



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Relation entre le métabolisme du platelet-activating factor (PAF) et l'activation des polymorphonucléaires neutrophiles bovins

Vandesteene, Christine

Award date:
1987

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

1987

RELATION ENTRE LE METABOLISME DU
PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF)
ET L'ACTIVATION DES POLYMORPHONUCLEAIRES
NEUTROPHILES BOVINS.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

VANDESTEENE Christine

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. Remacle qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et qui m'a judicieusement conseillée tout au long de l'année.

Je remercie également Monsieur Eric Remy pour l'aide efficace qu'il m'a apportée et pour sa très grande disponibilité.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance à tous les autres membres du département de biochimie cellulaire pour leur bienveillance et leur coopération.

 TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION	1
I. Activation des phagocytes	1
II . Formation des radicaux oxygénés	2
III. Les médiateurs de l'inflammation	3
III.1. Le Platelet-activating factor	3
III.1.1. Structure du PAF	3
III.1.2. Biosynthèse du PAF	5
Mécanisme de déacylation-réacylation	
III.1.3. Catabolisme du PAF	5
III.1.4. Activité biologique du PAF	5
III.2. Les métabolites de l'acide arachidonique	7
III.2.1. Métabolisme de l'acide arachidonique	7
IV. Position du problème	9
MATERIEL ET METHODES	11
I. Préparation des leucocytes polymorphonucléaires	11
I.1. Solutions	11
I.2.. Méthode	11
II. Dosage du platelet-activating factor	13
II.1. Par marquage radioactif	13
II.1.1. Principe	13
II.1.2. Méthode	13
II.1.2.1. Incubation des cellules	13
II.1.2.2. Extraction et séparation sur TLC	14
II.2. Par agrégation des plaquettes	15
II.2.1. Principe	15
II.2.1.1. Mécanisme d'agrégation des plaquettes	15
II.2.1.2. Inhibition spécifique de l'agrégation due au PAF	17
II.2.2 Méthode	17
II.2.2.1. Solutions	17
II.2.2.2. Production du PAF par les PMN	18
II.2.2.3. Extraction des lipides	18
II.2.2.4. Séparation des lipides sur HPLC	19
II.2.2.5. Dosage du PAF	19
a. Préparation des plaquettes	19
b. Dosage	20
c. Mesures et calculs	21

III.	Dosage de la production de dérivés oxygénés	21
	Méthode de la chémoluminescence	
III.1.	Principe	21
III.2.	Dosage	24
III.2.1.	Solutions	24
III.2.2.	Méthode	25
III.2.3.	Calcul des résultats	26
III.3.	Mises au point	26
III.3.1.	Influence de la concentration en luminol	26
III.3.2.	Influence de la concentration en cellules	30
IV.	Utilisation de la xanthine oxydase pour la production de radicaux libres	30
IV.1.	Principe	30
IV.2.	Dosage	31
IV.2.1.	Solutions	31
IV.2.2.	Méthode	31
V.	Dosage de la N-acétyl- β -glucosaminidase	32
V.1.	Solutions	32
V.2.	Méthode de dosage	33
V.2.1.	Préparation des cellules	33
V.2.2.	Dosage de la glucosaminidase	33
V.2.3.	Calculs	34
RESULTATS ET DISCUSSION		35
I.	Inhibition spécifique de la synthèse de PAF	35
I.1.	Inhibition spécifique de l'acétyl transférase	35
I.1.1	Effet du 1-palmitoyl-2-lyso- <u>sn</u> -glycéryl-3-phosphocholine sur la synthèse de PAF	36
I.1.2.	Effet du 3-O-alkyl-2-lyso- <u>sn</u> -glycéro-1-phosphorylcholine sur la synthèse de PAF	42
I.1.3.	Conclusion	44
I.2.	Inhibition de la synthèse de PAF par des inhibiteurs de la phospholipase A ₂	45
I.2.1.	Effet du BPB sur la synthèse de PAF	45
I.2.2.	Effet de l'acide arachidonique sur la synthèse de PAF	51

II.	Effets des inhibiteurs "spécifiques" de la synthèse du PAF sur l'activation des PMN	53
II.1.	Effet de l'acide arachidonique	53
II.2.	Effet du BPB	55
II.2.1.	Effet du BPB sur la production de dérivés de l'oxygène	55
II.2.2.	Effet du BPB sur la dégranulation des neutrophiles	59
III.	Discussion	61
BIBLIOGRAPHIE		63

INTRODUCTION.

I. ACTIVATION DES PHAGOCYTES.

Les phagocytes (polymorphonucléaires, monocytes) sont attirés vers les foyers inflammatoires par chimiotactisme, c'est-à-dire par attraction de molécules chimiques résultant du processus inflammatoire. Une fois sur place, ils adhèrent à la proie recouverte d'opsonines et la phagocytent.

La phagocytose est suivie de deux phénomènes qui participent à la destruction de la proie: la dégranulation et la poussée d'activité respiratoire. (BRAQUET et BRAQUET, 1983)

1. La dégranulation désigne la fusion du phagosome et des lysosomes primaires. Ceux-ci contiennent de nombreuses enzymes protéolytiques qui participent à la destruction de la particule ingérée.

2. La poussée d'activité respiratoire est une voie métabolique qui a pour fonction la production d'un groupe d'agents bactéricides très puissants dérivant de la réduction partielle de l'oxygène. La poussée d'activité respiratoire du phagocyte inclut quatre phénomènes (FRIDOVITCH, 1975; BABIOR, 1973):

-l'augmentation de la consommation d' O_2

-la production de radicaux superoxydes

- la production de peroxydes d'hydrogène
- l'activation du shunt des pentoses phosphates qui permet la régénération du NADPH.

La libération du contenu des phagocytes dans l'organisme peut provoquer des lésions tissulaires graves; ceci apparaît principalement dans les maladies liées aux inflammations chroniques.

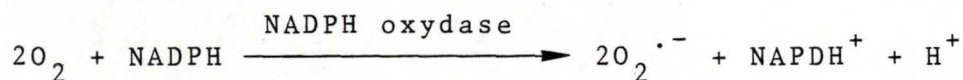
Nous pouvons reproduire expérimentalement ces deux phénomènes en activant les phagocytes par de nombreux stimuli (BRAQUET et BRAQUET, 1983):

- les stimuli particuliers: zymosan opsonisé, immuns complexes
- les stimuli solubles:
 - . phorbol myristate acétate (PMA)
 - . peptide chimiotactique N-formyl-L-méthionyl-L-leucyl-L-phénylalanine (FMLP)
 - . lectines (concanavaleine A), agglutinines
 - . ionophore du calcium A23187.

II. FORMATION DES RADICAUX OXYGENES.

L'augmentation de la consommation d'oxygène lors de l'activation cellulaire s'explique en grande partie par la formation de radicaux oxygénés:

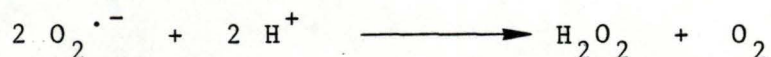
1. Le radical superoxyde:



La NADPH oxydase catalyse la réduction partielle de l'oxygène. Elle est localisée sur la membrane externe des phagocytes et se retrouve par la suite dans les phagosomes.

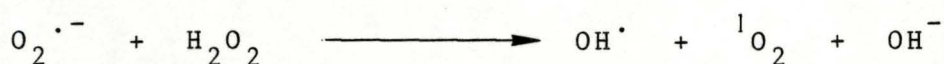
2. Le peroxyde d'hydrogène:

ROOT et METCALF (1977) ont montré que tout l'oxygène consommé au cours de la poussée d'activité respiratoire était converti en $O_2^{\cdot-}$ et que 80% de ces $O_2^{\cdot-}$ étaient convertis en H_2O_2 par dismutation:



3. L'oxygène singulet et le radical hydroxyl:

Les radicaux $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 ne sont pas les seuls agents toxiques: ils peuvent former d'autres agents très réactionnels comme le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) et l'oxygène singulet (1O_2) principalement lors de la réaction des deux dérivés précédents qui est catalysée par des traces de Fe^{+++} (Réaction d'Haber-Weiss):



III. LES MEDIATEURS DE L'INFLAMMATION.

III.1.LE PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF).

III.1.1.Structure du PAF. (V. Fig.1)

Le platelet-activating factor est un phospholipide de structure 1-0-alkyl-2-0-acétyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DEMOPOULOS, C.A., 1979) qui est produit par de nombreux types de cellules inflammatoires, et notamment les polymorphonucléaires neutrophiles (CLARCK, P., 1980; CAMUSSI, G., 1981).

III.1.2. Biosynthèse du PAF.

Mécanisme de déacylation-réacylation.

Lors de l'activation cellulaire, la phospholipase A₂ activée par le calcium hydrolyse le groupement 2-acyl d'un précurseur 1-O-alkyl-2-O-acyl-sn-glycéro-3-phosphocholine stocké dans les membranes, ce qui libère ainsi un composé 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycéro-3-phosphocholine. Ce composé lyso peut soit former le PAF par acétylation en position 2, soit reformer le précurseur de départ en étant réacylé (WYKLE, R.L., 1980; MUELLER, H.W., 1983). (figure 2).

