative et quantitative de la composition en VTs de plusieurs types d'extraits de Gui [61].

Ainsi, il semble que les MLs et les VTs supporteraient les activités cytotatique et cytotoxique des extraits de Gui.

2.2.3. La combinaison des extraits de Gui avec d'autres traitements anti-tumoraux

L'association des extraits de Gui ou des MLs avec des drogues couramment employées dans le traitement des atteintes tumorales, telles que la doxorubicine, l'étoposide, le cisplatine, la vincristine, le taxol ou la paclitaxel, ainsi que les rayonnements ionisants ont montré une additivité des pouvoirs cytotatiques et cytotoxiques de ces traitements [106, 115, 129, 130]. L'emploi de ces drogues pourrait donc s'avérer particulièrement opportun pour contourner les résistances acquises par certaines cellules tumorales aux traitements anticancéreux couramment prescrits.

3. Les propriétés immuno-modulatrices

Outre leurs propriétés cytotatique et cytotoxique, les extraits de Gui possèdent également des activités immuno-modulatrices. Des effets ont été reportés sur les différentes composantes du système immunitaire. Ces propriétés prennent une dimension particulière dans le contexte du développement d'une réaction immunitaire spécifique anti-tumorale.

3.1. Le développement d'une réaction immunitaire [131]

Le système immunitaire s'appuie sur deux composantes, innée et acquise. L'immunité innée assure la protection immédiate de l'organisme vis-à-vis d'un grand nombre de microorganismes, et met en place les conditions nécessaires au développement d'une réponse inflammatoire locale ainsi que d'une réaction immunitaire spécifique. Les contributions de la

réaction inflammatoire locale et de la réaction immunitaire spécifique sont essentielles au développement d'une immunité anti-tumorale.

3.1.1. La mise en œuvre de l'immunité innée

3.1.1.1. Les phénomènes précoces

Lorsqu'un microorganisme franchit les barrières cutanéomuqueuses, qui sont les premières défenses physico-chimiques de l'organisme, il active d'une part le système du complément, et d'autre part les phagocytes résidants au niveau des tissus.

La reconnaissance du microorganisme par les phagocytes repose sur l'expression, par ces cellules, de récepteurs qui vont reconnaître des motifs fréquemment exprimés par les microorganismes, mais non par nos cellules. Certains de ces récepteurs de motifs vont assurer la phagocytose du microorganisme et son élimination. D'autres, comme les TLRs vont générer des signaux au sein de la cellule, induisant la synthèse de nombreuses substances, telles que des peptides anti-microbiens ou des cytokines [132]. Les MØ tissulaires activés libèrent des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et les IL-1 β et -6. Les CD₈ immatures présentes au niveau des tissus disposent d'une grande capacité de phagocytose des microorganismes. Elles vont donc prendre en charge l'agent pathogène, ce qui provoque leur maturation, marquée entre autres par la migration au niveau des organes lymphoïdes secondaires, où résident les lymphocytes naïfs.

3.1.1.2. Les phénomènes inductibles de l'immunité innée

Les premiers événements consécutifs à l'introduction d'un microorganisme dans l'organisme, en particulier la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires comme les cytokines, induisent une réaction inflammatoire. Les cellules NK participent également de ces réponses innées induites qui limitent l'agression, le temps que les mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative prennent éventuellement le relais.

(1) La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire est une réaction tissulaire vis-à-vis d'une agression, qui vise à favoriser l'élimination de l'agent pathogène en recrutant davantage de cellules et de molécules effectrices sur le site lésionnel, mais aussi à limiter la dissémination de cet agent

par l'obstruction locale des vaisseaux sanguins. En outre, la réparation tissulaire est elle-même promue par l'inflammation [133].

Les symptômes rattachés à la réaction inflammatoire, à savoir rougeur, chaleur, douleur et œdème, traduisent des modifications locales des structures vasculaires. L'augmentation de la perméabilité vasculaire et la vasodilatation permettent une augmentation locale du débit sanguin, et donc l'afflux de cellules de l'immunité innée et adaptative, qui vont traverser la paroi endothéliale pour gagner les tissus.

Au niveau du site inflammatoire, l'expression de cytokines, appelées chémokines, qui attirent les cellules sur le site de l'inflammation, le ralentissement du flux sanguin, ainsi que l'expression par les cellules endothéliales de molécules d'adhésion, telles les sélectines ou les intégrines, permettent l'adhésion de ces cellules aux parois endothéliales.

Les principales cellules impliquées dans la réaction inflammatoire sont les MØ ainsi que les PNN, qui sont rapidement recrutés sur le site de l'infection et disposent de propriétés microbicides remarquables. La réaction est encore amplifiée par l'arrivée de monocytes se différenciant en MØ, qui sécrètent des facteurs pro-inflammatoires. Outre les cytokines évoquées précédemment, les MØ peuvent synthétiser des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires, tels que les leucotriènes ou les prostaglandines à partir de phospholipides membranaires (Fig. 5).

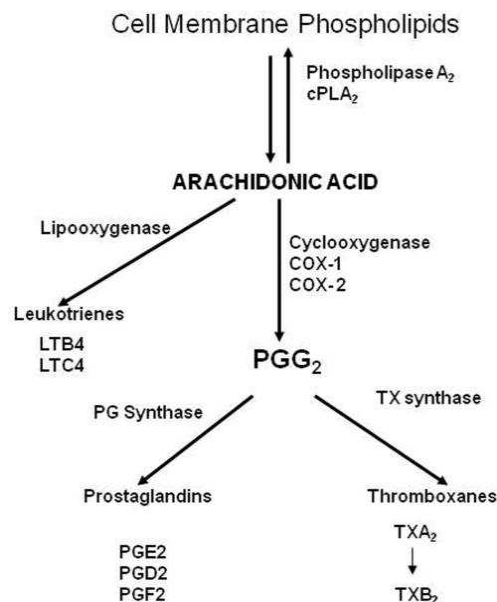


Figure 5. Synthèse de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires à partir des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique obtenu par action de la phospholipase A₂ sur les phospholipides membranaires génère des leucotriènes par action de la lipooxygénase, et des prostaglandines par celle des cyclooxygénases (Cox)-1 et -2. D'après [134].

Les mastocytes jouent également un rôle, notamment par la libération de granules contenant de l'histamine, autre facteur pro-inflammatoire.

Outre leurs actions locales, les cytokines sécrétées par les MØ, et principalement le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6, ont des effets systémiques, dont l'induction de fièvre. Ces cytokines induisent l'expression de la Cox-2, qui assure la synthèse de prostaglandine E2 (PGE2). Cette dernière agit sur l'hypothalamus et provoque l'augmentation de la température corporelle. Par ailleurs, ces cytokines assurent la synthèse hépatique de protéines dites de phase aiguë, qui vont reconnaître les microorganismes par les motifs qu'ils expriment, et promouvoir leur dégradation, soit par le système du complément, soit par les cellules phagocytaires. Enfin, ces cytokines soutiennent l'augmentation du nombre de PNN circulants, favorisant d'une part la production médullaire de leucocytes, ainsi que d'autre part leur détachement des parois vasculaires.

(2) L'activation des cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes dotés de récepteurs invariants, raison pour laquelle ils sont rattachés au système immunitaire inné, qui reconnaissent des structures présentées par les cellules infectées ou les cellules tumorales. Elles interviennent de manière précoce au cours de la réaction immunitaire, sous l'effet des interférons (IFN) et de cytokines, en particulier l'IL-12, produites par les MØ activés. Les cellules NK produisent de grandes quantités d'IFN- γ , participant ainsi au développement de la réaction immunitaire.

3.1.2. La mise en œuvre de l'immunité adaptative

Les LB et les LT disposent d'un récepteur spécifique de l'antigène (Ag). L'initiation d'une réponse immunitaire adaptative repose sur l'activation de ces cellules, en particulier des LT, par les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg). Elle permet le développement d'une réponse spécifiquement dirigée contre l'Ag, avec mise en place de cellules effectrices et de cellules mémoires. L'activation des LT naïfs est un phénomène central dans le développement de la réaction immunitaire spécifique, dans la mesure où certains LT activés sont nécessaires à l'activation des LB naïfs.

3.1.2.1. L'apprêtement de l'Ag par les CPAg et la présentation des peptides antigéniques aux LT

Les CD8 immatures qui ont phagocyté un microorganisme le dégradent pour générer de petits fragments peptidiques. Les propriétés de dégradation modérées des phagosomes de CD8 permettent la génération de ces peptides. En effet, l'acidification des phagosomes de ces cellules est plus faible que celle survenant dans d'autres types de phagocytes, tels que les PNN ou les MØ. Au cours de leur maturation, les CD8 acquièrent une haute capacité de présentation de l'Ag qu'ils présentent aux LT par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les LT reconnaissent de manière spécifique la molécule du CMH ainsi que le peptide antigénique qui lui est associé. Suivant l'origine du peptide antigénique, ceux-ci seront présentés par différentes classes de molécules du CMH à différentes sous-populations de LT, à savoir les LT CD4 et les LT CD8. Ces populations diffèrent quant à l'expression des corécepteurs qui sont associés à leur récepteur à l'Ag.

Ainsi, les microorganismes intracellulaires, tels que certaines bactéries ou virus, en contact direct avec le cytosol, sont présentés par les molécules du CMH de type I (CMH-I) ; ces peptides seront présentés aux LT CD8. Les microorganismes extracellulaires sont internalisés dans des compartiments vésiculaires et présentés par les molécules du CMH-II aux LT CD4.

Récemment, une voie permettant la présentation de peptides issus d'Ag extracellulaires par les molécules du CMH-I a été découverte, c'est la présentation croisée. Pour être efficacement présentés selon cette voie, les Ag doivent être internalisés dans des vésicules, puis libérés au sein du cytosol. Cette voie est empruntée pour présenter aux CD8 des peptides issus de virus qui ne peuvent infecter les CD8, et donc ne sont pas normalement localisées au niveau du cytosol. Cette voie est particulièrement importante dans la présentation d'Ag issus de cellules tumorales aux LT CD8, permettant le développement de LT cytotoxiques spécifiquement dirigés vers les cellules tumorales. A l'inverse, une présentation croisée de peptides issus de microorganismes intracellulaires par les molécules du CMH-II a également été découverte plus récemment encore [78]. Ce mécanisme met en jeu la prise en charge de microorganismes intracellulaires par le processus d'autophagie. Ces microorganismes sont délivrés dans des compartiments lysosomiaux au sein desquels ils sont dégradés. Ces compartiments sont dotés de la machinerie cellulaire permettant la présentation des peptides antigéniques ainsi générés, par des molécules du CMH-II.

Ces dernières années, l'existence de plusieurs populations de CD8, exerçant des fonctions différentes, a été découverte [135]. Ainsi, certaines sont particulièrement à même de réaliser le processus de présentation croisée, permettant le développement d'une réaction immunitaire

anti-virale optimale. Ces fonctions sont notamment conditionnées par le profil de récepteurs de motifs membranaires et cytosoliques exprimé par ces différentes populations de CD4 [136].

3.1.2.2. L'activation des LT naïfs

L'activation des LT naïfs se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires où ils résident, et est assurée par les CD4, principales CPAg, qui ont mûri.

Outre la diminution de leur capacité de phagocytose, la maturation des CD4 se caractérise par une modification de leur profil d'expression de récepteurs de chémokines, leur permettant de gagner les organes lymphoïdes secondaires. L'augmentation de leur aptitude à présenter l'Ag repose sur l'augmentation de l'expression des molécules du CMH, mais également sur celle des molécules de co-stimulation, dont les principales sont les molécules B7.

En effet, l'activation des LT naïfs et leur expansion requiert la génération concomitante d'au moins deux signaux (Fig. 6) :

- l'activation du récepteur pour l'Ag par reconnaissance spécifique du complexe peptide-CMH ;
- l'activation de CD28 par reconnaissance des molécules de co-stimulation, en particulier de type B7.

Les LT ainsi activés vont alors se multiplier de façon clonale, générant un grand nombre de LT présentant la même spécificité de reconnaissance de l'Ag, dont une partie évoluera en LT effecteurs et l'autre en LT mémoires, capables d'induire plus rapidement une réponse adaptative lors d'une nouvelle rencontre avec l'Ag.

Les LT vont alors acquérir leurs propriétés effectrices. Les LT CD8 vont devenir cytotoxiques, c'est-à-dire qu'ils vont entraîner l'apoptose des cellules au niveau desquelles ils vont spécifiquement reconnaître le complexe peptide-CMH.

Une différenciation supplémentaire, conditionnée par les cytokines présentes dans l'environnement, va permettre la mise en place de plusieurs types de LT CD4 effecteurs (Fig. 6). Ces sous-populations de LT CD4, à savoir les Th1, les Th2, les Th17 ainsi que les LT régulateurs (Treg), se distinguent les unes des autres par les cytokines qu'elles produisent et qui orientent leurs propriétés.

Les Th1, induits par l'IL-12 et l'IFN- γ , produisent ces mêmes cytokines et vont augmenter les propriétés microbicides des M ϕ . Les Th2 sont induits par l'IL-4, dont l'origine cellulaire reste encore à déterminer. Outre l'IL-4, les Th2 produisent de l'IL-5 et participent, avec les Th1, à l'activation des LB. Les Th17, favorisés par la présence de transforming growth factor (TGF)- β et d'IL-6, produisent de l'IL-17 et de l'IL-6, et sont impliqués dans le recrutement précoce de PNN aux sites infectieux. Enfin, la présence de TGF- β et d'IL-10 oriente les LT CD4 vers les Treg, qui sécrètent ces mêmes cytokines et qui inhibent l'activation des LT.

Les LT effecteurs vont alors migrer au niveau des tissus lésés, où leur activation ne nécessitera qu'un seul signal, généré par la reconnaissance spécifique du complexe peptide-CMH.

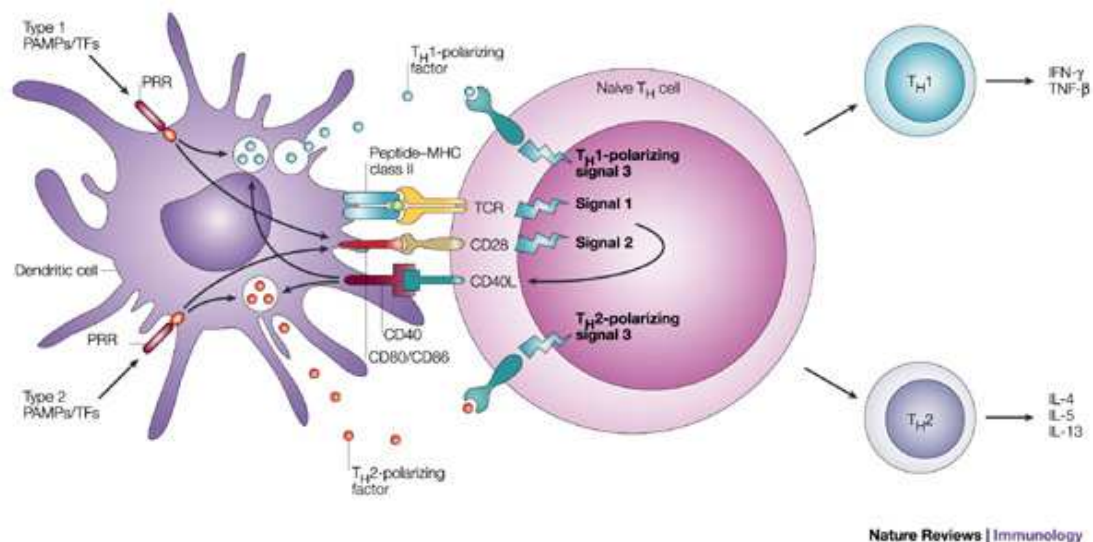


Figure 6. L'activation des LT par les CPAg. Les CD activent les LT (CD4 sur le schéma) par l'intermédiaire d'au moins deux signaux. Le premier réside dans la présentation du peptide antigénique associé à une molécule du CMH-II. Le complexe est reconnu spécifiquement par le récepteur à l'Ag du LT. Le second signal consiste en l'expression des molécules de co-stimulation B7 reconnues au niveau du LT par le CD28. Ces deux signaux assurent l'activation et la prolifération clonale de la cellule stimulée. Un troisième signal, correspondant aux différentes cytokines libérées par la CD, oriente la différenciation des LT. La réalisation de ces trois événements au niveau de la CD est étroitement conditionnée par les signaux de l'environnement perçus par l'intermédiaire des TLRs [137].

Ces dernières années, le rôle primordial de l'immunité innée, et en particulier la contribution des récepteurs de motifs, dans le développement d'une réaction immunitaire est apparu. En effet, les différentes étapes de la maturation des CD sont modulées par ces récepteurs. Ainsi, l'expression des molécules de co-stimulation, mais aussi le profil de cytokines sécrétées par les CPAg, et donc le type de réponse T induite, sont conditionnés par le ou les récepteurs de motifs sollicités par le microorganisme. Les TLRs jouent un rôle de premier ordre dans ce contexte, dans la mesure où ils activent des facteurs de transcription majeurs dans le système immunitaire, tels que NF- κ B ou les IRFs (IFN regulatory factor)-3 ou -7. Ces derniers

contrôlent l'expression de cytokines et d'IFN de type I, contribuant à l'orientation de la réponse immunitaire [132].

3.1.2.3. L'activation des LB naïfs

Tout comme les LT, les LB naïfs doivent percevoir deux variétés de signaux pour être activés au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

Le mécanisme qui est ici décrit s'applique aux Ag présentant une composante protéique, Ag appelés Ag thymodépendants.

Le premier signal est généré par la reconnaissance spécifique de l'Ag. La génération du signal de co-stimulation requiert l'aide des LT effecteurs Th1/Th2, qui reconnaissent un complexe peptide-CMH-II exprimé par le LB. La liaison du CD40 et du CD40 ligand exprimés respectivement par le LB et le LT activé après reconnaissance du complexe peptide-CMH, provoque les sécrétions d'IL-4, -5, et -6 par le LT. Ces cytokines activent la prolifération clonale des LB et leur différenciation en cellules sécrétrices d'Ac, les plasmocytes, ou en LB mémoires.

3.2. L'immunité anti-tumorale

3.2.1. *Immunité spécifique anti-tumorale*

Les cellules cancéreuses expriment des Ag tumoraux qui peuvent induire le développement d'une réaction immunitaire spécifique. L'immunité anti-tumorale spécifique repose principalement sur la mise en œuvre de mécanismes cytotoxiques. Parmi les cellules de l'immunité spécifique, les LT CD8 représentent des acteurs essentiels, capables de déclencher la mort des cellules cancéreuses qui présentent des Ag tumoraux dont ils sont spécifiques. Dans ce contexte, les CDs jouent un rôle crucial. En effet, les CDs phagocytent les cellules tumorales mortes, puis présentent les peptides issus de ces cellules dans un contexte CMH-I, selon le mécanisme de présentation croisée [138].

Les LB participent également grâce à la production d'Ac qui, après fixation sur les cellules tumorales, conduisent à la destruction de ces cellules.

3.2.2. Le rôle de l'inflammation dans le développement d'une tumeur

La formation d'un cancer est due à la multiplication anarchique de cellules qui ont subi des mutations géniques les libérant des mécanismes de régulation de la croissance cellulaire. Ces cellules forment un ensemble qui s'individualise au sein de l'organisme, en créant un microenvironnement lui offrant des conditions propices à son développement. Il est actuellement connu que 90 % des cancers sont liés à des mutations géniques somatiques et à des facteurs environnementaux [139]. D'une manière générale, l'inflammation à bas bruit mais chronique, résultant de l'exposition répétée à des facteurs environnementaux, comme le tabac, ou d'infections virales ou bactériennes chroniques, voire même résultant de l'obésité ou du vieillissement, contribuerait grandement à chacune des étapes de la tumorigénèse. A l'inverse, l'induction d'une réaction inflammatoire aiguë et intense a été employée efficacement pour lutter contre certains cancers, en particulier ceux de la vessie [140].

3.2.2.1. Le microenvironnement tumoral

Parmi les cellules constituant le microenvironnement d'une tumeur figurent, outre les cellules cancéreuses elles-mêmes, des cellules stromales, mais aussi des cellules de l'immunité, dont les principales sont constituées par les MØ associés aux tumeurs (MAT). De manière analogue aux LT CD4, deux principaux types de MØ ont été mis en évidence [141]. Les MØ de type M1 produisent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, le TNF- α et l'IL-6 ou l'IL-12, ainsi que des dérivés nitrés grâce à l'expression de la NO synthase inductible (iNOS). Leur développement est principalement favorisé par l'IFN- γ , produit par les LT Th1, dont l'activation et le recrutement sont soutenus en retour par ces MØ de type M1. Les MØ de type M1 sont aptes à induire une réaction immunitaire anti-tumorale. Les MØ de type M2 libèrent quant à eux des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, ou des facteurs pro-angiogéniques et expriment en particulier l'arginase-1 ou le récepteur du mannose (RM). L'IL-4, l'IL-13 ou l'IL-10 soutiennent le développement de cette population de MØ. Les MØ de type M2 promeuvent le remodelage des tissus et l'angiogénèse, créant ainsi des conditions favorables à l'évolution de la tumeur [140]. Ce sont ces derniers qui sont le plus souvent rencontrés associés aux tumeurs.

L'ensemble de ces cellules est engagé dans un échange permanent de cytokines et de chémokines qui font intégralement partie du microenvironnement tumoral. Ces molécules conditionnent les propriétés effectrices des cellules immunitaires environnantes, et par là l'évolution du développement tumoral. Ainsi, tandis que l'IL-12, le TRAIL ou l'INF- γ exercent des propriétés anti-tumorales, l'IL-6, l'IL-17 et l'IL-23 sont plutôt propices au

développement tumoral. Les effets de ces cytokines s'appuient sur l'activation de facteurs de transcription, comme NF- κ B et STAT3, au niveau des cellules cancéreuses, tout comme au niveau des cellules non cancéreuses [140, 142]. Elles agissent aussi directement sur la croissance et la survie des cellules cancéreuses.

3.2.2.2. L'inflammation et l'initiation de la tumeur

L'initiation tumorale correspond à la mutation initiale de cellules normales, leur conférant des avantages de survie et de prolifération par rapport aux cellules voisines. Pour qu'une tumeur soit effectivement initiée, il faut toutefois qu'une même cellule cumule au moins quatre ou cinq mutations. L'inflammation pourrait jouer ici un rôle déterminant. La contribution de l'inflammation dans l'initiation d'une tumeur peut se présenter soit sous la forme d'une inflammation préexistante, offrant les conditions propices à la transformation tumorale d'une cellule saine, soit sous la forme d'une mutation d'un oncogène qui favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'une ou l'autre de ces voies conduisent à la mise en place d'une inflammation locale chronique, médiée par les cytokines et amplifiée encore par le recrutement et l'activation en boucle des cellules immunocompétentes [142].

L'instabilité du génome des cellules pourrait être favorisée par l'inflammation. En particulier, les phagocytes activés libèrent de grandes quantités de ROS et de dérivés réactifs de l'oxyde nitrique (RNS) capables d'endommager l'ADN et d'induire ainsi des mutations géniques [143]. D'autre part, la présence de cytokines et de facteurs de croissance, dont l'expression est induite par l'inflammation, pourrait constituer un environnement favorable au développement de cellules multipotentes. Ainsi, STAT3 joue un rôle crucial dans l'auto-renouvellement des cellules souches [140]. Ces cellules indifférenciées seraient alors plus sensibles aux facteurs environnementaux. Enfin, l'inflammation pourrait moduler l'expression des gènes au niveau épigénétique [144].

3.2.2.3. L'inflammation et la promotion de la tumeur

La promotion tumorale représente l'évolution d'une seule cellule cancéreuse vers une formation tumorale primitive, constituée de cellules qui prolifèrent de manière intense, tout en échappant à la mort. Cette phase peut être déclenchée de manière différée par rapport à

l'initiation. La promotion tumorale s'appuie sur un environnement cytokinique favorable, mais requiert également l'apport en abondance de nutriments et d'oxygène.

L'hypoxie locale secondaire à la croissance rapide de l'amas tumoral, favorise la formation de nouvelles structures vasculaires ; c'est la néo-angiogénèse. Ce phénomène complexe nécessite une dégradation et un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), l'afflux local de cellules ainsi que leur prolifération et l'organisation des structures vasculaires. Il est promu par les mêmes signaux que l'inflammation [145]. Les cellules du microenvironnement tumoral (MATs, cellules endothéliales et cellules stromales) produisent des chémokines et des facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF (vascular endothelial cell growth factor), qui participent soit en soutenant la prolifération des cellules endothéliales, soit en favorisant la dégradation de la MEC, ou encore en attirant localement des cellules mononucléées qui amplifient davantage ce phénomène [146].

L'activation de NF- κ B, AP-1 ou STAT3, soutenue par les cytokines, module par ailleurs l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, comme celui codant p53 [147], dans l'apoptose, comme ceux codant Bcl-2 ou Bcl-xl [148, 149], de manière à favoriser la survie des cellules cancéreuses. Ces facteurs de transcription favorisent également la production, par les cellules cancéreuses elles-mêmes, ou par les fibroblastes qui leur sont associés, de cytokines qui attirent davantage de cellules pro-inflammatoires sur le site de tumorigénèse [140].

3.2.2.4. L'inflammation et la dissémination métastatique

La dissémination d'une tumeur repose tout d'abord sur la dédifférenciation des cellules épithéliales puis leur réorientation vers un phénotype fibroblastique, phénomène appelé transition épithélio-mésenchymateuse [150]. Les cellules cancéreuses acquièrent ainsi une plus grande mobilité. Pour accéder aux vaisseaux sanguins à proximité, les cellules cancéreuses doivent se frayer un chemin à travers la MEC. Les cytokines comme l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α y contribuent en induisant la production de métalloprotéases (MMP) qui dégradent la MEC [149]. Les cellules cancéreuses accèdent ainsi au courant circulatoire sanguin, étape qui peut être favorisée, dans un contexte inflammatoire, par l'augmentation de la perméabilité membranaire. Elles doivent alors survivre en suspension dans le flux sanguin, avant de s'arrêter au niveau d'un nouveau tissu. Il est remarquable que les cellules tumorales aient acquis la capacité d'exprimer de nombreux récepteurs de chémokines, leur permettant de

gagner autant de tissus différents de leur site d'origine ; l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α pourraient contribuer à ce phénomène [142].

3.2.2.5. Une inflammation anti-tumorale ?

Les effets de l'inflammation décrits jusqu'ici sont relatifs à une inflammation chronique à bas bruit, favorable au développement d'une tumeur. Cependant, l'induction d'une inflammation aiguë favorise le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi, les cancers de la vessie par exemple, répondent favorablement à l'administration du bacille de Calmette et Guérin (souche atténuée de *Mycobacterium bovis*). La sollicitation des TLRs a été envisagée pour expliquer cet effet, permettant le développement de MAT de type M1 [142]. L'activation de ces récepteurs pourrait également conduire à une rupture de la tolérance qui peut exister vis-à-vis des Ag tumoraux, notamment par l'induction de molécules de co-stimulation [151]. Des travaux récents ont souligné le rôle crucial des TLRs, et en particulier celui du TLR4, dans le développement d'une réaction immunitaire anti-tumorale spécifique. Ces travaux ont montré que l'aptitude de certains agents de chimiothérapie cytotoxiques à induire une telle réponse, repose entre autres sur la sécrétion, par les cellules tumorales en voie d'apoptose, de la protéine HMGB1. Cette dernière s'avère être un ligand du TLR4 [152], dont l'engagement constitue une condition requise à l'activation optimale des LT, notamment CD8, spécifiques d'Ags tumoraux, par les CDs [152]. De plus, des travaux ultérieurs ont montré que la sécrétion d'IL-1 β par les CDs est nécessaire à la mise en place d'une réponse anti-tumorale spécifique impliquant des LT CD8 cytotoxiques qui produisent de l'IFN- γ en grande quantité [153].

3.3. Modulation de la réponse immunitaire par les extraits de Gui

3.3.1. Modulation de la réponse immunitaire adaptative

L'injection d'extraits de Gui induit la production d'Ac spécifiques anti MLs ou anti VTs, associés à une réponse de type Th1 (IgG1 et 3) [23, 154, 155]. D'autre part, certaines études ont montré que l'incubation de cellules sanguines circulantes (CSC) en présence d'extraits soutient la prolifération et l'activation des LT CD4, reflétée par l'augmentation de l'expression du CD28, du récepteur de l'IL-2 (CD25) ainsi que celle des molécules du CMH-II (HLA-DR) mais non les prolifération et activation des LT CD8 [21, 23, 156, 157].

D'autres ont observé l'induction de la sécrétion de TNF- α et d'INF- γ par les LT CD8 cultivés en présence de CDs préalablement stimulées par les extraits [16].

3.3.2. L'influence des extraits de Gui sur l'immunité innée

3.3.2.1. L'activation des CPAg

L'incubation de CSCs en présence d'extraits de Gui conduit à l'augmentation de l'expression des molécules B7.1 à la surface des cellules mononucléées (monocytes et MØ), mais non celle des LB [21]. En outre, la maturation des CDs est également favorisée par les extraits de Gui, comme le montre l'augmentation de l'expression des molécules B7.1 et B7.2 à leur surface. Ainsi stimulées, ces cellules peuvent soutenir l'activation des LT CD4 et des LT CD8 [16].

3.3.2.2. L'influence des extraits de Gui sur les cellules NK

Des études ont montré que la stimulation par la ML-I de CSCs, et en particulier de lymphocytes, conduit à une augmentation du nombre de cellules NK ainsi que de leur activité cytotoxique [157-159]. Des études *in vivo* sur lapin ont montré une augmentation des cellules NK après traitement par la ML-I ou sa chaîne B, mais non sa chaîne A [160]. D'un autre côté, des études chez l'Homme n'ont pas noté de modification des populations cellulaires NK après traitement par les extraits [23, 156]. De plus, des études *in vitro* sur cellules humaines ont plutôt montré l'effet inhibiteur des extraits de Gui sur l'activation et les propriétés cytotoxiques de ces cellules [161].

En outre, des travaux ont montré l'aptitude des VTs à induire l'activation de ces cellules [162]. De même, les fractions polysaccharidiques, en particulier les rhamnogalacturonanes, favoriseraient l'activation de ces cellules en créant une jonction entre ces dernières et leur cible [65, 163, 164].

3.3.2.3. L'induction de la sécrétion de cytokines par les extraits de Gui

Les sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α sont induites après stimulation des phagocytes mononucléés (CDs ou MØ), et constituent un élément clé de l'initiation de la réaction inflammatoire.

La sécrétion de TNF- α , tout comme celle d'IL-1 β , est induite en réponse à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Toutefois, la sécrétion de cette cytokine ne nécessite pas la réalisation de deux signaux, contrairement à celle de l'IL-1 β .

En effet, étant donné l'importante activité biologique de l'IL-1 β , la sécrétion de cette cytokine est soumise à une très fine régulation, reposant sur deux étapes cruciales qui sont la synthèse de la pro-IL-1 β , puis la conversion de cette dernière par clivage en IL-1 β [165]. Dans la première, sont impliqués des récepteurs membranaires qui reconnaissent des motifs microbiens fréquemment présentés à la surface des micro-organismes mais non de nos cellules, des motifs endogènes évoquant un danger cellulaire, ou encore des cytokines [3, 4, 166]. Dans la seconde étape, participent des récepteurs cytosoliques capables de reconnaître des structures endogènes ou cristallines évoquant un danger tissulaire [167].

La stimulation de CSCs humaines, et en particulier de monocytes, par la ML-I induit l'expression d'ARNm codant les cytokines telles que l'IL-1 β ou l'IL-1 α , l'IL-6, et l'IL-10 ou l'IFN- γ et le TNF- α , mais pas de ceux codant l'IL-2 ou l'IL-5 [100, 101].

D'autre part, l'induction de la sécrétion par les CSCs d'IL-1 β , d'IL-2, d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 et d'IL-12, d'IFN- γ et de TNF- α , et de manière controversée d'IL-4 est favorisée par les extraits [10, 12, 13, 17-19, 23, 154, 168]. En outre, une étude menée sur des CSCs avec la ML-I a montré que la sécrétion de cytokines est favorisée aux mêmes concentrations que celles induisant l'apoptose des cellules traitées [169].

Etant donné l'objectif de ce travail, l'aptitude des extraits de Gui et des substances qu'ils contiennent à promouvoir les synthèses et sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α par les M ϕ , les propriétés biologiques de l'IL-1 β et les conditions conduisant à sa sécrétion vont être présentées de manière plus détaillée.

4. L'IL-1 β , un membre de la famille de l'IL-1

4.1 Les propriétés biologiques de l'IL-1 β

L'IL-1 β appartient à la grande famille de l'IL-1, qui compte 11 membres, dont l'IL-1 α , l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra), l'IL-18 ou encore l'IL-33 [3]. Les cytokines de cette famille jouent un rôle de premier ordre dans la régulation de la réaction inflammatoire, exerçant des effets pro- ou anti-inflammatoires. Ces cytokines sont reconnues soit par des récepteurs communs (comme l'IL-1 α et l'IL-1 β) ou qui leur sont spécifiques.

