

associés à une plus grande susceptibilité aux infections (Pruett et al., 2004). Les prochaines sections décrivent les effets de l'éthanol sur différentes composantes des branches innée et adaptative du système immunitaire.

Effets de l'éthanol sur les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée telles que les leucocytes polynucléaires, les monocytes/macrophages et les cellules *natural killer* (NK) sont équipées de différents récepteurs capables de reconnaître des motifs moléculaires associées aux pathogènes et de répondre rapidement aux signaux transmis par ceux-ci afin de combattre l'infection. Les récepteurs de ce type les mieux connus sont les *Toll-like receptors* (TLR) qui reconnaissent une variété de composantes microbiennes et amorcent la signalisation menant à l'activation des fonctions effectrices des cellules de l'immunité innée, comme la phagocytose ou la sécrétion de cytokines et de chimiokines. Les effets de l'éthanol sur l'activation de cellules de l'immunité innée par des ligands de différents TLR ont été largement étudiés et seront brièvement passés en revue dans les paragraphes suivants.

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont montrés qu'un traitement aigu à l'éthanol est capable d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à ces composantes. Par exemple, l'éthanol réduit la sécrétion de *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) et d'interleukine-1 β (IL-1 β) par des macrophages alvéolaires de souris et des monocytes de sang périphérique humain en réponse au lipopolysaccharide (LPS), un ligand du TLR4 (Nelson et al., 1989), (Verma et al., 1993). Il diminue aussi la production d'IL-6 et d'IL-12 induite par le *polyinosinic :polycytidylic acid* (poly I:C), un ligand du TLR3, par des macrophages péritonéaux de souris (Pruett et al., 2004). Enfin, des macrophages spléniques murins produisent moins de TNF- α et d'IL-6 lorsque traités à l'éthanol et stimulés au LPS, au peptidoglycane (TLR2) ou à l'ADN microbien (CpG) non-méthylé (TLR9) (Goral and Kovacs, 2005).

De plus, l'éthanol réduit aussi la production des chimiokines *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) et IL-8 par les monocytes humains en réponse à une stimulation à

l'entérotoxine B staphylococcique (SEB), au phytohémagglutinine (PHA) ou à l'interféron (IFN)- γ (Szabo et al., 1999). Dans un modèle d'infection pulmonaire, l'éthanol inhibe également les chimiokines *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) et *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC), ce qui, par conséquent, réduit l'influx de neutrophiles (Boe et al., 2003).

Les neutrophiles eux-mêmes sont d'ailleurs affectés par une exposition aiguë à l'éthanol : ils sécrètent moins des cytokines IL-8 et TNF- α et la dégranulation de *hepatocyte growth factor* (HGF) et d'élastase, des molécules responsables du remodelage des tissus environnants, est réduite (Taieb et al., 2002).

Les cellules endothéliales, qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins, sont aussi très importantes lors d'une réponse immunitaire. Une fois activées par des médiateurs pro-inflammatoires, elles permettent l'adhésion et le passage de cellules immunitaires vers le site inflammatoire ou infectieux. Elles sécrètent aussi d'avantage de cytokines et de chimiokines. Une intoxication aiguë à l'éthanol diminue le recrutement de leucocytes, la production de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro* (Saeed et al., 2004).

Les effets d'une exposition aiguë à l'éthanol sur les cellules NK sont aussi délétères à leur activité. Dans un modèle de propagation de métastases sensible aux cellules NK chez le rat, une exposition aiguë à l'éthanol inhibe l'activité de ces cellules et accroît le nombre de métastases (Ben-Eliyahu et al., 1996). De plus, dans un modèle murin de consommation aiguë d'alcool, l'activité cytolytique des cellules NK stimulées par le poly (I :C) est réduite (Hebert and Pruett, 2002).

Effets de l'éthanol sur les cellules de l'immunité adaptative

Tel que mentionnée précédemment, l'inflammation contribue au déclenchement de la réponse immunitaire adaptative contre un pathogène donné. Vu les effets délétères

susmentionnés de l'éthanol sur la réponse inflammatoire, il est donc cohérent que des composantes importantes de l'immunité acquise soient aussi affectés par une exposition à cet alcool.

Ainsi, il a été montré que l'éthanol réduit la prolifération de lymphocytes T spécifiques à un antigène en diminuant la capacité de présentation de cet antigène par les monocytes. Cet effet est causé par la diminution de production d'IL-1 β et l'augmentation de *transforming growth factor β* (TGF β) et d'IL-10 par les monocytes, les précurseurs des cellules dendritiques (Szabo et al., 1993; Mandrekar et al., 1996).

Les cellules dendritiques myéloïdes comptent parmi les plus puissantes présentatrices d'antigènes. Elles expriment une variété de molécules d'adhésion et de co-stimulation et produisent des cytokines régulatrices ce qui leur permet d'activer efficacement les lymphocytes T naïfs. Or, des cellules dendritiques générées en présence d'éthanol montrent un phénotype inhibiteur. Elles sont déficientes dans les fonctions associées à la présentation de l'antigène (capture, apprêtement et présentation) aux lymphocytes T. Elles ont aussi une expression réduite de molécules de co-stimulation en plus de produire moins d'IL-12 et d'avantage d'IL-10. Ces cellules dendritiques induisent l'anergie des lymphocytes T et inhibent la réponse T *helper* (Th)1 (Mandrekar et al., 2004).