III.1.3. Catabolisme du PAF.

Un contrôle strict de la quantité de PAF dans l'organisme est nécessaire du fait de la grande activité biologique de ce composé. C'est pourquoi il est rapidement inactivé par une acétyl hydrolase spécifique qui lui enlève son groupement acétyl (figure 2). Le lyso PAF libéré n'est pas détruit mais est réacylé par des acides gras (CHILTON, F.H., 1984; O'FLAHERTY, J.T., 1983; KRAMER, R.M., 1984).

III.1.4. Activité biologique du PAF.

-Le PAF joue un rôle important dans la réaction inflammatoire:

- .c'est un agent d'activation des neutrophiles chez lesquels il stimule le chémotactisme, l'agrégation, la dégranulation et le métabolisme oxydatif (SHAW, J.O., 1981)
- .il stimule l'agrégation et la dégranulation des plaquettes sanguines
- .il augmente la perméabilité vasculaire.

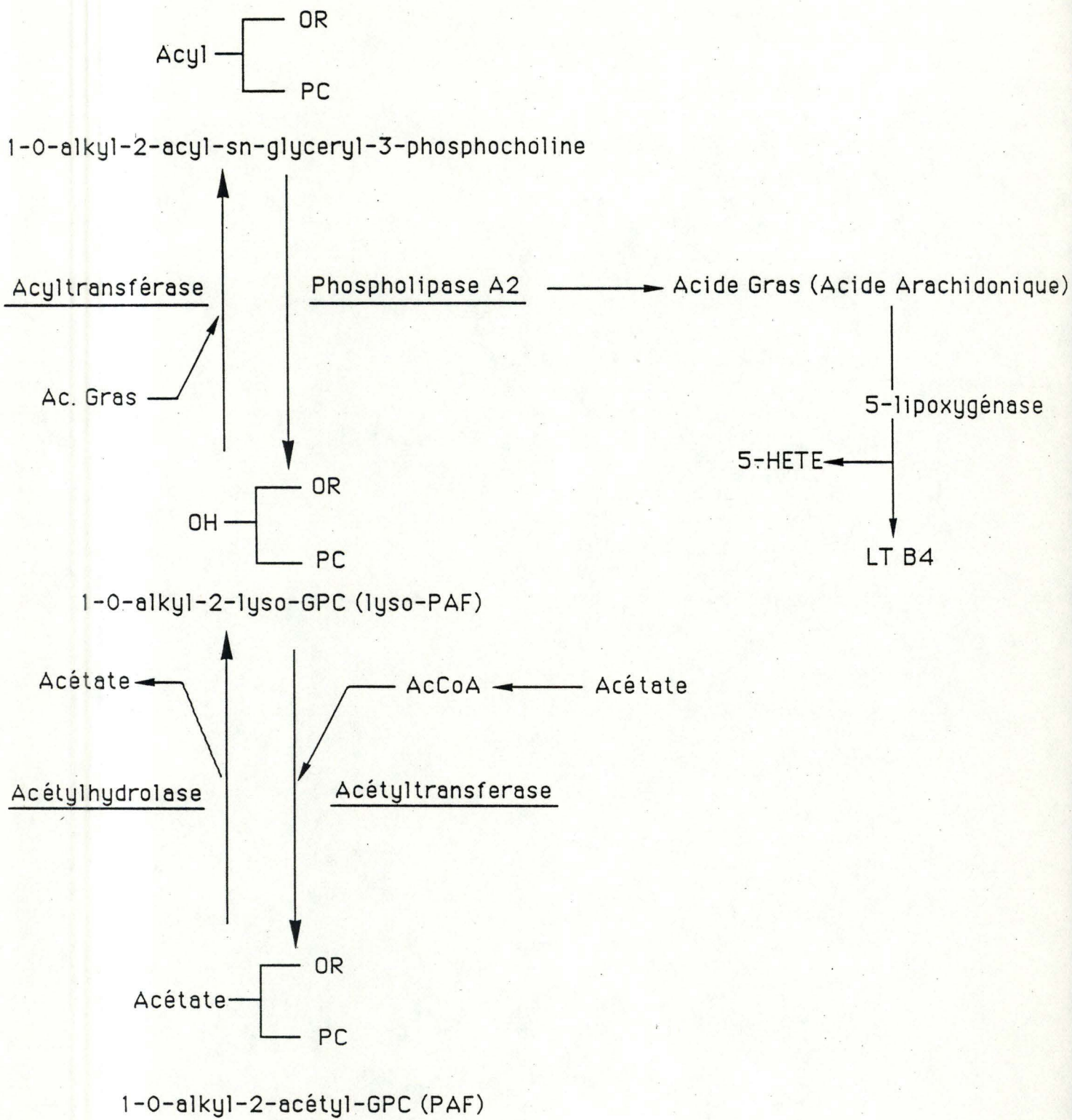


Fig. 2 Représentation schématique du métabolisme du PAF. (PC : phosphocholine ; R : $(\text{CH}_2)_n \text{CH}_3$)

- Il est également impliqué dans l'asthme: c'est un agent bronchoconstricteur extrêmement puissant.
- Il provoque l'exsudation du plasma, l'hémococoncentration et l'hypotension.
- Il est responsable d'arythmies cardiaques.
(O'FLAHERTY, J.T., 1983; BENVENISTE, J., 1985)
- On vient aussi de montrer qu'il possède un puissant effet ulcérogénique sur l'estomac (ROSAM, A.C., 1986).

III.2. LES METABOLITES DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE.

L'acide arachidonique et le PAF sont libérés de manière concomitante par les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) activés (figure 2).

En effet, plusieurs études ont montré que l'acide arachidonique libéré par la phospholipase A_2 lors de l'activation de ces cellules provient en grande partie de l'alkyl acyl GPC, qui est le précurseur du PAF.
(SWENDSEN, C.L., 1983; CHILTON, F.H., 1984)

CHILTON (1983) a démontré que la réacylation du lyso PAF se fait aussi préférentiellement avec de l'acide arachidonique, ce qui contribue à enrichir l'alkyl acyl GPC en cet acide gras.

III.2.1. Métabolisme de l'acide arachidonique.

L'acide arachidonique libéré est métabolisé d'une part en prostaglandines et thromboxane, par la voie de la cycloxygénase, et d'autre part en leucotriènes et HETE'S grâce aux diverse lipoxygénases. (CRASTES DE PAULET, 1983; BORGEAT, 1983).

La figure 3 illustre le schéma général du métabolisme de l'acide arachidonique; il indique bien le nombre important de médiateurs qui peuvent être produits par ces deux voies métaboliques.

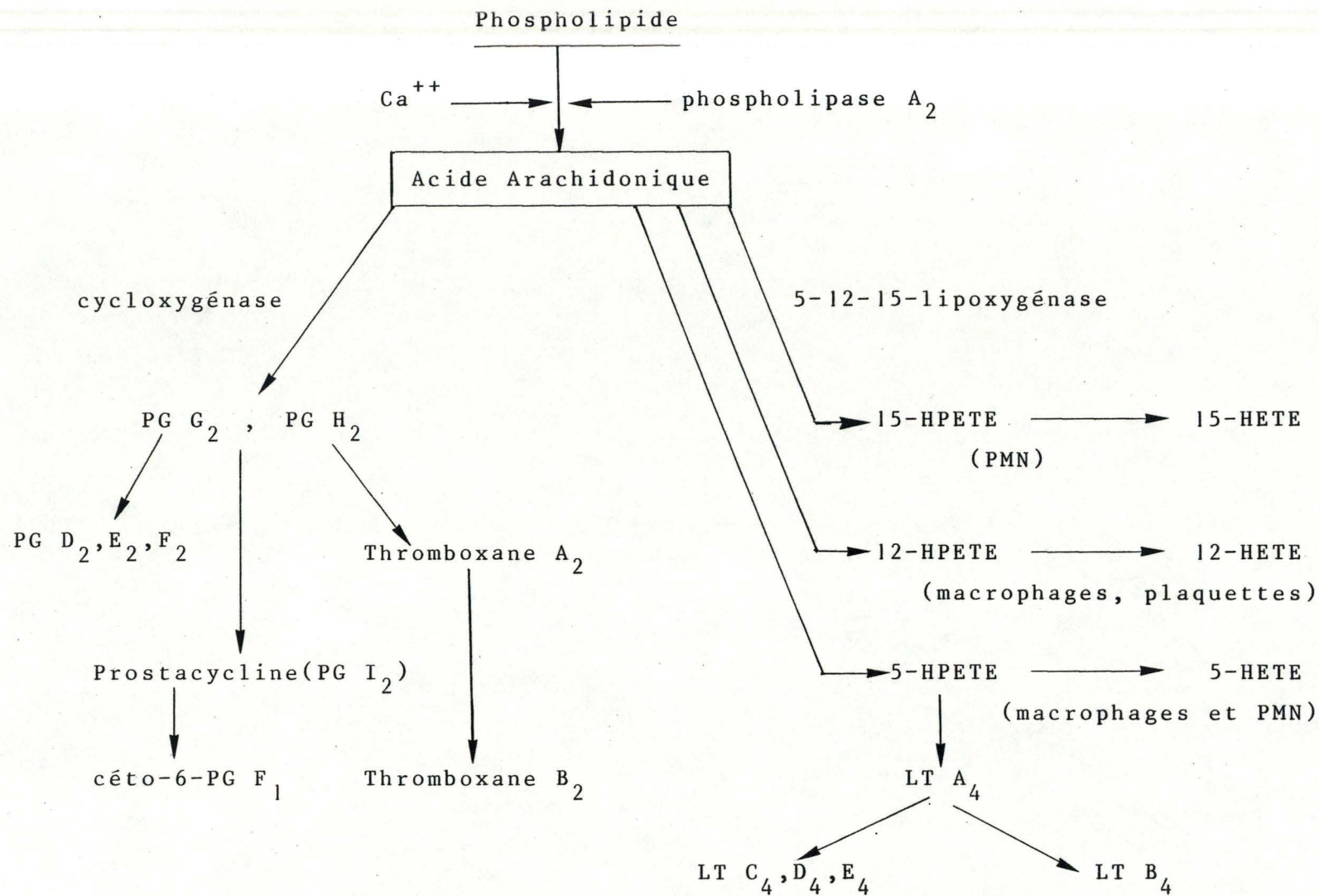


Fig. 3 : Schéma général du métabolisme de l'acide arachidonique

(d'après Borgeat et al., 1983);

HPETE = acide hydroperoxy éicotétraénoïque;

HETE = acide hydroxy éicotétraénoïque.