4.1.1. Les récepteurs de l'IL-1 β

A ce jour, une dizaine de types de récepteurs pour les différents membres de la famille de l'IL-1 ont été identifiés. Les activités biologiques de l'IL-1 α ou l'IL-1 β sont sous la dépendance du récepteur de type I. Ce dernier comporte au niveau intracellulaire un domaine Toll/IL-1 récepteur (TIR). La liaison de l'IL-1 β avec ce récepteur provoque une modification de sa conformation, permettant le recrutement d'une protéine accessoire. Cette protéine contient également un domaine de type TIR au niveau intracellulaire. La juxtaposition des TIRs de ces deux entités est requise à la transduction du signal, conduisant à l'activation du facteur NF- κ B ou de la voie des MAPKs [3, 170].

Le récepteur de type II lie aussi l'IL-1 β . Cependant, ne contenant pas de domaine TIR dans sa partie intracellulaire, celui-ci ne peut transmettre le signal de l'IL-1 β . De cette manière, le récepteur de type II piège l'IL-1 β qui n'est plus disponible pour une interaction avec le récepteur de type I. De plus, le récepteur de type II mobilise la protéine accessoire du récepteur de type I, l'empêchant d'être recrutée dans une interaction entre l'IL-1 β et son récepteur de type I. Ainsi, le récepteur de l'IL-1 β de type II participe à la régulation de l'activité biologique de cette cytokine.

4.1.2. Le rôle de l'IL-1 β dans l'inflammation

L'IL-1 β est l'une des principales cytokines permettant l'initiation de la réaction inflammatoire [3]. Au niveau local, elle induit l'expression de la Cox-2, de la iNOS ainsi que de la phospholipase A2. Ces enzymes supportent la synthèse de molécules pro-inflammatoires tels les RNS ou certains dérivés lipidiques. En outre, l'IL-1 β favorise la production de diverses cytokines, telles que l'IL-6. De plus, l'IL-1 β promeut la synthèse de chémokines et de molécules d'adhésion qui favorisent l'afflux local et la diapédèse de cellules immunocompétentes. Au niveau systémique, l'IL-1 β , mais aussi l'IL-6 et le TNF- α , les trois cytokines « alarmes », induisent la fièvre ainsi que la production médullaire de cellules sanguines, en particulier de PNN, essentiels dans la réaction inflammatoire.

Le rôle critique de l'IL-1 β dans la régulation de la réaction inflammatoire a été souligné par la découverte de mutations au niveau de gènes codant des protéines contrôlant l'activation de la pro-IL-1 β en IL-1 β , et induisant des maladies auto-inflammatoires. Cette dénomination regroupe un ensemble de syndromes inflammatoires caractérisés par une forte association avec les facteurs déclencheurs extérieurs, une manifestation périodique, ainsi que l'absence de

prédisposition liée à l'expression d'un haplotype CMH particulier. Ces maladies sont secondaires à une hypersécrétion de cette cytokine due à un dysfonctionnement au niveau de l'activation de la pro-IL-1 β en IL-1 β . Les différentes protéines impliquées dans ce processus peuvent être concernées [171, 172]. Ces pathologies répondent favorablement à un traitement par un agent qui bloque les effets de l'IL-1 β , notamment l'IL-1Ra.

4.1.3. D'autres protéines de la famille de l'IL-1 β participant à son activité biologique

4.1.3.1. L'IL-1 α

L'IL-1 α et l'IL-1 β se lient aux mêmes récepteurs et ont les mêmes propriétés biologiques [3, 170].

Le précurseur de l'IL-1 α est présent de manière constitutive dans de nombreux types cellulaires. Bien qu'il soit également doté d'un pro-domaine qui peut être clivé par une calpaïne membranaire, il est biologiquement actif. Ceci constitue une importante différence avec la pro-IL-1 β . Comme l'IL-1 β , l'IL-1 α ne possède pas de peptide signal lui permettant d'emprunter la voie classique de sécrétion des protéines. Toutefois, contrairement à l'IL-1 β , cette cytokine n'est que rarement retrouvée sous forme circulante mais est principalement active liée aux cellules, soit sous forme intracellulaire, soit sous forme membranaire. Au niveau intracellulaire, elle module l'expression de certains gènes. Elle peut toutefois être libérée lorsque les cellules qui en contiennent meurent en libérant leur contenu. D'ailleurs, l'IL-1 α est considérée comme une des substances majeures déterminant l'immunogénicité des cellules mourant par nécrose [173].

4.1.3.2. L'antagoniste du récepteur de l'IL-1

L'IL-1Ra est produite au niveau sanguin par les cellules mononucléées. Cet antagoniste lie le récepteur de l'IL-1 avec une très forte affinité, empêchant le recrutement de la protéine accessoire du récepteur de l'IL-1, et donc la transduction du signal. C'est par ailleurs une protéine de phase aigüe dont la synthèse hépatique est provoquée par l'IL-6 et plus efficacement encore si elle est combinée avec l'IL-1 β [174].

4.1.4. Le rôle de l'IL-1 β dans le développement de tumeurs

L'influence de l'inflammation dans le développement tumoral a été soulignée précédemment. En tant que cytokine pro-inflammatoire, l'IL-1 β joue un rôle essentiel dans ce phénomène. En effet, en provoquant l'activation de NF- κ B ou l'expression de gènes comme la Cox-2, l'IL-1 β participe à la mise en place d'un contexte inflammatoire propice au développement tumoral.

Des études basées sur l'induction d'une tumeur par un carcinogène chimique ont montré que l'IL-1 β est impliquée dans l'initiation de tumeurs [175]. En effet, parmi les souris déficientes en IL-1 β , seule une partie d'entre elles développent effectivement une tumeur, alors que toutes les souris du groupe contrôle présentent une tumeur. De surcroît, l'apparition de la tumeur est retardée dans le groupe déficient en IL-1 β par rapport au groupe contrôle. Dans ce contexte, l'aptitude de l'IL-1 β à induire la production de substances mutagènes, telles que les ROS ou les RNS pourrait être en cause.

Par ailleurs, un rôle crucial dans la promotion tumorale a pu être attribué à l'IL-1 β . Par le biais de l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B ou STAT3, cette cytokine concourt à l'échappement des cellules tumorales aux mécanismes gouvernant normalement la prolifération cellulaire. En outre, l'angiogénèse est largement dépendante de l'IL-1 β . Dans un modèle d'implantation de matrigel chez des souris, le déficit en IL-1 β inhibe la formation de nouveaux vaisseaux, et ce autours de plusieurs types de cancers [176]. L'implication de l'IL-1 β a été confirmée avec un modèle d'implantation chez la souris, de matrigels chargés de surnageants de MØ soumis à des conditions d'hypoxie. Il apparaît que l'infiltration de cellules et l'angiogénèse autours de ces dispositifs sont bloquées lorsque l'IL-1 β a été neutralisée dans ces surnageants [177]. De plus, l'IL-1 β favorise la vascularisation de la cornée et cet effet est bloqué par l'inhibition de la Cox-2 ou de NF- κ B, deux éléments activés par l'IL-1 β [145].

Plusieurs études basées sur la transfection de cellules tumorales avec l'IL-1 β active [178], sur l'administration de l'IL-Ra [179], ou encore sur des souris déficientes en IL-1 β [176] ont souligné la contribution de cette cytokine dans la dissémination des tumeurs.

Cependant, une série de travaux récents a souligné la contribution essentielle de l'IL-1 β dans la mise en place de l'immunité spécifique anti-tumorale. Ces études ont montré que l'expression de la calréticuline, protéine résidente du RE, au niveau de la membrane plasmique conditionne le développement de cette réaction, facilitant la prise en charge des cellules tumorales en voie d'apoptose par les CD8 [180]. D'autre part, il est apparu que la sécrétion de HMGB1 par les cellules tumorales mourantes participe aussi à ce phénomène. La

sécrétion de HMGB1 favorise la mise en place de LT CD8 cytotoxiques, suite à la reconnaissance de cette protéine par le TLR4 [152].

Toutefois, l'expression de la calréticuline ou la sécrétion de HMBG1 ne suffisent pas. Des études ultérieures ont considéré l'aptitude de divers types de traitement employés en chimiothérapie conventionnelle à induire le développement d'une réaction immunitaire spécifique anti-tumorale, principalement mise en évidence par l'induction de LT CD8 cytotoxiques. Les anthracyclines (doxorubicine, mitoxantrone et idarubicine), ou des agents ciblant le RE (thapsigargine, brefeldine), les mitochondries (arsénite, acide bétulinique) ou l'ADN (étoposide, mitomycine C ou camptothécine, oxaliplatine), mais aussi les rayonnements- γ ont été testés. Parmi eux, les anthracyclines, l'oxaliplatine, mais aussi les rayonnements supportent le développement de LT CD8 cytotoxiques produisant de l'IFN- γ [2]. Ces travaux ont montré que l'apoptose des cellules tumorales soumises à des agents de chimiothérapie est accompagnée d'une libération d'ATP avec déplétion de l'ATP intracellulaire [181]. Enfin, il est apparu que la sécrétion d'IL-1 β par les CD8 qui ont phagocyté les cellules tumorales en voie d'apoptose constitue l'élément qui relie l'expression de la calréticuline ou la sécrétion de HGMB1 à la mise en place d'une réponse anti-tumorale spécifique. En effet, la mise en place d'une telle réaction est bloquée lorsque soit la sécrétion, soit la signalisation de l'IL-1 β sont inhibées. De surcroît, ces observations ont été poursuivies par des études sur des patients atteints de cancer du sein. L'efficacité des anthracyclines est diminuée chez les sujets présentant une mutation du récepteur P2X7 qui diminue son affinité pour l'ATP [2]. L'IL-1 β renforcerait l'activation des LT CD8, optimisant leur capacité de production d'IFN- γ [153].

Dans ces travaux, le rôle primordial des CD8 a été souligné de manière récurrente, et l'IL-1 β est apparue comme le facteur assurant l'activation des LT CD8.

Les CD8 sont actuellement très étudiées dans le cadre de vaccinations anti-tumorales. Pour cela, les CD8 sont chargées *ex vivo* par des Ag tumoraux puis réadministrées au patient. Ces cellules présentent l'Ag tumoral aux LT, permettant ainsi le développement d'une réaction immunitaire anti-tumorale spécifique. Des études ont montré que la stimulation concomitante des CD8 *ex vivo* par un cocktail de cytokines, parmi lesquelles l'IL-1 β ou le TNF- α , augmente l'aptitude des CD8 à induire une telle réponse anti-tumorale. De manière similaire, la stimulation des CD8 par des ligands de TLRs favorise le développement d'une réaction immunitaire spécifique anti-tumorale [182].

4.2. Synthèse et sécrétion d'IL-1 β

Le modèle actuellement reconnu considère que la libération de cette protéine dans le milieu se fait en deux temps : la synthèse de la pro-IL-1 β , puis sa conversion en IL-1 β mature active et sa libération proprement dite, ces deux dernières étant étroitement liées [183-186]. Ces diverses étapes sont essentiellement contrôlées par l'engagement de récepteurs de motifs exposés par les phagocytes mononucléés, aussi bien au niveau membranaire qu'au niveau cytosolique.

4.2.1. La synthèse de la pro-IL-1 β

Dans un premier temps, la cellule synthétise la pro-IL-1 β inactive suite à la sollicitation de récepteurs de cytokines [4, 166] ou de récepteurs de motifs, comme les TLRs. Ceux-ci peuvent reconnaître des signatures microbiennes telles que le LPS, le peptidoglycane, l'acide lipotéichoïque, des motifs CpG (mimant les ADN microbiens) ou encore des motifs osidiques fongiques pour les TLRs [187-190]. L'engagement de ces récepteurs provoque l'activation de différentes voies de signalisation qui conduisent *in fine*, à l'activation de facteurs de transcription de gènes codant les cytokines pro-inflammatoires, comme les facteurs NF- κ B ou IRF [191].

Par ailleurs, d'autres types de récepteurs de motifs cytosoliques peuvent conduire à l'activation du facteur NF- κ B. C'est le cas des récepteurs NOD1 et NOD2 qui reconnaissent des structures respectivement présentes dans le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif tel l'acide méso-diaminopimélique, ou communes à toutes les bactéries, comme le muramyl dipeptide (MDP) [192].

L'activation du facteur NF- κ B conduit à la synthèse de pro-IL-1 β qui s'accumule au niveau du cytosol.

4.2.2. L'activation de la pro-IL-1 β en IL-1 β

La conversion de la pro-IL-1 β en forme active et la sécrétion de cette dernière reposent sur la génération d'un second signal au niveau intracellulaire.

Dans les études *in vitro*, l'ajout d'ATP exogène a longtemps été employé en tant que second stimulus. Suite à la liaison de ce composé au récepteur purinergique P2X7, la pro-IL-1 β est rapidement clivée en IL-1 β , suite à l'activation de la pro-caspase-1 en caspase-1, et sécrétée dans le milieu extracellulaire.

Chez la souris, la génération de ce deuxième signal est nécessaire à la sécrétion d'IL-1 β mature. Chez l'homme, la conversion se fait apparemment de manière spontanée, les monocytes ayant la capacité de produire eux-mêmes les conditions nécessaires à la réalisation de cette deuxième étape. En effet, il a été montré que ces cellules libèrent de l'ATP qui agit de manière autocrine pour promouvoir l'activation et la sécrétion de l'IL-1 β [193, 194].

Dernièrement, il a été réalisé que la stimulation par l'ATP conduit en fait à l'activation de plateformes protéiques cytosoliques appelées inflammasomes. La formation de ces structures déclenche une cascade d'activation où un zymogène inactif, la pro-caspase-1, est clivé en caspase-1 active. Cette dernière clive à son tour la pro-IL-1 β en IL-1 β .

4.2.3. Les inflammasomes

La voie d'activation de l'IL-1 β dépendante de la caspase-1 est la plus étudiée. Cette voie implique des récepteurs de motifs cytosoliques, tels que les NLRs ou le récepteur absent in melanoma 2 (AIM2).

La protéine AIM2, qui appartient à une autre famille que les NLRs, permet la formation d'un inflammasome après reconnaissance d'ADN double brin localisés au niveau cytosolique [195]. Ces ADN peuvent être d'origine virale, bactérienne, voire même endogène [196].

Aussi bien AIM2 que les NLRs sont dotés d'un domaine permettant l'interaction avec la pro-caspase-1, directement ou après recrutement d'une protéine adaptatrice comme ASC (apoptosis speck like containing a CARD).

4.2.3.1. Les inflammasomes formés autour des NLRs

Certains NLRs, tels que NOD1 et NOD2 comme indiqué plus haut, conduisent à l'activation de NF- κ B, favorisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la synthèse de pro-IL-1 β . D'autres sont impliqués plus spécifiquement dans la sécrétion de l'IL-1 β par l'intermédiaire de la caspase-1, et vont maintenant être considérés [192].

Les NLRs assurant l'activation de la caspase-1 comportent trois régions : un domaine C-terminal riche en répétition de leucine (LRR), un domaine central de liaison des nucléotides, et un domaine effecteur N-terminal [191, 192].

Les motifs LLRs, impliqués dans la reconnaissance de motifs microbiens au niveau des TLRs, pourraient remplir une même fonction au niveau des NLRs. Le domaine central d'interaction avec les nucléotides et d'oligomérisation (NOD) assure quant à lui la formation d'oligomères de NLRs et par là même leur activation. Enfin, le domaine N-terminal peut être de type recrutement de caspase (CARD), de type pyrine (PYD) ou encore de type répétition d'inhibiteur de baculovirus (BIR), définissant autant de sous-groupes de NLRs, à savoir respectivement les NLRCs, les NLRPs et les NAIPs. Ce domaine permet, après recrutement éventuel d'une pièce adaptatrice ASC, l'interaction avec la pro-caspase-1 et son activation autocatalytique.

A l'état basal, les NLRs seraient repliés sur eux-mêmes, empêchant leur activation intempestive. La sollicitation des LRRs déclencherait le déploiement des NLRs et leur auto-activation sous la forme d'oligomères. De manière analogue à l'apoptosome, ceci aboutit à la formation de plateformes moléculaires cytosoliques appelées inflammasomes et contenant les NLRs, ASC si nécessaire, ainsi que la pro-caspase-1 [197]. Les inflammasomes qui se forment autour de différents NLRs sont constitués en réponse à des stimulations mettant en œuvre un ensemble différent de ligands [198].

Les NLRP1, NLRP3 et NLRC4 constituent les NLRs assurant l'activation de la caspase-1.

La protéine NLRP1 a été mise en cause dans la réponse à la toxine léthale de *Bacillus anthracis*. Par ailleurs, cet inflammasome est activé après reconnaissance de MDP [199, 200]. L'inflammasome de type NLRC4 se forme en réponse aux bactéries dotées de système de sécrétions de type III ou IV, telles que *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* ou encore *Pseudomonas aeruginosa*. La protéine NLRC4 reconnaît la flagelline des bactéries, mais également d'autres motifs microbiens non encore identifiés [188, 201-203].

Considérant le nombre important de membres de la famille NLR, dont les fonctions ne sont pas encore connues, d'autres inflammasomes pourraient être découverts.

Par ailleurs, l'activation de la caspase-1 peut déclencher la mort des cellules par pyroptose. Ce processus est induit en réponse à l'infection des cellules par des bactéries intracellulaires, telles que *Salmonella typhimurium*, à la toxine léthale de *B. anthracis*, ou encore au LPS. Cette mort partage des caractéristiques morphologiques à la fois de nécrose et d'apoptose [74]. L'intensité de la pyroptose est corrélée avec le niveau d'activation de l'inflammasome, suggérant que ce type de mort serait sollicité lorsque les mécanismes protecteurs des cellules sont dépassés [204].

4.2.3.2. L'inflammasome de type NLRP3

L'activation de la caspase-1 consécutive à la formation d'un inflammasome autour de NLRP3 est celle qui est actuellement la plus étudiée.

(1) Les structures induisant l'activation de l'inflammasome de type NLRP3

Une très large palette de structures active l'inflammasome de type NLRP3. De nombreux microorganismes, tels que des bactéries (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), des virus (adénovirus, Sendai virus entre autres) ou des levures (*Candida albicans* par exemple) soutiennent l'activation de NLRP3 [187, 205-207]. En présence d'ATP, cette capacité s'étend également aux substances dérivées de ces micro-organismes. C'est le cas du LPS, de l'ARN viral simple ou double brin, ou encore d'éléments fongiques [6, 190, 205, 208]. Les imidazoquinolines de synthèse R837 et R848 peuvent également activer cet inflammasome, même en absence d'ATP [6].

De récents travaux ont montré que l'activation de NLRP3 nécessite une induction préalable du facteur NF- κ B. Outre l'induction de la synthèse de pro-IL-1 β , l'activation de ce facteur conditionne également l'expression de NLRP3 [5]. Ainsi, lorsque les cellules ont reçu un signal pro-inflammatoire conduisant à l'activation de NF- κ B, tel que celui généré en réponse à l'activation des TLRs, les toxines bactériennes maitotoxine ou nigéricine induisent l'activation de NLRP3 [187]. Outre ces toxines, des substances d'origine endogène, qui témoignent d'une lésion tissulaire, disposeraient de cette même capacité. Parmi celles-ci, figurent l'ATP extracellulaire ou des composants de la MEC, tels que le hyaluronane [209]. Il en est de même pour des structures cristallines telles que des cristaux d'acide urique ou de pyrophosphate de calcium dihydrate [210, 211], de cholestérol [212], mais aussi des agrégats de peptide A β présents au niveau cérébral [210]. D'autres substances fibrillaires d'origine exogène peuvent activer NLRP3. C'est notamment le cas des sels d'aluminium, couramment employés comme adjuvants de vaccins, des particules de silice ou d'amiante [213-218]. Tout récemment, l'activation de NLRP3 par le glucose a été mise en évidence, reliant, tout comme le cholestérol, cet inflammasome à des troubles métaboliques [219].

(2) Les mécanismes d'activation de l'inflammasome de type NLRP3

Les mécanismes proprement dits permettant l'activation de NLRP3 demeurent encore partiellement élucidés. La principale difficulté provient de la très grande diversité des stimuli connus. L'approche actuelle tend donc à proposer des mécanismes dans lesquels des

évènements intermédiaires interviendraient en aval des stimuli déjà identifiés, et seraient directement responsables de l'activation de NLRP3. Ainsi, trois principaux mécanismes permettant d'expliquer une activation par l'ensemble de ces stimuli sont envisagés [220, 221].

(2.1) L'efflux de K^+

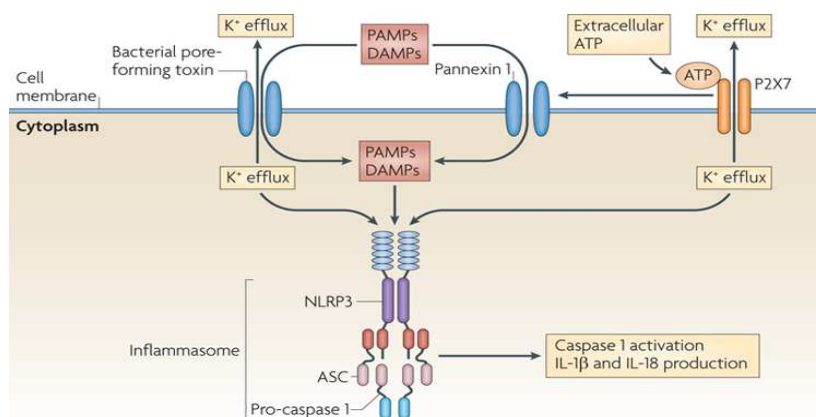
La diminution de la concentration intracellulaire de K^+ apparait comme une condition nécessaire à l'activation de NLRP3. En effet, l'activation de cet inflammasome requiert dans la très grande majorité des cas un efflux de K^+ , et l'activation de NLRP3 par pratiquement tous les stimuli connus est inhibée par une concentration extracellulaire de K^+ élevée [211]. Tous les stimuli connus conduisent à la formation de pores au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, l'ouverture de canaux, comme celui de Pannexine-1 en réponse à l'ATP, ou l'action de toxines bactériennes qui forment des pores permettent cet efflux de K^+ (Fig. 7). D'autre part, la nigéricine et la maitotoxine sont des ionophores potassiques.

L'importance de la concentration intracellulaire en K^+ dans l'initiation d'une réaction vis-à-vis d'une agression est soulignée d'une part, par le caractère conservé de cette stratégie, depuis les plantes, jusqu'aux animaux, mais aussi d'autre part, par la régulation exercée par le K^+ sur l'induction de l'apoptose [222].

Pourtant la diminution de la concentration de K^+ en elle-même ne suffit pas à soutenir l'activation de NLRP3, suggérant que des éléments restent encore énigmatiques [223].

Par ailleurs, Pannexine-1 pourrait permettre l'entrée de ligands, tels que des motifs microbiens ou des bactéries tuées par la chaleur, au niveau intracellulaire, où ils seraient à même d'activer NLRP3 [208]. Toutefois, le fait que l'interaction entre NLRP3 et ces ligands n'ait jamais été démontrée, ainsi que la diversité des ligands possibles, constituent des éléments en défaveur de cette éventualité. En revanche, la formation de pores membranaires (par l'ouverture des canaux Pannexine-1 ou par la délivrance de ces ligands au niveau intracellulaire) pourrait provoquer l'efflux de K^+ nécessaire à l'activation de NLRP3.

De plus, il est possible que ces structures ne soient pas impliquées dans l'activation proprement dite de NLRP3, mais plutôt dans l'induction de l'expression de NLRP3, préalable nécessaire à son activation par l'ATP notamment [5].

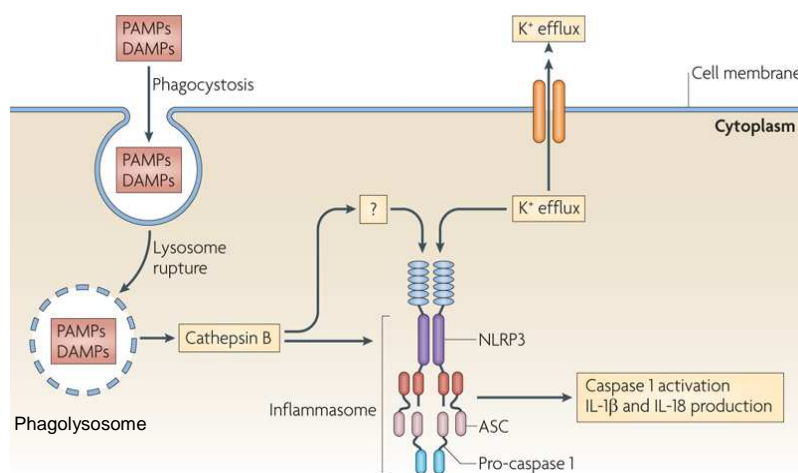


Nature Reviews | Immunology

Figure 7. Activation de l'inflammasome de type NLRP3 par l'efflux de K^+ . L'ATP est reconnu par les récepteurs P2X7, couplés à des canaux Pannexine-1, qui permettent eux aussi l'efflux de K^+ et l'internalisation de motifs microbiens. Par ailleurs, les toxines bactériennes induisant la formation de pores membranaires, mais aussi les structures cristallines permettent également l'efflux de K^+ . La diminution du K^+ intracellulaire est perçue par NLRP3 et conduit à son activation [221].

(2.2) La déstabilisation des membranes lysosomales

La phagocytose de particules de trop grande taille pour être éliminées conduirait à une déstabilisation des membranes des lysosomes et à la libération de leur contenu. Certaines substances pourraient alors, directement ou après activation d'un intermédiaire, activer NLRP3 (Fig. 8). Dans ce contexte, la cathepsine B, enzyme lysosomale, pourrait activer un intermédiaire qui interagirait alors avec NLRP3 [215]. Un tel mécanisme expliquerait notamment l'activation de NLRP3 par des structures cristallines ou agrégées ci-dessus évoquées, mais également par les toxines comme la nigéricine [224].



Nature Reviews | Immunology

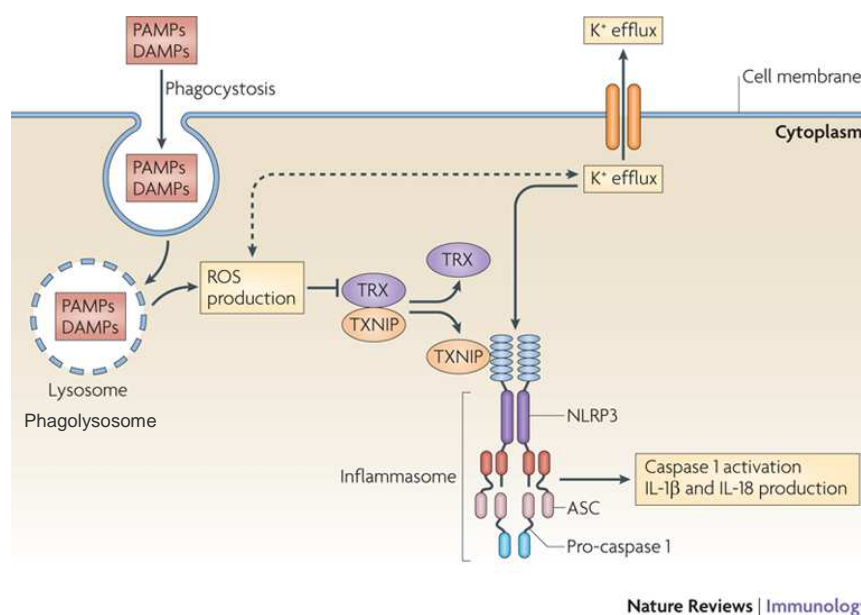
Figure 8. Activation de l'inflammasome de type NLRP3 par déstabilisation de la membrane lysosomale. Les structures cristallines de taille trop importante pour être éliminées après phagocytose induiraient la rupture de la membrane lysosomale/phagolysosomale suivie de la libération au niveau du cytosol d'enzymes protéolytiques, comme la cathepsine B. Certaines toxines pourraient également provoquer la libération de la cathepsine B. Cette dernière serait reconnue par le NLRP3. Adapté d'après [221].

(2.3) La production de ROS

La contribution des ROS dans l'activation de NLRP3 connaît de plus en plus d'intérêt. En effet, pratiquement tous les stimuli conduisant à l'activation de NLRP3 peuvent induire la production de ces substances, et l'activation de NLRP3 peut être inhibée par des agents qui les dégradent [213, 214, 225, 226]. Dernièrement, un mécanisme d'activation de NLRP3 par les ROS a été découvert [219]. Dans ce modèle, NLRP3 interagit avec la protéine interagissant avec la thiorédoxine (TXNIP), ce qui mène à son activation. Cette interaction est normalement entravée par la liaison et l'inhibition de la TXNIP avec la thiorédoxine (Fig. 9). Toutefois, l'absence de TXNIP n'inhibe pas totalement l'activation de la caspase-1, indiquant que d'autres mécanismes de régulation participeraient.

Tout comme le K^+ , les ROS sont impliqués dans l'immunité des plantes, et constituent un caractère conservé au cours de l'évolution.

Inversement, certaines études montrent que les ROS peuvent inhiber l'activation de l'inflammasome [227]. Les complexes enzymatiques NADPH oxydase (Nox) constituent des sources intracellulaires majeures de ROS. Les différents types de complexes Nox sont constitués de plusieurs sous-unités, mais tous ont en commun la sous-unité $p22^{phox}$ [228]. Ainsi, des travaux ont montré que le déficit en $p22^{phox}$, empêchant donc l'activation de tous les complexes Nox, ne bloque pas la sécrétion d'IL-1 β [229, 230]. D'autres ont rapporté ce déficit comme inhibant la sécrétion d'IL-1 β en réponse à des inducteurs de l'activation de NLRP3 [214].



Nature Reviews | Immunology

Figure 9. Activation de l'inflammasome de type NLRP3 par les ROS. Les agents connus pour activer l'inflammasome de type NLRP3 soutiendraient la production de ROS au niveau intracellulaire. Le complexe thiorédoxine (TRX)/TXNIP est dissocié par les ROS et TXNIP interagit alors avec NLRP3, conduisant à son activation [221].

Tenant compte du rôle du K^+ et des ROS dans l'immunité des plantes en tant que signaux produits en réponse à un danger, ainsi que de la similitude des systèmes de reconnaissance de ceux-ci entre les plantes et les animaux, ces modèles sont ceux qui semblent être les plus vraisemblablement impliqués, de manière non exclusive.

Par ailleurs, bien que l'activation de la pro-IL-1 β ait essentiellement lieu au niveau intracellulaire, il existe toutefois une voie extracellulaire, indépendante de la caspase-1. Dans ce cas, l'activation de la pro-IL-1 β peut être assurée par des protéases telles que la protéinase-3, produite par les PNN dans des conditions d'inflammation stérile, l'élastase ou la MMP9 [231]. L'IL-1 β ainsi générée a un poids moléculaire différent de l'IL-1 β issue de l'activation par la caspase-1, et ces formes sont biologiquement actives [232, 233].

4.2.4. Les voies de sécrétion de l'IL-1 β

Le mode de sécrétion de l'IL-1 β pose également de nombreuses questions. En effet, cette cytokine ne présente pas le peptide signal caractéristique des protéines sécrétées, qui suivent la voie classique RE/Golgi, telles que le TNF- α . Plusieurs voies de sécrétion ont ainsi été envisagées pour l'IL-1 β , et il semblerait que chacune d'entre elles soit empruntée selon les conditions et les types cellulaires considérés (Fig. 10) [189].

La sécrétion d'IL-1 β a longtemps été considérée comme associée à une lyse cellulaire [234]. Il apparaît aujourd'hui que cette protéine peut être sécrétée sans que les cellules ne soient détruites [235, 236]. Plus récemment, des travaux ont montré que l'IL-1 β pourrait être libérée après avoir été dirigée dans des compartiments vésiculaires. En effet, la sécrétion d'IL-1 β par des macrophages murins dérivés de moelle osseuse (BMDMs) peut solliciter la libération dans le milieu, de microvésicules formées à partir de la membrane plasmique [237, 238]. Par ailleurs, la libération d'exosomes constitue un autre mécanisme de sécrétion d'IL-1 β par les BMDMs [239]. Avant d'être sécrétées, ces vésicules sont contenues dans des structures formées par invagination de la membrane d'endosomes, et appelées corps multivésiculaires. Les exosomes sont libérés lorsque ces corps multivésiculaires fusionnent avec la membrane cellulaire. La sécrétion d'IL-1 β au sein de vésicules membranaires repose sur une stimulation par l'ATP. Par ailleurs, il a été proposé que la sécrétion d'IL-1 β par les M \emptyset péritonéaux murins pourrait impliquer des transporteurs membranaires spécifiques non encore identifiés [240].