Les effets observés d'une exposition aiguë à l'éthanol sur la fonction des lymphocytes T eux-mêmes sont contradictoires. Dans un modèle murin d'intoxication aiguë, la prolifération de splénocytes en réponse à la concanavaleine A (ConA) demeure à peu près inchangée (Kawakami et al., 1991). Une autre étude montre que l'éthanol augmente la prolifération de cellules de sang périphérique mononuclées (PBMC) stimulées *in vitro* par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ou la ConA (Szabo et al., 1993). D'autres ont plutôt observé une réduction de la production d'IL-2 et de la prolifération de PBMC traitées à la ConA en présence d'éthanol (Chiappelli et al., 1995). Plus récemment, un autre groupe a montré une réduction de la sécrétion et de la quantité d'ARN messager de l'IL-2 dans des

cellules Jurkat et des lymphocytes T CD4 primaires stimulés au PHA ou avec des anticorps contre CD3 et CD28 en présence d'éthanol (Ghare et al., 2011).

Effets aigus versus effets chroniques

Jusqu'ici, les effets décrits de l'éthanol sur la fonction immunitaire ont été ceux causés par une exposition aiguë à cette substance. Or, l'exposition chronique à l'éthanol est fréquente chez les individus alcooliques. Il est bien connu maintenant que ces deux types d'exposition à l'éthanol ont des effets opposés sur la fonction immunitaire : une exposition aiguë est inhibitrice alors que l'exposition chronique augmente la réponse inflammatoire (Goral et al., 2008; Szabo and Mandrekar, 2009). Par exemple, une intoxication chronique à l'éthanol accroît la production de TNF- α par les cellules de Kupffer – des macrophages du foie – en réponse à une stimulation au LPS (Nagy, 2003).

La figure 1.2 présentée plus loin résume les effets modulateurs de l'éthanol sur la fonction de différentes cellules immunitaires et leur habileté à répondre à un pathogène. La production de cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-1 et le TNF- α) est inhibée par l'éthanol aigu alors que l'alcool chronique l'augmente. La fonction de présentation de l'antigène des monocytes et des cellules dendritiques est altérée par les deux formes d'exposition à l'éthanol ce qui contribue à l'activation déficiente des lymphocytes T. La production d'IL-12 est aussi réduite. Il en résulte des changements dans la balance entre les cytokines de type Th1 (IFN γ) et Th2 (IL-10). Collectivement, ces changements induits par l'éthanol nuisent à l'élimination des pathogènes et à l'induction d'une réponse adaptative à l'infection chez l'individu exposé à l'alcool (Szabo and Mandrekar, 2009).

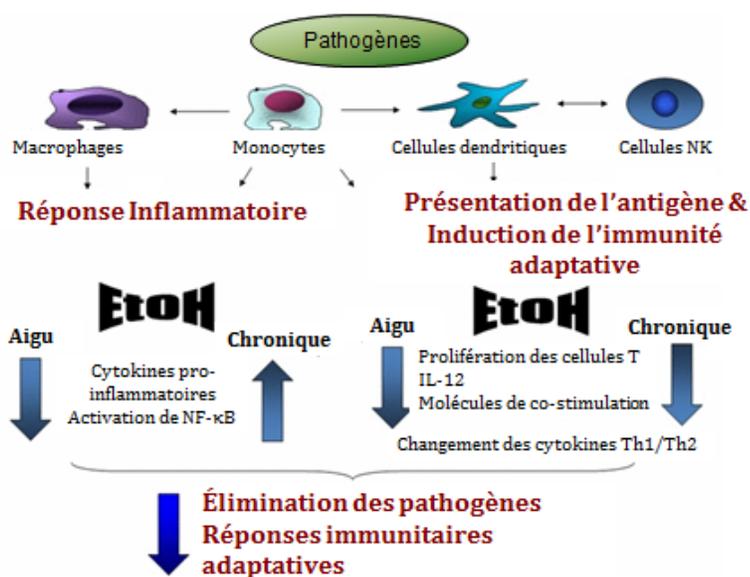


Figure 1.2 - L'éthanol altère l'immunité innée et adaptative.

Les expositions chroniques et aiguës à l'éthanol ont de larges effets immunorégulateurs. Adapté de (Szabo and Mandrekar, 2009, Alcoholism Clinical & Experimental Research)

Mécanismes moléculaires des effets de l'éthanol sur la fonction immune

La plupart des mécanismes moléculaires connus expliquant les effets immunomodulateurs de l'éthanol sont liés à l'activation des cellules immunitaires par les TLR (Pruett et al., 2004; Goral et al., 2008). Ces TLR possèdent un court domaine intracellulaire Toll/IL-1R (TIR) qui, suite à la liaison d'un ligand, recrute des molécules adaptatrices et induit les événements de signalisation en aval. Comme plusieurs autres TLR, TLR4 interagit avec la molécule adaptatrice MyD88 qui à son tour recrute IL-1R-associated kinase (IRAK) 4. IRAK4 phosphoryle et active IRAK1 qui va s'associer au TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6). L'association entre IRAK1 et TRAF6 est régulée négativement par la protéine IRAK-monocyte (IRAK-M) (Kobayashi et al., 2002). Les cascades de signalisation intracellulaire induite ensuite par le complexe IRAK1/TRAF6 comprennent l'activation du