IV. POSITION DU PROBLEME.

Nous avons répertorié très succinctement ci-dessus les diverses molécules qui sont produites et/ou libérées lors des processus inflammatoires et de l'activation des phagocytes.

Le problème général dans lequel se situe notre mémoire est celui de la régulation de ce processus inflammatoire par l'intervention des diverses cellules et des médiateurs chimiques qui sont synthétisés. Il s'agit évidemment d'un problème très complexe que nous devons restreindre considérablement dans le cadre d'un travail de mémoire.

Tout d'abord, nous nous limiterons à l'étude des polymorphonucléaires de bovins que nous activerons grâce à l'utilisation d'un ionophore du Ca^{++} . On sait que dans ces conditions, les cellules synthétisent le PAF, le LTB_4 et le 5-HETE.

Nous nous sommes demandés laquelle de ces trois substances serait responsable de l'activation de la cellule et notamment de l'augmentation de l'activité de l'oxygénase produisant les intermédiaires réactionnels. E.REMY (1985) avait déjà montré que l'inhibition de la lipoxygénase entraînait une inhibition dans la production de radicaux libres, mais la production de leucotriènes seule, ne pouvait pas rendre compte de l'activation des cellules.

Nous avons donc décidé de considérer le PAF comme un candidat possible pour expliquer le phénomène d'activation cellulaire.

Etant donné qu'il est normalement synthétisé conjointement avec les leucotriènes, nous avons donc commencé par rechercher une possibilité d'inhibition de la synthèse du PAF sans toucher à la synthèse des leucotriènes.

Par la suite, nous avons abordé le problème que nous avons posé ci-dessus, à savoir quelle était la relation entre la synthèse du PAF et l'activation des phagocytes que nous avons suivie par la production de dérivés oxygénés et la dégranulation.

MATERIEL ET METHODES.

I. PREPARATION DES LEUCOCYTES POLYMORPHONUCLEAIRES.

I.1. SOLUTIONS.

A = Solution NaCl 0,12M tamponnée à pH 6,8 par une solution phosphate 0,0132M

B = Solution NaCl 0,46M tamponnée à pH 6,8 par une solution phosphate 0,0132M

C = Solution EDTA 0,04M préparée ds la solution A

H = Solution de HANKS modifiée, sans calcium

Composition: 0,65mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,64mM KH_2PO_4 ;
4,65mM KCl; 132,56mM NaCl;
23,84mM Tris; 9,60mM glucose;
tamponnée à pH 7,4.

I.2. METHODE.

- Dans 6 bouteilles de centrifugation de 250 ml, placer 10 ml de solution C et 100 ml de sang de bovin.

- Centrifuger 20 min. à 2000 RPM et 20°C au rotor JA 14 (Beckman, J 21 -B).

- Aspirer le surnageant contenant les plaquettes, ainsi que la couche blanchâtre de monocytes et lymphocytes qui recouvrent le culot de globules rouges.
- Lyser les globules rouges au moyen d'un premier choc hypotonique. Pour ce faire:
 - . ajouter aux globules rouges 100 ml d'eau distillée et agiter 30 sec.
 - . rétablir l'isotonicité en ajoutant 50 ml de solution B.
- Centrifuger 20 min. à 1100 RPM et 20°C au rotor JA 14 (Beckman, J 21-B).
- Enlever le surnageant contenant les globules rouges lysés.
- Resuspendre le culot dans 10 ml de solution A.
- Rassembler le contenu de chaque récipient dans une seule bouteille.
- Centrifuger 20 min à 1100 RPM et 20°C au rotor JA 14 (Beckman, J 21-B).
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 10 ml de solution A.
- Lyser les derniers globules rouges par un second choc hypotonique; pour cela:
 - . ajouter 50 ml d'eau distillée et agiter 30 sec.
 - . ajouter 25 ml de solution B pour rétablir l'isotonicité.
- Centrifuger 20 min. à 1100 RPM et 20°C au rotor JA 14 (Beckman, J 21-B).

- Les PMN purifiés sont resuspendus dans leur milieu d'incubation (Tampon de HANKS modifié) et conservés à 0°C jusqu'au moment de leur utilisation. Une estimation de la quantité de cellules est réalisée par comptage à l'hémocytomètre (chambre de Neubauer).

II. DOSAGE DU PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF).

II.1. PAR MARQUAGE RADIOACTIF.

II.1.1. Principe.

Dans notre laboratoire, E.REMY (1986) a montré que les polymorphonucléaires neutrophiles de bovins, stimulés par l'ionophore du calcium, ont la capacité d'incorporer dans le PAF l'acide acétique radioactif présent dans le milieu d'incubation.

L'acétate tritié est tout d'abord fixé sur le coenzyme A pour être ensuite transféré en position 2 du lyso-PAF, formant ainsi du PAF marqué:
1-O-alkyl-2-³H|acétyl-GPC (V. figure 2).

II.1.2. Méthode.

II.1.2.1. Incubation des cellules.

- Placer dans un tube de centrifugation 4 ml de tampon d'incubation contenant les PMN ($1,2 \cdot 10^8$) 1,4 mM de CaCl₂ et la molécule à tester.
- Préincuber 5min. à 37°C en présence de 160 µCi de ³H|acétate (Amersham, Belgique).
- Stimuler les PMN avec 3,18 µM d'ionophore A23187 (Sigma, StLouis).

- Incuber 4 min.
- Arrêter la réaction avec 15 ml de méthanol/chloroforme (2/1; V/V).

Rem: Durée totale de préincubation:

- . p Bromophénacyl Bromide (BPB) (Janssen, Belgique) : 10 min.
- . acide arachidonique (AA) (Sigma, StLouis) : 5 min.

II.1.2.2. Extraction et séparation sur TLC.

La procédure d'extraction des lipides totaux est tirée de la méthode de BLIGH and DYER (1959).

- Les cellules et le milieu d'incubation sont extraits avec 15 ml de méthanol/chloroforme (2/1; V/V) en conservant une agitation constante durant 20 min. en chambre froide.
- Le mélange est ensuite centrifugé 10 min. à 2300 g pour enlever les débris cellulaires.
- Le surnageant reçoit 5 ml de chloroforme et est agité durant 30 sec.; il reçoit ensuite 5 ml d'eau distillée et est agité 30 sec..
- La phase chloroforme, séparée de la phase supérieure, est lavée une fois avec 19 ml de méthanol/eau (1/0,9; V/V) pour enlever 1' ^3H | acétyl-coA et 1' ^3H | acétate résiduels. Elle est ensuite évaporée sous un flux d'azote.
- Les lipides sont alors resuspendus dans 350 μl de chloroforme/méthanol (4/1; V/V) pour être déposés sur une plaque de silica gel de 0,25 mm (Merck, RFA).

- Le PAF est séparé par chromatographie sur couche mince (TLC) utilisant le système de solvant:
 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{OOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50:25:8:4, en volume).

II.2. PAR AGREGATION DES PLAQUETTES.

II.2.1. Principe.

II.2.1.1. Mécanismes d'agrégation des plaquettes.

Trois médiateurs intracellulaires, l'ADP, le thromboxane et le PAF, sont responsables de l'agrégation des plaquettes qui peut être provoquée par des agents, comme la thrombine, le collagène ou l'ionophore calcique A23187 + Ca^{++} .

Les différents mécanismes d'agrégation sont représentés à la figure 4.a.

La PLA_2 stimulée par la thrombine, le collagène ou l'ionophore du Ca^{++} libère l'acide arachidonique et le PAF.

L'AA est métabolisé en TXA_2 , qui déclenche l'agrégation soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de l'ADP. Le même mécanisme est applicable au PAF qui agit directement ou indirectement via l'ADP.

L'inhibition de l'agrégation par des inhibiteurs de la PLA_2 peut être court-circuitée par addition directe de PAF ou d'AA.