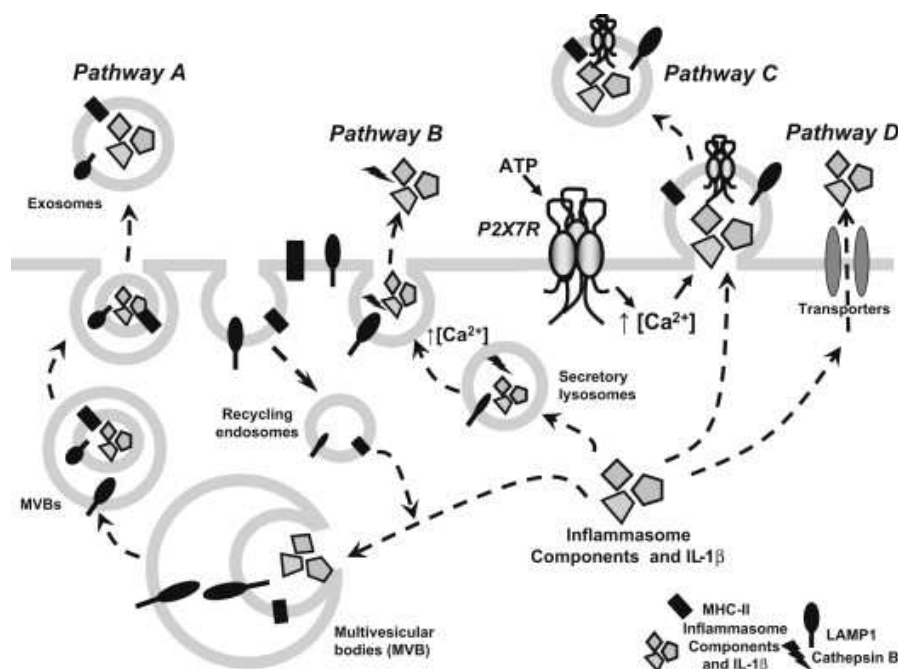


Figure 10. Mécanismes de sécrétion de l'IL-1 β par les monocytes, les M ϕ ou les CD après stimulation par le LPS et l'ATP. Voie A : l'IL-1 β est prise en charge par des endosomes de recyclage, qui s'accumulent dans des compartiments vésiculaires et forment des corps multivésiculaires (MVBs). Ces derniers fusionnent avec la membrane plasmique, libérant des exosomes contenant l'IL-1 β . Voie B : l'IL-1 β est envoyée dans des vésicules appelées lysosomes sécrétoires. Après stimulation des cellules par l'ATP, ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, libérant leur contenu dans le milieu. Voie C : la stimulation par l'ATP provoque la formation de bourgeonnements de la membrane plasmique, dans lesquels est contenue l'IL-1 β . Les vésicules ainsi créées sont libérées dans le milieu. Voie D : la sécrétion d'IL-1 β est assurée par des transporteurs membranaires. Adapté d'après [7].

4.3. Induction de la sécrétion d'IL-1 β et de TNF- α par les extraits de Gui ou leurs composants

Comme précédemment évoqué, les extraits de Gui et les MLs ont été démontrés comme induisant la sécrétion de nombreuses cytokines, dont le TNF- α ou l'IL-1 β .

4.3.1. Induction de la sécrétion de TNF- α

Il a été rapporté que les extraits [10, 12, 18], ou les MLs [10, 12, 13, 18, 22, 101, 125] induisent la sécrétion de TNF- α par les CSCs, notamment les monocytes. L'absence d'une telle sécrétion a également été rapportée par d'autres études [19]. Par ailleurs, des travaux menés sur du sang total ou sur des CSCs humaines ont montré que la quantité de TNF- α sécrétée après 24 h de traitement est moindre comparée à celle observée après 4 h. De plus, une pré-stimulation par les extraits ou par du LPS inhibe la sécrétion de cette cytokine induite par ces mêmes extraits ou par du LPS. D'un autre côté, une étude menée sur du sang total a montré que ni la ML-I, ni un extrait en contenant, ne peuvent induire la sécrétion de TNF- α , mais qu'une co-stimulation avec du LPS soutient une telle sécrétion. Cet effet repose

notamment sur l'inhibition de la sécrétion d'IL-10. En outre, la seule chaîne B de la ML-I ne suffit pas à soutenir un tel effet, suggérant la contribution de la chaîne A [241].

4.3.2. Induction de la sécrétion d'IL-1 β

Des travaux réalisés soit avec les extraits, fermentés ou non [10, 17, 18], soit avec les MLs [12, 13], voire même la seule chaîne B de la ML-I [13], ont mis en évidence l'induction de la sécrétion de cette cytokine par les CSCs, notamment les monocytes. D'autres études n'ont cependant pas détecté de libération de cette cytokine, aussi bien avec les extraits [19], qu'avec les MLs [101]. De plus, des travaux menés sur sang total avec un extrait ayant une teneur définie en ML I, ou la ML I elle-même, n'ont pas observé d'induction de la sécrétion d'IL-1 β , même lorsque les cellules sont co-incubées avec du LPS [241].

Globalement, ces données suggèrent que les extraits et les MLs sont à même, dans des conditions appropriées, de conduire à la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β . Toutefois, la sécrétion de ces cytokines est davantage amplifiée à des concentrations cytotoxiques [12, 242] ou induisant les plus fortes diminutions de la viabilité cellulaire [10, 243].

D'autre part, le rôle des MLs dans la sécrétion de ces cytokines a été souligné par l'inhibition de celles-ci en présence d'un sucre compétiteur [13]. Pourtant, d'autres substances seraient également impliquées, certains travaux montrant que la sécrétion de ces cytokines n'est pas corrélée avec la teneur en MLs des préparations étudiées [18]. De plus, la destruction de ces MLs par la chaleur ne réduit que partiellement l'effet inducteur de la sécrétion de TNF- α des extraits [23].

Il apparaît également que l'aptitude des extraits à induire la sécrétion de ces cytokines varie grandement, notamment avec l'arbre hôte dont est issu le Gui [18].

Il apparait donc que l'inflammation, et en particulier l'IL-1 β , joue un rôle primordial dans le développement tumoral, bien qu'encore partiellement compris. Par ailleurs les mécanismes moléculaires contrôlant l'activation de la caspase-1 d'une part, et la sécrétion d'IL-1 β d'autre part sont très complexes. De plus, les travaux antérieurs qui ont exploré l'induction de la sécrétion d'IL-1 β en réponse aux extraits de Gui ont permis de mettre en évidence que ces extraits disposeraient, dans certaines conditions, de l'aptitude à induire les synthèses et sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α .

Dans ce travail, considérant l'importance que prend l'IL-1 β dans l'immunité anti-tumorale, de telles aptitudes vont être réévaluées, en tenant compte, en particulier, des nouveaux mécanismes mis à jour ces toutes dernières années.

MATERIELS ET METHODES

1. Réactifs

Origine des réactifs

L'ATP ultra pure, le LPS d'*Escherichia coli* (O111:B4), l'albumine sérique bovine (BSA), l'o-phénylènediamine (OPD Sigma Fast[®]), le Triton X-100, la peroxydase (HRP) couplée à l'avidine (Av-HRP), le N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA), le cycloheximide (CHX), le Bay11-7082 (Bay) ainsi que les sucres proviennent de Sigma.

L'imiquimod (R837) est de Calbiochem.

Pour les déterminations de cytokines par la méthode ELISA (décrite ci-dessous), les Ac suivants, ainsi que les cytokines recombinantes, provenant tous de chez eBioscience, ont été utilisés.

Pour l'IL-1 β , l'Ac monoclonal (clone B122) d'amster arménien anti IL-1 β murine, le sérum polyclonal d'Ac biotinylés de lapin anti IL-1 β murine et l'IL-1 β recombinante murine ont été employés.

Les Ac monoclonaux biotinylés (clones MP6-XT22 et MP6-XT3) ou non (clone 1F3F3D4) anti-TNF- α murin et le TNF- α recombinant murin ont été utilisés pour le TNF- α .

L'IL-6 a été dosée grâce à l'Ac monoclonal de rat anti IL-6 murine (clone MP5-20F3), l'Ac biotinylé de rat anti IL-6 murine (clone MP5-32C11) ainsi que l'IL-6 murine recombinante. Le dosage de l'IL-10 a été réalisé avec l'Ac anti IL-10 murine (clone JES5-16E3) ainsi que l'Ac biotinylé anti IL-10 murine (clone JES5-2A5) et l'IL-10 murine recombinante.

L'Ac de chèvre anti IgG de lapin couplé à l'HRP provient de chez Jakson ImmunoResearch.

Le sérum polyclonal d'Ac biotinylés de chèvre anti IL-1 β murine, employé pour la technique d'immuno-empreinte, provient de R et D systems.

Le cocktail d'inhibiteurs de protéases complet est de Roche.

Le réactif MTS et le kit Cyto Tox 96[®] non radioactif de dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) ont été obtenus auprès de Promega.

Préparation et conservation des réactifs

L'imiquimod a été dilué en DMSO et aliquoté à 10 mM. Tous les autres réactifs ont été dilués en milieu de culture des cellules (voir chapitre suivant). Le LPS a été aliquoté à la concentration de 1 mg/ml, le CHX à 10 mg/ml, le Bay à 10 mM, l'ATP à 250 mM et le

L-NMMA à 10 mM. L'IL- β et l'IL-6 ont été aliquotées à 10 μ g/ml, le TNF- α à 5 μ g/ml et l'IL-10 à 1 μ g/ml. L'Av-HRP a été aliquotée à 1 mg/ml.

Les aliquots ont été conservés à -20°C.

Les extraits de Gui fermentés (VAFs) Iscador[®], ainsi que des ampoules de milieu de dilution des extraits (soluté isotonique de NaCl, ici appelé « vecteur ») nous ont été fournis par les laboratoires Weleda. Les VAFM et VAFQ ont des teneurs en MLs qui sont respectivement de 250 ng/ml et 375 ng/ml pour 5 mg d'extrait par ampoule de 1 ml. Le VAFP contient 10 mg d'extrait par ampoule de 1 ml. Pour ces travaux, nous avons utilisé les lots 80111 de VAFP, 80411 de VAFM et 90411 ou 80211 de VAFQ.

Dans toutes les expériences dans lesquelles les VAFs sont employés à différentes concentrations, la concentration de vecteur a été maintenue constante et égale à celle obtenue avec la plus forte concentration de VAFs. Pour cela, à partir de la plus forte concentration de VAFs, les dilutions successives ont été réalisées extemporanément dans un mélange de milieu de culture additionné de vecteur, en concentration identique à celle obtenue lors de la préparation de la plus forte concentration de VAFs. Un contrôle vecteur, consistant en un mélange de milieu de culture additionné de vecteur, en concentration identique à celle obtenue lors de la préparation de la plus forte concentration de VAFs a été réalisé lors de toutes les expériences.

Concernant les expériences dans lesquelles sont employées des substances diluées en DMSO, une démarche analogue a été adoptée. Dans tous les cas, la concentration finale maximale en DMSO ne dépasse pas 0,1 %.

2. Culture cellulaire

2.1. Entretien des cultures

Les MØ murins E-Clone, établis à partir de MØ J774 sur la base d'une expression du RM, nous ont été fournis par Mr le Dr Stahl. Les cellules MAMI issues de co-cultures de cellules microgliales et de fibroblastes proviennent de Mr le Dr Lombard [244, 245]. Ces cellules ont été cultivées en milieu RPMI 1640 Glutamax I (Gibco) additionné de pénicilline (100 UI/ml), streptomycine (20 μ g/ml ; Sigma) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Gibco) (désigné dorénavant sous le terme RPMI complet) en flacons de culture stériles de 75 cm² (TPP) placés dans un incubateur humide à 37°C, 5 % de CO₂. Le milieu de culture a

été renouvelé de moitié tous les trois jours. Dans ces conditions, une fraction des cellules, avec une viabilité excédant 95 % (déterminée par test d'exclusion du bleu trypan [Sigma]), passait spontanément en suspension ; ces cellules ont été utilisées lors des expériences réalisées au cours de cette étude.

2.2. Obtention des cellules et mise en culture dans des puits

Les cellules ont été prélevées stérilement dans les boîtes de culture en aspirant et refoulant délicatement le milieu de culture. Le milieu prélevé a été réparti dans des tubes stériles de 50 ml (Falcon). Après centrifugation (10 min à 1000 tr/min), les cellules ont été dénombrées au microscope. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion du bleu Trypan dans une cellule de Malassez. Les cellules mortes sont colorées en bleu par incorporation du colorant, tandis que les cellules vivantes excluent ce colorant et sont réfringentes. Les culots cellulaires ont alors été repris par un volume de RPMI complet permettant d'obtenir la densité cellulaire désirée. Les cellules ont alors été réparties dans des plaques de cultures stériles et placées dans l'étuve jusqu'à l'expérience proprement dite.

3. Mesure de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion du bleu Trypan après traitement par les VAFs

Les cellules ont été dénombrées au microscope après traitement par les VAFs. Pour ce traitement, les cellules ont été mises en culture en plaques stériles de 24 puits (TPP), sous 500 µl (5×10^5 ϕ /puits), puis placées dans l'étuve à 37°C pendant 6 h pour adhérer. Elles ont ensuite été traitées par les VAFs dilués dans du milieu complet (sous un volume de 500 µl), puis placées dans l'étuve pendant 24 h. Après avoir éliminé les surnageants, les cellules ont été incubées 30 min à 4°C dans du PBS additionné de trypsine (0.0015 % [v/v]) et d'EDTA (5 mM). Les cellules ont ensuite été délicatement décollées par aspiration/refoulement, puis dénombrées comme précédemment décrit par le test d'exclusion du bleu Trypan. Aussi bien les cellules qui excluent le bleu Trypan que celles qui ne l'excluent pas ont été dénombrées.

4. Mesure de l'activité métabolique et/ou viabilité cellulaire par le test au MTS

4.1. Principe du test

Le principe du test repose sur la réduction d'un sel de tétrazolium, le MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), en formazan soluble, par des déshydrogénases actives dans les cellules métaboliquement actives. Ainsi, l'intensité de la coloration apparaissant dans les puits reflète l'activité métabolique des cellules, et donc indirectement leur viabilité.

4.2. Réalisation du test

Les cellules ont été mises en culture en plaques stériles de 96 puits (TPP) à raison de 2×10^4 ϕ /puits (nombre de cellules préalablement déterminé, voir plus loin), sous 100 μ l de milieu RPMI complet pour adhérer. Sur chaque plaque, un « blanc réactif » a été incorporé, consistant en du milieu de culture sans cellules, et ne recevant que le réactif MTS/PMS (phenazine methosulfate). Les cellules ont ensuite été traitées par les réactifs, ajoutés sous 100 μ l. Le réactif MTS/PMS a été reconstitué extemporanément à partir de solutions mères de MTS (2 mg/ml) et de PMS (0.92 mg/ml) dilués dans du tampon phosphate salin (PBS), à raison de 2 ml de la solution de MTS et de 100 μ l de celle de PMS. Le réactif a été distribué sous 25 μ l/puits. La réaction a été menée pendant 4 h dans l'incubateur. Après uniformisation de la coloration par agitation ménagée, l'absorbance a été lue, contre « le blanc réactif », à 490 nm avec un lecteur de microplaques (Molecular Devices).

Les valeurs correspondent à la moyenne et à l'écart-type des 3 puits et sont exprimées en pourcentage de l'activité métabolique moyenne du contrôle (100 %).

4.3. Détermination du nombre cellules à déposer par puits

Le nombre de cellules à déposer a été déterminé en mesurant l'absorbance obtenue en fonction du nombre de cellules déposé par puits (Fig. 11). A été retenu celui qui donnait une valeur d'absorbance située dans la zone de linéarité, à savoir 2×10^4 ϕ /puits, en plaque 96 puits.

Un nombre similaire de cellules MAMI à déposer par puits a été déterminé (données non montrées).

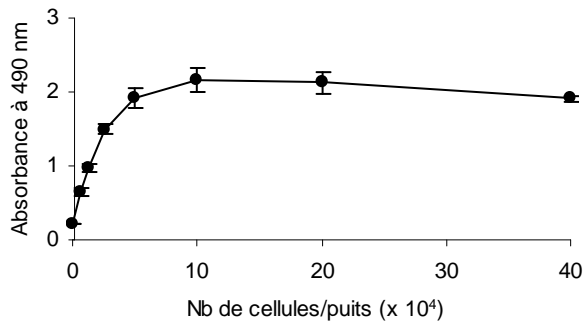


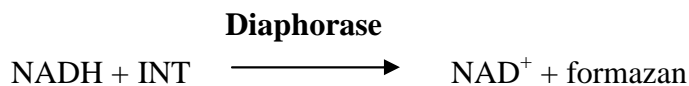
Figure 11. Variation de l'absorbance en fonction du nombre de cellules déposé par puits. Les MØ E-clone ont été déposés sous un nombre de 0,625 à 40 x 10⁴ ϕ /puits dans des plaques 96 puits. Elles ont été incubées en milieu RPMI complet pendant 24 h, à 37°C. Le réactif MTS/PMS a été ajouté 4 h avant la fin de l'incubation. L'absorbance a été lue à 490 nm avec un lecteur de microplaques.

5. Mesure de la cytotoxicité par dosage de la LDH

La LDH est une enzyme cytosolique. Ainsi, la libération de celle-ci dans le milieu de culture témoigne d'une atteinte de l'intégrité membranaire de la cellule et d'une lyse cellulaire.

5.1. Principe du dosage

Le principe du dosage repose sur la réduction enzymatique par la diaphorase, d'un sel de tétrazolium (INT) en formazan de couleur rouge, selon la réaction suivante :



Le NADH provient lui-même d'une réaction enzymatique impliquant la LDH :



Le dosage de la LDH est donc indirect, et l'intensité de la coloration est fonction de la quantité de LDH libérée dans le milieu.

5.2. Réalisation du dosage

Les échantillons, surnageants et lysats, issus des expériences de mesure de l'induction de la sécrétion de cytokines, ont été distribués séparément, dans des plaques 96 puits PolySorp™ (Nunc), sous 50 µl. Ces échantillons ont été éventuellement dilués, de manière à ce que la valeur de l'absorbance obtenue se situe dans la zone de linéarité (voir le chapitre suivant). Un « blanc réactif » (réactif ajouté soit à du milieu de culture pour les surnageants, soit à la solution de lyse pour les lysats) a été incorporé sur chaque plaque. La LDH a été dosée par ajout de 25 µl/puits de réactif. La réaction colorée a été développée pendant environ 30 min à température ambiante (TA) et à l'obscurité, puis arrêtée par ajout de 25 µl/puits de H₂SO₄ 0,1 M. L'absorbance a été lue, contre le « blanc réactif », à 490 nm avec un lecteur de microplaques.

La quantité totale de LDH a été déterminée par addition des quantités de LDH dosées dans les surnageants et les lysats. La LDH dans les surnageants est exprimée en pourcentage de la LDH totale. Les valeurs correspondent à la moyenne et à la déviation standard des pourcentages des 3 puits.

Il faut noter que le rouge de phénol présent dans le milieu de culture RPMI interfère avec ce dosage. C'est la raison pour laquelle les expériences ont été réalisées en milieu RPMI 1640 Glutamax I sans rouge de phénol (Gibco).

5.3. Détermination de la zone de linéarité de l'absorbance en fonction de la quantité de LDH

La zone de linéarité de l'absorbance en fonction de la quantité de LDH libérée a été déterminée en mesurant l'absorbance obtenue en fonction du nombre de cellules déposé par puits (Fig. 13). Les MØ E-clone ont été déposés sous un nombre de 0,625 à 40 x 10⁴ ϕ /puits, sous 200 µl, dans des plaques stériles de 96 puits (TPP). Après adhésion au support, les surnageants ont été éliminés, et les tapis cellulaires ont été lysés dans 200 µl de RPMI additionné de Triton X-100 (concentration finale de 0,1 %). La LDH a ensuite été dosée par mesure de l'absorbance à 490 nm avec un lecteur de microplaques (Fig. 12).

Il apparait que l'absorbance varie de manière linéaire avec le nombre de cellules déposées par puits tant que celui-ci se situe en deçà de 10 x 10⁴ cellules pour 200 µl, donc de

50 x 10⁴ cellules pour 1 ml (volume de travail dans les plaques 24 puits). Les dilutions des échantillons à doser ont été réalisées de manière à ce que la quantité de LDH présente dans l'échantillon dilué soit inférieure à celle libérée par l'équivalent de 50 x 10⁴ cellules/ml.

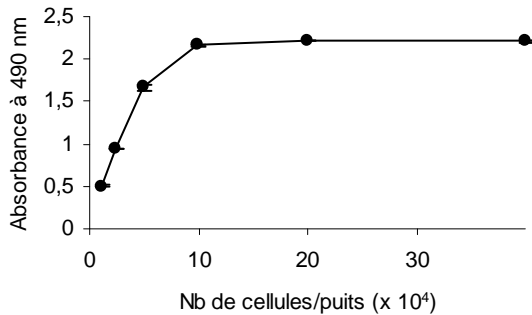


Figure 12. Variation de l'absorbance en fonction du nombre de cellules déposées par puits. Les MØ E-clone ont été déposés sous un nombre de 0,625 à 40 x 10⁴ ϕ /puits, sous un volume de 200 μ l. Les cellules ont été lysées par addition de Triton x-100 (concentration finale 0,1 %). L'absorbance a été mesurée contre le « blanc réactif » à 490 nm avec un lecteur de microplaques, 30 min après ajout du réactif.

6. Incubation des cellules pour les dosages des cytokines et de la LDH

Les cellules ont été distribuées en plaques stériles de 24 puits (TPP), sous 500 μ l (5 x 10⁵ ϕ /puits), puis placées dans l'étuve à 37°C pendant 4 ou 12 h pour adhérer. Passé ce temps, les traitements proprement dits ont été réalisés et les réactifs (préparés en milieu complet) ont été ajoutés sous un volume de 500 μ l. Chaque condition a été réalisée en triplicat. A la fin de l'expérience, les surnageants de culture ont été récupérés et centrifugés pendant 5 min à 1100 tr/min pour les débarrasser des éléments particuliers, puis aliquotés. Les tapis cellulaires ont été lysés pendant 30 min à 4°C, par 500 μ l de RPMI complet sans rouge de phénol additionné de 0,1 % de Triton X-100. Les lysats ainsi obtenus ont été centrifugés 5 min à 15000 tr/min pour éliminer les fractions insolubles, puis aliquotés. Surnageants et lysats ont été soit analysés immédiatement, soit conservés à - 20°C jusqu'à leur analyse.

7. Dosage des cytokines par ELISA

Les dosages ont été réalisés dans des plaques 96 puits MaxiSorp™ (Nunc). Les Ac monoclonaux primaires (Ac d'amster arménien anti IL-1 β murine, Ac anti TNF- α murin, Ac de rat anti IL-10 murine ou Ac anti IL-6 murine) dilués à 1 μ g/ml dans du PBS, ont été adsorbés sous 100 μ l/puits pendant une nuit à 4°C. Après 4 lavages par 200 μ l de PBS additionné de 0,1 % (v/v) de Tween 20, l'étape de saturation a été menée pendant 1 h à TA,

en déposant 100 µl/puits de PBS – 0,1 % (p/v) de BSA. Les plaques ont été lavées 5 fois. Les échantillons ont été dilués, et une gamme étalon a été préparée par dilution de la protéine recombinante en milieu RPMI complet. La gamme s'étendait, pour l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-10, de 62,5 à 4000 pg/ml et celle pour le TNF- α de 78 à 5000 pg/ml. La gamme étalon (une pour chaque plaque) ainsi que les échantillons, ont été distribués sous 100 µl/puits. Un blanc substrat (contenant uniquement l'OPD), a été incorporé sur chaque plaque. Après une nuit d'incubation à 4°C, les puits ont été lavés 5 fois. Les Ac secondaires biotinylés (sérum polyclonal d'Ac de lapin anti IL-1 β murine et les Ac monoclonaux anti TNF- α murin, anti IL-10 murine et anti IL-6 murine) ont été dilués à 0,5 µg/ml dans du PBS – 0,1 % de BSA. Ils ont alors été distribués sous 100 µl/puits et laissés 3 h à TA. Après 5 lavages, 100 µl/puits de Av-HRP (1/5000 en PBS – 0,1 % de BSA) ont été appliqués pour 1 h à TA, et à l'obscurité. Après 6 lavages, l'OPD Sigma Fast[®] a été ajouté sous 100 µl/puits. La réaction colorée a été développée pendant 30 min à l'obscurité, puis arrêtée par ajout de 100 µl/puits d'H₂SO₄ 0,1 M. L'absorbance a été lue contre le blanc substrat, à 490 nm avec un lecteur de microplaques.

8. Immunoempreinte

Les MØ E-Clone ont été distribués sous 1 ml de milieu, dans des plaques de culture de 12 puits stériles (TPP) à raison de 1 x 10⁶ ϕ /puits. Les plaques ont été placées dans l'étuve à 37°C pendant 6 h pour laisser les cellules adhérer. Après élimination de 700 µl de milieu de culture, les réactifs, dilués en milieu de culture, ont été ajoutés sous 300 µl (volume réactionnel final de 600 µl). Différents types de milieux ont été utilisés. Pour l'analyse des surnageants, les cellules ont été cultivées en milieu sans sérum (OPTI-MEM, Gibco). Lorsque les cellules ont été stimulées par du LPS, du SFV a été ajouté (concentration finale 1 % [v/v]). Lorsque seuls les lysats ont été analysés, les cellules ont été cultivées en milieu RPMI complet.

Les surnageants ont été récupérés et centrifugés 5 min à 1100 tr/min, à 4°C. En parallèle, les préparations cellulaires ont été lysées à 4°C pendant 30 min avec 150 µl/puits de PBS avec Ca et Mg (PBS⁺) additionné de 1 % (v/v) de Triton X-100 et d'inhibiteurs de protéases. Les lysats ont été récupérés et centrifugés 5 min à 15000 tr/min, à 4°C. Lysats et surnageants ont été mélangés avec du mix 4 X (Tris 125 mM, glycérol 20 % [v/v], SDS 4 % [p/v], bleu de Bromophénol), puis ebouillantés pendant 10 min. Pour la migration, des quantités équivalentes de cellules (75000 cellules/ligne) ont été déposées. Ainsi, 15 µl de lysat ou 60 µl

de surnageant ont été déposés sur gel de polyacrylamide à 12 %. Après migration (à ampérage constant de 30 mA), le transfert sur membrane de polyvinylidifluorure (PVDF) a été effectué une nuit durant à voltage constant (voltage maximal et ampérage à 70 mA), dans des conditions d'immersion totale (tampon glycine 190 mM, Tris 25 mM, méthanol 20 % [v/v]). Après saturation des membranes avec un tampon tris salin (TBS) additionné de poudre de lait écrémé (5 % [p/v]) pendant 30 min, l'IL-1 β a été révélée par 1 h d'incubation avec le sérum polyclonal d'Ac biotinylés de chèvre anti IL-1 β murine (dilué au 1/500^{ème} dans du TBS - 0,5 % BSA). L'Av-HRP (1/15000^{ème} dans du TBS - 0,5 % BSA) a alors été appliquée. Pour mettre en évidence la β -actine, les membranes ont été mises en présence de l'Ac de souris couplé à l'HRP (1/1000^{ème} dans du TBS - 0,5 % BSA). Chacune de ces étapes a été suivie de 3 lavages (10 min dans du TBS - 0,1 % Tween 20). La détection a été réalisée après développement d'une réaction de chimiluminescence, en incubant les membranes avec le réactif ECL[®] (Amersham) pendant 2 min puis exposition et développement de films photosensibles (Amersham).

9. Dosage des nitrites par la méthode de Griess

Après adhésion des cellules (5×10^5 ϕ /puits en plaques 24 puits) en milieu RPMI complet et après traitements, 100 μ l de surnageants ont été transférés dans des plaques 96 puits PolySorp[™] (Nunc). Le réactif de Griess (solution composée de naphthyléthylènediamine [solution aqueuse à 1 mg/ml] et de sulfanilamide [10 mg/ml dissout dans l'H₃PO₄ à 5 %] à parties égales), préparé extemporanément, a été rajouté sous 100 μ l/puits. Après développement de la réaction pendant 10 min à l'obscurité, l'absorbance a été lue à 550 nm avec un lecteur de microplaques (Molecular Devices). La quantité de nitrites a été déterminée par rapport à une gamme étalon de NaNO₂ (1 à 100 μ M) traitée de la même façon.

10. Statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart-type de trois déterminations, et sont représentatifs d'une expérience indépendante. Chaque expérience a été réalisée trois fois. L'analyse statistique a été menée avec le test de Student non apparié bilatéral. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative (*), et une valeur de $p < 0,005$ comme très significative (**).

RESULTATS

1. Evaluation de l'aptitude des cellules MAMI et des MØ E-clone à sécréter de l'IL-1 β

Deux modèles d'induction de la sécrétion d'IL-1 β ont été expérimentés. L'un d'entre eux repose sur la mise en œuvre successive de deux variétés de signaux. Le LPS, ligand du TLR4, a été retenu comme motif microbien, pour assurer la synthèse de pro-IL-1 β ; l'ATP constitue le signal requis pour déclencher le clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β ainsi que la sécrétion de cette dernière [3]. Le TNF- α , cytokine connue pour induire la synthèse de pro-IL-1 β [4], a également été employé comme premier signal. Le second modèle considère l'aptitude des cellules à répondre à une stimulation unique. L'imiquimod, ligand du TLR7 notamment, est capable de soutenir chacune des étapes requise à la sécrétion d'IL-1 β , et a donc été employé seul [6].

Ces modèles ont été appliqués à deux lignées cellulaires. Les macrophages E-clone ont été obtenus à partir de la lignée de MØ murins J-774 sur la base de l'expression du RM [246]. Les cellules MAMI sont issues de co-culture de MØ de microglie et de fibroblastes. Ces lignées cellulaires expriment toutes deux le RM. Par ailleurs, elles prolifèrent de manière modérée. En effet, le nombre de cellules n'est pas augmenté après transfert et culture (24 h) dans des plaques, pour l'une ou l'autre de ces lignées. Il n'en va pas de même pour d'autres lignées, telles que les cellules J-774 ou les MØ RAW (observations non montrées). Cette caractéristique permet de mieux appréhender les effets de drogues sur la viabilité cellulaire ou sur la sécrétion de cytokines.

Avant d'étudier la capacité des extraits de Gui à induire la sécrétion de cytokines, et en particulier d'IL-1 β , sur ces modèles cellulaires, nous nous sommes assurés de leur validité dans ce contexte.

1.1. Les MØ E-clone et les cellules MAMI sécrètent de l'IL-1 β en réponse aux stimulations par le LPS puis par l'ATP

Pour déterminer l'aptitude des MØ E-clone à sécréter de l'IL-1 β en réponse à la stimulation par le LPS puis par l'ATP, ces cellules ont été mises en culture dans des plaques pendant 24 h, puis stimulées par des concentrations croissantes de LPS lors des 4 dernières heures de culture, puis stimulées ou non par de l'ATP. Comme décrit dans la littérature, le LPS seul ne

suffit pas à la sécrétion de cette cytokine (Fig. 13a). En présence d'ATP, la sécrétion est maximale pour 1000 ng/ml de LPS, toutefois 100 ng/ml suffisent à induire une sécrétion significative. Par ailleurs, la viabilité et/ou activité métabolique des MØ E-clone tend à être augmentée par le LPS (Fig. 13b). L'éventualité d'une sécrétion passive secondaire à une lyse cellulaire par pyroptose a été écartée, la libération de LDH n'étant pas augmentée, quelle que soit la concentration de LPS appliquée, et ce en présence ou en absence d'ATP (Fig. 13c).

De nombreuses études explorant la sécrétion d'IL-1 β emploient maintenant l'ATP à la concentration de 5 mM [211, 226, 247, 248]. La comparaison des sécrétions induites par l'ATP à 1 ou à 5 mM montre que la concentration de 1 mM s'avère être la plus adaptée pour le modèle E-clone, la sécrétion étant extrêmement réduite à 5 mM (Fig. 13d). La plus forte sécrétion observée avec 1 mM d'ATP n'est pas secondaire à une fuite passive des cellules, la libération de LDH n'étant que faiblement amplifiée à cette concentration par rapport aux autres conditions (Fig. 13e).

Le LPS est décrit comme conduisant à la synthèse et à l'accumulation intracellulaire de pro-IL-1 β . Comme précédemment indiqué, la conversion de la pro-IL-1 β en IL-1 β est principalement assurée par la caspase-1, et l'activation de l'IL-1 β est rapidement suivie de la sécrétion de cette dernière dans le milieu. L'ATP extracellulaire est communément employé pour soutenir à la fois l'activation de la caspase-1 ainsi que la sécrétion d'IL-1 β [3]. Ainsi, la sécrétion d'IL-1 β déclenchée par une stimulation par de l'ATP, successive à celle par du LPS, devrait être accompagnée d'une chute de la quantité d'IL-1 β présente au niveau intracellulaire. Or, lorsque les MØ E-clone sont incubés en présence de LPS puis stimulés par l'ATP, une augmentation significative des quantités de pro-IL-1 β et/ou d'IL-1 β est mise en évidence au niveau intracellulaire en ELISA (les Ac employés pour le dosage ELISA reconnaissent les deux formes, précurseur et mature, de cette cytokine) (Fig. 13f). De manière inexplicable, une telle augmentation n'a pas pu être mise en évidence après analyse par immuno-empreinte. L'analyse par immuno-empreinte montre que la stimulation par le LPS induit la synthèse de pro-IL-1 β (35 kDa), mise en évidence dans les lysats, sans que l'IL-1 β ne puisse être détectée dans les surnageants. Lorsque l'ATP est ajouté, le précurseur est clivé et la forme mature (17 kDa) devient détectable dans le surnageant (Fig. 13h).

Plusieurs études ont montré que la sécrétion d'IL-1 β par des macrophages murins dérivés de moelle osseuse (BMDMs) peut s'accompagner d'une libération de structures vésiculaires dans

le milieu, dans lesquelles est contenue de l'IL-1 β . De telles vésicules peuvent provenir soit du bourgeonnement de la membrane plasmique [237, 238], soit de la fusion de corps multivésiculaires avec cette dernière (les corps multivésiculaires contiennent des vésicules appelées exosomes) [239]. Le déclenchement de ces deux mécanismes de sécrétion dépend d'un signal généré par la stimulation par l'ATP.