facteur de transcription *activator protein-1* (AP-1) via les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) et l'activation du facteur de transcription *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) (Takeda and Akira, 2005). Ces deux voies de signalisation sont altérées par une exposition aiguë à l'éthanol. De fait, cet alcool réduit la phosphorylation de p38 et l'activation de NF- κ B induites par le LPS dans des leucocytes humains (Arbabi et al., 1999; Mandrekar et al., 1999). L'activation de p38, de NF- κ B et de la sous-unité c-Jun du facteur de transcription AP-1 sont inhibés par l'alcool dans des macrophages péritonéaux de souris activés via TLR3 par le poly (I:C) (Pruett et al., 2004). De plus, l'éthanol réduit la phosphorylation de p38 et de *l'extracellular-signal regulated kinase* (ERK)-1/2 dans des macrophages murins stimulés par des ligands pour les TLR2, 4 et 9 (Goral and Kovacs, 2005). Une étape importante de la signalisation précoce induite par les TLR est l'activation de la protéine IRAK1 et son hyperphosphorylation qui, ultimement, mène à sa dégradation par le protéosome. Il a été montré que l'activité kinase d'IRAK1 est réduite en présence d'éthanol dans des monocytes humains stimulés via TLR4 par le LPS. Par contre, cet effet est absent lorsque les cellules sont stimulées via TLR2 (Oak et al., 2006). Dans une lignée de macrophages murins, la dégradation d'IRAK1 suite à l'activation des cellules par le LPS est diminuée en présence d'éthanol (Dai et al., 2005).

Une analyse de l'expression des gènes modifiés par une exposition aiguë à l'éthanol par micropuce à ADN a permis d'identifier, chez des macrophages péritonéaux de souris stimulés au poly(I :C), la suppression d'une boucle d'amplification lié à l'interféron (Pruett et al., 2004). Non seulement l'ARNm de l'IFN et la protéine IFN α sont diminués, mais on note aussi que l'expression de molécules responsables de la signalisation produite par l'IFN et de molécules directement induites par l'IFN est réduite.

Tel que mentionné précédemment, une exposition chronique à l'éthanol accroît la production de cytokines pro-inflammatoires. Il a été montré que l'augmentation de la production de TNF- α par les cellules de Kupffer en réponse au LPS était associée à un accroissement de l'activité de p38 et ERK1/2 (Kishore et al., 2001; Kishore et al., 2002). L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans la figure 1.3.

Il a aussi été proposé que l'éthanol puisse agir au niveau le plus précoce des événements de signalisation en altérant la structure et/ou la fonction des radeaux lipidiques. De fait, suite à

la stimulation avec des ligands spécifiques, des TLR membranaires, comme TLR2 et TLR4, sont recrutés dans des radeaux lipidiques. CD14, un composant du complexe du récepteur TLR4, est aussi redistribué dans les microdomaines membranaires suite à la liaison du LPS (Szabo et al., 2007). Des études indiquent qu'une exposition aiguë à l'éthanol altère la redistribution induite par le LPS aux radeaux lipidiques de TLR4 et CD14. Ces changements sont associés à une diminution de la sécrétion de TNF- α et à une réduction de l'activation du facteur de transcription NF- κ B. De plus, le traitement de cellules de type macrophages avec des drogues qui perturbent les radeaux lipidiques a des effets similaires (Dai et al., 2005; Dolganiuc et al., 2006).

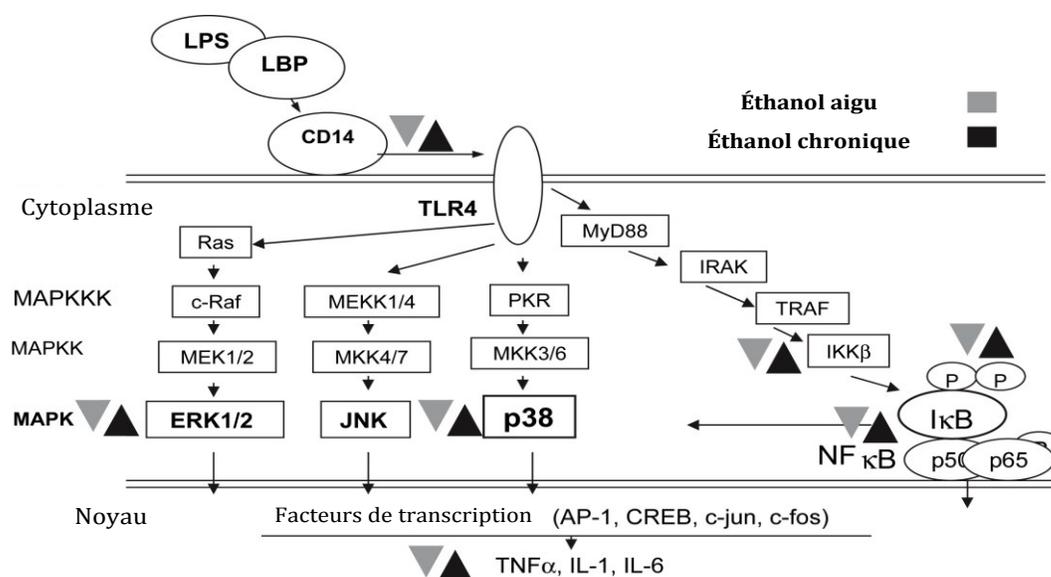


Figure 1.3 Effets d'une exposition aiguë ou chronique à l'éthanol sur l'activation du TLR4 par le LPS.