Le schéma montre également que l'agrégation peut encore se faire en présence d'inhibiteurs de la cycloxygénase (indométhacine) par l'intermédiaire du PAF. (VARGAFTIG, B.B., 1981).

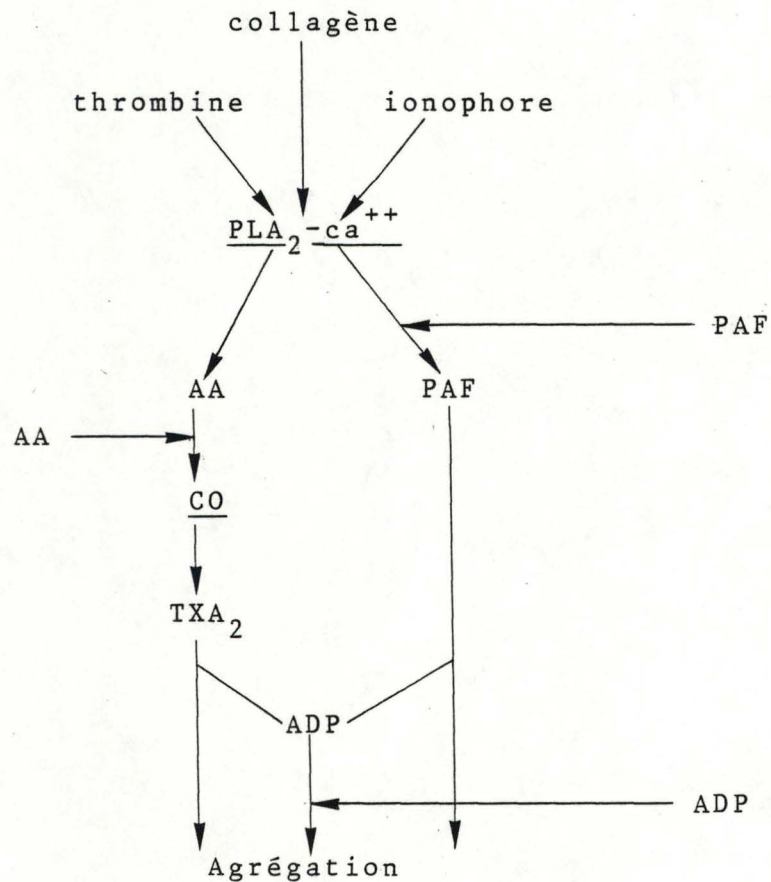


Fig 4 a : Schéma des divers métabolites intervenant dans l'agrégation des plaquettes .
 PLA₂ : Phospholipase A₂ ; CO : Cycloxygénase ; AA : acide arachidonique ; TXA₂ : Thromboxane A₂ ; PAF : Platelet-activating factor .

II.2.1.2. Inhibition spécifique de l'agrégation due au PAF.

E.KORNECKI (1984) a montré que les triazolobenzodiazépines, triazolam et alprazolam (Upjohn), sont des antagonistes spécifiques du PAF pour l'agrégation des plaquettes.

II.2.2. Méthode.

II.2.2.1. Solutions.

- . CaCl_2 : solution 0,2 M ds l'eau distillée.
- . ionophore du calcium A23187 (Sigma Chemical co, St Louis) solution 1,59 mM ds l'éthanol.
- . molécules à tester:
 - Palmitoyl lyso GPC (Sigma Chemical co, St Louis)
 - Lyso-PAF isomère (Serva, Suisse)
 dissoutes dans 5% d'éthanol + 95% de tampon d'incubation contenant 0,25% de sérum albumine bovine (Sigma Chemical Co, St Louis).
- . Solution citrate: 3,8% de tri-sodium citrate + 2% de D-glucose ds l'eau distillée.
- . Tampon Tyrode (= TG)
 - 2,6 mM KCl; 1 mM $\text{Hg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 24 mM NaHCO_3 ;
 - 137 mM NaCl; glucose: 0,1%; gélatine: 0,25%.
 - TG + CaCl_2 : 1,3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dissous dans TG; pH 7,3
 - TG + EGTA : 0,2 mM EGTA dissous dans TG; pH 6,5
- . Indométhacine (Sigma Chemical co, St Louis): 1,5 mg/ml dans l'éthanol.

II.2.2.2. Production du PAF par les PMN.

- Placer dans un tube de centrifugation 1,9 ml de tampon d'incubation contenant les PMN (concentration finale: $30 \cdot 10^6$ /ml) et 0,1ml de la molécule à tester.
- Ajouter 14 μ l de CaCl_2 0,2 M (concentration finale: 1,4 mM).
- Préincuber 5min. à 37°C.
- Stimuler les PMN avec 4 μ l d'ionophore du calcium (concentration finale : 3,18 μ m).
- Incuber 4 min..
- Arrêter la réaction avec 7,5 ml d'un mélange chloroforme/méthanol (1/2; V/V).

II.2.2.3. Extraction des lipides (extraction de BLIGH and DYER, 1959).

- Agiter le test 20 min. à 0°C.
- Centrifuger 10 min. à 6000 RPM et 0°C au rotor JA 20 (Beckman, J 21-B).
- Ajouter au surnageant:
 - 2,5 ml de chloroforme et agiter 30 sec..
 - 2,5 ml d'eau et agiter 30 sec..
- Récupérer la phase inférieure contenant les lipides.
- Evaporer le chloroforme sous un flux d'azote.

- Resuspendre les lipides dans 500 μ l de la phase mobile qui sera utilisée lors de la chromatographie liquide à haute pression (HPLC).

II.2.2.4. Séparation des lipides sur HPLC.

L'appareil HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) est un appareil Kontron HPLC System 600 ; il est équipé d'une colonne lichrosorb DIOL (phase inverse).

Composition de la phase mobile:

T-Buthyl-Méthyl-Ether/Méthanol/H₂O/NH₄OH
(235/65/10/0,02; V/V).

Le débit est réglé sur 2 ml/min..

Le volume d'élution du PAF est connu par un étalonnage avec du ^3H -PAF standard (Amersham, Belgique).

- Pour chaque test, on récolte la fraction correspondant au volume d'élution du PAF. Le solvant est ensuite évaporé sous un flux d'azote.
- On resuspend le PAF dans 200 μ l d'éthanol + 800 μ l de TG + CaCl₂ contenant 0,25% de BSA délipidée (Sigma Chemical Co, St Louis).

II.2.2.5. Dosage du PAF.

a. Préparation des plaquettes.

- Dans 8 tubes, mettre 0,5 ml de solution citrate.
- Ajouter 4,5 ml de sang de lapin.

- Centrifuger, immédiatement après le prélèvement, à 200 g pendant 15 min.
- Rassembler les surnageants contenant les plaquettes dans 4 tubes, et centrifuger à 1500 g pendant 15 min..
- Resuspendre les plaquettes dans 2,5 ml de TG + EGTA (pH 6,5) et les rassembler dans 2 tubes.
- Centrifuger 15 min. à 1500 g .
- Resuspendre les plaquettes dans 2 ml de TG + EGTA (pH 6,5) et les rassembler dans un seul tube.

b. Dosage.

Le dosage est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre à 2 faisceaux (Perkin-Elmer 557, Tokyo).

La mesure est effectuée à 37°C et 530 nm sous agitation constante.

Placer dans la cuvette:

- 1,6 ml de TG + CaCl_2 (pH 7,3)
- 0,4 ml de plaquettes
- 5 μl d'indométhacine (conc. finale: 10^{-5} M).

La réaction est démarrée après une préincubation de 7 min. en ajoutant 10 μl de l'aliquot contenant le PAF.

L'addition de 5 μl de Triazolam (conc. finale: 10 μM) nous permet de vérifier que l'agrégation observée est bien due au PAF.

c. Mesures et calculs.

La figure 4.b. montre une réponse typique d'agrégation obtenue avec le PAF.

L'agrégation est quantifiée en % de la variation maximale d'absorbance, lorsque l'on considère la suspension plaquettaire de départ comme étant le zéro d'agrégation, et l'absorbance obtenue avec le tampon seul comme 100% .

Différentes concentrations en PAF standard ont été testées sur l'agrégation des plaquettes (figure 4.c.). Le % d'agrégation est proportionnel à la quantité de PAF entre 0 et 20 pM.

L'aliquot contenant le PAF produit par les PMN est dilué de telle sorte que l'on se trouve dans la zone linéaire.

III. DOSAGE DE LA PRODUCTION DE DERIVES OXYGENES.

METHODE DE LA CHEMOLUMINESCENCE.

III.1. PRINCIPE.

La chémoluminescence représente une émission de lumière qui, en général, pour être mesurable nécessite la présence d'une molécule "amplificatrice". Elle peut être utilisée pour la détection de radicaux oxygénés (H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$, 1O_2).

La molécule amplificatrice réagit alors avec ces radicaux oxygénés émis par les phagocytes lors de la poussée d'activité respiratoire. Elle est excitée et lors de son retour à l'état initial, elle émet un photon qui peut être détecté par un photomètre.