Pour explorer l'implication de vésicules membranaires dans lesquelles serait contenue de l'IL-1 β , les surnageants de cellules stimulées par du LPS (100 ng/ml, 4 h) puis de l'ATP (1 mM, 30 dernières min) ont été lysés et les quantités d'IL-1 β présentes dans ceux-ci ont été comparées à celles présentes dans les surnageants non lysés. Après un tel traitement, la quantité d'IL-1 β n'est pas différente entre les surnageants lysés ou non. Ceci suggère que, pour les M ϕ E-clone, la contribution de la libération de vésicules contenant de l'IL-1 β dans le milieu serait négligeable par rapport à celle directement dosable, et donc sécrétée sans être contenue dans des vésicules (Fig. 13g).

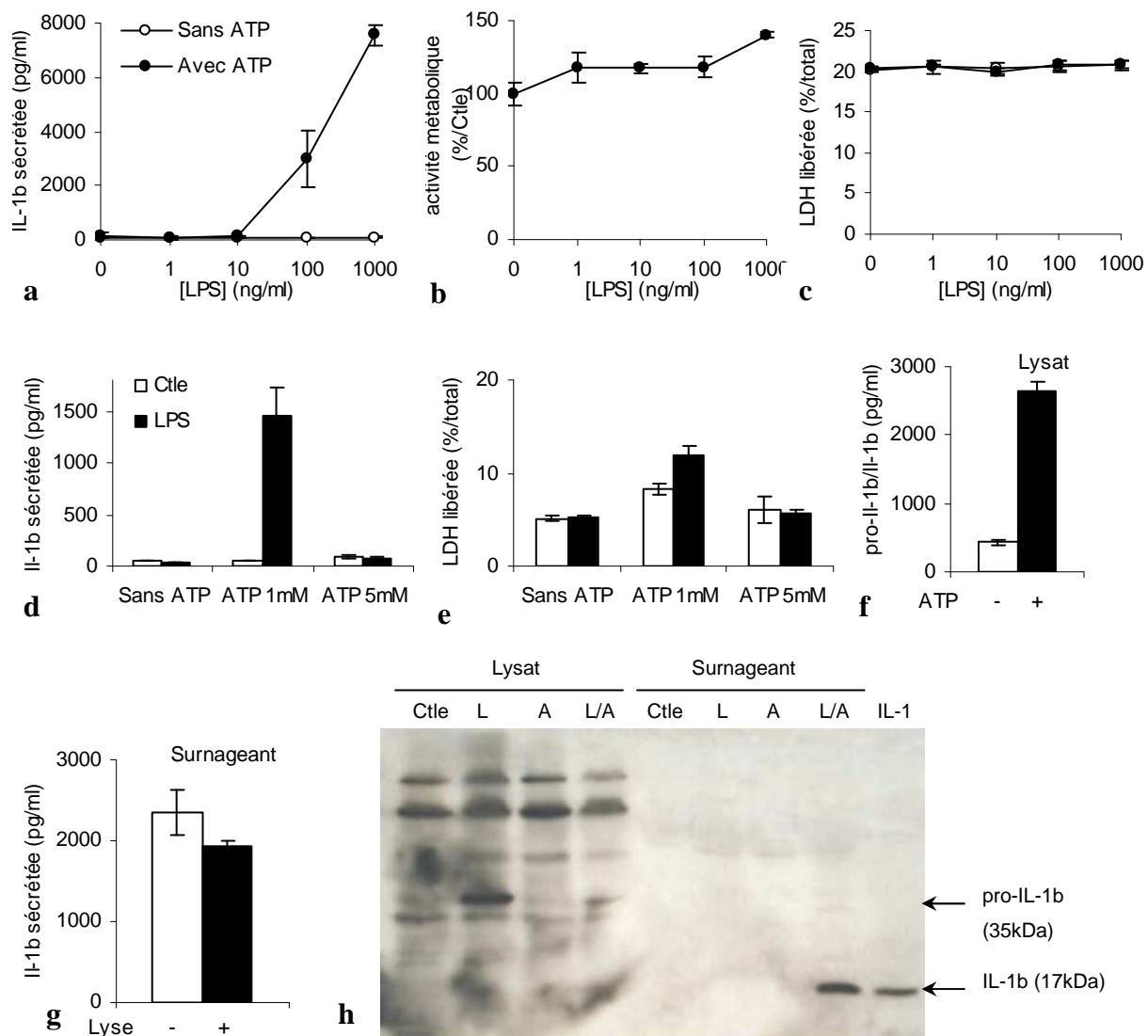


Figure 13. Les MØ E-clone sécrètent de l'IL-1 β en réponse aux stimulations par le LPS puis l'ATP. Les cellules ont été distribuées dans des plaques 24 puits sous 500 μ l (5×10^5 cellules/puits [a et c-g]), ou dans des plaques 96 puits sous 100 μ l (2×10^4 cellules/puits [b]) et cultivées pendant 20 h. Elles ont alors été traitées par des concentrations croissantes de LPS (1 à 1000 ng/ml) pendant 4 h, puis (a-c) brièvement stimulées ou non par de l'ATP (30 dernières min, 1 mM). Alternativement, les cellules ont été incubées en présence de LPS (100 ng/ml, 4 h), associé ou non de l'ATP (30 dernières min) appliqué soit à 1 mM (f et g), soit à 1 ou 5 mM (d et e). L'implication de la libération de vésicules dans la sécrétion d'IL-1 β a été explorée (g) en lysant les surnageants (Triton x-100 à 0.1 % final) après stimulation des cellules par du LPS (100 ng/ml, 4 h), puis par l'ATP (1 mM, 30 dernières min). Les volumes réactionnels finals étaient de 1000 μ l (a, c-g) ou de 200 μ l (b). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants (a-d et g), lysés ou non (g), ou les lysats (f) par la méthode ELISA. L'activité métabolique/et ou viabilité cellulaire a été évaluée par la technique du MTS (b). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité métabolique cellulaire du contrôle. La LDH a été dosée dans les surnageants et les lysats (c et e) ; la LDH libérée est exprimée en pourcentage de la LDH totale, dosée dans les surnageants et les lysats, pour une condition donnée. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois. Pour l'immuno-empreinte (h), les cellules ont été distribuées dans des plaques 12 puits sous 1 ml (1×10^6 cellules/puits). Après adhésion des cellules au support et élimination de 700 μ l de surnageant, les réactifs (préparés en milieu complet) ont été ajoutés sous 300 μ l (volume réactionnel final de 600 μ l). Les cellules ont été traitées, ou non (Ctl), par du LPS (1000 ng/ml, 4 h [L]), en présence ou en absence d'ATP (1 mM, 30 dernières min [A]). Les lysats et les surnageants ont alors été analysés. L'IL-1 β recombinante (IL-1) a été incorporée parmi les échantillons déposés. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante réalisée trois fois.

D'autre part, de récents travaux ont montré que le TNF- α peut soutenir l'activation du facteur NF- κ B, induisant la synthèse de pro-IL-1 β , puis la sécrétion d'IL-1 β en réponse à une stimulation ultérieure par l'ATP [4, 5]. L'aptitude du TNF- α à induire la synthèse de pro-IL-1 β a été explorée en stimulant les MØ E-clone par du TNF- α (10 ng/ml) pendant des temps croissants, associé ou non à de l'ATP. La libération d'IL-1 β a ensuite été mesurée. Une faible sécrétion d'IL-1 β est effectivement induite après 24 h de stimulation par cette cytokine, en présence d'ATP (Fig. 14). Cette quantité est toutefois modeste lorsqu'elle est comparée à celle obtenue après stimulations par le LPS puis l'ATP.

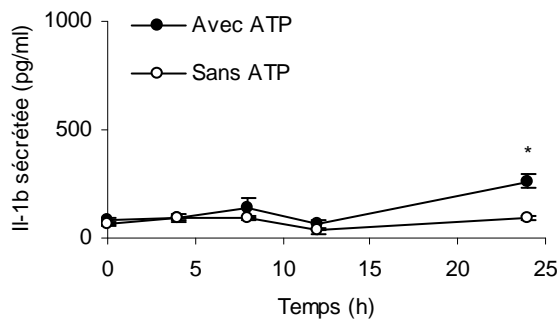


Figure 14. Induction de la sécrétion d'IL-1 β après stimulation des MØ E-clone par le TNF- α puis l'ATP. Les MØ E-clone ont été stimulés par du TNF- α (10 ng/ml), pendant des temps croissants (0 à 24 h) en présence ou en absence d'ATP (1 mM, 30 dernières min). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée une fois.

Les cellules MAMI ont été traitées de manière analogue aux MØ E-clone (Fig. 13). Comme les MØ E-clone, elles sont capables de sécréter de l'IL-1 β en réponse aux stimulations par le LPS puis l'ATP. De plus, elles semblent plus sensibles au LPS, la plus faible concentration de LPS utilisée (1 ng/ml) conduisant à une sécrétion maximale de cette cytokine (Fig. 15a).

Par ailleurs, l'absence d'augmentation de la quantité d'IL-1 β dosée dans les surnageants après leur lyse (Triton X-100 à concentration finale 0,1 %), indique que la sécrétion d'IL-1 β par les cellules MAMI ne ferait pas intervenir de libération de vésicules dans lesquelles serait contenue cette cytokine, et ce tout du moins en quantités appréciables (Fig. 15b).

En outre, l'augmentation mise en évidence au niveau des MØ E-clone, de la quantité de pro-IL-1 β ou d'IL-1 β présente au niveau cytosolique après stimulation par le LPS et l'ATP n'est pas retrouvée au niveau des cellules MAMI (Fig. 15c).

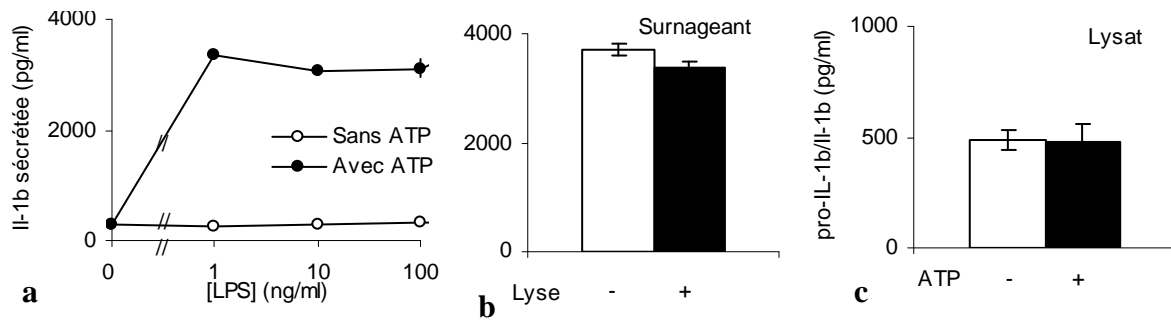


Figure 15. Les cellules MAMI sécrètent de l'IL-1 β en réponse aux stimulations par le LPS puis l'ATP. Les cellules ont été traitées soit par des concentrations croissantes de LPS (1 à 1000 ng/ml [a]), soit par 100 ng/ml de LPS (b et c), pendant 4 h, en présence ou en absence d'ATP (30 dernières min, 1 mM). L'implication de la libération de vésicules dans la sécrétion d'IL-1 β (b) a été explorée en lysant les surnageants (Triton x-100 à 0.1 % final) après stimulation des cellules par du LPS (100 ng/ml, 4 h), puis par l'ATP (1 mM, 30 dernières min). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants (a), lysés ou non (b), ou dans les lysats cellulaires (c) par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

1.2. Les M ϕ E-clone, mais non les cellules MAMI sécrètent de l'IL-1 β en réponse à la stimulation par l'imiquimod

L'aptitude des M ϕ E-clone à induire la sécrétion d'IL-1 β en réponse à une seule stimulation a été explorée grâce à l'imiquimod. Comme précédemment observé [6], et bien que l'ATP amplifie la sécrétion d'IL-1 β , l'imiquimod seul (100 μ M, 24 h) soutient effectivement cette sécrétion (Fig. 16a). En outre, la modeste augmentation de la libération de LDH dans le milieu suggère que cette sécrétion ne serait pas due à une libération passive du contenu cellulaire dans le milieu (Fig. 16b). De plus, alors que l'activité métabolique et/ou viabilité cellulaire reste comparable à celle du contrôle après stimulation de ces cellules par l'imiquimod, le nombre de cellules excluant le bleu Trypan diminue dès 10 μ M (Fig. 16c et d). L'apparente préservation de l'activité métabolique, alors que le nombre de cellules viables diminue, indique une augmentation de l'activité métabolique des cellules persistantes induite par l'imiquimod.

D'autre part, la production de dérivés nitrés en grandes quantités par les phagocytes mononucléés repose principalement sur l'induction d'une iNOS. L'accumulation de ces dérivés au niveau extracellulaire, décelable après quelques heures de stimulation, a été évaluée après 24 h de traitement par l'imiquimod (30 μ M). Une production de ces dérivés nitrés est effectivement détectable dès 24 h, et est davantage accrue après 48 h de traitement (Fig. 16e). L'intensité de cette sécrétion est comparable à celle obtenue avec le LPS (24 h de stimulation) (Fig. 16f). Les libérations de dérivés nitrés induites par l'imiquimod ou le LPS sont toutes deux bloquées en présence de L-NMMA, un inhibiteur de la iNOS (Fig. 16g et h), indiquant que cette dernière serait principalement responsable de la production de ces dérivés.

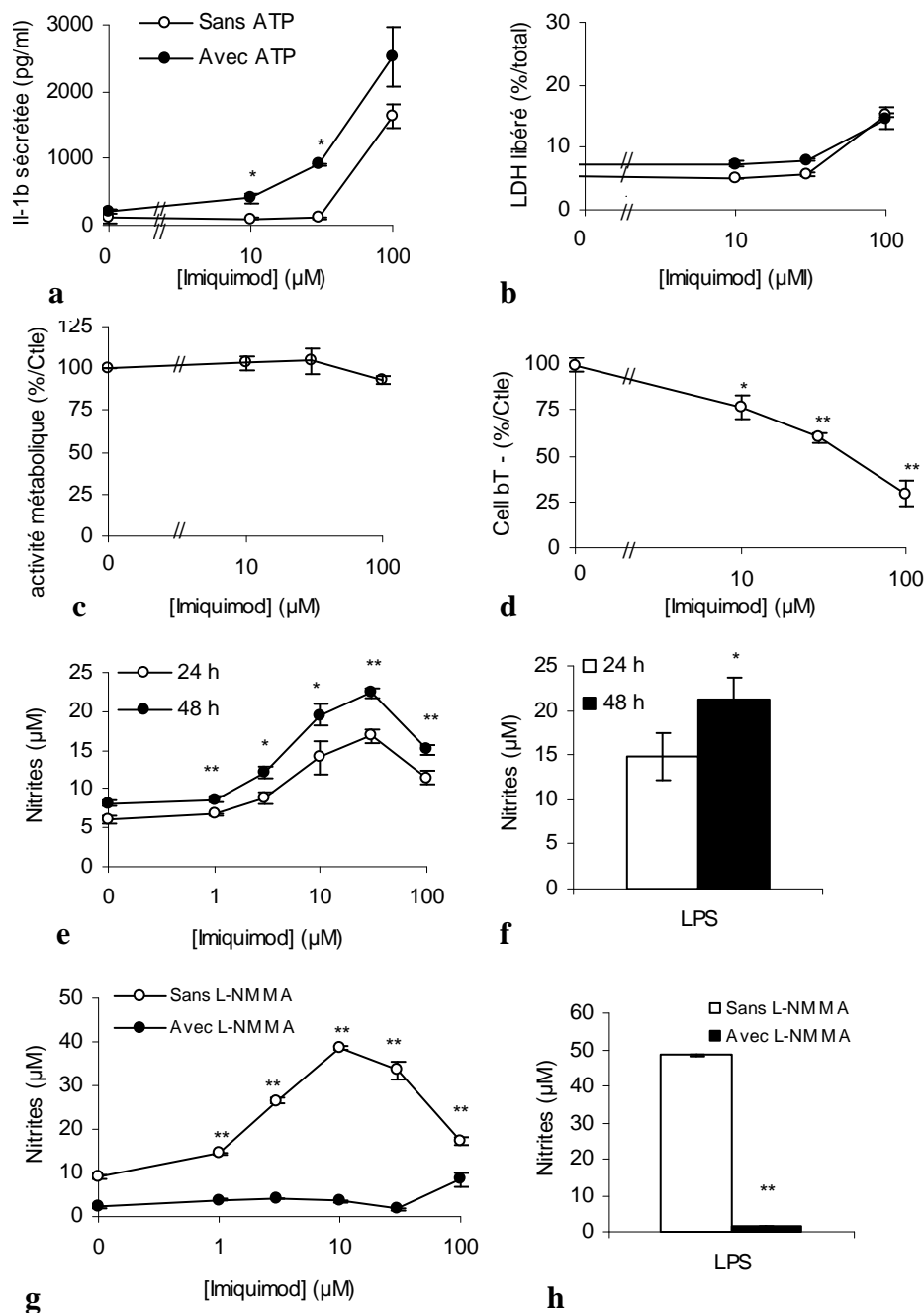


Figure 16. Les MØ E-clone sécrètent de l'IL-1 β et des dérivés nitrés en réponse à la stimulation par l'imiquimod. Les MØ E-clone ont été traités par des concentrations croissantes d'imiquimod (10 à 100 μ M [a-e et g]), pendant 24 h (a-e) ou 48 h (e et g) ou par du LPS (1000 ng/ml), pendant 24 h (f) ou 48 h (f et h), en présence ou en absence d'ATP (30 dernières min, 1 mM [a et b]). Le L-NMMA (100 μ M final) a été ajouté 30 min avant les stimulations par le LPS ou l'imiquimod et maintenu pendant toute la durée de celles-ci (g et h). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants par la méthode ELISA (a). La LDH a été dosée dans les surnageants et les lysats (b). La LDH libérée est exprimée en pourcentage de la LDH totale, dosée dans les surnageants et les lysats, pour une condition donnée. L'activité métabolique et/ou viabilité cellulaire a été évaluée par la technique du MTS (c). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité métabolique cellulaire du contrôle. Les cellules excluant le bleu Trypan (Cell bT -) ont été dénombrées au microscope après avoir été décrochées du support (cf matériel et méthodes) (d), puis exprimées en pourcentage du contrôle. Les dérivés nitrés ont été dosés par la méthode de Griess (e-h). Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante (m \pm SD, n=3) réalisée trois fois.

Concernant les cellules MAMI, la stimulation par l'imiquimod ne permet pas d'induire la sécrétion d'IL-1 β , et ce en présence ou en absence d'ATP (Fig. 17). Des études par immun Empreinte montrent que les cellules MAMI n'expriment pas le TLR7, alors que les M \emptyset E-clone l'expriment (étude réalisée avec Mr le Dr Vidal).

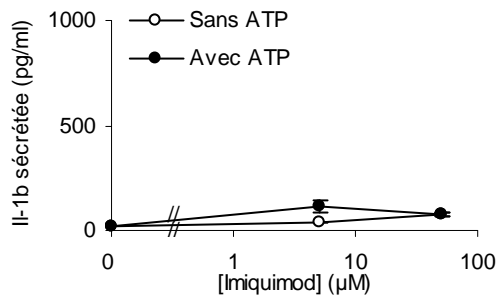


Figure 17. Les cellules MAMI ne peuvent pas sécréter d'IL-1 β en réponse à la stimulation par l'imiquimod. Les cellules ont été traitées par de l'imiquimod (5 ou 50 μ M) pendant 18 h, en présence ou en absence d'ATP (30 dernières min, 1 mM). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants, par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Considérées dans leur ensemble, ces expériences montrent que les M \emptyset E-clone sécrètent de l'IL-1 β lorsqu'ils sont stimulés soit par du LPS puis de l'ATP, soit par de l'imiquimod. Les cellules MAMI peuvent sécréter cette cytokine lorsqu'elles sont stimulées par du LPS puis de l'ATP, mais pas par l'imiquimod.

Ces deux modèles peuvent donc être employés dans l'étude de l'aptitude des extraits de Gui à promouvoir la synthèse et/ou la sécrétion d'IL-1 β .

2. Etude de l'aptitude des VAFs à induire les synthèses et/ou sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α

2.1. Evaluation de l'induction des sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α en réponse à des incubations prolongées en présence de VAFs

Pour étudier la capacité des VAFs à promouvoir les sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α , les M \emptyset E-clone ainsi que les cellules MAMI ont été initialement stimulés par des concentrations croissantes de VAFs pendant 24 h.

Aucune sécrétion d'IL-1 β n'a pu être mise en évidence lorsque les cellules MAMI ont été stimulées dans ces conditions par les VAFs (Fig. 18a-c). Il n'en va pas de même pour le

TNF- α . En effet, une sécrétion de TNF- α est significativement induite par le VAFM et le VAFQ, respectivement aux concentrations de 50 et 150 $\mu\text{g/ml}$. Utilisé à 500 $\mu\text{g/ml}$, le VAFP induit également une sécrétion de cette cytokine, et ce de façon moins intense que lorsque les deux autres VAFs sont utilisés à cette même concentration (Fig. 18c-e).

L'aptitude de ces cellules à réduire le MTS, qui reflète l'activité métabolique et/ou la viabilité cellulaire, est fortement diminuée lorsqu'elles sont cultivées en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$ de VAFM ou de VAFQ. Toutefois, pour ces deux extraits, ce paramètre n'est pas significativement diminué (par rapport au contrôle) lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations allant jusqu'à 150 $\mu\text{g/ml}$. Quant au VAFP, même lorsqu'il est utilisé à 500 $\mu\text{g/ml}$, il ne diminue pas significativement l'activité métabolique et/ou la viabilité de ces cellules (Fig. 18f-h).

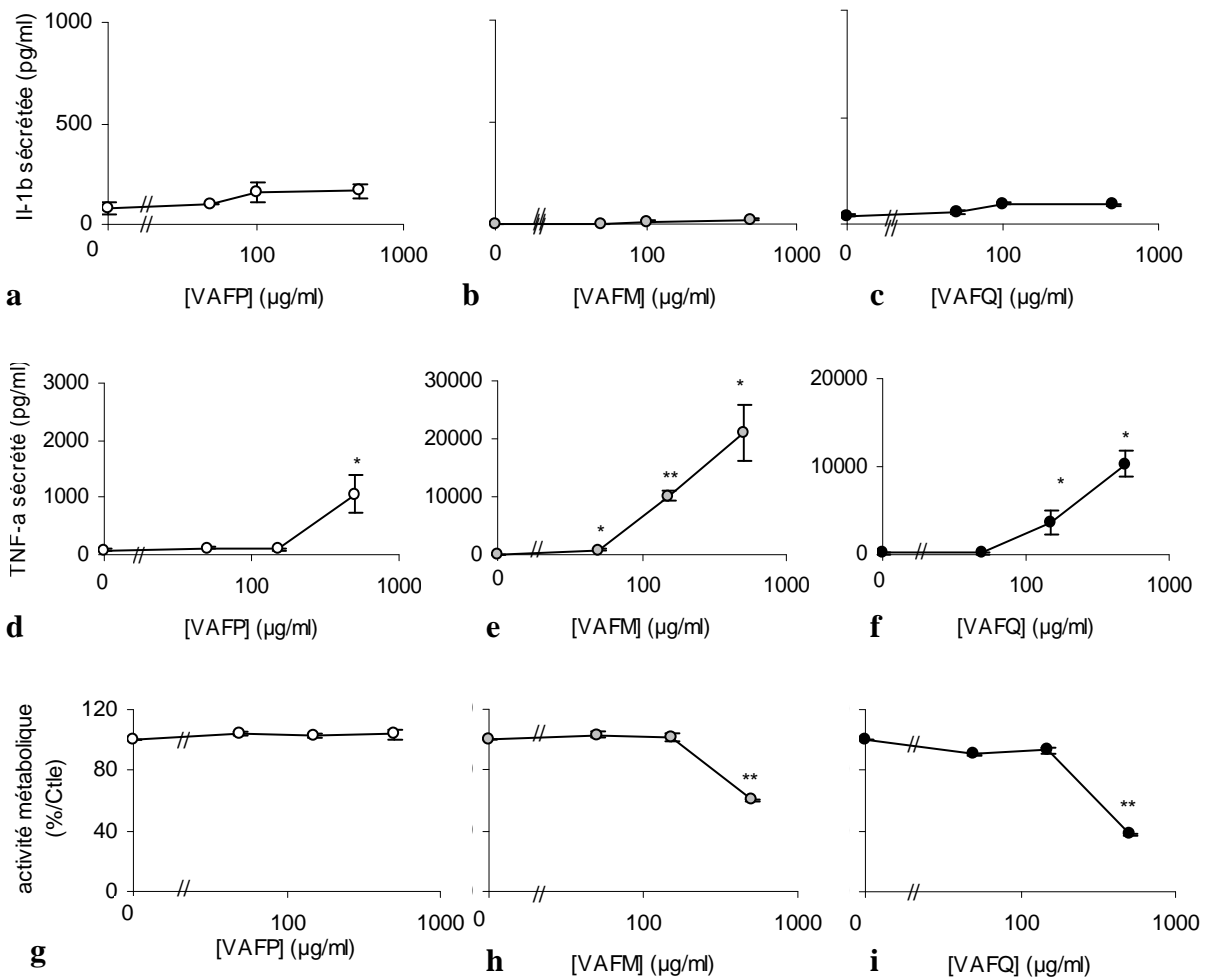


Figure 18. Les cellules MAMI sécrètent du TNF- α mais non de l'IL-1 β après traitement prolongé par les VAFs. Après 4 h de culture dans les puits, les cellules ont été stimulées 24 h par les VAFs aux concentrations de 50, 150 ou 500 $\mu\text{g/ml}$. L'IL-1 β (a-c) et le TNF- α (d-f) ont été dosés dans les surnageants par la méthode ELISA. L'activité métabolique et/ou viabilité a été évaluée par la technique du MTS (g-i). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité métabolique du contrôle. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm \text{SD}$, $n=3$) réalisée une (d-f) ou trois fois.

Ainsi, un traitement de 24 h par les VAFs induit la sécrétion de TNF- α , mais non celle d'IL-1 β chez les cellules MAMI.

Il n'en va pas de même lorsque les M ϕ E-clone sont pareillement incubés en présence de VAFs pendant 24 h.

Effectivement, bien qu'elle reste modérée par rapport à celle induite par l'imiquimod à 100 μ M (Fig. 16a), une libération d'IL-1 β est mise en évidence en présence de 150 et 500 μ g/ml de VAFQ ou 500 μ g/ml de VAFM (Fig. 19b et c). Le VAFP quant à lui n'induit pas de sécrétion de cette cytokine, quelle que soit la concentration utilisée (Fig. 19a).

Pour déterminer la nature de la forme d'IL-1 β sécrétée dans ces conditions, les surnageants de culture ont été analysés par immuno-empreinte (Fig. 19d). Les résultats montrent que l'imiquimod induit la sécrétion d'IL-1 β clivée, qui migre au même niveau que l'IL-1 β recombinante (17 kDa). Les VAFM et VAFQ induisent des sécrétions d'une forme clivée d'IL-1 β , qui cependant ne migre pas au même niveau que la protéine recombinante, indiquant qu'elle serait d'un poids moléculaire inférieur. Ceci suggère que la pro-IL-1 β pourrait être activée selon des mécanismes distincts par l'imiquimod ou les VAFM et VAFQ.

Ainsi, la stimulation des M ϕ E-clone, par ces concentrations de VAFQ ou VAFM, pourrait soutenir à la fois la synthèse de pro-IL-1 β , et l'activation et la sécrétion de l'IL-1 β . A ces concentrations cytotoxiques, de grandes quantités de ligands endogènes, dont l'ATP, sont libérées dans le milieu extracellulaire. De tels ligands peuvent concourir à la synthèse de pro-IL-1 β puis à son clivage et à la sécrétion d'IL-1 β .

Dans les mêmes conditions de stimulation, ces cellules sécrètent du TNF- α , à partir de 150 μ g/ml de VAFM et VAFQ, et 500 μ g/ml de VAFP (Fig. 19e-h). Cette sécrétion est toutefois modeste en regard de celles induites en réponse à l'imiquimod ou au LPS notamment (Fig. 19h).

De même, la sécrétion d'IL-6 est induite par la stimulation par les VAFs. Lorsqu'il est appliqué à des concentrations cytotoxiques, le VAFM induit la plus forte sécrétion de cette cytokine, en quantités comparables à celles induites par le LPS utilisé à 100 ng/ml (Fig. 19i-l). Le traitement par les VAFs, même aux concentrations cytotoxiques, n'induit pas la sécrétion d'IL-10 (Fig. 19m-p).

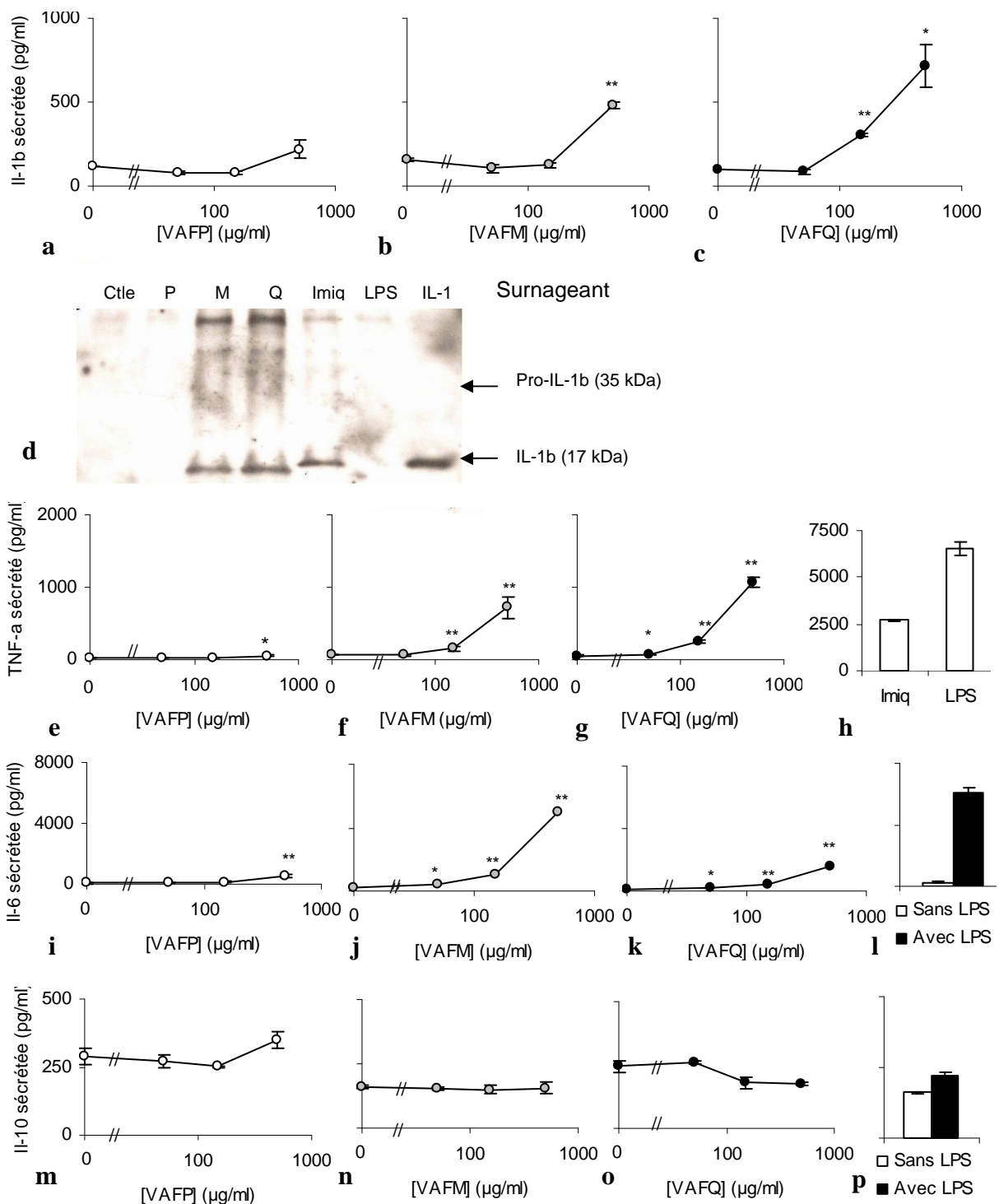


Figure 19. Les MØ E-clone sécrètent de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du TNF- α mais non de l'IL-10 après traitement prolongé par les VAFs. Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes de VAFs (50 à 500 µg/ml) pendant 24 h (a-c, e-g, i-k, et m-o), ou (h) par de l'imiquimod (50 µM, 24 h) ou (h, l et p) du LPS (100 [l et p] ou 1000 [h] ng/ml, 4 dernières heures de stimulation). L'IL-1 β (a-c), le TNF- α (e-h), l'IL-6 (i-l) ou l'IL-10 (m-p) ont été dosés dans les surnageants par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante (m \pm SD, n=3) réalisée deux (i-p) ou trois fois.