Adapté de (Goral et al., 2008, Alcohol)

Mécanismes généraux des effets biologiques des alcools

Les événements moléculaires qui sous-tendent les effets biologiques de l'alcool sont complexes, mais une image plus complète commence à émerger, du moins en partie, en empruntant certains concepts clés d'études réalisées sur des composés anesthésiques (Eckenhoff, 2001; Streiff et al., 2006; Vedula et al., 2009). Notre compréhension de la façon dont fonctionnent les alcools (et d'autres anesthésiques plus efficaces et/ou moins toxiques) a été portée principalement sur la membrane cellulaire au cours de la majeure partie du XX^e siècle (Seeman et al., 1971; Roth and Seeman, 1972; Pringle et al., 1981). Le premier aperçu du mécanisme d'action présumé des alcools est venu de l'observation qu'ils suivent la règle de Meyer-Overton, tout comme d'autres anesthésiques généraux. Cette règle établie une corrélation entre le pouvoir anesthésiant d'un composé donné et son coefficient de partition huile : eau; ainsi, les molécules dotées de chaînes carbonées plus longues ont tendance à être plus puissantes comparativement à celles qui sont moins hydrophobes (Figure 1.4). L'opinion prédominante était que la dissolution des molécules lipophiles dans la bicouche lipidique allait changer ses propriétés physiques compromettant ainsi indirectement la fonction des protéines intégrées (Seeman, 1972; Eckenhoff, 2001). Il existe cependant des exceptions à cette corrélation, la plus notable étant la coupure de l'effet anesthésique (*cut-off*) après l'atteinte d'une taille moléculaire précise pour une série de molécules homologues. Par exemple, pour la série homologue des *n*-alcools aliphatiques saturés, le pouvoir anesthésiant augmente progressivement avec la longueur de la chaîne carbonée et atteint un maximum à 12 carbones; après ce point les alcools successifs sont dépourvus d'activité anesthésique malgré qu'ils soient plus hydrophobes que les précédents (Alifimoff et al., 1989).

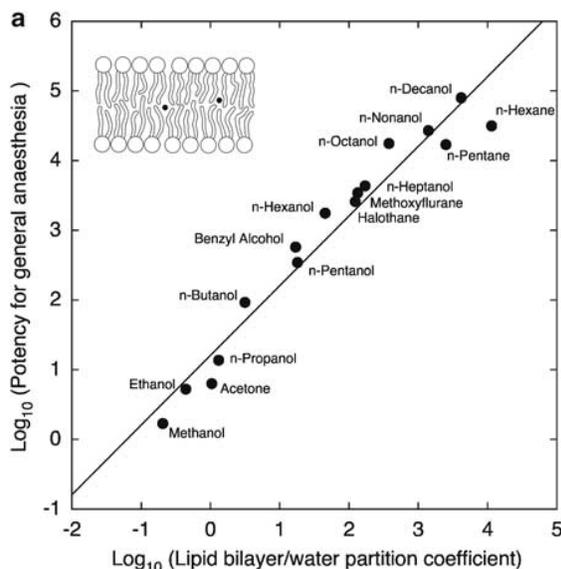


Figure 1.4 – Corrélation de Meyer-Overton

Relation entre la puissance de différents anesthésiques (montré comme la réciproque de leur EC₅₀ molaire pour l'anesthésie) et leur coefficient de partition huile :eau. Tiré de (Franks, 2006, British Journal of Pharmacology)

Hypothèses lipidiques

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les mécanismes responsables des perturbations de la bicouche lipidique qui pourraient induire l'anesthésie dont l'expansion du volume membranaire, le désordonnement de la membrane cellulaire et le changement dans les transitions de phase lipidique (Peoples et al., 1996).

Selon le modèle de l'expansion du volume membranaire, les alcools ou autres anesthésiques produisent leurs effets comportementaux en occupant un espace précis dans la membrane des neurones, ce qui aurait pour effet d'accroître le volume membranaire. Cette expansion de volume serait attribuable aux effets des molécules d'alcools ou d'anesthésiques sur les lipides et possiblement aussi les protéines membranaires. En conséquence, il résulterait une augmentation des forces latérales dans la membrane qui altérerait le fonctionnement des

protéines membranaires intégrales (Seeman, 1972). Toutefois, les changements de volume membranaire induits par des concentrations pertinentes d'alcools (qui induisent l'anesthésie) sont extrêmement petits et peuvent être reproduits par des élévations de température de seulement quelques degrés Celsius. Or, de tels changements de température n'induisent pas d'anesthésie ou de signes d'effets comportementaux d'une intoxication à l'alcool (Franks and Lieb, 1982).