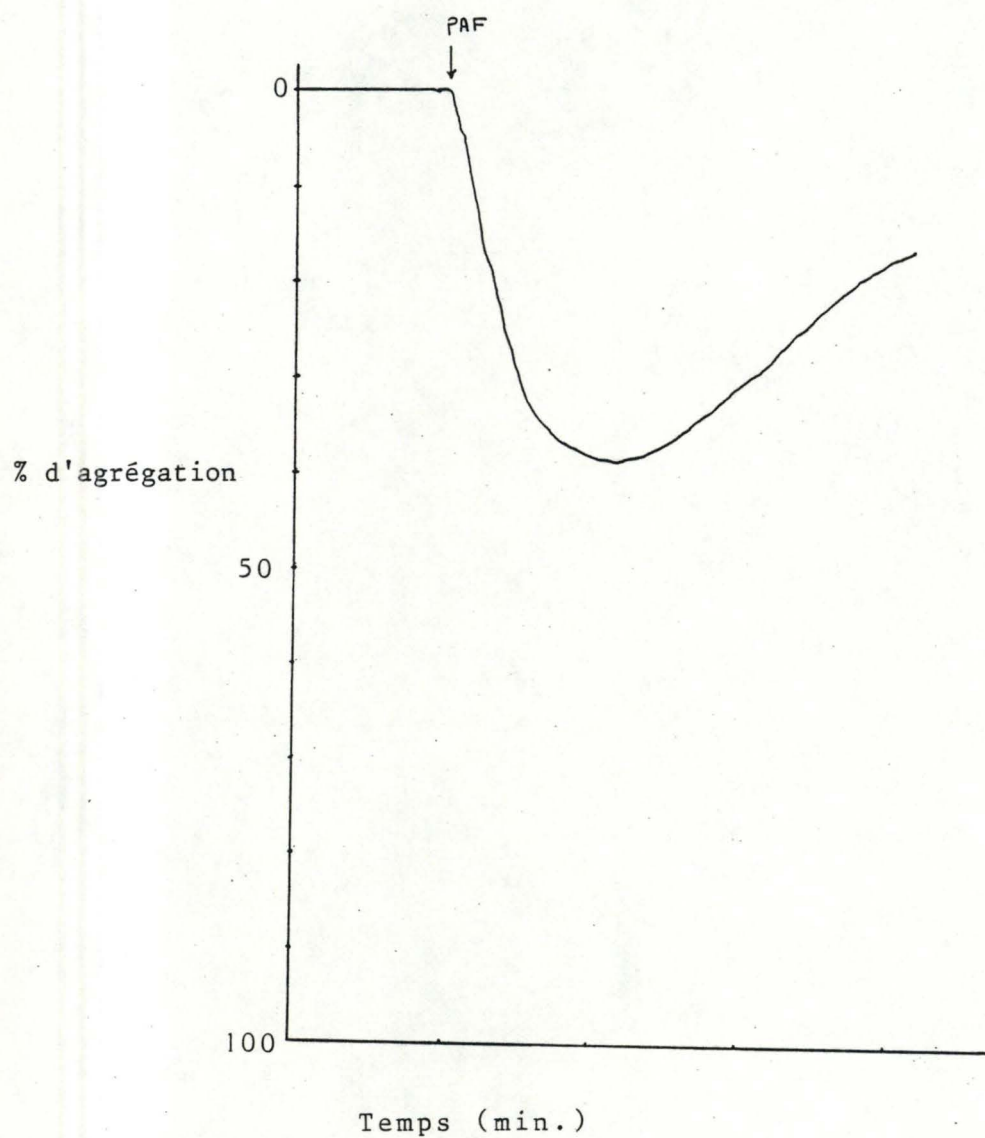


Fig. 4.b : Réponse typique d'agrégation des plaquettes obtenue par addition d'un échantillon de PAF.

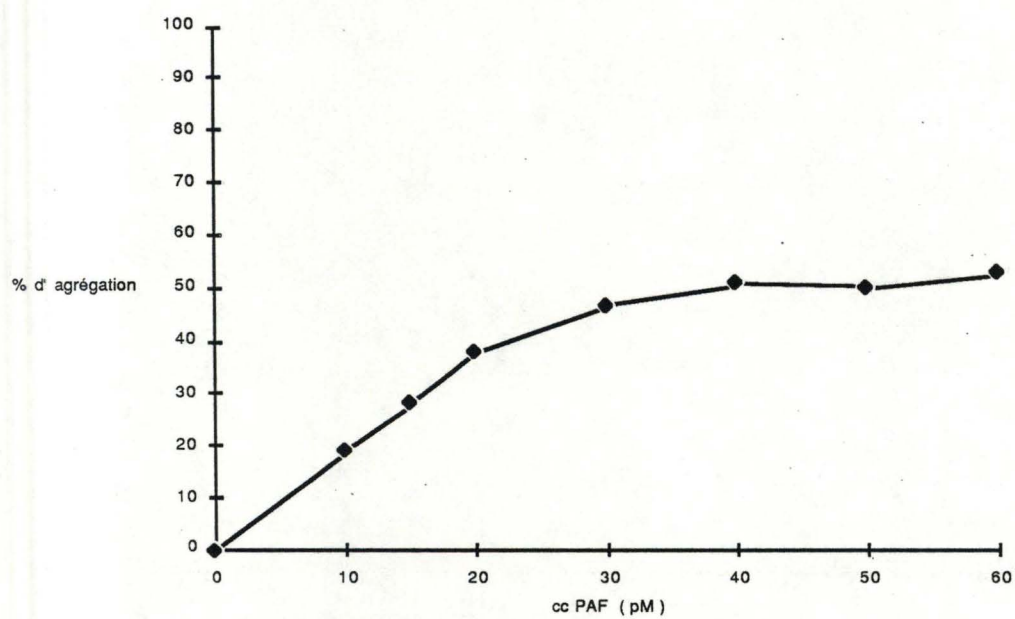
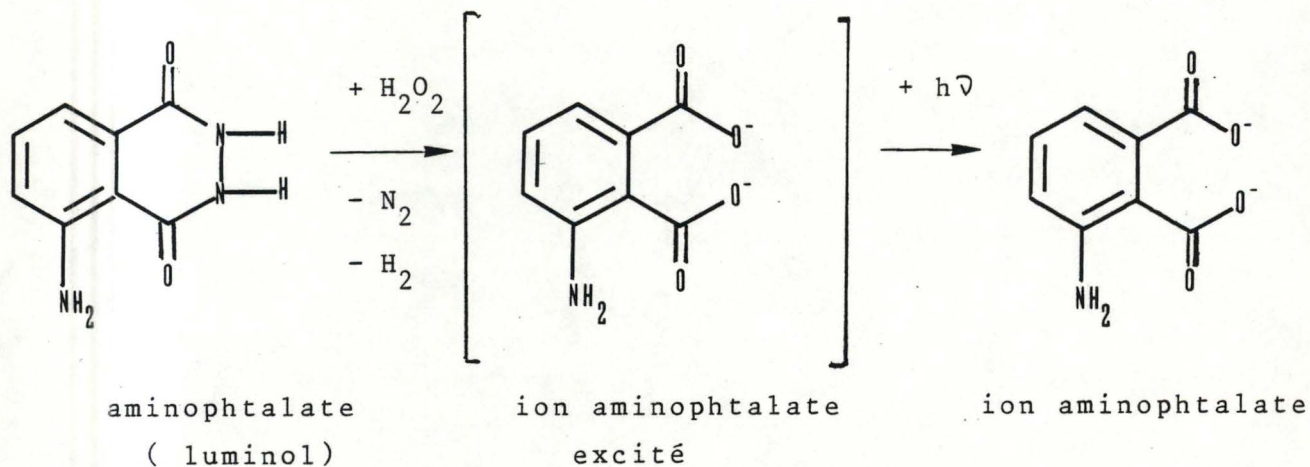


Fig. 4.c : Agrégation des plaquettes:
Courbe d'étalonnage réalisée en fonction de la
quantité de PAF dans le milieu de dosage.

Pour doser les dérivés de $^1\text{O}_2$, nous utiliserons le luminol, qui réagit principalement avec H_2O_2 et $^1\text{O}_2$. (MULLER-PEDDINGHAUS, 1984).

Le principe de la réaction qui se déroule lors de cette activation du luminol est le suivant:



III.2. DOSAGE.

III.2.1. Solutions.

. HBSS = solution salée de HANKS sans calcium.

Composition pour 1 litre:

NaCl	8 g
glucose	1 g
KCl	0,4 g
NaHCO_3	0,35 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,100 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,100 g
$\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,060 g
KH_2PO_4	0,060 g

. Luminol (Sigma, St Louis): $2 \cdot 10^{-3}$ M dissous dans du DMSO et dilué dans HBSS.

. CaCl_2 : solution 0,2M dans l'eau distillée.

- . Molécules à tester :dissoutes dans l'éthanol.
- p-Bromophénacyl bromide (BPB) (Janssen, Belgium)
- Acide arachidonique (AA) (Sigma, StLouis)

III.2.2. Méthode.

Le dosage est réalisé à 37°C sur un photomètre (Biocounter Lumac M2010, Schaesberg, Netherlands). On maintient une agitation constante tout au long de l'expérience, grâce à un agitateur magnétique. Les leucocytes polymorphonucléaires sont maintenus à 0°C jusqu'au moment de leur utilisation.