Pour l'immuno-empreinte dans des plaques 12 puits sous 1 ml (1×10^6 cellules/puits). Après adhésion des cellules au support et élimination du 700 µl de surnageant, les réactifs (préparés en milieu de culture, supplémenté de 2 % de SVF) ont été ajoutés sous 300 µl (volume réactionnel final de 600 µl). Les cellules ont été traitées, ou non (Ctle), par les VAFs (500 µg/ml, 24 h [P, M et Q]), l'imiquimod (100 µM, 24 h [Imiq]) ou le LPS (1000 ng/ml, 4 dernières heures de l'épreuve). L'IL-1 β recombinante (IL-1) a été ajoutée lors de l'analyse des surnageants de culture. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante réalisée trois fois.

En parallèle, la sensibilité des MØ E-clone aux VAFs a été étudiée. Pour cela, trois méthodes complémentaires d'étude de la viabilité cellulaire ont été employées : la mesure de l'activité métabolique et/ou viabilité cellulaires (réduction du MTS), l'évaluation de l'effet cytotoxique (libération de LDH dans le surnageant) et le dénombrement cellulaire.

Comme indiqué par l'étude de la réduction du MTS, l'activité métabolique et/ou viabilité cellulaire est diminuée dès la concentration 150 µg/ml de VAFM et VAFQ, et 500 µg/ml de VAFP (Fig. 20a-c). A 500 µg/ml, le VAFQ exerce la plus forte inhibition de l'activité métabolique, tandis que celle exercée par le VAFP est la plus réduite. La diminution de l'activité métabolique induite par le VAFM est intermédiaire entre celles induites par le VAFQ et le VAFP.

Une libération de LDH apparaît dès 150 µg/ml de VAFQ ou de VAFM, mais seulement à la plus forte concentration de VAFP testée, à savoir 500 µg/ml (Fig. 20d-f).

D'autre part, alors que le nombre de cellules excluant le bleu Trypan (cellules viables) diminue dès 150 µg/ml de VAFQ ou VAFM, le VAFP n'affecte pas ce paramètre (Fig. 20g-i). L'augmentation de la libération de LDH et les diminutions de l'activité métabolique et du nombre de cellules viables (qui excluent le bleu Trypan) observées aux fortes concentrations de VAFs, suggèrent que les VAFM et VAFQ disposent d'activités cytotoxiques vis-à-vis des MØ E-clone. Pourtant, il est remarquable que le pourcentage de cellules mortes (incorporant le bleu Trypan) n'augmente pas à ces concentrations (Fig. 20j-l). Ceci pourrait provenir du fait que les cellules mortes ont été phagocytées, et ainsi éliminées par leurs voisines saines.

En considérant les résultats de ces trois approches, il apparaît que la viabilité des MØ E-clone n'est pas diminuée par des concentrations de VAFP en deçà de 500 µg/ml, et de 150 µg/ml pour les VAFQ et VAFM.

Par ailleurs, l'activité cytotoxique du VAFQ est la plus intense. Celle du VAFM est également manifeste, mais toutefois moindre que celle du VAFQ. Le VAFP dispose de l'activité cytotoxique la plus réduite.

Parmi les substances contenues dans les VAFs, des propriétés cytotoxiques ont été rapportées pour les MLs et les VTs [11, 61]. Cependant, les activités de ces substances diffèrent. Les MLs induisent une mort de type apoptotique, après 24 h de traitement. L'action des VTs est beaucoup plus rapide et conduit à une mort de type nécrotique.

La diminution du nombre de cellules excluant le bleu Trypan induite par les plus fortes concentrations de VAFM coïncide avec la quantité de LDH libérée dans le milieu dans ces mêmes conditions. Ceci suggère que le VAFM induirait la mort des MØ E-clone par nécrose.

Dans une certaine mesure, un raisonnement similaire pourrait être appliqué pour rendre compte de l'activité cytotoxique du VAFQ, la diminution du nombre de cellules qui excluent le bleu Trypan excédant toutefois la quantité de LDH libérée. Il peut donc être proposé pour ce dernier une combinaison d'activités cytotoxiques, reposant sur la mise en œuvre de mort à la fois après nécrose et apoptose. Seule une modeste diminution du nombre de cellules viables est mise en évidence pour le VAFP, ainsi qu'une faible libération de LDH.

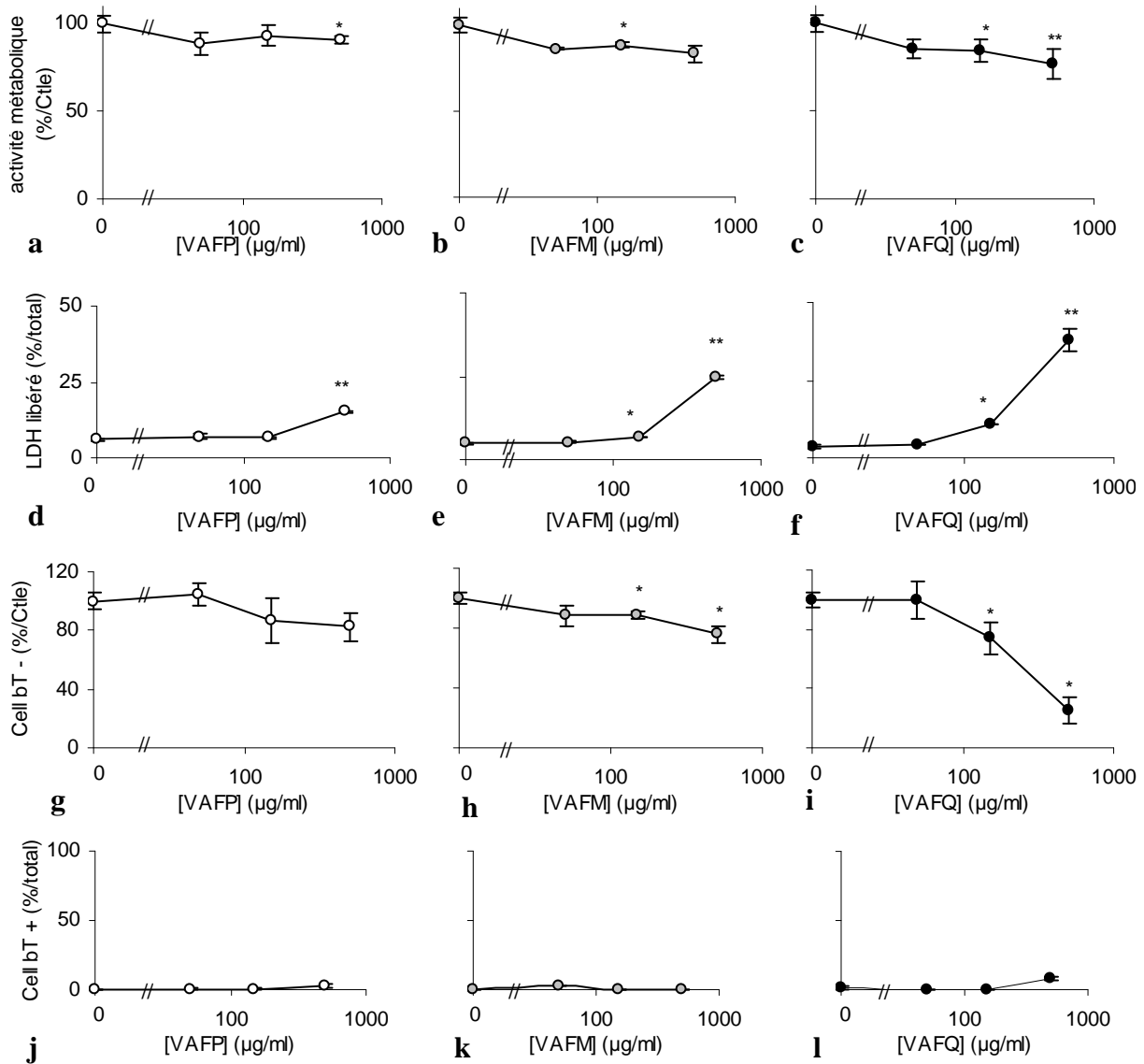


Figure 20. Mise en évidence après traitements prolongés par les VAFs des activités cytotoxiques développées au niveau des MØ E-clone. Les cellules ont été stimulées 24 h par les VAFs aux concentrations de 50, 150 ou 500 µg/ml. L'activité métabolique et/ou viabilité cellulaire a ensuite été évaluée par la technique du MTS (a-c). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité métabolique du contrôle. La LDH a été dosée dans les lysats et dans les surnageants (d-f). La LDH libérée est exprimée en pourcentage de la LDH totale, dosée dans les surnageants et les lysats, pour une condition donnée. Les cellules excluant le bleu Trypan (Cell bT -) ont été dénombrées au microscope (g-i), puis exprimées en pourcentage du contrôle. Les cellules incorporant le bleu Trypan (Cell bT +) ont été dénombrées pareillement, et exprimées en pourcentage du nombre total de cellules (j-l). Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

La faible libération de LDH observée aux faibles concentrations de VAFs suggère que la mort des cellules ne serait pas associée à une atteinte de l'intégrité de la membrane cellulaire. Aux plus fortes concentrations, l'augmentation de la libération de LDH témoigne d'une lyse des cellules avec libération de leur contenu dans le milieu. C'est dans ces conditions-ci que des libérations d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α induites par les VAFs ont été observées.

2.2. Des traitements prolongés par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFs ne conduisent pas à la sécrétion d'IL-1 β

Alors que la sécrétion de TNF- α est assurée par les MØ E-clone et les cellules MAMI, l'induction de la sécrétion d'IL-1 β par les VAFs n'apparaît, pour les MØ E-clone mais non les cellules MAMI, que pour des concentrations induisant une diminution de la viabilité de ces cellules, et en particulier affectant leur intégrité membranaire (comme en témoigne la libération de LDH). La lyse cellulaire ayant lieu dans ces conditions, permet la libération de ligands endogènes des récepteurs de motif, ligands qui sont normalement retenus au niveau intracellulaire. Parmi ceux-ci, figurent des ligands des TLRs, comme par exemple la protéine HMGB1, qui sont capables d'induire la synthèse de pro-IL-1 β au niveau intracellulaire, après activation du facteur de transcription NF- κ B. D'autres peuvent induire le clivage de la pro-IL-1 β et la sécrétion de l'IL-1 β , après avoir activé l'inflammasome de type NLRP3. Les cristaux d'urates, libérés par les cellules mortes par nécroses, constituent de tels ligands. L'ATP en fait également partie et est largement employé en tant qu'inducteur de l'activation et de la sécrétion de l'IL-1 β dans les études in vitro.

Dans l'éventualité où les VAFs seraient à même d'induire la synthèse de pro-IL-1 β , alors l'ajout d'ATP devrait amplifier la sécrétion d'IL-1 β observée en réponse aux concentrations sub-cytotoxiques de VAFs.

Pour étudier ceci, les cellules ont été stimulées pendant 24 h par les VAFs, puis l'ATP (1 mM) a été ajouté lors des 30 dernières min de l'épreuve (Fig. 21a).

Les expériences réalisées avec les cellules MAMI indiquent que la présence d'ATP ne permet aucune amplification de la sécrétion d'IL-1 β induite par les VAFs (Fig. 21b-d).

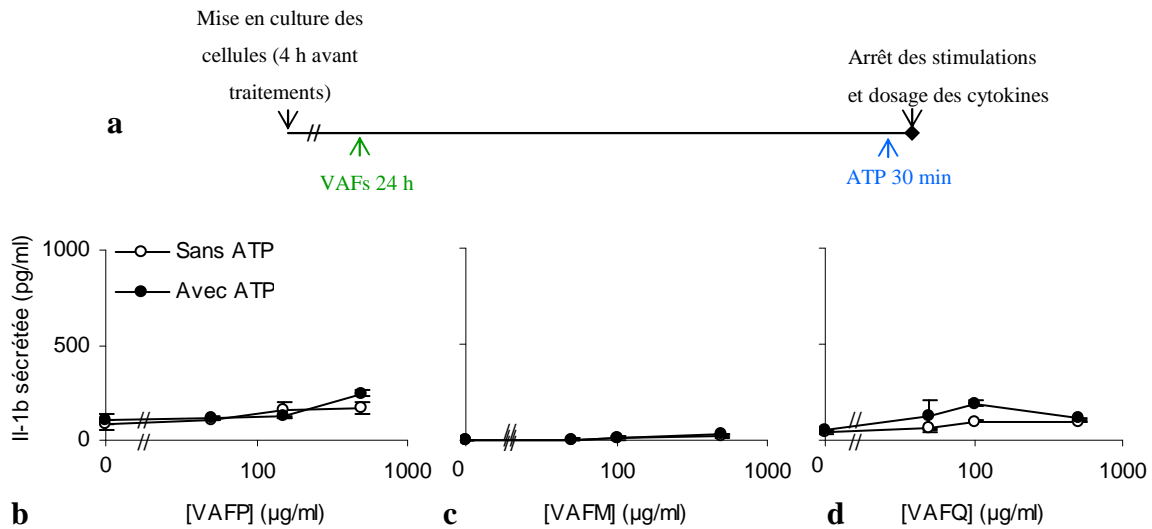


Figure 21. Sécration d'IL-1 β par les cellules MAMI traitées par les VAFs et l'ATP. Les cellules ont été traitées, 4 h après avoir été mises en culture (a) par des concentrations croissantes de VAFs (50, 150 et 500 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24 h, en présence ou en absence d'ATP (30 dernières min, 1 mM). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants par la méthode ELISA (b-d). Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm \text{SD}$, $n=3$) réalisée trois fois.

De même, l'ajout d'ATP aux VAFs ne permet pas d'observer d'amplification de la sécrétion d'IL-1 β induite par les VAFs, chez les M \emptyset E-clone (Fig. 22a-c). Cependant, l'analyse des lysats par immuno-empainte après traitement par le VAFM utilisé aux concentrations de 50 ou 150 $\mu\text{g/ml}$, et dans une moindre mesure de 500 $\mu\text{g/ml}$, révèle une induction de la synthèse de pro-IL-1 β au niveau intracellulaire. Une telle induction, bien que plus modeste, apparait également après un traitement similaire par le VAFQ (Fig. 22d et e).

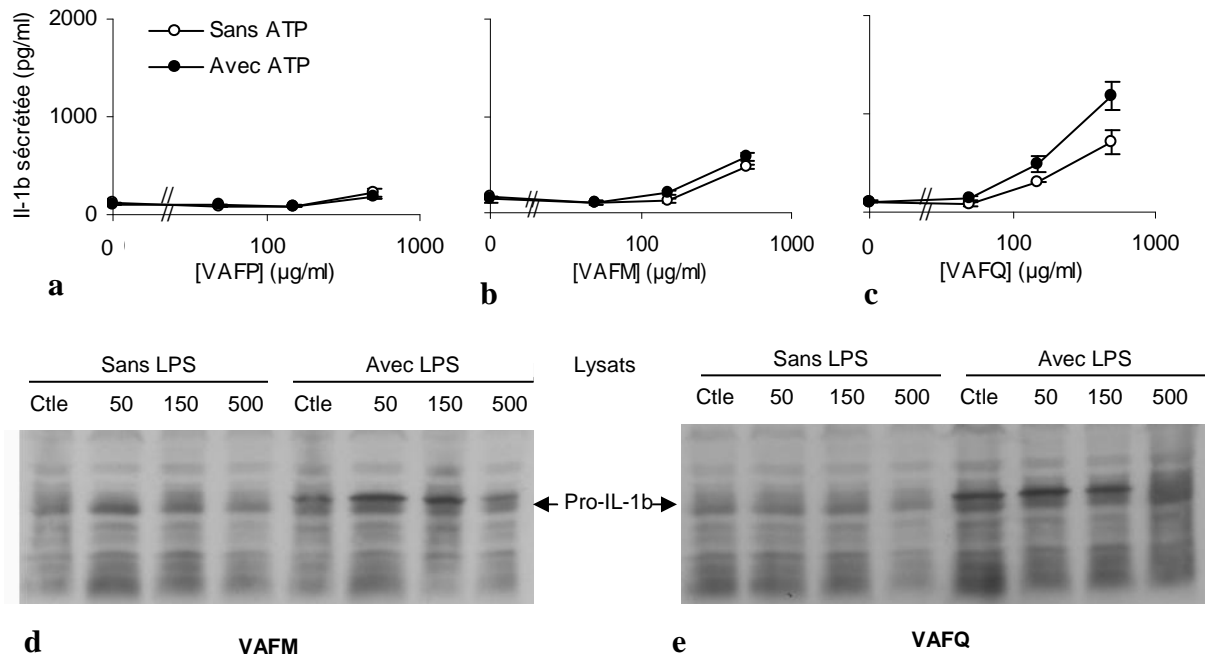


Figure 22. Sécrétion d'IL-1 β par les MØ E-clone traités par les VAFs et l'ATP. Les MØ E-clone ont été traités (a-c) par des concentrations croissantes de VAFs (50, 150 et 500 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24 h, en présence ou en absence d'ATP (30 dernières min, 1 mM). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Pour l'immuno-empreinte (d et e), les cellules ont été distribuées dans des plaques 12 puits sous 1 ml (1×10^6 cellules/puits). Après adhésion des cellules au support et élimination de 700 μl de surnageant, les réactifs (préparés en milieu de culture, supplémenté de 2 % de SVF) ont été ajoutés sous 300 μl (volume réactionnel final de 600 μl). Les cellules ont été traitées par différentes concentrations (50, 150 ou 500 $\mu\text{g/ml}$) de VAFM (d) ou de VAFQ (e) pendant 24 h, avec ou sans LPS. Les lysats cellulaires ont été analysés. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante réalisée trois fois.

Il apparait donc que les extraits ne sont pas aptes à provoquer la sécrétion d'IL-1 β à des concentrations sub-cytotoxiques, et ce aussi bien pour le modèle E-clone que pour le modèle MAMI.

2.3. Les VAFs utilisés à concentrations sub-cytotoxiques ne peuvent induire la sécrétion d'IL-1 β , quelle que soit la durée de stimulation

Les résultats obtenus jusqu'ici indiquent que la sécrétion d'IL-1 β survient après 24 h de traitement par les VAFs, uniquement lorsqu'ils sont appliqués à des concentrations cytotoxiques. Des travaux récents ont toutefois souligné la complexité de la synthèse et la sécrétion de pro-IL-1 β et d'IL-1 β . Celles-ci sont maximales lorsque les cellules sont traitées 8 h avec du LPS, mais décroissent pour des durées supérieures [226]. Cette réalisation a alors rendu nécessaire l'évaluation de l'aptitude des VAFs à induire une sécrétion d'IL-1 β pour des durées de stimulation plus courtes.

Des épreuves de stimulation avec mesure de la libération d'IL-1 β en cinétique ont donc été menées avec les VAFs (150 μ g/ml) ou le LPS, en présence ou en absence d'ATP.

En absence d'ATP, aucune sécrétion d'IL-1 β n'apparaît, quelles que soient les durées d'application des VAFs ou du LPS (Fig. 23a et c-e). Quand l'ATP est ajouté en fin de stimulation, une sécrétion d'IL-1 β apparaît de manière maximale après 12 h d'incubation en présence de LPS. Des durées de stimulation supérieures conduisent à une diminution de cette sécrétion (Fig. 23a). Au niveau intracellulaire, l'accumulation de pro-IL-1 β /IL-1 β est maximale à 12 h, puis décroît, en présence ou en absence d'ATP (Fig. 23b). Ainsi, les quantités de pro-IL-1 β /IL-1 β décroissent lorsque la stimulation par le LPS est maintenue plus de 12 h, suggérant que cette cytokine serait dégradée au niveau intracellulaire. Par ailleurs, quelle que soit la durée d'application, les VAFs n'induisent pas de sécrétion d'IL-1 β (Fig. 23c-e).

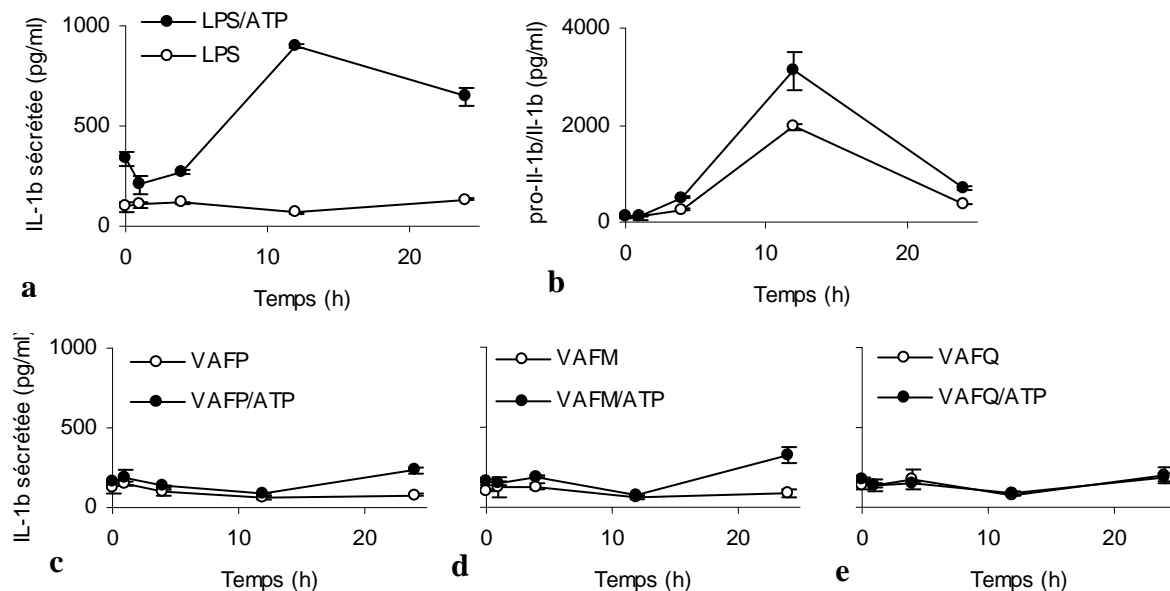


Figure 23. Les VAFs appliqués à concentrations sub-cytotoxiques ne supportent pas la sécrétion d'IL-1 β chez les M ϕ E-clone, quelle que soit la durée de stimulation. Les M ϕ E-clone ont été stimulés pendant différents temps (0, 1, 4, 12 et 24 h) par les VAFs (150 μ g/ml [c-e]), ou le LPS (100 ng/ml [a et b]), puis incubées ou non en présence d'ATP (1 mM, 30 min). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants (a et c-e), ou dans les lysats (b) par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

La stimulation des M ϕ E-clone par le LPS puis l'ATP conduit donc à des synthèses et sécrétion de pro-IL-1 β et d'IL-1 β respectivement, qui sont maximales après 12 h de traitement, puis décroissent. Quant aux VAFs, il apparaît que quel que soit le temps d'incubation, ils ne peuvent supporter la sécrétion d'IL-1 β , en présence ou en absence d'ATP. Ainsi, quelles que soient les conditions de stimulation considérées, les VAFs utilisés à concentrations sub-cytotoxiques ne peuvent induire la sécrétion d'IL-1 β , même après ajout d'ATP.

3. Etude de l'aptitude des VAFs à moduler les sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α

Les résultats obtenus suggèrent que les VAFs employés à concentrations non cytotoxiques, ne sont pas à même d'assurer la sécrétion d'IL-1 β . Nous avons alors envisagé que si les VAFs ne pouvaient pas conduire à une stimulation suffisamment intense pour mener à la synthèse et sécrétion de cette cytokine, ils pourraient en moduler la sécrétion provoquée par des stimuli connus pour l'induire, comme la stimulation par le LPS puis l'ATP, ou encore celle par l'imiquimod. Pour explorer cette éventualité, les M \emptyset E-clone ont été co-stimulés par des concentrations croissantes de VAFs et soit de l'imiquimod, soit du LPS puis de l'ATP. L'imiquimod et le LPS ont été appliqués à des concentrations stimulant la sécrétion d'IL-1 β de manière sub-optimale, de sorte à se placer dans des conditions où une éventuelle modulation de cette sécrétion serait induite par les VAFs.

3.1. Un prétraitement par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFP amplifie la sécrétion d'IL-1 β induite par les stimulations par le LPS puis l'ATP

Les M \emptyset E-clone ont été traités pendant 24 h par des concentrations croissantes de VAFs, puis par du LPS ajouté à concentration sub-optimale (4 dernières heures de traitement), et enfin par de l'ATP (30 dernières min). Une amplification de la sécrétion de cette cytokine induite par le LPS et l'ATP est alors apparue. Parmi les trois types d'extraits étudiés, le VAFP s'avère avoir l'effet le plus intense (Fig. 24a-c). Ainsi, une stimulation de la sécrétion d'IL-1 β est mise en évidence dès la concentration de 5 μ g d'extrait/ml. Cette sécrétion est davantage amplifiée lorsque cet extrait est employé à plus forte concentration, et ce jusqu'à être doublée à la concentration de 150 μ g/ml, déterminée comme sub-cytotoxique (Fig. 24a). En outre, l'augmentation de la libération de cette cytokine dans le milieu extracellulaire s'accompagne d'une diminution des formes (pro-IL-1 β /IL-1 β) mises en évidence au niveau intracellulaire (Fig. 24a). L'analyse par immuno-empreinte confirme que la quantité de pro-IL-1 β présente au niveau intracellulaire est diminuée quand les cellules sont prétraitées par le VAFP (150 μ g/ml), avant stimulations par le LPS puis l'ATP. D'autre part, l'analyse des surnageants montre que seule la forme clivée d'IL-1 β est sécrétée (Fig. 24c). Considérés dans leur ensemble, ces éléments indiquent que la stimulation par le VAFP favorise la sécrétion d'IL-1 β , et suggèrent que le mécanisme impliqué pourrait reposer sur une amplification de la transformation de pro-IL-1 β intracellulaire en IL-1 β , qui serait alors sécrétée.

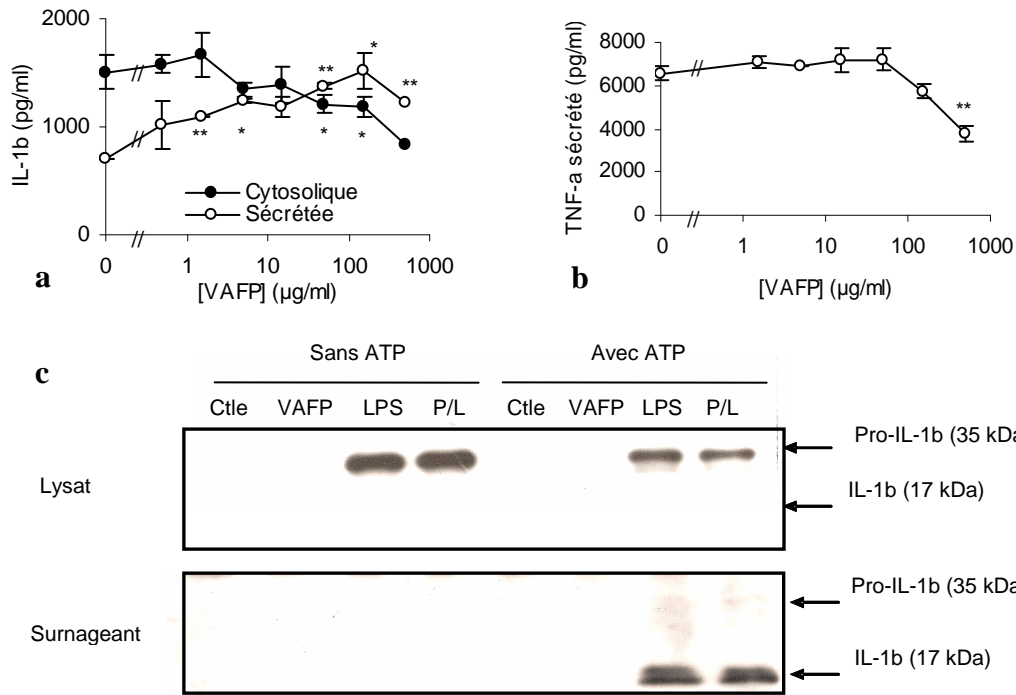


Figure 24. Une pré-stimulation par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFP amplifie la sécrétion d'IL-1 β induite par la stimulation par le LPS et l'ATP. Les M \emptyset E-clone ont été stimulés 24 h par le VAFP (concentrations comprises entre 0,5 à 500 μ g/ml), par du LPS (100 ng/ml, 4 heures finales) et les 30 dernières min par de l'ATP 1 mM (a et b). L'IL-1 β (a) et le TNF- α (b) ont été dosés dans les surnageants par la méthode ELISA, l'IL-1 β a également été dosée dans les lysats (a). Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Pour l'immuno-empreinte (c), les cellules ont été distribuées dans des plaques 12 puits sous 1 ml (1×10^6 cellules/puits). Après adhésion des cellules au support et élimination de 700 μ l de surnageant, les réactifs (préparés en milieu de culture, supplémenté de 2 % de SVF) ont été ajoutés sous 300 μ l (volume réactionnel final de 600 μ l). Les cellules ont été traitées, ou non (Ctl), par le VAFP (150 μ g/ml, 24 h), le LPS (100 ng/ml, 4 dernières heures de l'épreuve), ou l'association du VAFP et du LPS (P/L). Les lysats et les surnageants ont été analysés. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante réalisée trois fois.

Le prétraitement des M \emptyset E-clone par les VAFM induit également une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β induite par les stimulations par le LPS puis l'ATP (Fig. 25a). Toutefois, un tel effet est moins intense que celui du VAFP (augmentation de la sécrétion d'IL-1 β de 50 %), et n'apparaît qu'à la concentration de 150 μ g/ml, précédemment déterminée comme cytotoxique. En outre, la diminution de la forme intracellulaire d'IL-1 β est moins marquée que dans le cas du VAFP. Enfin, le VAFQ ne montre pas d'amplification de la sécrétion d'IL-1 β induite par les stimulations par le LPS puis l'ATP (Fig. 25c). A 500 μ g/ml, la sécrétion d'IL-1 β est même diminuée, vraisemblablement de manière consécutive à l'activité cytotoxique de cet extrait employé à cette concentration.

Par ailleurs, dans ces mêmes conditions, si les sécrétions de TNF- α induites par le LPS restent inchangées par une pré-stimulation par de faibles concentrations de VAFs, elles diminuent significativement lorsque les VAFs sont employés à 150 μ g/ml ou davantage (Fig. 24b et 25b et d).

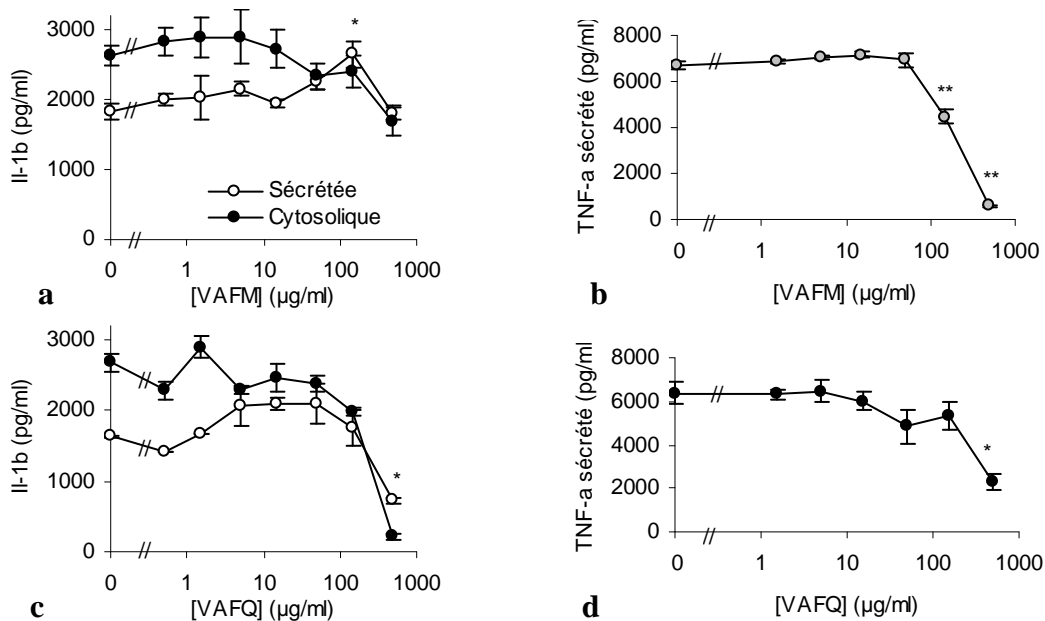


Figure 25. Modulation, par les VAFM et VAFQ, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP. Les M \emptyset E-clone ont été stimulés 24 h par le VAFM (a et b) ou (c et d) le VAFQ (concentrations comprises entre 0,5 à 500 μ g/ml), par du LPS (100 ng/ml, 4 heures finales) et les 30 dernières min par de l'ATP 1 mM. Le TNF- α (b et d) a été dosé dans les surnageants par la méthode ELISA, l'IL-1 β a été dosée dans les surnageants et les lysats (a et c). Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Ainsi, la sécrétion d'IL-1 β induite par une stimulation par le LPS et une brève stimulation par l'ATP est amplifiée par la pré-incubation en présence de VAFP ou de VAFM appliqués à la concentration de 150 μ g/ml. L'effet exercé par le VAFP est plus intense que celui du VAFM. De plus, la concentration à laquelle il apparaît est sub-cytotoxique pour le VAFP, tandis qu'une cytotoxicité est mise en évidence pour le VAFM. La sécrétion de TNF- α induite par le LPS n'est pas amplifiée par les VAFs.