Le modèle des transitions de phases lipidiques s'attarde essentiellement au changement de point de fusion des lipides membranaires. Il a été proposé que les alcools et les anesthésiques pourrait altérer l'équilibre entre les phases ordonné et désordonné des lipides membranaires (Lee, 1976; Trudell, 1977). Ainsi, les lipides entourant une protéine telle qu'un canal ionique pourrait devoir être dans un état moins ordonné et plus compressible permettant au canal de s'ouvrir. Donc selon cette hypothèse, les alcools et les anesthésiques affecteraient la fonction des canaux ioniques en réduisant la température à laquelle les lipides entrent dans la phase ordonnée. Cependant, des concentrations cliniques d'anesthésiques diminuent cette température de seulement 1-2°C : une perturbation analogue à celle provoquée par une augmentation de la température corporelle de même magnitude (Eckenhoff, 2001).

Selon le modèle du désordre ou de la fluidité membranaire, l'hypothèse fut émise que le désordonnement de l'essentiel de la phase lipidique de la membrane cellulaire par les alcools pourrait perturber la fonction normale de protéines intégrées, telles que les canaux ioniques (Goldstein, 1984). De fait, il a été démontré que la dissolution de *n*-alcools anesthésiques (octanol, décanol, dodécanol) dans des membranes synaptiques accroît leur désordre tandis que la dissolution de *n*-alcools plus longs et non-anesthésiques n'a pas d'effet (tetradécanol) ou a même l'effet inverse (hexadécanol, octadécanol). Cela permettrait donc d'expliquer la coupure (*cut-off*) observée de l'effet anesthésique de la série homologue des *n*-alcools après le dodécanol (Miller et al., 1989). Cependant, plusieurs réserves existent quant à la validité de cette hypothèse. D'abord, les effets des alcools sur le désordonnement de la membrane cellulaire ne sont généralement mesurables qu'à des concentrations nettement plus élevées que celles de la gamme pharmacologique. Il serait donc difficile d'envisager que des concentrations pertinentes d'un point de vue

pharmacologique puissent avoir un effet significatif sur ce désordonnement. D'ailleurs, à des concentrations associées à l'anesthésie, on estime qu'il n'y aurait qu'une seule molécule d'alcool pour 200 molécules de lipides dans la membrane plasmique (Peoples et al., 1996). Ensuite, comme pour l'expansion de la membrane et les transitions de phase lipidique, les changements de désordre membranaire induits par les alcools ou les anesthésiques peuvent être imités par une légère augmentation de température (Pang et al., 1980). Puisqu'une fièvre légère n'induit pas la perte de sensibilité, il s'avère improbable que les hypothèses lipidiques fournissent une explication unitaire de l'anesthésie.

Hypothèse protéique

Une autre interprétation n'impliquant pas la modification de la bicouche lipidique, mais qui envisage plutôt des protéines en tant que cibles directes des alcools, reçu un soutien considérable après qu'il fut montré que des alcools primaires lient la luciférase *in vitro* en absence d'un contexte lipidique (Franks and Lieb, 1984; Franks and Lieb, 1985). Les alcools compétitionnent avec le substrat luciférine et inhibent l'activité enzymatique en fonction de la taille de leur chaîne carbonée et à des concentrations très similaires à celles induisant l'anesthésie dans des modèles animaux. Puisque les alcools plus longs tel que le *n*-décanol sont des inhibiteurs de la luciférase plus puissants de plusieurs ordres de grandeurs que les plus petits et moins hydrophobes *n*-propanol ou éthanol, la règle de Meyer-Overton peut être extrapolée au-delà de la dissolution dans la bicouche lipidique au niveau de sous-domaines protéiques hydrophobes. D'autant plus que les *n*-alcools lient la luciférase de mieux en mieux à mesure de la croissance de leur chaîne carbonée jusqu'au *n*-hexanol et au *n*-heptanol, qui ont une affinité très similaire. La corrélation entre la longueur de la chaîne de carbone et la liaison reprend avec le *n*-octanol et se poursuit jusqu'au *n*-dodécanol, après quoi elle disparaît à nouveau (figure 1.5). Ces découvertes suggèrent l'existence d'une pochette de liaison hydrophobe qui aurait la capacité d'accommoder deux molécules de *n*-hexanol ou une seule de *n*-dodécanol tandis que les alcools plus longs resteraient partiellement exposés au solvant (Franks and Lieb, 2004). Ces observations fournissent une alternative valable aux hypothèses lipidiques en plus d'une explication

simple au respect de la règle de Meyer-Overton. D'ailleurs des sites de liaisons aux anesthésiques qui suivent aussi cette corrélation ont été découverts sur d'autres enzymes : la cytochrome c oxydase (Hasinoff and Davey, 1989) et la protéine kinase C (Slater et al., 1993). Le *cut-off* de l'effet anesthésique des *n*-alcools peut aussi être expliqué simplement par la liaison de ces molécules à des pochettes ou des crevasses de dimensions définies sur des cibles protéiques.