Placer dans la cuvette du photomètre:

- . 932 μ l de tampon auquel on ajoute 44,8 μ l de cellules (concentration finale: 1,4 mM)
- . 7,7 μ l de CaCl_2 0,2M (conc. finale: 1,4 mM)
- . 110 μ l de luminol $2 \cdot 10^{-3}$ M (concentration finale: $2 \cdot 10^{-4}$ M)

Préincuber 10 min. à 37°C.

- . Stimuler avec 3,3 μ l d'ionophore (concentration finale: 3,18 μ M)

Molécules à tester:

- 2,2 μ l de la molécule à tester sont ajoutés:
 - en même temps que le luminol, les cellules et le CaCl_2 , pour le BPB.
 - après 5 min. de préincubation, pour l'AA.

Dans ce contrôle, le solvant seul est ajouté à la préparation.

III.2.3. Calcul des résultats.

La figure 5 montre l'évolution de la chémoluminescence au cours de l'expérience. Lorsque l'activateur est ajouté aux cellules, on observe d'abord une période de latence suivie d'une montée spectaculaire de la chémoluminescence qui atteint un optimum au bout de quelques minutes.

L'aire d'intégration de la courbe, entre le moment de la stimulation et la 5^{ième} minute qui suit cette stimulation a été utilisée comme mesure de production radicalaire. On verra ci-dessous que cette mesure permet d'évaluer avec précision l'ampleur de la production de chémoluminescence par les PMN activés.

III.3. MISES AU POINT.

III.3.1. Influence de la concentration en luminol.

Nous avons d'abord voulu réaliser le dosage dans des conditions optimales. Dans ce but, nous avons incubé les cellules avec des concentrations croissantes en luminol.

La figure 6 montre qu'après stimulation des PMN avec l'ionophore, la chémoluminescence atteint un optimum pour une concentration en luminol proche de $2 \cdot 10^{-4}$ M. Au-delà de cette valeur, le luminol semble avoir un effet inhibiteur, probablement dû à un effet de "quenching".

Dans la suite, nous utiliserons une concentration en luminol de $2 \cdot 10^{-4}$ M.

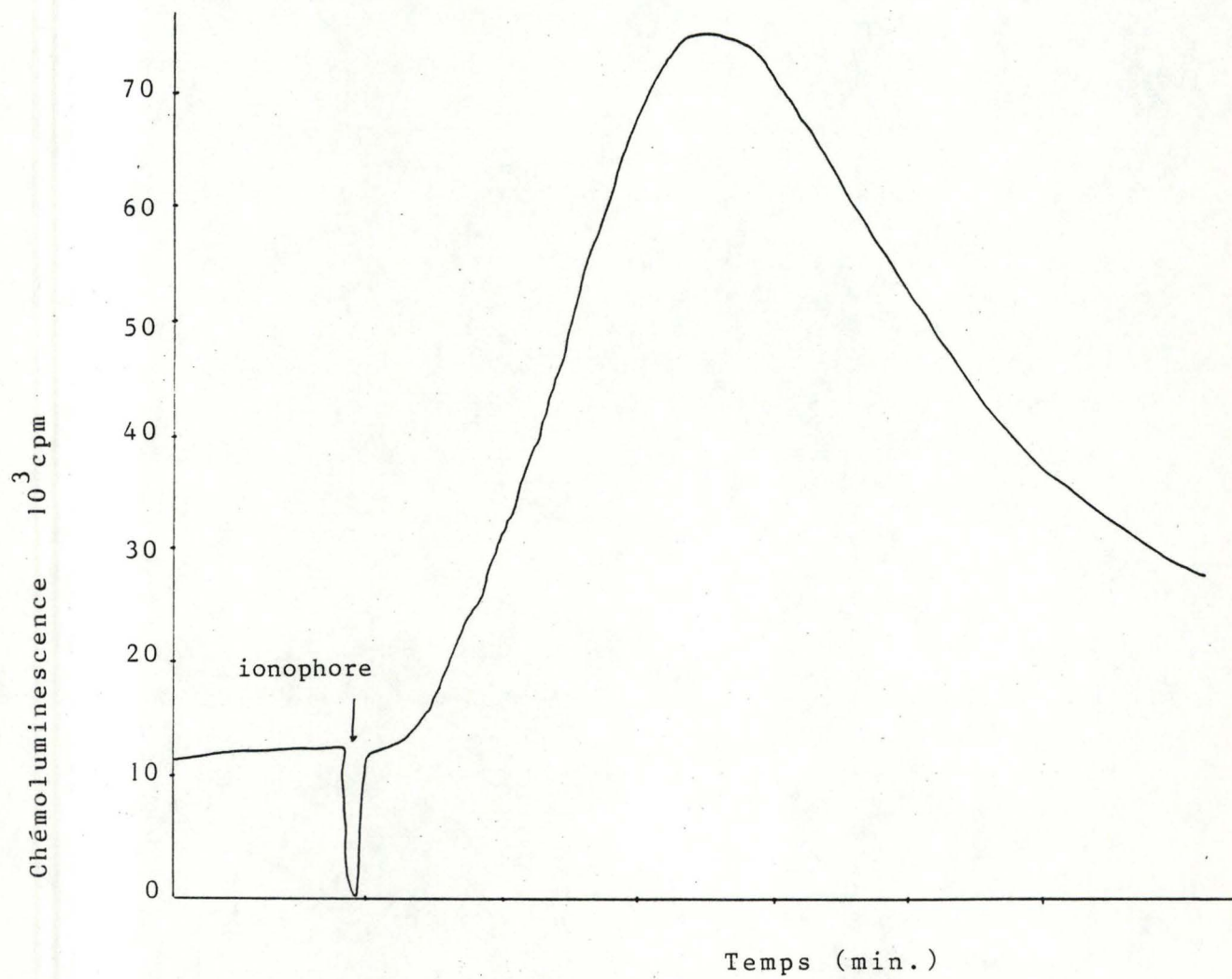


Fig. 5 : Evolution au cours du temps de la chémoluminescence de PMN stimulés par l'ionophore du Ca^{++} .

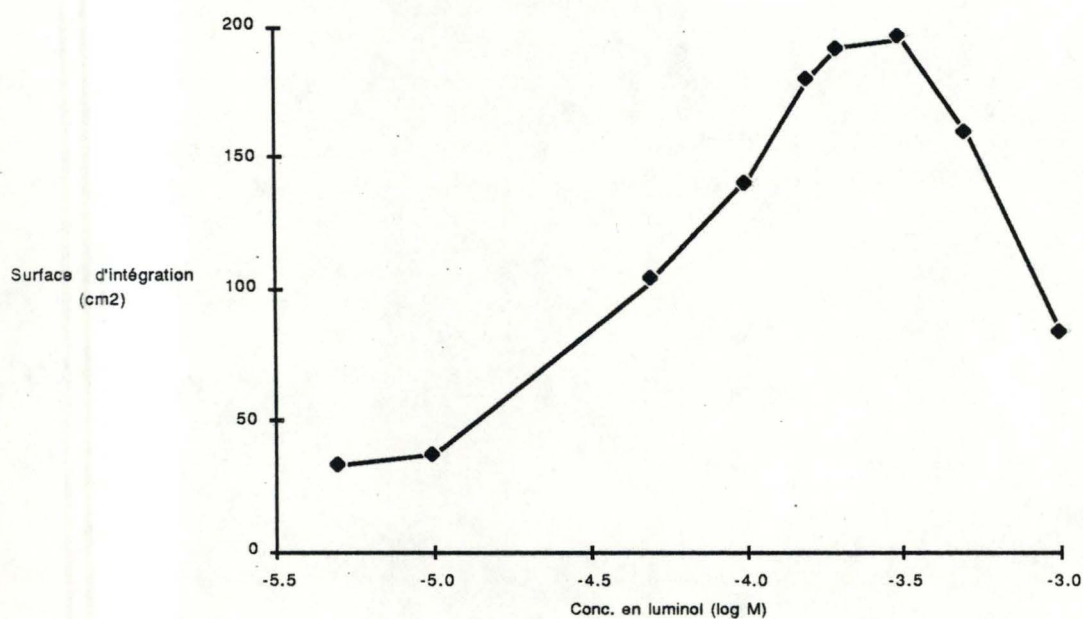


Fig. 6 : Effet de la concentration en luminol sur la production d' $O_2^{\cdot -}$. Les PMN de bovins ont été activés par l'ionophore du Ca^{++} et incubés en présence de luminol à diverses concentrations. L'émission lumineuse est représentée par l'aire d'intégration au cours des 5 premières minutes après la stimulation.