3.1.1. Détermination des conditions optimales de stimulation par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFP et par le LPS et l'ATP

Les résultats précédents indiquent que, parmi les VAFs testés, le VAFP utilisé à une concentration sub-cytotoxique (150 μ g/ml), serait celui qui disposerait de l'activité modulatrice la plus prononcée, se traduisant par une amplification de la sécrétion d'IL-1 β lorsque les M \emptyset E-clone sont stimulés de manière sub-optimale par le LPS puis l'ATP.

L'optimisation des conditions de stimulation va être déterminée pour ce VAFP.

3.1.1.1. Détermination du temps de prétraitement nécessaire pour que le VAFP amplifie la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP

Les M ϕ E-clone ont été mis en culture puis stimulés pendant des temps variables par le VAFP avant de l'être par le LPS (4 h) puis l'ATP (30 dernières min), tel que présenté dans le protocole de stimulation figurant ci-dessous (Fig. 26a). Quelle que soit la durée d'application du VAFP, la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP est amplifiée, et ce même lorsque le VAFP est ajouté en même temps que le LPS (Fig. 26b). La sécrétion de TNF- α demeure inchangée (Fig. 26c).

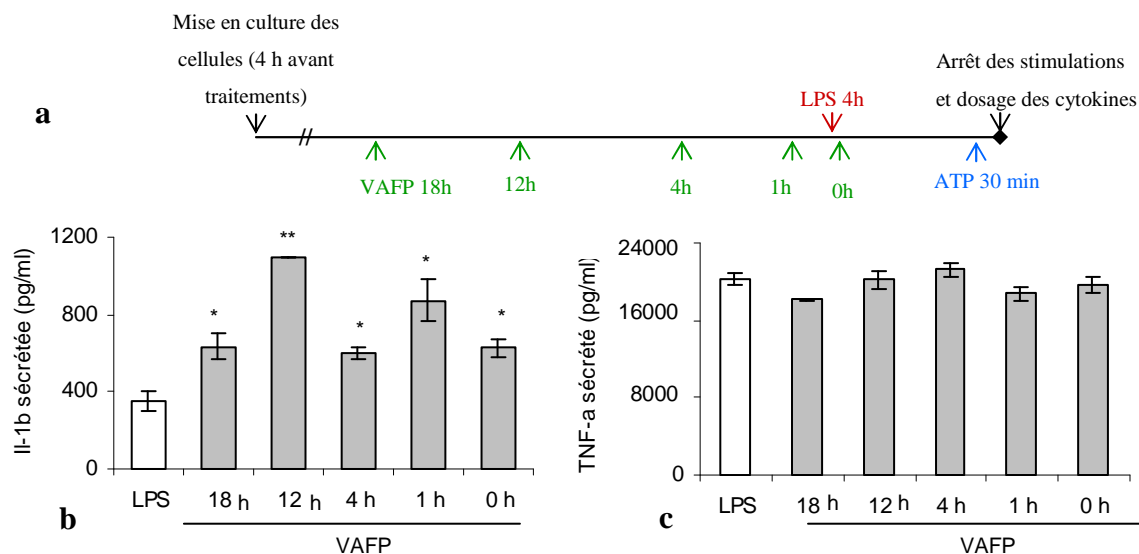


Figure 26. L'effet du VAFP persiste même en absence de phase de prétraitement. Les M ϕ E-clone ont été pré-incubés par le VAFP (150 μ g/ml) pendant des temps variables (0, 1, 4, 12 et 18 h). L'application du VAFP a été réalisée à différents temps après mise en culture, de manière à ce que le LPS puisse être ajouté au même moment pour toutes les conditions (a). Les cellules ont alors été traitées par le LPS (100 ng/ml, les 4 dernières h) et l'ATP (1 mM, 30 min). L'IL-1 β (b) et le TNF- α (c) ont été dosés dans les surnageants par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Il apparaît donc que l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β induite par le VAFP persiste alors que la durée de prétraitement est réduite, et que cette stimulation peut toujours survenir alors qu'elle est réalisée en même temps que celle induite par le LPS. De plus, cet effet affecte spécifiquement la sécrétion d'IL-1 β , la sécrétion de TNF- α n'étant pas modulée par le VAFP.

3.1.1.2. Caractérisation de la sécrétion d'IL-1 β lorsque les stimulations induites par le LPS et les VAFs surviennent de manière simultanée

Comme évoqué plus haut, la durée de stimulation par le LPS revêt une importance particulière dans la synthèse et la sécrétion de la pro-IL-1 β et de l'IL-1 β . Les travaux menés jusque là indiquent d'une part que la sécrétion d'IL-1 β est maximale lorsque le LPS est appliqué

pendant 12 h (Fig. 23a), et d'autre part que l'effet amplificateur de cette sécrétion exercé par le VAFP, se développe lorsque ces substances sont appliquées en même temps (Fig. 26a). Dans ces conditions, nous avons exploré si le VAFP disposait d'une aptitude à moduler (1) la cinétique de sécrétion d'IL-1 β supportée par les stimulations par le LPS puis l'ATP, et (2) la diminution de la sécrétion d'IL-1 β , apparaissant pour des durées de stimulation avec le LPS supérieures à 12 h. Pour cela, les MØ E-clone ont été traités pendant des temps variables par du LPS, associé ou non aux VAFs (Fig. 27a).

La stimulation par le LPS pour des durées variables, en présence ou en absence de VAFP, montre que la sécrétion d'IL-1 β est maximale après 8 h de traitement (Fig. 27b). L'activité stimulatrice est toujours mise en évidence et survient après 8 h de stimulation. La co-stimulation ne modifie pas la cinétique de sécrétion mise en évidence lorsque le LPS est utilisé seul. De plus, lorsqu'elles sont davantage prolongées, les stimulations conduisent à une libération d'IL-1 β réduite, indiquant que le VAFP ne peut moduler le mécanisme aboutissant à la diminution de la sécrétion d'IL-1 β qui survient lorsque la durée de stimulation dépasse 8 h.

Par ailleurs, une forte sécrétion de TNF- α apparaît en réponse au LPS. Bien que l'ajout de VAFP amplifie cette sécrétion, l'effet du VAFP est moins intense que celui s'exerçant sur la sécrétion d'IL-1 β . En outre, la sécrétion de TNF- α atteint un plateau après 12 h de traitement (Fig. 27c).

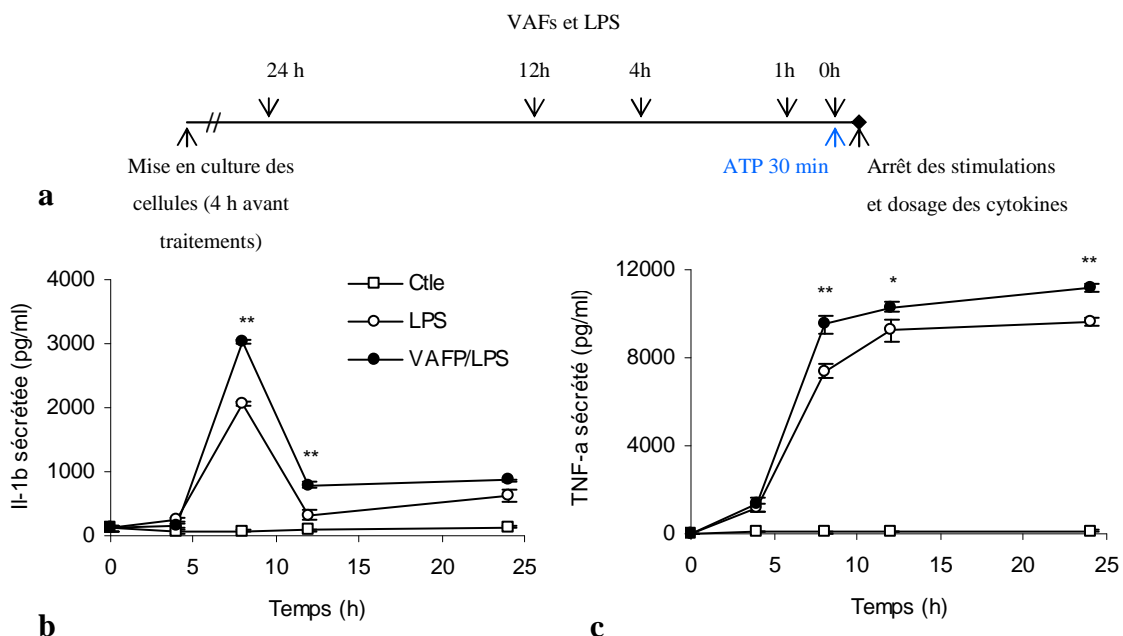


Figure 27. Analyse cinétique des sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α induites en réponse à la stimulation simultanée par le LPS et le VAFP. Les MØ E-clone ont été stimulés (a), 4 h après avoir été mis en culture, pendant différents temps (0, 4, 8, 12 et 24 h) par la combinaison du VAFP (150 μ g/ml) et du LPS (100 ng/ml), puis par l'ATP (1 mM, 30 min). L'IL-1 β (b) et le TNF- α (c) ont été dosés dans les surnageants par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Associé aux VAFM ou VAFQ, le LPS conduit toujours à une sécrétion maximale pour 8 h de stimulation. Aucun effet amplificateur des sécrétions n'est mis en évidence suite aux co-stimulations avec ces VAFs. Toutefois, une amplification de la sécrétion induite par le LPS peut être mise en évidence pour les durées de traitement les plus longues (Fig. 28a et b).

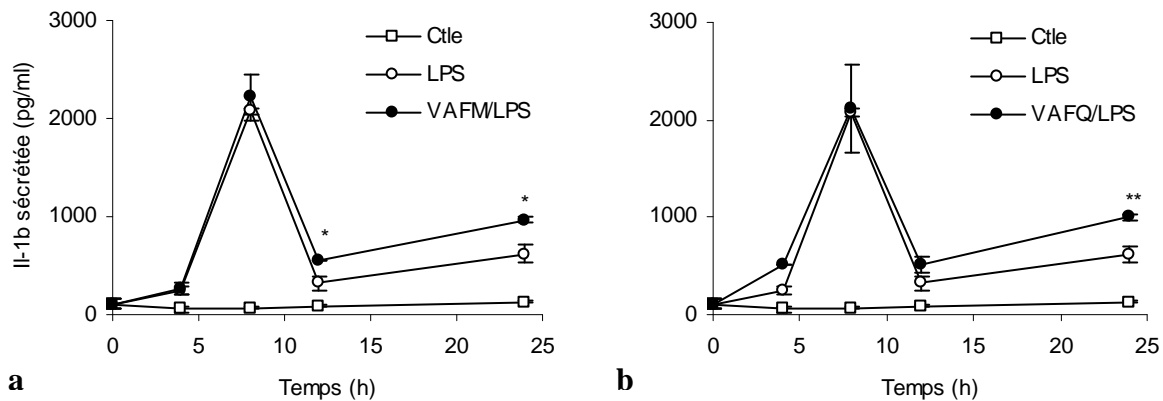


Figure 28. Analyse cinétique de la sécrétion d'IL-1 β induite en réponse à la stimulation simultanée par le VAFM ou le VAFQ et le LPS. Les MØ E-clone ont été stimulés comme précédemment (Fig. 28a) pendant différents temps (0, 4, 8, 12 et 24 h) par la combinaison des VAFM ou VAFQ (50 μ g/ml) et du LPS (100 ng/ml), puis par l'ATP (1 mM, 30 min). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

3.1.1.3. L'effet amplificateur de la sécrétion d'IL-1 β est maintenu lorsque le VAFP est ajouté après stimulation par le LPS

L'effet amplificateur de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP apparaît aussi bien lorsque les cellules sont pré-stimulées par le VAFP puis stimulées par le LPS, que quand ces deux agents sont appliqués simultanément. Cet effet persiste alors que les cellules étaient d'abord stimulées par le LPS, puis par le VAFP. En fixant la durée totale de stimulation par le LPS à 8 h, le VAFP a été rajouté à différents temps après sensibilisation par le LPS, et avant stimulation par l'ATP (30 min). Le protocole de stimulation est schématisé ci-dessous (Fig. 29a). Une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β est mise en évidence même lorsque le VAFP est additionné en même temps que l'ATP (sécrétion qui est doublée par rapport au contrôle) (Fig. 29b).

La sécrétion de TNF- α est également favorisée lorsque le VAFP est ajouté après prétraitement par le LPS, mais de façon très modérée par rapport à celle d'IL-1 β (Fig. 29c).

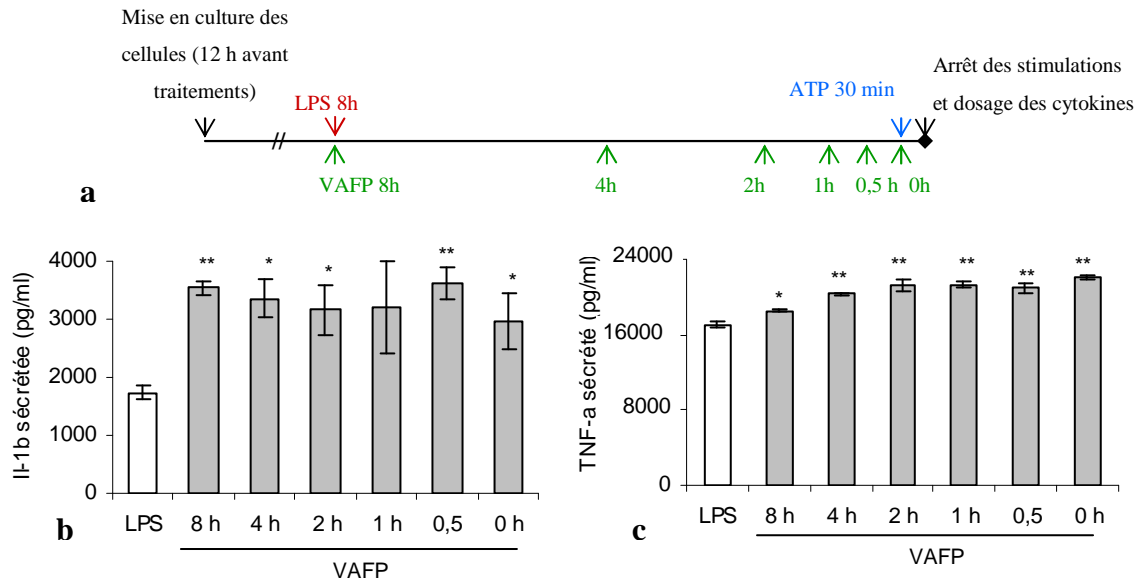


Figure 29. L'effet du VAFP persiste même pour de courtes durées de traitement après pré stimulation par le LPS. Les MØ E-clone ont été stimulés par du LPS, pour une durée de 8 h, après 12 h de culture dans les puits. Le VAFP (150 μ g/ml) a été ajouté en même temps que le LPS ou de manière différée, soit 8, 4, 2, 1, 0,5 ou 0 h avant une brève stimulation (30 min) par 1 mM d'ATP (a). L'IL-1 β (b) et le TNF- α (c) ont été dosés dans les surnageants par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

L'aptitude du VAFP à amplifier la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP a initialement été mise en évidence pour de longues durées de pré-stimulation (24 h) par cet extrait. Les dernières expériences montrent que cet effet se développe également lorsque les temps de pré-incubation sont réduits, voire lorsque le VAFP est ajouté en même temps que le LPS. Enfin, l'effet se développe encore davantage lorsque le VAFP est appliqué au cours des 8 h de traitement par le LPS, même très brièvement avant la stimulation par l'ATP.

3.1.2. La sécrétion d'IL-1 β induite par le prétraitement par le LPS est amplifiée en réponse à une brève stimulation par les trois VAFs

Les dernières expériences indiquent que de courtes durées de stimulation, par le VAFP tout du moins, suffisent à induire une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β secondaire à la stimulation par le LPS. Ce protocole a été adopté pour des expériences de stimulation par des concentrations croissantes de VAFs. La plus faible concentration de VAFP appliquée (0,5 μ g/ml) conduit ici à une très forte amplification de la sécrétion d'IL-1 β (presque doublée par rapport au LPS seul), qui s'accroît davantage encore pour de plus fortes concentrations (Fig. 30a).

Dans ce cas, les VAFM et VAFQ disposent également d'une telle activité, toutefois mise en évidence pour des concentrations plus élevées (5 et 50 μ g/ml respectivement) (Fig. 31b et c).

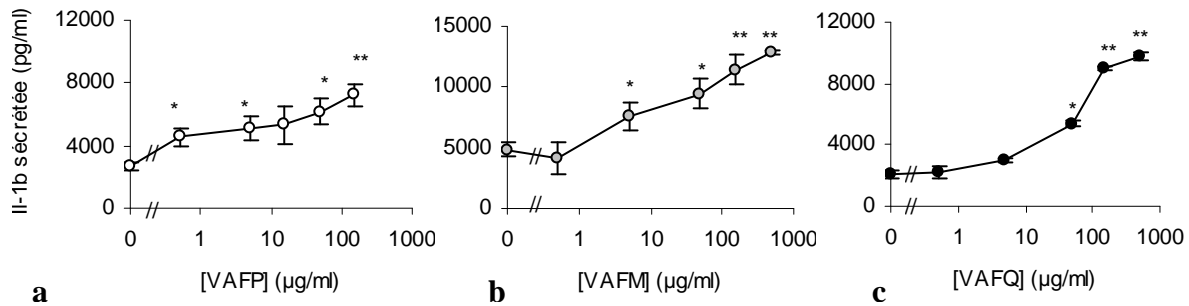


Figure 30. Appliqués après pré-stimulation par le LPS, les trois VAFs amplifient la sécrétion d'IL-1 β après ajout d'ATP. Les M \emptyset E-clone ont été stimulés par du LPS pendant 8 h, après 12 h de culture dans les puits. Les VAFs (concentrations comprises entre 0,5 à 500 μ g/ml) ont été rajoutés la dernière heure, 30 min avant l'ATP (1 mM, 30 dernières min). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants par la méthode ELISA. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Ces expériences montrent que, ajoutés après stimulation par le LPS, et quelques minutes avant une brève stimulation par l'ATP, les trois types de VAFs amplifient intensément la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS. Les trois types de VAFs étudiés diffèrent entre eux notamment au niveau de leur teneur en MLs et en VTs. Les MLs sont présentes en concentrations plus importantes dans les VAFM et VAFQ que dans le VAFP [11, 67]. Bien que la concentration en VTs soit la plus faible au niveau du VAFP, les teneurs des trois VAFs en VTs sont plus proches que leurs teneurs en MLs. Le fait que les trois VAFs développent un effet sur la sécrétion d'IL-1 β ne permet pas d'évoquer d'emblée l'implication des VTs ou des MLs dans cette activité.

3.1.3. Mécanismes impliqués dans l'amplification, par les VAFs, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP

Les mécanismes impliqués dans l'activité des VAFs ont été étudiés avec le VAFP.

3.1.3.1. Implication de la synthèse protéique et de NF- κ B dans la modulation, par le VAFP, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP

Pour rendre compte de l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β apparaissant lorsque les cellules sont préalablement traitées par le LPS (100 ng/ml, 8 h) puis par le VAFP (150 μ g/ml, 30 min avant ajout d'ATP), plusieurs mécanismes peuvent être envisagés de manière non exclusive. La stimulation par le VAFP pourrait favoriser l'activation de la pro-IL-1 β en IL-1 β , et ainsi permettre la sécrétion de cette dernière. Eventuellement, l'activité du VAFP pourrait intervenir au niveau des mécanismes cellulaires contrôlant la libération de l'IL-1 β dans le milieu. Dans ce contexte, une action au niveau du trafic intracellulaire de cette cytokine serait

envisageable. Un autre mécanisme permettant de rendre compte de l'augmentation de la sécrétion de cette cytokine serait l'induction d'une néosynthèse protéique.

Pour explorer cette dernière éventualité, l'effet d'un inhibiteur de la néosynthèse protéique, le cycloheximide (CHX), ainsi que celui d'un inhibiteur spécifique de NF- κ B, le Bay11-7082 (Bay), ont été étudiés. Ces drogues ont été appliquées à des concentrations n'induisant pas d'augmentation de la libération de LDH (Fig. 31f et g), selon le protocole de stimulation décrit ci-dessous (Fig. 31a).

Lorsque le CHX est ajouté 30 min avant le LPS, les sécrétions de TNF- α et d'IL-1 β sont efficacement bloquées (Fig. 31b et c), indiquant qu'à la concentration utilisée (15 μ g/ml), le CHX bloque efficacement la néo-synthèse protéique. Par contre, lorsque l'application du CHX a lieu avant l'ajout, soit du VAFP, soit de l'ATP, l'amplification de la sécrétion d'IL-1 β induite par le VAFP persiste (Fig. 31b). Ceci indique que cet effet est indépendant d'une néosynthèse protéique. La sécrétion de TNF- α n'est pas inhibée par l'ajout de CHX avant ajout de VAFP ou d'ATP (Fig. 31c).

L'ajout du Bay (10 μ M) avant stimulation par le LPS bloque effectivement les sécrétions d'IL-1 β et de TNF- α (Fig. 31d et e), indiquant que l'activation de NF- κ B, facteur contrôlant la production de ces deux cytokines, a bien été inhibée. Lorsque cette drogue est appliquée 30 min avant l'incubation, soit avec le VAFP, soit avec l'ATP, la sécrétion d'IL-1 β est significativement diminuée et l'effet amplificateur du VAFP réduit. Cette drogue n'a par contre pas d'incidence sur la sécrétion de TNF- α lorsqu'elle est ajoutée soit avant le VAFP, soit avant l'ATP (Fig. 31e).

Comme démontré récemment, outre le facteur NF- κ B, le Bay inhibe également l'activité de NLRP3 [249]. Ceci permettrait de rendre compte des résultats obtenus. En effet, le Bay, mais non le CHX, bloque la sécrétion d'IL-1 β induite par les stimulations par le LPS puis l'ATP. Différents inflammasomes soutiennent le clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β . De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de NLRP3 lorsque la stimulation survient après mise en œuvre de LPS puis d'ATP [3]. Le fait que l'activité stimulatrice induite par le VAFP soit également diminuée par le Bay suggère que NLRP3 pourrait être impliqué dans la sécrétion d'IL-1 β induite en réponse à la stimulation par le VAFP associé au LPS et à l'ATP.

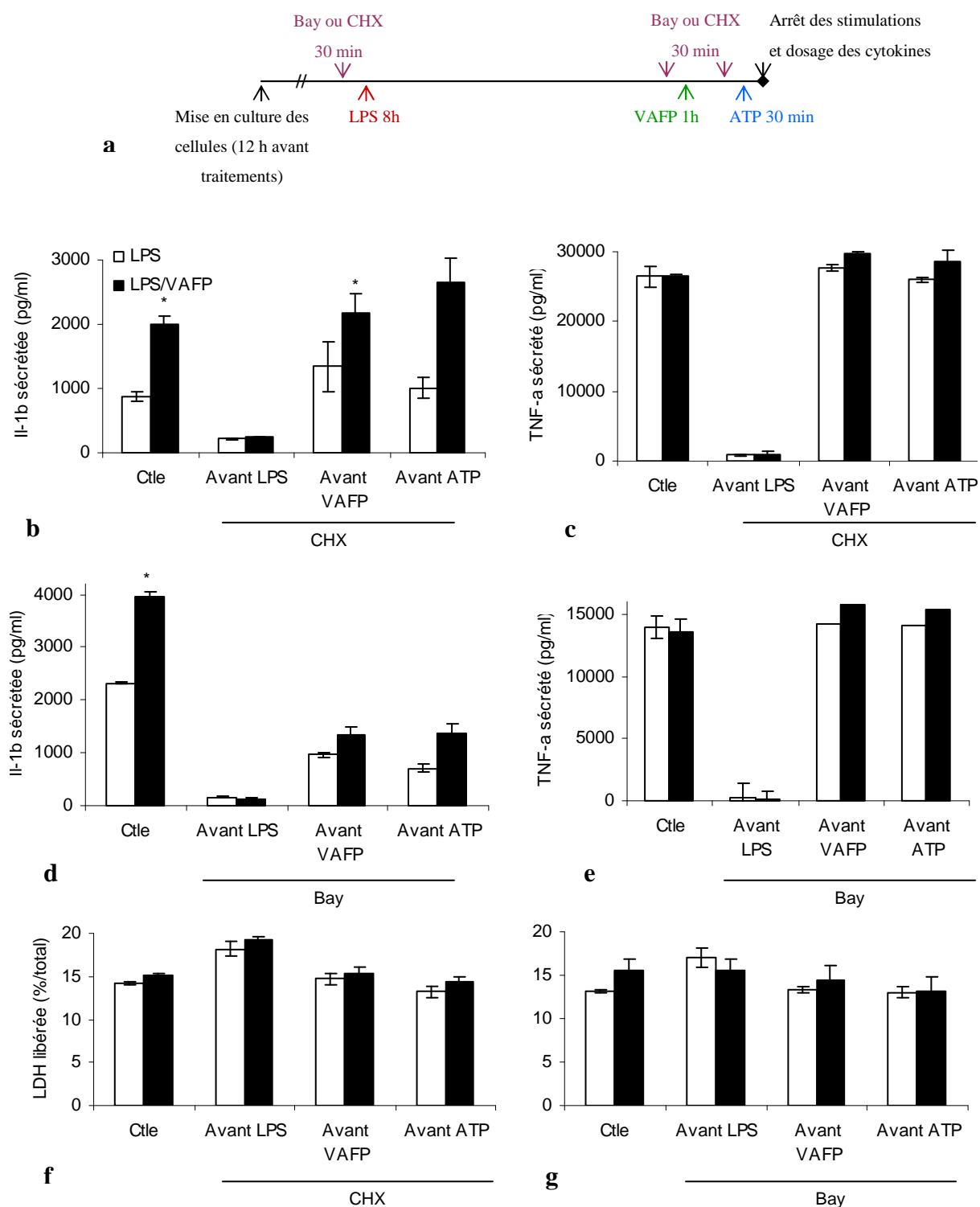


Figure 31. Le Bay11-7082, mais non le cycloheximide, inhibe l'amplification de la sécrétion d'IL-1 β induite par le VAFP. Après 12 h de culture dans les puits, les M ϕ E-clone ont été stimulés 8 h par du LPS (100 ng/ml), puis le VAFP (150 μ g/ml) a été rajouté 1 h avant l'ATP (30 dernières minutes, 1 mM). Le CHX (15 μ g/ml [b, c et f]) ou le Bay (10 μ M [d, e et g]) ont été appliqués 30 min soit avant le LPS, soit avant le VAFP, soit avant l'ATP (a). L'IL-1 β (b et d) et le TNF- α (c et e) ont été dosés dans les surnageants par la méthode ELISA. La LDH a été dosée dans les lysats et dans les surnageants (f et g). La LDH libérée est exprimée en pourcentage de la LDH totale, dosée dans les surnageants et les lysats, pour une condition donnée. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Ces expériences indiquent que l'effet du VAFP ne repose pas sur une synthèse protéique, suggérant qu'il pourrait plutôt mobiliser des stocks préexistants de pro-IL-1 β présents au niveau intracellulaire. D'autre part, l'ajout du Bay s'oppose à la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et le VAFP, suggérant que l'activité de NLRP3 y serait requise.

3.1.3.2. La stimulation par le VAFP induit un mécanisme qui accélère la sécrétion d'IL-1 β

Le fait que l'effet du VAFP ne requiert pas de synthèse de novo de protéine indique que cet effet pourrait recourir à un recrutement de stocks intracellulaires de pro-IL-1 β . L'effet observé pourrait venir de son aptitude à accélérer le clivage et la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP. Ceci pourrait conduire soit à une augmentation de la quantité d'IL-1 β libérée, soit à une accélération transitoire de la sécrétion induite par le LPS. Des épreuves de stimulation par l'ATP avec dosage en cinétique, comme schématisé ci-dessous (Fig. 32a) révèlent que, lorsque les cellules sont stimulées par le VAFP, la sécrétion d'IL-1 β est accélérée pendant les 45 premières minutes. L'effet s'amenuise ensuite et les quantités d'IL-1 β sécrétées, avec ou sans stimulation par le VAFP, ne sont plus significativement différentes lorsqu'elles sont déterminées après 90 min de stimulation (Fig. 32b). De plus, la libération de LDH est comparable lorsque les cellules sont stimulées ou non par le VAFP (Fig. 32c).

Ces résultats montrent que l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β par le VAFP mise en évidence pour des durées de stimulation de 30 min par l'ATP reflète une accélération de cette sécrétion, plutôt qu'une augmentation proprement dite de la quantité d'IL-1 β libérée.

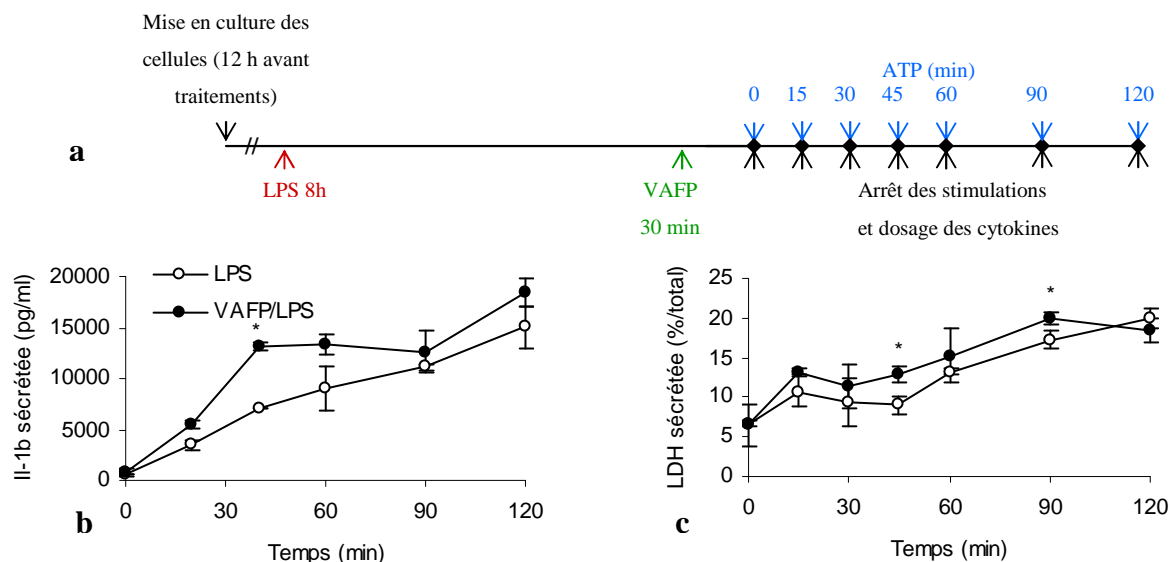


Figure 32. Le VAFP accélère la sécrétion d'IL-1 β induite en réponse à la stimulation par le LPS et l'ATP. Les M ϕ E-clone ont été stimulés par du LPS pendant 8 h. Le VAFP (150 μ g/ml) a été rajouté la dernière heure, 30 min avant l'ATP (1 mM). La stimulation par l'ATP a été menée pendant des temps croissants de 15 à 120 min. Les épreuves ont été arrêtées les unes après les autres, à la fin de l'incubation pendant le temps nécessaire avec l'ATP (a). L'IL-1 β a été dosée dans les surnageants par la méthode ELISA (b). La LDH a été dosée dans les lysats et dans les surnageants (c). La LDH libérée est exprimée en pourcentage de la LDH totale, dosée dans les surnageants et les lysats, pour une condition donnée. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

3.1.3.3. Implication des ROS dans la modulation, par le VAFP, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP

Parmi les modèles envisagés pour expliquer l'activation de la caspase-1 au niveau de l'inflammasome de type NLRP3, figure celui impliquant une contribution des ROS. En effet, les ROS pourraient faire office d'intermédiaire entre NLRP3 et la plupart des stimuli capables de conduire à son activation. Ainsi, l'activité de NLRP3 peut être inhibée par des agents dégradant les ROS [213, 214, 225, 226]. Une étude montre que les ROS réagissent avec la thiorédoxine, et qu'ainsi cette protéine ne peut plus interagir avec la TXNIP. Cette protéine, ainsi libérée, se lie à NLRP3 et provoque son activation [219]. Les complexes enzymatiques Nox constituent les principales sources intracellulaires de ROS. Ils sont tous caractérisés par la présence d'une sous-unité p22^{phox} commune [228]. Chez un modèle déficient en cette sous-unité, l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β sont fortement inhibées [214].

Par ailleurs, les MLs et les VTs, principales substances actives des VAFs, provoquent la production de ROS au niveau intracellulaire [99, 108].

Considérant ces données, la contribution des ROS dans l'effet amplificateur de la sécrétion d'IL-1 β du VAFP a été explorée de manière indirecte par un inhibiteur des ROS, le N acétyl-cystéine (NAC). Cette drogue est couramment employée à la concentration de 20 à

25 mM [214, 226]. A ces concentrations, le NAC présente une forte cytotoxicité sur les MØ E-clone (Fig. 33c).