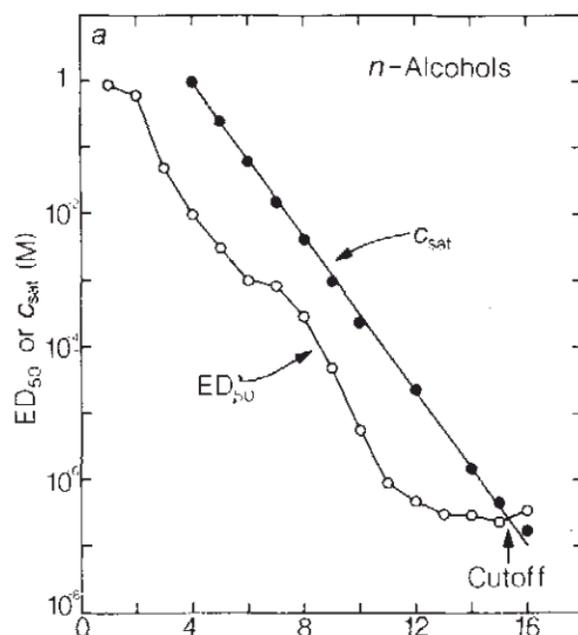


Figure 1.5 – Concentration de *n*-alcools requise pour inhiber de 50% l'activité luciférase.

ED₅₀ pour l'inhibition de la luciférase en fonction du nombre d'atomes de carbones de la molécule. La ligne c_{sat} représente la solubilité maximale des différents alcools en solution aqueuse. Tiré de (Franks and Lieb, 1985, Nature)

Des travaux ultérieurs impliquant la mutagenèse d'acides aminés spécifiques ont contribué à définir les sites putatifs de liaison aux alcools dans diverses protéines (tableau 1.2). Par exemple, pour l'enzyme adénylate cyclase, dont l'activité est augmentée par l'éthanol, il a été montré que deux régions définies de la protéine sont responsables de cet effet : les 28 premiers acides aminés de la région N-terminale du domaine C_{1a} et les 140 acides aminés

de la région C-terminale de la molécule (Yoshimura et al., 2006). En ce qui concerne le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR), des mutations de résidus spécifiques dans le domaine M2 qui forme le pore du récepteur change la sensibilité de la protéine aux anesthésiques (isoflurane, *n*-hexanol et *n*-octanol). Plus les acides aminés introduits sont hydrophobes, plus le nAChR est inhibé par ces substances (Forman et al., 1995). Dans le même ordre d'idée, la sensibilité à l'éthanol des récepteurs au glutamate *N-méthyl-D-aspartate* (NMDA), dont la fonction est inhibée par l'alcool, dépend de résidus précis situés dans les domaines transmembranaires (TM) 3 et TM4 de la sous-unité NR1. La mutation de ces acides aminés altère la sensibilité à l'éthanol des récepteurs NMDA (Smothers and Woodward, 2006).

La plupart des protéines présentées dans le tableau 1.2 sont impliquées dans des processus neurobiologiques et n'ont pas un impact immunologique direct; cependant, il est intéressant de constater qu'il existe peut-être une interrelation entre les événements moléculaires causés par l'alcool qui produisent des effets neurobiologiques et ceux qui mènent à des effets immunologiques. À cet égard, il a été rapporté récemment que l'expression du TLR4 est régulée par le récepteur à l'acide γ -aminobutyrique de type A (GABA_A) dans le noyau central de l'amygdale et que ce procédé est associé à la consommation excessive d'alcool (taux d'alcoolémie $\geq 0,08$ g% dans une période de 2 h) (Liu et al., 2011). Le récepteur GABA_A possède une cavité de liaison à l'alcool formée par des acides aminés provenant de quatre domaines transmembranaires et a longtemps été considérée comme une cible pour les effets de l'alcool dans le système nerveux central (Harris et al., 2008).

Tableau 1.2 – Protéines dont la fonction est altérée par des alcools.

<i>Cibles définies par des analyses biochimiques et de mutagénèse</i>	<i>Molécules co-cristallisées</i>	<i>Référence</i>
Récepteurs canaux pentamériques (pLGIC)		
Récepteur GABA _A		(Jung et al., 2005)
Récepteur glycine		(Lobo et al., 2008)
Récepteur nicotinique de l'acétylcholine		(Forman et al., 1995)
Récepteur au glutamate <i>N-méthyl-D-aspartate</i>		(Smothers and Woodward, 2006)
Homologue bactérien de pLGIC (GLIC)	Propofol, desflurane	(Nury et al., 2011)
Canaux potassiques		
Shaw2		(Shahidullah et al., 2003)
G protein inwardly rectifying potassium channel 2		(Aryal et al., 2009)
IRK1	2-méthyl-2,4-pentanediol	(Pegan et al., 2006)
Molécules d'adhésion		
L1		(Dou et al., 2011)
Protéine de liaison d'odorants		
LUSH	Éthanol, 1-propanol, 1-butanol	(Kruse et al., 2003)
Enzymes		
Luciférase	Bromoforme	(Franks et al., 1998)
Alcool déshydrogénase	Alcool pentafluorobenzyle, trifluoroéthanol	(Ramaswamy et al., 1994)
Adénylate cyclase		(Yoshimura et al., 2006)

Plus important encore, les données de mutagenèse ont consolidé les résultats obtenus avec le modèle luciférase à établir le principe que les alcools peuvent interagir directement avec des protéines qui appartiennent à des groupes fonctionnels très différents à condition qu'elles affichent des pochettes de liaison appropriées.