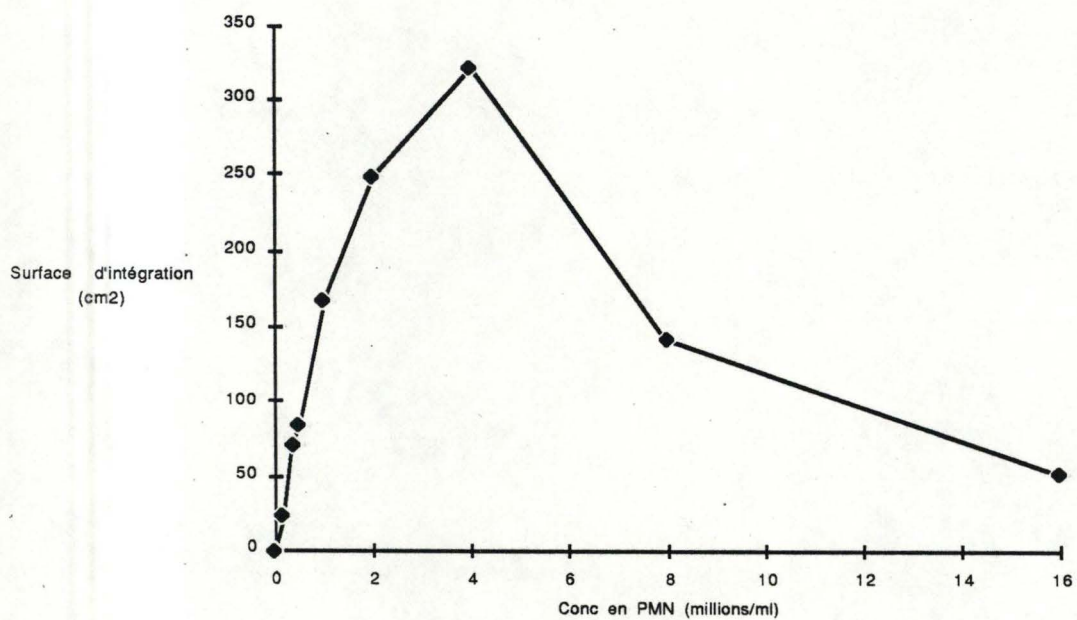


Fig. 7 : Courbe d'étalonnage du dosage par chémoluminescence de la production de dérivés oxygénés lors de l'activation des PMN par l'ionophore du Ca^{++}

III.3.2. Influence de la concentration en cellules.

La figure 7 représente l'effet de la concentration en cellules sur la production de dérivés oxygénés. Nous observons qu'il y a une zone linéaire entre 0 et 1×10^6 cellules/ml ; la proportionnalité décroît entre 2 et $4 \cdot 10^6$ cellules/ml pour atteindre un maximum pour $4 \cdot 10^6$ de cellules par ml.

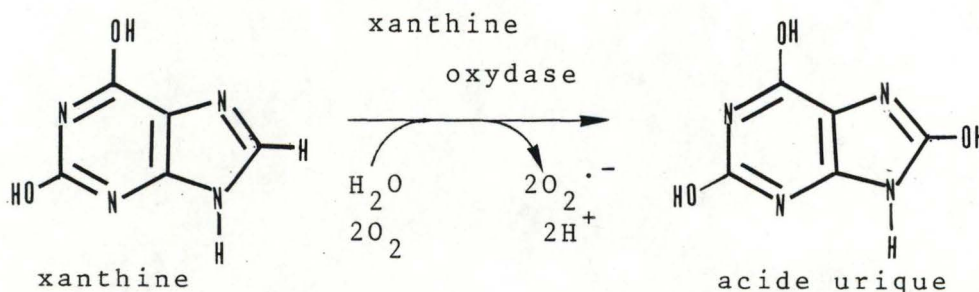
Pour la suite des expériences, nous choisirons une concentration en cellule qui se situe dans la zone linéaire.

En ce qui concerne les autres paramètres (concentration en calcium et en ionophore), nous utiliserons les mêmes concentrations que pour la synthèse de PAF, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans les différentes expériences.

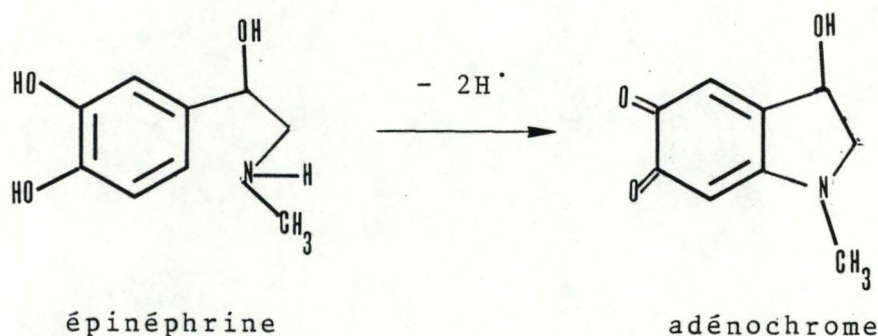
IV. UTILISATION DE LA XANTHINE OXYDASE POUR LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES.

IV.1. PRINCIPE.

La xanthine, en présence de xanthine oxydase, se transforme en acide urique en produisant des radicaux $O_2^{\cdot -}$.



Le dosage des radicaux $O_2^{\cdot-}$ se fait indirectement par la mesure de l'augmentation d'absorbance de l'adénochrome à 480 nm. Cet adénochrome provient de l'oxydation par les $O_2^{\cdot-}$ de l'épinéphrine qui est ajoutée au système xanthine - xanthine oxydase.



IV.2. DOSAGE.

IV.2.1. Solutions.

- . Tampon TRAP (Merck, Darmstadt) (triéthanol amino-hydrochloride) 20 mM , pH 9 contenant du sucrose 0,25 M et de l'EDTA 20 nM .
- . Xanthine (Sigma Chemical Co., St Louis) 0,1 M solubilisée dans l'eau distillée par quelques gouttes de Na OH concentré.
- . Xanthine oxydase (Sigma) concentrée (20 U/ ml).
- . Epinéphrine (Sigma) 0,1 M dans HCl 0,2 N .

IV.2.2. Méthode.

Le dosage est réalisé sur un spectromètre à 2 faisceaux et 2 monochromateurs (Perkin-Elmer 557, Tokyo, Japon).

La mesure est réalisée à 25°C : l'augmentation d'absorbance est lue à 480 nm avec une lecture de référence à 575 nm .

Placer dans la cuvette:

- 1 ml de tampon TRAP , pH 9
- 25 µl de xanthine
- 10 µl d'épinéphrine
- 5 µl de xanthine oxydase.

La pente obtenue représente l'augmentation d'absorbance due à la formation d'adénochrome. On peut alors ajouter dans la cuvette 100 µl contenant la molécule à tester; la pente obtenue représente le test.

Le rapport entre les deux pentes permet de calculer le pourcentage d'activation ou d'inhibition produite par la molécule .

V. DOSAGE DE LA N-ACETYL- β -GLUCOAMINIDASE.

V.1. SOLUTIONS.

- . Tampon Citrate 50 mM + Triton X-100 0,2% ;
pH = 3,5
- . Tampon glycine-NaOH 50 mM + EDTA 5 mM, pH = 10,5
- . Substrat: 4-méthylumbelliferyl-2-acetamido-2-déoxy- β -D glucopyranoside (Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook Bucks, England): 1 mM dans le tampon Citrate.

V.2. METHODE DE DOSAGE.

V.2.1. Préparation des cellules.

- . 2 ml de tampon de HANKS modifié contenant les PMN (concentration finale: $30 \cdot 10^6$ /ml) sont préincubés à 37°C durant 10 min. en présence de 14 μ l de CaCl_2 et de 4 μ l de la molécule à tester ou d'éthanol pour les contrôles.
- . Les PMN sont stimulés avec 4 μ l d'ionophore (3,18 μ M final) .
- . Arrêter la réaction après 30 min. en plongeant les tubes dans la glace.
- . Centrifuger 10 min. à 1500 RPM à la centrifugeuse de table.
- . Récupérer le surnageant .
- . Resuspendre le culot dans 2 ml de tampon de HANKS contenant 0,1% de triton; mélanger puis centrifuger 10 min. à 4000 RPM.
- . Récupérer le surnageant.

V.2.2. Dosage de la glucosaminidase.

Dans chaque tube, on met:

- 0,4 ml de la solution substrat
- 0,1 ml d'enzyme (diluée de manière adéquate).

Incuber 45 min. à 37°C .

Stopper la réaction avec 2 ml de tampon glycine-EDTA.

Lire l'absorbance au fluorimètre, la longueur d'onde d'excitation étant 360 nm et la longueur d'onde d'émission 460 nm .

Le blanc blanc (BB) contient 0,4 ml de tampon Citrate + triton et 0,1 ml d'eau distillée;

le blanc substrat (BS): 0,4 ml de solution substrat + 0,1 ml d'eau distillée;

les blancs enzymes (B): 0,4 ml de tampon citrate + 0,1 ml d'enzymes.

V.2.3. Calcul.

$$\text{mU/ml} = \frac{(T - B - (BS - BB)) \times \text{dil} \times 2,523 \times 25}{\text{Etalon} \times \text{Temps (min)}}$$

$$\% \text{ de dégranulation} = \frac{\text{mU/ml surnageant}}{\text{mU/ml surn.} + \text{mU/ml culot}} \times 100$$

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\% \text{ de dégranulation (T - R)}}{\% \text{ de dégranulation (C - R)}}$$

T = Test.

C = Contrôle: stimulation des cellules sans les molécules.

R = dégranulation résiduelle, c'est-à-dire lorsque les cellules ne sont pas stimulées.

RESULTATS ET DISCUSSION.