Appliqué 30 min avant ajout d'ATP (Fig. 33a) à la concentration de 5 mM, le NAC induit une augmentation de l'IL-1 β aussi bien sous sa forme sécrétée qu'intracellulaire. De plus, l'amplification de la sécrétion d'IL-1 β induite par le VAFP disparaît, alors que la quantité d'IL-1 β intracellulaire est plus forte en présence de VAFP qu'en son absence (Fig. 33b et c). La libération de LDH est amplifiée à cette concentration de NAC, toutefois modestement (Fig. 33d).

Ces résultats indiquent que l'inhibition des ROS perturbe considérablement la synthèse et la sécrétion d'IL-1 β . Toutefois, il semble qu'à de faibles concentrations de NAC, l'inhibition des ROS favorise la sécrétion d'IL-1 β . Ainsi, en présence de NAC, les sécrétions induites alors que les cellules ont été ou non traitées par le VAFP ne sont plus significativement différentes entre elles, et sont dans les deux cas significativement augmentées (Fig. 33c).

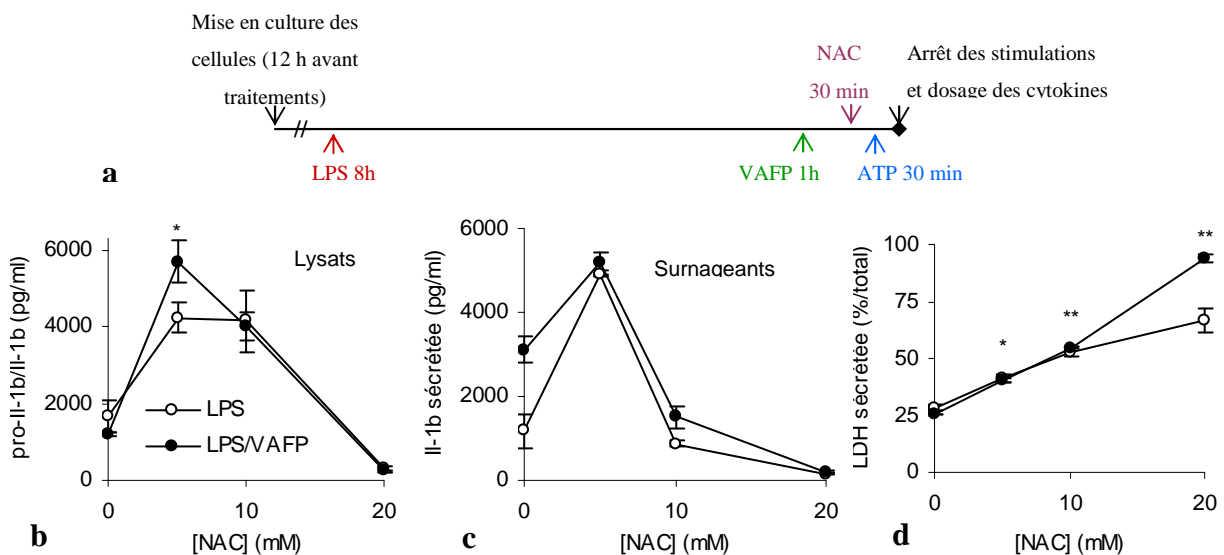


Figure 33. Contribution des ROS dans la modulation, par le VAFP, de la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS et l'ATP. Après 12 h de culture en puits, les MØ E-clone ont été stimulés (a) par du LPS (100 ng/ml, 8 h), du VAFP (150 μ g/ml, 1 h avant l'ATP) et de l'ATP (1 mM, 30 dernières min). Le NAC a été appliqué à des concentrations croissantes (5 à 20 mM) 30 min avant l'ajout de l'ATP. L'IL-1 β a été dosée dans les lysats (b) et dans les surnageants (c) par la méthode ELISA. La LDH a été dosée dans les lysats et dans les surnageants (d). La LDH libérée est exprimée en pourcentage de la LDH totale, dosée dans les surnageants et les lysats, pour une condition donnée. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée une fois.

Ces résultats indiquent une contribution des ROS dans le mécanisme aboutissant aux synthèses et sécrétion d'IL-1 β . Cette contribution, en partie tout du moins, permettrait de rendre compte de l'activité stimulatrice du VAFP au niveau de la sécrétion d'IL-1 β .

3.2. Les VAFs modulent la sécrétion d'IL-1 β induite par l'imiquimod

L'imiquimod a été retenu pour explorer l'aptitude des M ϕ E-clone à moduler la sécrétion d'IL-1 β induite par une stimulation unique. Pour ce faire, les M ϕ E-clone ont été stimulés par des concentrations croissantes de VAFs, associées ou non à l'imiquimod appliqué à concentration sub-optimale (10 μ M), pendant 24 h. Une forte stimulation de la sécrétion d'IL-1 β induite par l'imiquimod apparaît lorsque les VAFs sont appliqués à concentrations cytotoxiques (Fig. 34a-c). La co-stimulation par les VAFs et l'imiquimod n'augmente pas la libération de LDH en comparaison à la stimulation par les VAFs seuls (Fig. 34i-k). De plus, lorsque les M ϕ E-clone sont stimulés par les VAFs utilisés à concentrations sub-cytotoxiques (150 μ g/ml de VAFP, ou 50 μ g/ml de VAFQ ou VAFM), la sécrétion d'IL-1 β induite par l'imiquimod, également appliqué à concentration sub-cytotoxique (30 μ M), est augmentée par le VAFP (Fig. 34d).

La sécrétion de TNF- α induite par l'imiquimod est favorisée par les fortes concentrations de VAFM (à partir de 150 μ g/ml). Cette sécrétion est également amplifiée en présence de 50 μ g/ml de VAFQ, mais elle est diminuée aux plus fortes concentrations de VAFQ. Le VAFP n'affecte pas la sécrétion de TNF- α induite par l'imiquimod (Fig. 34f-h).

L'IL-1 β induit l'expression de la iNOS. La sécrétion d'IL-1 β étant augmentée dans ces conditions de stimulation, l'augmentation de l'expression d'iNOS devrait conduire à l'amplification de la sécrétion de dérivés nitrés. La mesure de ces dérivés montre qu'il n'y a pas de différences lorsque les cellules sont traitées ou non par le VAFP (Fig. 34e). Ceci suggère que l'IL-1 β libérée dans ces conditions pourrait ne pas être biologiquement active, et devrait donc être étudiée.

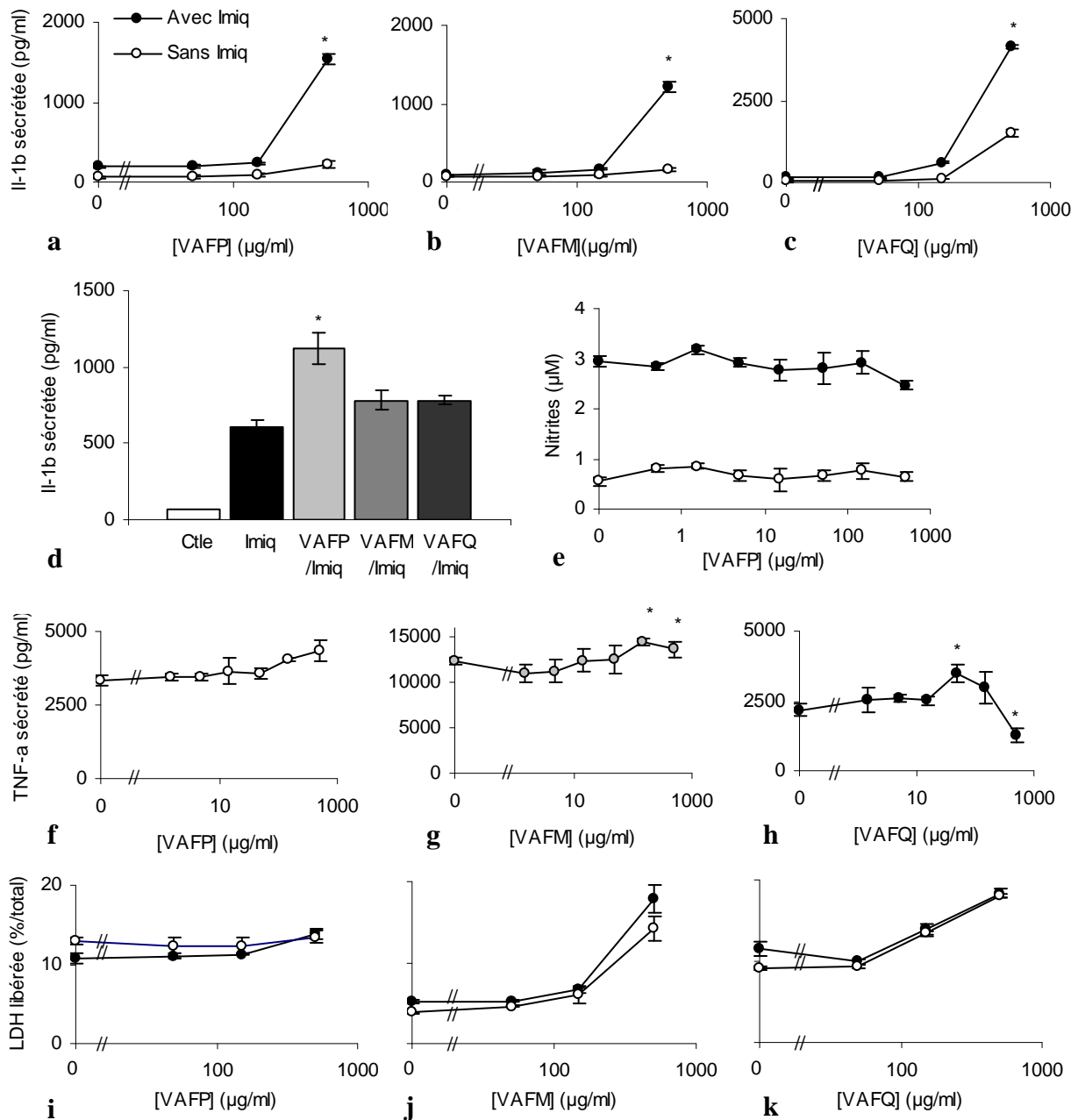


Figure 34. La co-stimulation par les VAFs amplifie la sécrétion d'IL-1 β induite par l'imiquimod. Après 4 h de culture en puits, les MØ E-clone ont été traités par des concentrations croissantes de VAFs (50, 150 et 500 μ g/ml, 24 h), et de l'imiquimod (10 μ M, 24 h). Par ailleurs, les MØ E-clone ont été traités par de l'imiquimod (30 μ M [Imiq]) et le VAFP (150 μ g/ml), le VAFM ou le VAFQ (50 μ g/ml) pendant 24 h (d). L'IL-1 β (a-d) et le TNF- α (f-h) ont été dosés dans les surnageants par la méthode ELISA. Les dérivés nitrés ont été dosés par la méthode de Griess (e). La LDH a été dosée dans les lysats et dans les surnageants (i-k). La LDH libérée est exprimée en pourcentage de la LDH totale, dosée dans les surnageants et les lysats, pour une condition donnée. Les résultats sont représentatifs d'une expérience indépendante ($m \pm SD$, $n=3$) réalisée trois fois.

Considérés dans leur ensemble, les travaux réalisés mettent en évidence la capacité des VAFs à moduler la sécrétion d'IL-1 β provoquée par les stimulations par l'imiquimod ou le LPS et l'ATP. Ces expériences montrent également que les VAFs employés à concentrations sub-cytotoxiques ne sont pas capables de soutenir la sécrétion d'IL-1 β . D'un autre côté, les premières expériences indiquent qu'aux concentrations cytotoxiques, les VAFM et VAFQ, mais non le VAFP, sont capables de promouvoir la sécrétion d'IL-1 β .

DISCUSSION

La mise en place d'une réaction inflammatoire constitue la première ligne de défense de l'organisme. De plus, elle permet la mise en place des conditions nécessaires au développement d'une réaction immunitaire spécifique, notamment anti-tumorale. Dans ce contexte, la mise en œuvre de propriétés cytotoxiques est particulièrement importante dans le développement d'une réaction immunitaire anti-tumorale spécifique efficace. Les extraits de Gui disposent de propriétés anti-tumorales qui reposent principalement sur des activités immuno-modulatrices et cytotoxiques.

Sécrétion de cytokines en réponse à des traitements prolongés en présence de VAFs

Pour les deux modèles de MØ murins étudiés, les synthèses et sécrétions de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α , sont induites en réponse à des incubations prolongées en présence de VAFs. Une telle activité est mise en évidence principalement avec des concentrations cytotoxiques de VAFs, et dans une moindre mesure avec des concentrations sub-cytotoxiques. Des études antérieures ont également permis d'observer une sécrétion maximale de cytokines, principalement le TNF- α et l'IL-1 β , en réponse à des concentrations cytotoxiques d'extraits de Gui [10]. Toutefois de nombreuses études ont mis en évidence une sécrétion de TNF- α [10, 18, 154] ou d'IL-1 β [10, 17, 18] en réponse à des concentrations sub-cytotoxiques d'extraits.

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'activité cytotoxique des VAFs suggèrent que la mort cellulaire induite par les VAFs implique la mise en œuvre à la fois de l'apoptose et de la nécrose. De nombreuses études ont rapporté l'aptitude des extraits de Gui, ainsi que celle des MLs à induire l'apoptose [71, 91, 97, 99, 102, 114, 116]. Les VTs induisent une mort de type nécrotique [99, 108]. La mort cellulaire survenant dans ces conditions s'accompagne de la libération dans le milieu de nombreux constituants intracellulaires, dont certains constituent des ligands endogènes de récepteurs de motifs. L'induction de la sécrétion de cytokines, mise en évidence dans ces conditions, pourrait ainsi provenir de la libération de tels ligands, qui après avoir interagit avec leur récepteur, conduiraient à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, et donc à la sécrétion de ces cytokines.

Par ailleurs, les VAFs ou certains de leurs constituants, pourraient disposer d'une activité stimulatrice intrinsèque. Cette activité reposerait sur la stimulation d'un système de reconnaissance, dont la transduction cellulaire permettrait l'activation du facteur de transcription NF- κ B.

La sécrétion d'IL-1 β est induite après traitement prolongé par des concentrations cytotoxiques de VAFs, et en particulier de VAFM ou VAFQ, uniquement au niveau des M \emptyset E-clone. L'analyse des surnageants de culture par immuno-empreinte montre qu'un tel traitement induit la libération d'IL-1 β clivée. Toutefois, cette IL-1 β ne migre pas au même niveau que celle libérée en réponse à la stimulation par l'imiquimod, qui migre au même niveau que l'IL-1 β recombinante (17 kDa). Ceci suggère que le traitement par des concentrations cytotoxiques de VAFM ou de VAFQ pourrait permettre le clivage de la pro-IL-1 β par un mécanisme distinct de celui déclenché suite à la stimulation par l'imiquimod. La lyse cellulaire survenant lors du traitement des M \emptyset E-clone par de telles concentrations de VAFs pourrait permettre la libération dans le milieu de pro-IL-1 β , qui serait alors accessible à diverses enzymes. Ainsi, des travaux ont montré que la pro-IL-1 β peut être clivée par des protéases extracellulaires, telles que des métalloprotéases [3].

Une telle sécrétion n'est pas observée au niveau des cellules MAMI, qui par ailleurs ne sécrètent pas d'IL-1 β en réponse à une stimulation par l'imiquimod. La reconnaissance de cette substance repose sur l'expression du TLR7, dont l'absence a été montrée au niveau des cellules MAMI. Ces données indiquent qu'une stimulation sollicitant ce récepteur serait nécessaire à la synthèse et/ou la sécrétion de la pro-IL-1 β ou de l'IL-1 β respectivement. Il est vraisemblable qu'en absence de TLR7, l'incapacité des M \emptyset à sécréter l'IL-1 β reposerait davantage sur un défaut au niveau du processus d'activation de la pro-IL-1 β , que dans celui aboutissant à sa synthèse. En effet, après traitement par les VAFs, les cellules MAMI peuvent soutenir les sécrétions de diverses cytokines pro-inflammatoires, dont la synthèse repose, tout comme celle de la pro-IL-1 β , sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Le fait que la synthèse de pro-IL-1 β soit induite par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFM ou VAFQ (mise en évidence par immuno-empreinte) constituerait un argument en faveur de cette éventualité.

Toutefois, alors que la synthèse de pro-IL-1 β serait induite dans de telles conditions, une stimulation par l'ATP ne permet pas d'induire une sécrétion effective d'IL-1 β . La stimulation par l'ATP active l'inflammasome de type NLRP3. Cependant, pour qu'une sécrétion d'IL-1 β survienne en réponse à la stimulation par l'ATP, les cellules doivent être préalablement activées de manière appropriée afin que les synthèses de pro-IL-1 β , mais aussi de NLRP3 soient induites [5]. Après traitement par les VAFs, la présence de pro-IL-1 β au niveau intracellulaire, ainsi que l'absence de sécrétion d'IL-1 β après stimulation par l'ATP, suggèrent qu'un élément essentiel à la constitution du complexe permettant le clivage puis la sécrétion de l'IL-1 β ne serait pas induit. Le fait que la forme d'IL-1 β sécrétée après

stimulation des MØ diffère au niveau de son poids moléculaire de celle générée après mise en œuvre de l'un ou l'autre des inflammasomes (NLRP3 en particulier) serait un élément en faveur d'une telle éventualité.

Sécrétion de cytokines en réponse à des traitements brefs en présence de VAFs

Une brève application de VAFs induit une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β lorsque les MØ sont stimulés de manière appropriée pour réaliser une telle sécrétion, à savoir après stimulations par le LPS puis l'ATP. Cette activité stimulatrice a été mise en évidence après un bref traitement par des concentrations sub-cytotoxiques des trois VAFs testés. Une étude plus détaillée avec des concentrations sub-cytotoxiques de VAFP montre que cette activité repose sur l'accélération de la sécrétion d'IL-1 β induite par les stimulations par le LPS puis l'ATP.

De plus, l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 β apparaît lorsque différentes conditions de stimulation par des concentrations sub-cytotoxiques de VAFP sont appliquées. Ainsi, lorsque le VAFP est ajouté simultanément au LPS, son activité persiste. L'incubation en présence de VAFP pendant 24 h induit également une augmentation de cette sécrétion, toutefois de manière plus modérée. Parmi les trois types de VAFs étudiés, seul le VAFP dispose d'une telle activité. L'étude des activités cytotoxiques de ces VAFs montre par ailleurs que le VAFP est doté de l'activité cytotoxique la plus faible, indiquant que cette augmentation est indépendante d'un phénomène de lyse cellulaire.

La mise en évidence d'une activité stimulatrice ne reposant pas sur une néosynthèse protéique nous a incités à rechercher la contribution d'un mécanisme mettant en œuvre une interaction de type ligand-récepteur. Parmi les substances contenues dans les VAFs, les MLs ont été impliquées, directement ou par inhibition compétitive, dans l'induction de la sécrétion de cytokines, dont l'IL-1 β , en particulier par les monocytes [10, 12, 13]. Toutefois, d'autres études n'ont pas observé de sécrétion de cette cytokine en réponse aux MLs [101, 241]. Les MLs disposent d'une spécificité de reconnaissance de domaines osidiques. Ainsi, la ML-I reconnaît le D-galactose, la ML-III le N-acétyl-D-galactosamine, et la ML-II peut lier ces deux types de sucres [34]. En présence des sucres compétiteurs, les activités stimulatrices des VAFs n'ont pas été inhibées (données non montrées). Toutefois, ces travaux ne permettent pas d'exclure d'emblée une contribution de l'une ou l'autre des MLs dans cette activité. En effet, des études récentes ont mis en évidence qu'outre des spécificités de reconnaissance pour les sucres, tels que le galactose ou le N-acétyl-D-galactosamine, les MLs peuvent reconnaître

spécifiquement des groupements osidiques complexes, en particulier des motifs sialylés présentés par des gangliosides [40, 250].

Les MLs et les VTs, principales substances actives des VAFs, provoquent la production de ROS au niveau intracellulaire [99, 108]. L'implication des ROS dans l'activation de la caspase-1 par l'inflammasome de type NLRP3 fait l'objet de nombreux travaux. Bien qu'un modèle d'activation de NLRP3 par les ROS ait été proposé [219], la contribution de ces substances reste néanmoins controversée. En particulier, certaines études ont montré que le déficit en une sous-unité essentielle des complexes Nox, principales sources intracellulaires de ROS, inhibe l'activité de cet inflammasome [214], suggérant que les ROS contribueraient à son activation. D'autres études, notamment celles menées avec des cellules mononucléées de patients atteints de granulomatose chronique, présentant un déficit fonctionnel au niveau des Nox, suggèrent que la fonctionnalité de ces complexes ne serait pas requise à l'activation de la caspase-1 au niveau de ces cellules [227, 229, 230]. De plus, à l'état basal, les monocytes de ces patients présentent de plus fortes activation de la caspase-1 et sécrétion d'IL-1 β que ceux des sujets contrôles. Ces résultats suggèrent que les ROS pourraient au contraire inhiber l'activation de la caspase-1, et donc la sécrétion d'IL-1 β [229].

Malgré des résultats contradictoires, ces études s'accordent sur la contribution des ROS dans la modulation (stimulatrice ou inhibitrice) de l'activité de l'inflammasome de type NLRP3.

Dans la mesure où l'implication des ROS dans l'activation de NLRP3 reste partiellement comprise, les résultats présentés dans ce travail doivent être interprétés avec prudence. Malgré ce, ces données préliminaires suggèrent que l'inhibition des ROS induit la rétention au niveau intracellulaire de l'IL-1 β qui devrait être libérée en réponse à la stimulation par le VAFP. De plus, ces travaux pourraient être complétés en utilisant d'autres types d'inhibiteurs de ROS, mais aussi en mesurant directement la production de ROS au niveau intracellulaire, après traitement par les VAFs.

De récents travaux ont montré que l'induction d'une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale est conditionnée par l'aptitude des CD8 à phagocyter les cellules tumorales mortes et à présenter les Ag issus de ces cellules aux LT. Ces études ont montré que l'expression précoce de la calréticuline au niveau des cellules tumorales en voie d'apoptose permet la prise en charge de ces cellules par les CD8 [180]. Des études ultérieures ont montré que la sécrétion

de HMGB1, par les cellules tumorales en voie d'apoptose, favorise la présentation de ces Ag par les CDs, et que cet effet est médié par le TLR4 [152]. Enfin, la sécrétion d'IL-1 β par les CDs, consécutive à l'activation de NLRP3 en réponse à l'ATP libéré par les cellules tumorales en voie d'apoptose, est essentielle pour la mise en place de LT CD8, optimisant leur capacité de production d'IFN- γ [2, 153].

Dans ce contexte, l'aptitude des VAFs à moduler la sécrétion d'IL-1 β induite par le LPS pourrait être étendue à d'autres types de ligands du TLR4, notamment HMGB1. De plus, des travaux ont rapporté l'augmentation de la production d'INF- γ par des LT CD8 stimulés par des CDs préalablement incubées avec les extraits [16]. Par ailleurs, les extraits de Gui ont déjà été combinés avec des traitements de chimiothérapie conventionnels, augmentant leurs propriétés cytotoxiques [115, 130, 251, 252]. Ainsi, administrés conjointement avec ces traitements, les VAFs pourraient augmenter leur immunogénicité et ainsi favoriser le développement d'une réaction immunitaire spécifiquement dirigée contre la tumeur.

Les expériences menées au cours de cette étude révèlent que les VAFs, employés à concentrations sub-cytotoxiques, sont capables de moduler la sécrétion d'IL-1 β induite par des stimuli connus pour la soutenir. Par ailleurs, appliqués à de plus fortes concentrations, les VAFs promeuvent la sécrétion d'IL-1 β . Dans les deux cas, il serait nécessaire de déterminer si l'IL-1 β libérée est biologiquement active. D'autre part, l'étude du modèle MAMI pourrait s'avérer particulièrement informatif quant aux mécanismes moléculaires soutenant l'action de ces extraits.

BIBLIOGRAPHIE

1. Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216 (2002).
2. Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaele, Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J. L., Schlemmer, F., Tasdemir, E., Uhl, M., Genin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., Andre, F., Lidereau, R., McLaughlin, N. M., Haynes, N. M., Smyth, M. J., Kroemer, G. and Zitvogel, L. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* **15**, 1170-8 (2009).
3. Dinarello, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519-50 (2009).
4. Franchi, L., Eigenbrod, T. and Nunez, G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* **183**, 792-6 (2009).
5. Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V. and Latz, E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* **183**, 787-91 (2009).
6. Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P., Akira, S. and Nunez, G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233-6 (2006).
7. Eder, C. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology* **214**, 543-53 (2009).
8. Duong Van Huyen, J. P., Delignat, S., Kazatchkine, M. D. and Kaveri, S. V. Comparative study of the sensitivity of lymphoblastoid and transformed monocytic cell lines to the cytotoxic effects of *Viscum album* extracts of different origin. *Chemotherapy* **49**, 298-302 (2003).
9. Kovacs, E. Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines. Comparison of *Viscum album* QuFrF extract with vincristine in an in vitro model. *ScientificWorldJournal* **10**, 311-20.
10. Elsasser-Beile, U., Voss, M., Schuhle, R. and Wetterauer, U. Biological effects of natural and recombinant mistletoe lectin and an aqueous mistletoe extract on human monocytes and lymphocytes in vitro. *J Clin Lab Anal* **14**, 255-9 (2000).
11. Eggenschwiler, J., von Balthazar, L., Stritt, B., Pruntsch, D., Ramos, M., Urech, K., Rist, L., Simoes-Wust, A. P. and Viviani, A. Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*). *BMC Complement Altern Med* **7**, 14 (2007).

- 12.** Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M. L., Poindron, P. and Anton, R. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett* **109**, 33-8 (1996).
- 13.** Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, H. J. Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res* **50**, 3322-6 (1990).
- 14.** Van Huyen, J. P., Bayry, J., Delignat, S., Gaston, A. T., Michel, O., Bruneval, P., Kazatchkine, M. D., Nicoletti, A. and Kaveri, S. V. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med* **8**, 600-6 (2002).
- 15.** Elluru, S. R., JP, V. A. N. H., Delignat, S., Prost, F., Heudes, D., Kazatchkine, M. D., Friboulet, A. and Kaveri, S. V. Antiangiogenic properties of *viscum album* extracts are associated with endothelial cytotoxicity. *Anticancer Res* **29**, 2945-50 (2009).
- 16.** Elluru, S. R., van Huyen, J. P., Delignat, S., Kazatchkine, M. D., Friboulet, A., Kaveri, S. V. and Bayry, J. Induction of maturation and activation of human dendritic cells: a mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* as complimentary therapy in cancer. *BMC Cancer* **8**, 161 (2008).
- 17.** Huber, R., Classen, K., Werner, M. and Klein, R. In vitro immunoreactivity towards lectin-rich or viscotoxin-rich mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador applied to healthy individuals. *Arzneimittelforschung* **56**, 447-56 (2006).
- 18.** Elsasser-Beile, U., Lusebrink, S., Grussenmeyer, T., Wetterauer, U. and Schultze-Seemann, W. Comparison of the effects of various clinically applied mistletoe preparations on peripheral blood leukocytes. *Arzneimittelforschung* **48**, 1185-9 (1998).
- 19.** Mossalayi, M. D., Alkharrat, A. and Malvy, D. Nitric oxide involvement in the anti-tumor effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador on human macrophages. *Arzneimittelforschung* **56**, 457-60 (2006).
- 20.** Lavastre, V., Cavalli, H., Rathe, C. and Girard, D. Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol* **137**, 272-8 (2004).
- 21.** Stein, G. M. and Berg, P. A. Flow cytometric analyses of the specific activation of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors after in vitro stimulation with a fermented mistletoe extract and mistletoe lectins. *Eur J Cancer* **34**, 1105-10 (1998).
- 22.** Mannel, D. N., Becker, H., Gundt, A., Kist, A. and Franz, H. Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. *Cancer Immunol Immunother* **33**, 177-82 (1991).

- 23.** Heinzerling, L., von Baehr, V., Liebenthal, C., von Baehr, R. and Volk, H. D. Immunologic effector mechanisms of a standardized mistletoe extract on the function of human monocytes and lymphocytes in vitro, ex vivo, and in vivo. *J Clin Immunol* **26**, 347-59 (2006).
- 24.** Zuber, D. Biological flora of Central Europe : *Viscum album* L. *Flora*, 181-203 (2004).
- 25.** Ostermann, T., Raak, C. and Bussing, A. Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review. *BMC Cancer* **9**, 451 (2009).
- 26.** Hartley, M. R. and Lord, J. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim Biophys Acta* **1701**, 1-14 (2004).
- 27.** Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D. and Uhlenbruck, G. The lectin from *Viscum album* L.--isolation, characterization, properties and structure. *Int J Biochem* **11**, 429-35 (1980).
- 28.** Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A. Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *J Biol Chem* **257**, 13263-70 (1982).
- 29.** Eck, J., Langer, M., Mockel, B., Baur, A., Rothe, M., Zinke, H. and Lentzen, H. Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain. *Eur J Biochem* **264**, 775-84 (1999).
- 30.** Eschenburg, S., Krauspenhaar, R., Mikhailov, A., Stoeva, S., Betzel, C. and Voelter, W. Primary structure and molecular modeling of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 367-72 (1998).
- 31.** Krauspenhaar, R., Eschenburg, S., Perbandt, M., Kornilov, V., Konareva, N., Mikailova, I., Stoeva, S., Wacker, R., Maier, T., Singh, T., Mikhailov, A., Voelter, W. and Betzel, C. Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 418-24 (1999).
- 32.** Wacker, R., Stoeva, S., Betzel, C. and Voelter, W. Complete structure determination of N-acetyl-D-galactosamine-binding mistletoe lectin-3 from *Viscum album* L. album. *J Pept Sci* **11**, 289-302 (2005).
- 33.** Wacker, R., Stoeva, S., Pfuller, K., Pfuller, U. and Voelter, W. Complete structure determination of the A chain of mistletoe lectin III from *Viscum album* L. ssp. album. *J Pept Sci* **10**, 138-48 (2004).
- 34.** Franz, H., Ziska, P. and Kindt, A. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem J* **195**, 481-4 (1981).
- 35.** Eck, J., Langer, M., Mockel, B., Witthohn, K., Zinke, H. and Lentzen, H. Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains. *Eur J Biochem* **265**, 788-97 (1999).

- 36.** Tonevitsky, A. G., Agapov, II, Pevzner, I. B., Maluchenko, N. V., Moisenovich, M. M., Palmer, R. A., Yurkova, M., Pfuller, K. and Pfuller, U. A new gene encoding the ribosome-inactivating protein from mistletoe extracts. *Arzneimittelforschung* **54**, 242-9 (2004).
- 37.** Pevzner, I. B., Agapov, II, Pfueller, U., Pfueller, K., Maluchenko, N. V., Moisenovich, M. M., Tonevitsky, A. G. and Kirpichnikov, M. P. Cloning and expression of mistletoe lectin III B-subunit. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 306-15 (2005).
- 38.** Kourmanova, A. G., Soudarkina, O. J., Olsnes, S. and Kozlov, J. V. Cloning and characterization of the genes encoding toxic lectins in mistletoe (*Viscum album* L.). *Eur J Biochem* **271**, 2350-60 (2004).
- 39.** Pevzner, I. B., Agapov, II, Niwa, H., Maluchenko, N. V., Moisenovich, M. M., Pfuller, U. and Tonevitsky, A. G. Differences in amino acid sequences of mistletoe lectin I and III B-subunits determining carbohydrate binding specificity. *Biochim Biophys Acta* **1675**, 155-64 (2004).
- 40.** Muthing, J., Burg, M., Mockel, B., Langer, M., Metelmann-Strupat, W., Werner, A., Neumann, U., Peter-Katalinic, J. and Eck, J. Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally alpha2-6-sialylated neolacto-series gangliosides. *Glycobiology* **12**, 485-97 (2002).
- 41.** Sandvig, K. and Olsnes, S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol* **87**, 828-32 (1980).
- 42.** Rapak, A., Falnes, P. O. and Olsnes, S. Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3783-8 (1997).
- 43.** van Deurs, B., Tonnessen, T. I., Petersen, O. W., Sandvig, K. and Olsnes, S. Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex. *J Cell Biol* **102**, 37-47 (1986).
- 44.** Sandvig, K. and van Deurs, B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* **76**, 949-66 (1996).
- 45.** Melby, E. L., Prydz, K., Olsnes, S. and Sandvig, K. Effect of monensin on ricin and fluid phase transport in polarized MDCK cells. *J Cell Biochem* **47**, 251-60 (1991).
- 46.** Wesche, J., Rapak, A. and Olsnes, S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Biol Chem* **274**, 34443-9 (1999).
- 47.** Wales, R., Chaddock, J. A., Roberts, L. M. and Lord, J. M. Addition of an ER retention signal to the ricin A chain increases the cytotoxicity of the holotoxin. *Exp Cell Res* **203**, 1-4 (1992).
- 48.** Day, P. J., Owens, S. R., Wesche, J., Olsnes, S., Roberts, L. M. and Lord, J. M. An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. *J Biol Chem* **276**, 7202-8 (2001).

49. Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-8 (1999).
50. Tsai, B., Ye, Y. and Rapoport, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 246-55 (2002).
51. Hazes, B. and Read, R. J. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* **36**, 11051-4 (1997).
52. Deeks, E. D., Cook, J. P., Day, P. J., Smith, D. C., Roberts, L. M. and Lord, J. M. The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry* **41**, 3405-13 (2002).
53. Argent, R. H., Parrott, A. M., Day, P. J., Roberts, L. M., Stockley, P. G., Lord, J. M. and Radford, S. E. Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain. *J Biol Chem* **275**, 9263-9 (2000).
54. Sandvig, K. and van Deurs, B. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther* **12**, 865-72 (2005).
55. Moisenovic, M., Tonevitsky, A., Agapov, I., Niwa, H., Schewe, H. and Bereiter-Hahn, J. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells. *Eur J Cell Biol* **81**, 529-38 (2002).
56. Romagnoli, S., Ugolini, R., Fogolari, F., Schaller, G., Urech, K., Giannattasio, M., Ragona, L. and Molinari, H. NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L. *Biochem J* **350 Pt 2**, 569-77 (2000).
57. Coulon, A., Mosbah, A., Lopez, A., Sautereau, A. M., Schaller, G., Urech, K., Rouge, P. and Darbon, H. Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2 and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures. *Biochem J* **374**, 71-8 (2003).
58. Pal, A., Debreczeni, J. E., Sevvana, M., Gruene, T., Kahle, B., Zeeck, A. and Sheldrick, G. M. Structures of viscotoxins A1 and B2 from European mistletoe solved using native data alone. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**, 985-92 (2008).
59. Olson, T. and Samuelsson, G. The amino acid sequence of viscotoxin A2 from the European mistletoe (*Viscum album* L., Loranthaceae). *Acta Chem Scand* **26**, 585-95 (1972).
60. Samuelsson, G. and Jayawardene, A. L. Isolation and characterization of viscotoxin 1-Ps from *Viscum album* L. ssp. *austriacum* (Wiesb.) vollmann, growing on *Pinus silvestris*. *Acta Pharm Suec* **11**, 175-84 (1974).
61. Schaller, G. U., K. and Giannattasio, M. Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the european subspecies of *Viscum album* L. *Phytother Res* **10**, 473-7 (1996).
62. Jager, S., Winkler, K., Pfuller, U. and Scheffler, A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. *Planta Med* **73**, 157-62 (2007).

- 63.** Peumans, W. J., Verhaert, P., Pfuller, U. and Van Damme, E. J. Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). *FEBS Lett* **396**, 261-5 (1996).
- 64.** Klett, C. Y. and Anderer, F. A. Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from viscum album extract. *Arzneimittelforschung* **39**, 1580-5 (1989).
- 65.** Mueller, E. A. and Anderer, F. A. A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon gamma inducer. *Cancer Immunol Immunother* **32**, 221-7 (1990).
- 66.** Jordan, E. and Wagner, H. Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). *Oncology* **43 Suppl 1**, 8-15 (1986).
- 67.** Urech, K., Schaller, G. and Jaggy, C. Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung* **56**, 428-34 (2006).
- 68.** Melzer, J., Iten, F., Hostanska, K. and Saller, R. Efficacy and safety of mistletoe preparations (*Viscum album*) for patients with cancer diseases. A systematic review. *Forsch Komplementmed* **16**, 217-26 (2009).
- 69.** Kienle, G. S., Glockmann, A., Schink, M. and Kiene, H. *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *J Exp Clin Cancer Res* **28**, 79 (2009).
- 70.** Horneber, M. A., Bueschel, G., Huber, R., Linde, K. and Rostock, M. Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003297 (2008).
- 71.** Harmsma, M., Ummelen, M., Dignef, W., Tusenius, K. J. and Ramaekers, F. C. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador on cell cycle and survival of tumor cells. *Arzneimittelforschung* **56**, 474-82 (2006).
- 72.** Kelter, G. and Fiebig, H. H. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 26 human tumor cell lines by mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador in vitro. *Arzneimittelforschung* **56**, 435-40 (2006).
- 73.** Kovacs, E., Link, S. and Toffol-Schmidt, U. Cytostatic and cytotoxic effects of mistletoe (*Viscum album* L.) quercus extract Iscador. *Arzneimittelforschung* **56**, 467-73 (2006).
- 74.** Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. and Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3-11 (2009).
- 75.** Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E. and Swanson, P. E. Cell death. *N Engl J Med* **361**, 1570-83 (2009).

- 76.** Degtarev, A. and Yuan, J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 378-90 (2008).
- 77.** Deretic, V. and Levine, B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* **5**, 527-49 (2009).
- 78.** Schmid, D. and Munz, C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27**, 11-21 (2007).
- 79.** Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* **2**, 330-5 (2001).
- 80.** Zeng, X., Overmeyer, J. H. and Maltese, W. A. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* **119**, 259-70 (2006).
- 81.** Geng, J. and Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* **9**, 859-64 (2008).
- 82.** Hamasaki, M. and Yoshimori, T. Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS Lett* **584**, 1296-301.
- 83.** Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K. and Lippincott-Schwartz, J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656-67.
- 84.** Thorburn, A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* **13**, 1-9 (2008).
- 85.** Hajto, T., Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F. and Nemeth, P. Investigation of the effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador on the proliferation and apoptosis of murine thymocytes. *Arzneimittelforschung* **56**, 441-6 (2006).
- 86.** Eggenschwiler, J., Patrignani, A., Wagner, U., Rehrauer, H., Schlapbach, R., Rist, L., Ramos, M. H. and Viviani, A. Gene expression profiles of different breast cancer cells compared with their responsiveness to fermented mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador from oak (*Quercus*), pine (*Pinus*), white fir (*Abies*) and apple tree (*Malus*) in vitro. *Arzneimittelforschung* **56**, 483-96 (2006).
- 87.** Zuzak, T. J., Rist, L., Eggenschwiler, J., Grotzer, M. A. and Viviani, A. Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to *Viscum album* (Mistletoe) preparations. *Anticancer Res* **26**, 3485-92 (2006).
- 88.** Urech, K., Buessing, A., Thalmann, G., Schaefermeyer, H. and Heusser, P. Antiproliferative effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extract in urinary bladder carcinoma cell lines. *Anticancer Res* **26**, 3049-55 (2006).

- 89.** Thies, A., Nugel, D., Pfuller, U., Moll, I. and Schumacher, U. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology* **207**, 105-16 (2005).
- 90.** Zarkovic, N., Kalisnik, T., Loncaric, I., Borovic, S., Mang, S., Kissel, D., Konitzer, M., Jurin, M. and Grainza, S. Comparison of the effects of *Viscum album* lectin ML-1 and fresh plant extract (Isorel) on the cell growth in vitro and tumorigenicity of melanoma B16F10. *Cancer Biother Radiopharm* **13**, 121-31 (1998).
- 91.** Beuth, J., Ko, H. L., Schneider, H., Tawadros, S., Kasper, H. U., Zimst, H. and Schierholz, J. M. Intratumoral application of standardized mistletoe extracts down regulates tumor weight via decreased cell proliferation, increased apoptosis and necrosis in a murine model. *Anticancer Res* **26**, 4451-6 (2006).
- 92.** Braun, J. M., Ko, H. L., Schierholz, J. M. and Beuth, J. Standardized mistletoe extract augments immune response and down-regulates local and metastatic tumor growth in murine models. *Anticancer Res* **22**, 4187-90 (2002).
- 93.** Braun, J. M., Ko, H. L., Schierholz, J. M., Weir, D., Blackwell, C. C. and Beuth, J. Application of standardized mistletoe extracts augment immune response and down regulates metastatic organ colonization in murine models. *Cancer Lett* **170**, 25-31 (2001).
- 94.** Kuttan, G., Menon, L. G., Antony, S. and Kuttan, R. Anticarcinogenic and antimetastatic activity of Iscador. *Anticancer Drugs* **8 Suppl 1**, S15-6 (1997).
- 95.** Van Huyen, J. P., Delignat, S., Bayry, J., Kazatchkine, M. D., Bruneval, P., Nicoletti, A. and Kaveri, S. V. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Lett* **243**, 32-7 (2006).
- 96.** Elluru, S., Van Huyen, J. P., Delignat, S., Prost, F., Bayry, J., Kazatchkine, M. D. and Kaveri, S. V. Molecular mechanisms underlying the immunomodulatory effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung* **56**, 461-6 (2006).
- 97.** Bussing, A. and Schietzel, M. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res* **19**, 23-8 (1999).
- 98.** Bussing, A., Suzart, K., Bergmann, J., Pfuller, U., Schietzel, M. and Schweizer, K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett* **99**, 59-72 (1996).
- 99.** Bussing, A., Wagner, M., Wagner, B., Stein, G. M., Schietzel, M., Schaller, G. and Pfuller, U. Induction of mitochondrial Apo2.7 molecules and generation of reactive oxygen-intermediates in cultured lymphocytes by the toxic proteins from *Viscum album* L. *Cancer Lett* **139**, 79-88 (1999).
- 100.** Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J. and Saller, R. Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anticancer Drugs* **8 Suppl 1**, S43-6 (1997).

- 101.** Hostanska, K., Hajto, T., Spagnoli, G. C., Fischer, J., Lentzen, H. and Herrmann, R. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Immun* **14**, 295-304 (1995).
- 102.** Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H. and Girard, D. *Viscum album* agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br J Haematol* **130**, 527-35 (2005).
- 103.** Lavastre, V., Chiasson, S., Cavalli, H. and Girard, D. *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leuk Res* **29**, 1443-53 (2005).
- 104.** Lavastre, V., Pelletier, M., Saller, R., Hostanska, K. and Girard, D. Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol* **168**, 1419-27 (2002).
- 105.** Duong Van Huyen, J. P., Sooryanarayana, Delignat, S., Bloch, M. F., Kazatchkine, M. D. and Kaveri, S. V. Variable sensitivity of lymphoblastoid cells to apoptosis induced by *Viscum album* Qu FrF, a therapeutic preparation of mistletoe lectin. *Chemotherapy* **47**, 366-76 (2001).
- 106.** Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K. and Wesselborg, S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* **59**, 2083-90 (1999).
- 107.** Bussing, A., Schaller, G. and Pfuller, U. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. *Anticancer Res* **18**, 4291-6 (1998).
- 108.** Bussing, A., Stein, G. M., Wagner, M., Wagner, B., Schaller, G., Pfuller, U. and Schietzel, M. Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L. *Eur J Biochem* **262**, 79-87 (1999).
- 109.** Gabius, H. J., Darro, F., Remmelink, M., Andre, S., Kopitz, J., Danguy, A., Gabius, S., Salmon, I. and Kiss, R. Evidence for stimulation of tumor proliferation in cell lines and histotypic cultures by clinically relevant low doses of the galactoside-binding mistletoe lectin, a component of proprietary extracts. *Cancer Invest* **19**, 114-26 (2001).
- 110.** Endo, Y., Tsurugi, K. and Franz, H. The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett* **231**, 378-80 (1988).
- 111.** Moazed, D., Robertson, J. M. and Noller, H. F. Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* **334**, 362-4 (1988).

- 112.** Endo, Y. and Wool, I. G. The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem* **257**, 9054-60 (1982).
- 113.** Wool, I. G., Gluck, A. and Endo, Y. Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. *Trends Biochem Sci* **17**, 266-9 (1992).
- 114.** Seifert, G., Jesse, P., Laengler, A., Reindl, T., Luth, M., Lobitz, S., Henze, G., Prokop, A. and Lode, H. N. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Lett* **264**, 218-28 (2008).
- 115.** Hostanska, K., Vuong, V., Rocha, S., Soengas, M. S., Glanzmann, C., Saller, R., Bodis, S. and Pruschy, M. Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. *Br J Cancer* **88**, 1785-92 (2003).
- 116.** Bussing, A., Stein, G. M., Pfuller, U. and Schietzel, M. Induction of Fas ligand (CD95L) by the toxic mistletoe lectins in human lymphocytes. *Anticancer Res* **19**, 1785-90 (1999).
- 117.** Vousden, K. H. and Lane, D. P. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 275-83 (2007).
- 118.** Bussing, A., Multani, A. S., Pathak, S., Pfuller, U. and Schietzel, M. Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine-specific toxic lectin from *Viscum album* L. is associated with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations. *Cancer Lett* **130**, 57-68 (1998).
- 119.** Hostanska, K., Hajto, T., Weber, K., Fischer, J., Lentzen, H., Sutterlin, B. and Saller, R. A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Nat Immun* **15**, 295-311 (1996).
- 120.** Bussing, A., Stein, G. M., Herterich-Akinpelu, I. and Pfuller, U. Apoptosis-associated generation of reactive oxygen intermediates and release of pro-inflammatory cytokines in human lymphocytes and granulocytes by extracts from the seeds of *Acalypha wilkesiana*. *J Ethnopharmacol* **66**, 301-9 (1999).
- 121.** Hughes, P., Dennis, E., Whitecross, M., Llewellyn, D. and Gage, P. The cytotoxic plant protein, beta-purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *J Biol Chem* **275**, 823-7 (2000).
- 122.** Ribereau-Gayon, G., Jung, M. L., Di Scala, D. and Beck, J. P. Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoe preparations on cultured tumor cells. *Oncology* **43 Suppl 1**, 35-41 (1986).
- 123.** Bussing, A., Stein, G. M. and Pfuller, U. Selective killing of CD8+ cells with a 'memory' phenotype (CD62Llo) by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Viscum album* L. *Cell Death Differ* **5**, 231-40 (1998).
- 124.** Bussing, A., Suzart, K. and Schweizer, K. Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. *Anticancer Drugs* **8 Suppl 1**, S9-14 (1997).

- 125.** Ribereau-Gayon, G., Jung, M. L., Frantz, M. and Anton, R. Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album* L. extracts or mistletoe lectins. *Anticancer Drugs* **8 Suppl 1**, S3-8 (1997).
- 126.** Vervecken, W., Kleff, S., Pfuller, U. and Bussing, A. Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 317-26 (2000).
- 127.** Bussing, A., Stein, G. M., Pfuller, U. and Schietzel, M. Differential binding of toxic lectins from *Viscum album* L., ML I and ML III, to human lymphocytes. *Anticancer Res* **19**, 5095-9 (1999).
- 128.** Hostanska, K., Hajto, T., Fischer, J., Mengs, U., Weber, K., Lentzen, H. and Saller, R. Selective modulation of phosphatidylserine exposure on subpopulations of human peripheral blood lymphocytes by a plant lectin, *Viscum album* agglutinin (VAA)-I and its recombinant form (rVAA) in vitro. *Cancer Detect Prev* **23**, 511-23 (1999).
- 129.** Sabova, L., Pilatova, M., Szilagyi, K., Sabo, R. and Mojzis, J. Cytotoxic effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract on Jurkat cells and its interaction with doxorubicin. *Phytother Res* **24**, 365-8.
- 130.** Siegle, I., Fritz, P., McClellan, M., Gutzeit, S. and Murdter, T. E. Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells. *Anticancer Res* **21**, 2687-91 (2001).
- 131.** Janeway, C. *Immunobiology*.
- 132.** Takeuchi, O. and Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-20.
- 133.** Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**, 771-6.
- 134.** Rao, J. S. and Rapoport, S. I. Mood-stabilizers target the brain arachidonic acid cascade. *Curr Mol Pharmacol* **2**, 207-14 (2009).
- 135.** Shortman, K. and Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**, 19-30 (2007).
- 136.** Lubber, C. A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O'Keefe, M. and Mann, M. Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* **32**, 279-89.
- 137.** Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3**, 984-93 (2003).
- 138.** Steinman, R. M. and Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419-26 (2007).

- 139.** Aggarwal, B. B., Vijayalekshmi, R. V. and Sung, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* **15**, 425-30 (2009).
- 140.** Grivennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-99.
- 141.** Biswas, S. K. and Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889-96.
- 142.** Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-44 (2008).
- 143.** Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361-70 (2000).
- 144.** Cooper, C. S. and Foster, C. S. Concepts of epigenetics in prostate cancer development. *Br J Cancer* **100**, 240-5 (2009).
- 145.** Ono, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci* **99**, 1501-6 (2008).
- 146.** Mantovani, A., Savino, B., Locati, M., Zammataro, L., Allavena, P. and Bonecchi, R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 27-39.
- 147.** Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. and Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073-81 (2009).
- 148.** Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431-6 (2006).
- 149.** Yu, H., Kortylewski, M. and Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **7**, 41-51 (2007).
- 150.** Kalluri, R. and Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-8 (2009).
- 151.** Rakoff-Nahoum, S. and Medzhitov, R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* **9**, 57-63 (2009).
- 152.** Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J. P., Delaloge, S., Andre, F., Tursz, T., Kroemer, G. and Zitvogel, L. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* **220**, 47-59 (2007).
- 153.** Aymeric, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Martins, I., Kroemer, G., Smyth, M. J. and Zitvogel, L. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res* **70**, 855-8.

- 154.** Stein, G. M. and Berg, P. A. Modulation of cellular and humoral immune responses during exposure of healthy individuals to an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res* **3**, 307-14 (1998).
- 155.** Klein, R., Classen, K., Berg, P. A., Ludtke, R., Werner, M. and Huber, R. In vivo-induction of antibodies to mistletoe lectin-1 and viscotoxin by exposure to aqueous mistletoe extracts: a randomised double-blinded placebo controlled phase I study in healthy individuals. *Eur J Med Res* **7**, 155-63 (2002).
- 156.** Stein, G. M. and Berg, P. A. Evaluation of the stimulatory activity of a fermented mistletoe lectin-1 free mistletoe extract on T-helper cells and monocytes in healthy individuals in vitro. *Arzneimittelforschung* **46**, 635-9 (1996).
- 157.** Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H. J., Burrichter, H., Oette, K. and Pulverer, G. Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin Investig* **70**, 658-61 (1992).
- 158.** Baxevanis, C. N., Voutsas, I. F., Soler, M. H., Gritzapis, A. D., Tsitsilonis, O. E., Stoeva, S., Voelter, W., Arsenis, P. and Papamichail, M. Mistletoe lectin I-induced effects on human cytotoxic lymphocytes. I. Synergism with IL-2 in the induction of enhanced LAK cytotoxicity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **20**, 355-72 (1998).
- 159.** Hajto, T., Hostanska, K., Weber, K., Zinke, H., Fischer, J., Mengs, U., Lentzen, H. and Saller, R. Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo. *Nat Immun* **16**, 34-46 (1998).
- 160.** Hajto, T., Hostanska, K. and Gabius, H. J. Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res* **49**, 4803-8 (1989).
- 161.** Lee, S. J., Son, Y. O., Kim, H., Kim, J. Y., Park, S. W., Bae, J. H., Kim, H. H., Lee, E. Y., Chung, B. S., Kim, S. H. and Kang, C. D. Suppressive effect of a standardized mistletoe extract on the expression of activatory NK receptors and function of human NK cells. *J Clin Immunol* **27**, 477-85 (2007).
- 162.** Tabiasco, J., Pont, F., Fournie, J. J. and Vercellone, A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Biochem* **269**, 2591-600 (2002).
- 163.** Mueller, E. A., Hamprecht, K. and Anderer, F. A. Biochemical characterization of a component in extracts of *Viscum album* enhancing human NK cytotoxicity. *Immunopharmacology* **17**, 11-8 (1989).
- 164.** Mueller, E. A. and Anderer, F. A. Chemical specificity of effector cell/tumor cell bridging by a *Viscum album* rhamnogalacturonan enhancing cytotoxicity of human NK cells. *Immunopharmacology* **19**, 69-77 (1990).
- 165.** Dinarello, C. A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* **201**, 1355-9 (2005).

- 166.** Li, H., Ambade, A. and Re, F. Cutting edge: Necrosis activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* **183**, 1528-32 (2009).
- 167.** Martinon, F., Mayor, A. and Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* **27**, 229-65 (2009).
- 168.** Kovacs, E. Serum levels of IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients treated with *Viscum album* extract. *Biomed Pharmacother* **54**, 305-10 (2000).
- 169.** Mockel, B., Schwarz, T., Zinke, H., Eck, J., Langer, M. and Lentzen, H. Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneimittelforschung* **47**, 1145-51 (1997).
- 170.** Sims, J. E. and Smith, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* **10**, 89-102.
- 171.** Sluyter, R., Shemon, A. N. and Wiley, J. S. Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1 beta release from human monocytes. *J Immunol* **172**, 3399-405 (2004).
- 172.** Sluyter, R., Dalitz, J. G. and Wiley, J. S. P2X7 receptor polymorphism impairs extracellular adenosine 5'-triphosphate-induced interleukin-18 release from human monocytes. *Genes Immun* **5**, 588-91 (2004).
- 173.** Chen, C. J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S. and Rock, K. L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* **13**, 851-6 (2007).
- 174.** Gabay, C., Smith, M. F., Eidlen, D. and Arend, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest* **99**, 2930-40 (1997).
- 175.** Apte, R. N. and Voronov, E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev* **222**, 222-41 (2008).
- 176.** Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A. and Apte, R. N. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2645-50 (2003).
- 177.** Carmi, Y., Voronov, E., Dotan, S., Lahat, N., Rahat, M. A., Fogel, M., Huszar, M., White, M. R., Dinarello, C. A. and Apte, R. N. The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis. *J Immunol* **183**, 4705-14 (2009).
- 178.** Song, X., Voronov, E., Dvorkin, T., Fima, E., Cagnano, E., Benharroch, D., Shendler, Y., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C. A. and Apte, R. N. Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol* **171**, 6448-56 (2003).
- 179.** Chirivi, R. G., Garofalo, A., Padura, I. M., Mantovani, A. and Giavazzi, R. Interleukin 1 receptor antagonist inhibits the augmentation of metastasis induced by interleukin 1 or lipopolysaccharide in a human melanoma/nude mouse system. *Cancer Res* **53**, 5051-4 (1993).

- 180.** Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**, 54-61 (2007).
- 181.** Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., Seror, C., Metivier, D., Perfettini, J. L., Zitvogel, L. and Kroemer, G. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* **8**, 3723-8 (2009).
- 182.** Kalinski, P. and Okada, H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors. *Semin Immunol* **22**, 173-82.
- 183.** Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisi, M. R., Chimini, G. and Rubartelli, A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* **10**, 1463-75 (1999).
- 184.** Burns, K., Martinon, F. and Tschopp, J. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Curr Opin Immunol* **15**, 26-30 (2003).
- 185.** Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L. V., Torrisi, M. R. and Rubartelli, A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9745-50 (2004).
- 186.** Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. and Sitia, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *Embo J* **9**, 1503-10 (1990).
- 187.** Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M. and Dixit, V. M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-32 (2006).
- 188.** Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., Roose-Girma, M., Erickson, S. and Dixit, V. M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213-8 (2004).
- 189.** Mariathasan, S. and Monack, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**, 31-40 (2007).
- 190.** Lamkanfi, M., Malireddi, R. K. and Kanneganti, T. D. Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. *J Biol Chem* **284**, 20574-81 (2009).
- 191.** Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M. and Nunez, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* **27**, 549-59 (2007).
- 192.** Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y. G. and Nunez, G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* **4**, 365-98 (2009).
- 193.** Piccini, A., Carta, S., Tassi, S., Lasiglie, D., Fossati, G. and Rubartelli, A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8067-72 (2008).

- 194.** Netea, M. G., Nold-Petry, C. A., Nold, M. F., Joosten, L. A., Opitz, B., van der Meer, J. H., van de Veerdonk, F. L., Ferwerda, G., Heinhuis, B., Devesa, I., Funk, C. J., Mason, R. J., Kullberg, B. J., Rubartelli, A., Van der Meer, J. W. and Dinarello, C. A. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1{beta} in monocytes and macrophages. *Blood* (2008).
- 195.** Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J. and Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* (2009).
- 196.** Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., Latz, E. and Fitzgerald, K. A. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514-8 (2009).
- 197.** Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417-26 (2002).
- 198.** Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N. and Tschopp, J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319-25 (2004).
- 199.** Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J. M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I. and Reed, J. C. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* **25**, 713-24 (2007).
- 200.** Boyden, E. D. and Dietrich, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* **38**, 240-4 (2006).
- 201.** Miao, E. A., Alpujch-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I. and Aderem, A. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* **7**, 569-75 (2006).
- 202.** Miao, E. A., Ernst, R. K., Dors, M., Mao, D. P. and Aderem, A. Pseudomonas aeruginosa activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2562-7 (2008).
- 203.** Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C. and Nunez, G. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages. *PLoS Pathog* **3**, e111 (2007).
- 204.** Schroder, K. and Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell* **140**, 821-32.
- 205.** Kanneganti, T. D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Whitfield, J., Franchi, L., Taraporewala, Z. F., Miller, D., Patton, J. T., Inohara, N. and Nunez, G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **281**, 36560-8 (2006).
- 206.** Joly, S., Ma, N., Sadler, J. J., Soll, D. R., Cassel, S. L. and Sutterwala, F. S. Cutting edge: Candida albicans hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* **183**, 3578-81 (2009).

- 207.** Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschlager, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Mocsai, A., Tschopp, J. and Ruland, J. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* **459**, 433-6 (2009).
- 208.** Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M., Kim, Y. G., Chen, G., Park, J. H., Franchi, L., Vandenabeele, P. and Nunez, G. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* **26**, 433-43 (2007).
- 209.** Yamasaki, K., Muto, J., Taylor, K. R., Cogen, A. L., Audish, D., Bertin, J., Grant, E. P., Coyle, A. J., Misaghi, A., Hoffman, H. M. and Gallo, R. L. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem* **284**, 12762-71 (2009).
- 210.** Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. and Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237-41 (2006).
- 211.** Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F. and Tschopp, J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**, 1583-9 (2007).
- 212.** Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, V. and Latz, E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **466**, 652.
- 213.** Cassel, S. L., Eisenbarth, S. C., Iyer, S. S., Sadler, J. J., Colegio, O. R., Tephly, L. A., Carter, A. B., Rothman, P. B., Flavell, R. A. and Sutterwala, F. S. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9035-40 (2008).
- 214.** Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T. and Tschopp, J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674-7 (2008).
- 215.** Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A. and Latz, E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* **9**, 847-56 (2008).
- 216.** Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S. and Flavell, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122-6 (2008).
- 217.** Franchi, L. and Nunez, G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* **38**, 2085-9 (2008).
- 218.** Li, H., Willingham, S. B., Ting, J. P. and Re, F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* **181**, 17-21 (2008).

- 219.** Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. and Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* **11**, 136-40.
- 220.** Stutz, A., Golenbock, D. T. and Latz, E. Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest* **119**, 3502-11 (2009).
- 221.** Tschopp, J. and Schroder, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* **10**, 210-5.
- 222.** Cain, K., Langlais, C., Sun, X. M., Brown, D. G. and Cohen, G. M. Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* **276**, 41985-90 (2001).
- 223.** Pelegrin, P. and Surprenant, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J* **25**, 5071-82 (2006).
- 224.** Hentze, H., Lin, X. Y., Choi, M. S. and Porter, A. G. Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ* **10**, 956-68 (2003).
- 225.** Cruz, C. M., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L., Persechini, P. M. and Ojcius, D. M. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* **282**, 2871-9 (2007).
- 226.** Pelegrin, P. and Surprenant, A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1beta release through pyrophosphates. *Embo J* **28**, 2114-27 (2009).
- 227.** Meissner, F., Molawi, K. and Zychlinsky, A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol* **9**, 866-72 (2008).
- 228.** Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Febs J* **275**, 3249-77 (2008).
- 229.** Meissner, F., Seger, R. A., Moshous, D., Fischer, A., Reichenbach, J. and Zychlinsky, A. Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood*.
- 230.** van Bruggen, R., Koker, M. Y., Jansen, M., van Houdt, M., Roos, D., Kuijpers, T. W. and van den Berg, T. K. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood* **115**, 5398-400.
- 231.** Greten, F. R., Arkan, M. C., Bollrath, J., Hsu, L. C., Goode, J., Miething, C., Goktuna, S. I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., Van Rooijen, N., Xu, Y., O'Cain, T., Jaffee, B. B., Busch, D. H., Duyster, J., Schmid, R. M., Eckmann, L. and Karin, M. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* **130**, 918-31 (2007).
- 232.** Gardella, S., Andrei, C., Costigliolo, S., Olcese, L., Zocchi, M. R. and Rubartelli, A. Secretion of bioactive interleukin-1beta by dendritic cells is modulated by interaction with antigen specific T cells. *Blood* **95**, 3809-15 (2000).

- 233.** Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wieczorek, M., Kroona, H., Leimer, A. H. and Cheronis, J. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6261-6 (1999).
- 234.** Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C. and Surprenant, A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* **180**, 7147-57 (2008).
- 235.** Hogquist, K. A., Nett, M. A., Unanue, E. R. and Chaplin, D. D. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8485-9 (1991).
- 236.** Laliberte, R. E., Egglar, J. and Gabel, C. A. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *J Biol Chem* **274**, 36944-51 (1999).
- 237.** Pizzirani, C., Ferrari, D., Chiozzi, P., Adinolfi, E., Sandona, D., Savaglio, E. and Di Virgilio, F. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* **109**, 3856-64 (2007).
- 238.** Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Moller, T., Matteoli, M. and Verderio, C. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol* **174**, 7268-77 (2005).
- 239.** Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. and Dubyak, G. R. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* **179**, 1913-25 (2007).
- 240.** Brough, D. and Rothwell, N. J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci* **120**, 772-81 (2007).
- 241.** Boneberg, E. M. and Hartung, T. Mistletoe lectin-1 increases tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated whole blood via inhibition of interleukin-10 production. *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 996-1000 (2001).
- 242.** Braun, J. M., Blackwell, C. C., Weir, D. M. and Beuth, J. Cytokine release of whole blood from adult female donors challenged with mistletoe lectin-1 standardised mistletoe extract and E. coli endotoxin or phytohaemagglutinin (PHA). *Anticancer Res* **23**, 1349-52 (2003).
- 243.** Gorter, R. W., Joller, P. and Stoss, M. Cytokine release of a keratinocyte model after incubation with two different *Viscum album* L extracts. *Am J Ther* **10**, 40-7 (2003).
- 244.** Falkenberg, U., Lombard, Y., Giaimis, J., Poindron, P. and Falkenberg, F. W. Phenotypic characterization of three long-term-cultured murine resident macrophage lines. *Res Immunol* **143**, 25-32 (1992).
- 245.** Lombard, Y., Bartholeyns, J., Chokri, M., Illinger, D., Hartmann, D., Dumont, S., Kaufmann, S. H., Landmann, R., Loor, F. and Poindron, P. Establishment and characterization of long-term cultured cell lines of murine resident macrophages. *J Leukoc Biol* **44**, 391-401 (1988).

- 246.** Diment, S., Leech, M. S. and Stahl, P. D. Generation of macrophage variants with 5-azacytidine: selection for mannose receptor expression. *J Leukoc Biol* **42**, 485-90 (1987).
- 247.** Marina-Garcia, N., Franchi, L., Kim, Y. G., Miller, D., McDonald, C., Boons, G. J. and Nunez, G. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol* **180**, 4050-7 (2008).
- 248.** Franchi, L., Kanneganti, T. D., Dubyak, G. R. and Nunez, G. Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem* **282**, 18810-8 (2007).
- 249.** Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Datta, P., Solorzano, L., Yu, J. W., Meng, R., Quong, A. A., Latz, E., Scott, C. P. and Alnemri, E. S. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem* **285**, 9792-802.
- 250.** Distler, U., Souady, J., Hulsewig, M., Drmic-Hofman, I., Haier, J., Denz, A., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Senninger, N., Dreisewerd, K., Berkenkamp, S., Schmidt, M. A., Peter-Katalinic, J. and Muthing, J. Tumor-associated CD75s- and iso-CD75s-gangliosides are potential targets for adjuvant therapy in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* **7**, 2464-75 (2008).
- 251.** Lavastre, V., Binet, F., Moisan, E., Chiasson, S. and Girard, D. Viscum album agglutinin-I induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases. *Br J Haematol* **138**, 545-54 (2007).
- 252.** Sabova L, P. M., Szilagyi K, Sabo r, Moijzis J. Cytotoxic effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract on Jurkat cells and its interaction with doxorubicin. *Phytother Res* (2009).

Résumé

Dans cette étude, l'aptitude de trois extraits de Gui fermentés (VAF), issus de trois arbres hôtes, à induire ou moduler la sécrétion de cytokines, telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , a été explorée à l'aide de deux modèles de macrophages murins. Des traitements prolongés par des concentrations cytotoxiques, mais non sub-cytotoxiques, de VAFs induisent la sécrétion d'IL-1 β . Dans ces conditions, les concentrations sub-cytotoxiques de VAFs amplifient les sécrétions d'IL-1 β induites après stimulations par le LPS puis l'ATP, ou par l'imiquimod. Par ailleurs, appliqués brièvement et à concentrations sub-cytotoxiques, les VAFs accélèrent la sécrétion d'IL-1 β induite après stimulations par le LPS puis l'ATP.

Mots clé : extraits de Gui, IL-1 β , TNF- α , macrophages murins, cytotoxicité

Summary

In this study, the ability of fermented extracts from mistletoe grown on three host trees, to induce or modulate the secretion of pro-inflammatory cytokines, like IL-1 β , IL-6 and TNF- α has been explored. When applied for long times, cytotoxic, but not sub-cytotoxic concentrations of fermented mistletoe extracts induce the secretion of IL-1 β . In these conditions, sub-cytotoxic concentrations increase the IL-1 β secretions induced either by LPS and ATP, or by imiquimod. When applied briefly at sub-cytotoxic concentrations, fermented mistletoe extracts can accelerate the secretion of IL-1 β induced by LPS and ATP.

Key words : mistletoe extracts, IL-1 β , TNF- α , murine macrophages, cytotoxicity