L'anatomie de ces poches de liaison peut être déduite des caractéristiques les plus fondamentales de la molécule d'alcool soit l'existence d'un groupe hydroxyle lié à un atome

de carbone. Le groupe hydroxyle permet aux alcools de se comporter comme des acides faibles et des donneurs de liaisons hydrogène, tandis que la chaîne aliphatique est responsable de leurs propriétés hydrophobes (Ballinger, 1960; Dwyer and Bradley, 2000). Il a été suggéré que les alcools lieraient un site miroir dans les protéines cibles (Dwyer and Bradley, 2000). Selon ce point de vue, on pourrait s'attendre à trouver dans un voisinage proche: (i) un site accepteur de liaison hydrogène, (ii) une charge nette positive localisée pour interagir avec l'atome électronégatif du groupe hydroxyle, et (iii) un sillon hydrophobe qui pourraient résulter de l'empilement d'hélices- α . Ainsi, les alcools déplaceraient les molécules d'eau de ces pochettes et établiraient des interactions atomiques avec les protéines *via* des liaisons hydrogènes qui seraient stabilisées par des forces de van der Waals au sein du sillon hydrophobe (Klemm, 1998). La déformation locale causée par cette interaction moléculaire pourrait mener à une altération de la fonction des protéines (figure 1.6). Par exemple, le canal potassique neuronal de la drosophile Shaw 2 est inhibé par des concentrations physiologiques de *n*-alcanols. Ceux-ci se lient probablement à une région formée de 13 acides aminés situés dans la sous-unité formant le pore de la protéine et stabilisent l'état fermé du canal ionique. Des interactions hydrophobes et des forces polaires faibles déterminent la puissance de liaison des alcools à ce site circonscrit. D'ailleurs, la structure α -hélicoïdale de cette région semble critique pour la liaison des alcools et/ou pour l'inhibition allostérique de l'ouverture du canal par les alcanols (Shahidullah et al., 2003).

Les caractéristiques structurelles prédites ci-dessus ont été largement confirmées par des données cristallographiques à propos de complexes protéines-alcools (tableau 1.2). La protéine de liaison d'odorants de la drosophile LUSH sert de modèle pour les sites de liaisons aux alcools. LUSH est une protéine non-enzymatique requise pour les réponses comportementales et électrophysiologiques des neurones olfactifs de la drosophile aux *n*-alcools. La résolution de la structure cristalline de LUSH en présence de 30-50 mM de différents *n*-alcools (éthanol, propanol et butanol) a révélé la présence d'un seul site de liaison aux alcools situé dans une cavité hydrophobe d'environ 390 Å³. Cette cavité est remplie de molécules d'eau et se situe entre un ensemble d'hélices- α (Kruse et al., 2003). En plus de plusieurs résidus hydrophobes, ce site de liaison présente un jeu de résidus

polaires qui forment un réseau de ponts hydrogènes avec les alcools et l'eau. Ainsi, le groupe hydroxyle des alcools établis un lien hydrogène fort avec la thréonine 57 (T57) et un plus faible avec la sérine 52 (S52). L'arrangement optimal aurait T57 donnant un lien hydrogène à l'alcool, qui, à son tour, en donne un à S52, tandis que S52 en donne un au groupe carbonyle de la chaîne principale (Thode et al., 2008).

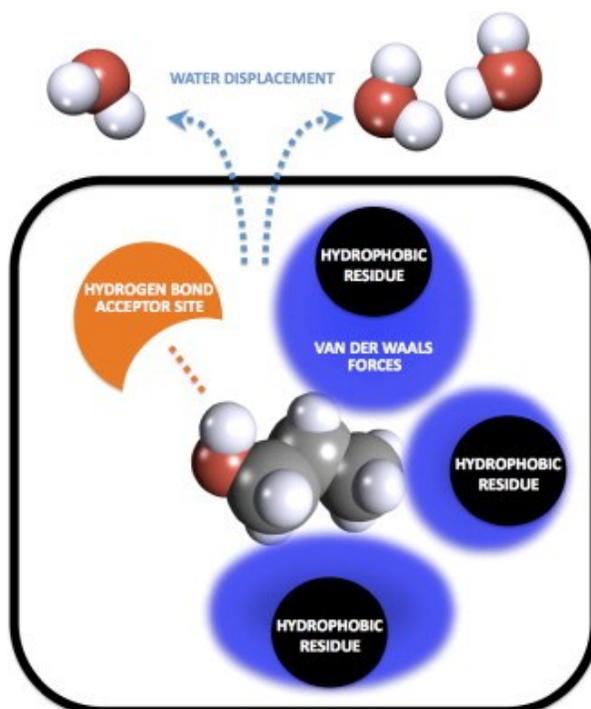


Figure 1.6 – Caractéristiques de base des pochettes de liaison aux alcools dans les protéines. Tiré de (Désy et al., 2012, *Toxicology Letters*)

Le schéma décrit l'interaction du n-propanol avec un site protéique hypothétique par une liaison hydrogène et des forces de van der Waals. Les résidus hydrophobes (cercles noirs) aux alentours de la cavité stabilisent la molécule d'alcool par des forces de van der Waals (ombres bleutées). Le site accepteur de liaison hydrogène est représenté par un croissant orange et le lien hydrogène lui-même par une ligne pointillée orange. Le déplacement des molécules d'eau en dehors de la pochette induit par la liaison de l'alcool est indiqué par des flèches pointillées bleues.

Des cavités similaires ont été découvertes par la résolution de la structure cristalline de la *G protein-insensitive inwardly rectifying potassium channel* (IRK1) et du *Gloeobacter*

violaceus pentameric ligand-gated ion channel (GLIC) en interaction avec le 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD) et le propofol/desflurane respectivement (Pegan et al., 2006), (Nury et al., 2011).

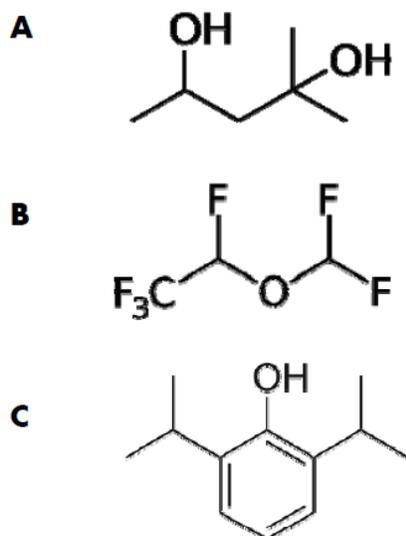


Figure 1.7 - Structure moléculaire des composés co-cristallisés en interaction avec des canaux ioniques.

(A) 2-méthyl-2,4-pentanediol; (B) Desflurane; (C) Propofol.

La pochette de liaison aux alcools d'IRK1 est formée par les chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes (F47, L232, L245, L330 et Y337) et aussi de résidus permettant la formation d'un réseau de liens hydrogènes entre les groupes hydroxyles du MPD et des groupes carbonyles ou hydroxyles de P244, Y242 et Y337 (Aryal et al., 2009). En ce qui concerne GLIC, il a été montré que le desflurane (un anesthésique général volatil) se trouve enfoui profondément à l'intérieur de la cavité et établi des interactions hydrophobiques avec plusieurs résidus (I201, I202, I258, T255, V242); de plus, son atome d'oxygène se trouve à une distance de pont hydrogène de T255. Le propofol (un anesthésique administré par voie intraveineuse) se situe plus près de l'entrée de la cavité et interagi principalement avec T255 et Y254 par des contacts de van der Waals. Le groupe hydroxyle du propofol pourrait former un lien hydrogène avec Y254 (Nury et al., 2011).

Enfin, le site de liaison aux alcanols de l'alcool déshydrogénase est bien connu : la cavité est de nature hydrophobe comme celle des protéines décrites précédemment, mais elle est la seule qui utilise un atome de zinc pour lier le groupe hydroxyle (Ramaswamy et al., 1994). Cette particularité pourrait expliquer l'affinité de liaison aux alcools substantiellement plus élevée pour cette enzyme, soit environ 1 mM.

Problématique, Hypothèses et Objectifs

Il est désormais bien établi que la consommation d'éthanol a des conséquences sur le système immunitaire. Les expositions aiguës et chroniques à cet alcool modifient la réponse immune normale aux pathogènes bactériens et viraux. Cependant, les propriétés immunomodulatrices d'autres alcools à courte chaîne d'usage courant, ou même des alcanols en général, demeurent inconnues. En se basant sur des motifs structuraux, nous avons émis l'hypothèse que l'isopropanol et le méthanol, d'autres alcools à courte chaîne dont l'utilisation est répandue, partageraient les effets immunomodulateurs de l'éthanol lors d'une exposition aiguë. Nous nous sommes donc fixés comme objectifs d'examiner les effets immunomodulateurs de l'isopropanol et du méthanol et ensuite d'identifier les mécanismes moléculaires responsables des effets observés.

Les alcanols aliphatiques possèdent des propriétés anesthésiantes qui suivent la règle de Meyer-Overton; c'est-à-dire que leur potentiel anesthésique est corrélé à leur degré d'hydrophobicité. Dans cet ordre d'idée, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont indiqué que l'isopropanol est plus efficace que l'éthanol pour altérer les fonctions effectrices des lymphocytes T. Par ailleurs, la caractérisation des événements moléculaires responsables des effets neurobiologiques des alcools, tel que l'anesthésie, est beaucoup plus avancée que ce qui est connu concernant leurs effets immunologiques. Ainsi, il a été montré par des études biochimiques et structurelles que les alcools pouvaient lier et moduler l'activité de cibles protéiques comme des canaux ioniques ou des molécules d'adhésion, ce qui explique de façon plausible leurs effets neurobiologiques. Par contre, l'identification de cibles protéiques directes dans les cellules immunitaires ne fait que

commencer; et les possibles impacts des alcools sur les lipides membranaires ne sont pas écartés non plus (Szabo et al., 2007). La majorité de l'information disponible à ce sujet ne concerne d'ailleurs que l'éthanol.

Ces observations nous ont amené à émettre comme seconde hypothèse que, à l'instar de leurs effets anesthésiques, les *n*-alcanols possèderaient aussi des effets immunomodulateurs corrélés à la longueur de leur chaîne carbonée, respectant ainsi la règle de Meyer-Overton. Les objectifs associés à cette hypothèse étaient, en premier lieu, d'examiner les effets sur la fonction effectrice des lymphocytes T de la série des *n*-alcanols comprenant de un à douze carbones; et ensuite, de dégager les mécanismes moléculaires à la base de ces effets. Nous avons aussi comme but d'identifier une ou des cibles protéiques d'intérêt immunologique auxquelles les alcanols pourraient se lier.