I. INHIBITION SPECIFIQUE DE LA SYNTHÈSE DU PAF.

Nous avons pensé à deux approches possibles permettant d'inhiber spécifiquement la synthèse de PAF sans toucher au métabolisme de l'acide arachidonique:

1. Inhiber l'acétyl-transférase (=acétyl-coA: 1-alkyl-2-lyso-sn-glycéro-3-phosphocholine acétyl-transférase qui est une enzyme spécifiquement responsable de la synthèse de PAF (figure 2) (WYKLE, 1980).
2. Inhiber la phospholipase A₂, qui est impléquée dans la synthèse du PAF et des leucotriènes (fig.2) et restaurer la synthèse des leucotiènes en fournissant à la cellule de l'acide arachidonique exogène.

I.1. INHIBITION "SPECIFIQUE" DE L'ACÉTYL-TRANSFERASE.

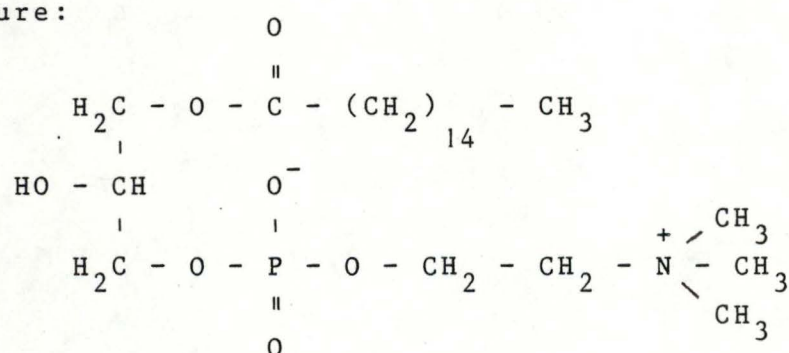
Il nous a semblé intéressant de tester d'abord l'inhibition de l'acétyl-transférase; ce qui permettait l'inhibition de la voie de synthèse de PAF après libération de l'acide arachidonique endogène et donc permettait une synthèse normale des leucotriènes.

Comme on ne dispose pas d'inhibiteurs spécifiques de cette enzyme, nous avons pensé diminuer la synthèse de PAF en utilisant de faux substrats de l'acétyl-transférase qui sont des analogues du lyso PAF.

En effet, il n'était pas possible d'utiliser des analogues de l'acétyl-coA : celui-ci étant impliqué dans beaucoup d'autres réactions que la synthèse de PAF, nous risquions de produire des effets non spécifiques.

I.1.1.Effet du 1-palmitoyl-2-lyso-sn-glycéryl-3-phosphoryl choline sur la synthèse du PAF.

Structure:



1-palmitoyl-2-lyso-sn-glycéryl-3-phosphorylcholine
ou palmitoyl lyso GPC.

Cette molécule paraissait intéressante parce que:

- WYKLE, R.L. (1980) a montré que le palmitoyl lyso GPC a la capacité d'être acétylé au même titre que le lyso PAF par l'acétyl-transférase de microsomes de la rate;
- le 1-palmitoyl-2-acétyl-GPC est ainsi synthétisé en même temps que le PAF par les PMN stimulés; les enzymes impliqués dans le mécanisme de déacylation-réacylation ne montrent donc pas une grande sélectivité pour la liaison C₁ (SATOUCI, K., 1985);
- le 1-palmitoyl-2-acétyl-GPC ainsi synthétisé n'a pas les propriétés d'activation du PAF (O'FLAHERTY, J.T., 1983).

L'idée que nous voulions exploiter était que le palmitoyl lyso GPC exogène pourrait entrer en compétition avec le lyso PAF, produit par la cellule, pour l'acétyl-transférase et diminuer ainsi la synthèse de PAF.

La figure 8 représente l'effet direct du palmitoyl lyso GPC à 2 concentrations sur la synthèse de PAF. Deux contrôles ont été réalisés. Comme nous pouvons le constater, le palmitoyl lyso GPC n'a pas d'effet inhibiteur sur la synthèse de PAF dans ces conditions.

Cependant nous nous sommes demandés si la molécule était disponible en quantité suffisante à l'intérieur des cellules pour inhiber efficacement l'acétyl-transférase.

Nous avons donc voulu enrichir l'ensemble cellulaire de phospholipides en palmitoyl arachidonoyl GPC en préincubant le palmitoyl lyso GPC pendant une heure en absence d'ionophore.

Cet enrichissement en phospholipides est possible puisque nous avons constaté que le [^3H] lyso PAF est reconverti en 1-O- ^3H alkyl-2-acyl-GPC par les PMN non stimulés. La figure 9 représente cette transformation au cours du temps. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité totale récupérée. On constate qu'après 45 minutes d'incubation à 37°C, 70% du lyso PAF est converti en alkyl acyl GPC.

D'autre part, CHILTON (1983) a démontré que le palmitoyl lyso GPC, comme le lyso PAF, était préférentiellement réacylé par l'acide arachidonique.

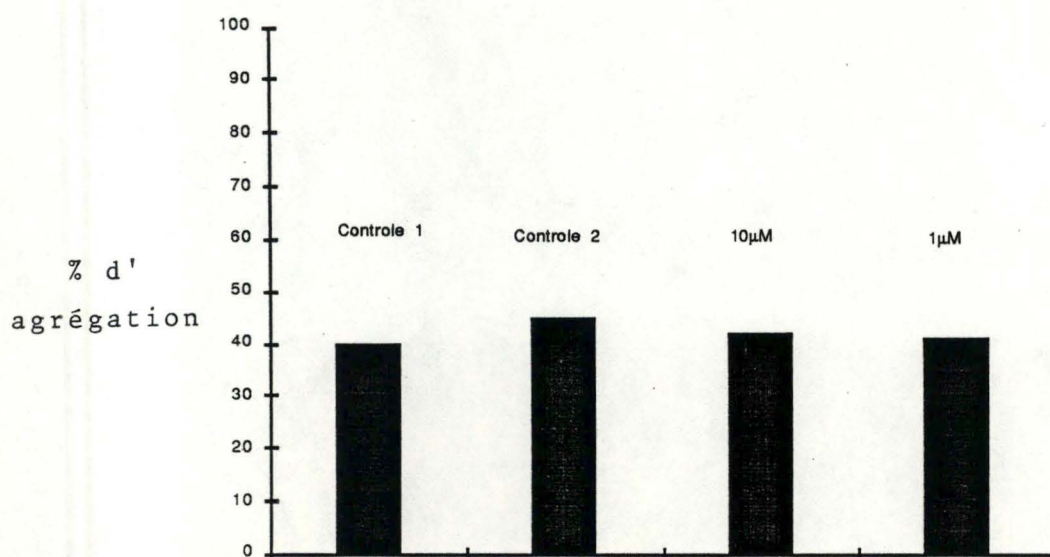


Fig. 8 : Effet de la présence de palmitoyl lyso-GPC sur la synthèse du PAF obtenu par stimulation des PMN par l'ionophore du Ca^{++} . La quantité de PAF synthétisée est mesurée par son pouvoir d'agrégation des plaquettes.

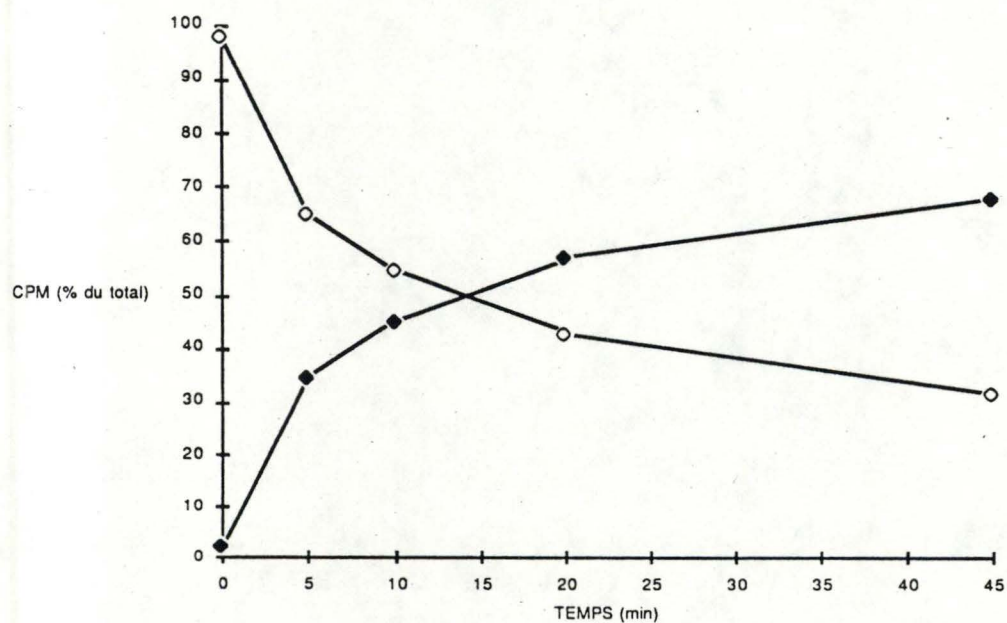


Fig. 9 Cinétique de la conversion du [³H]lyso-PAF en 1-O-[³H]alkyl-2-acyl-GPC par les PMN non stimulés. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité totale contenue dans le [³H]lyso-PAF (○) et le 1-O-[³H]alkyl-acyl-GPC (●).

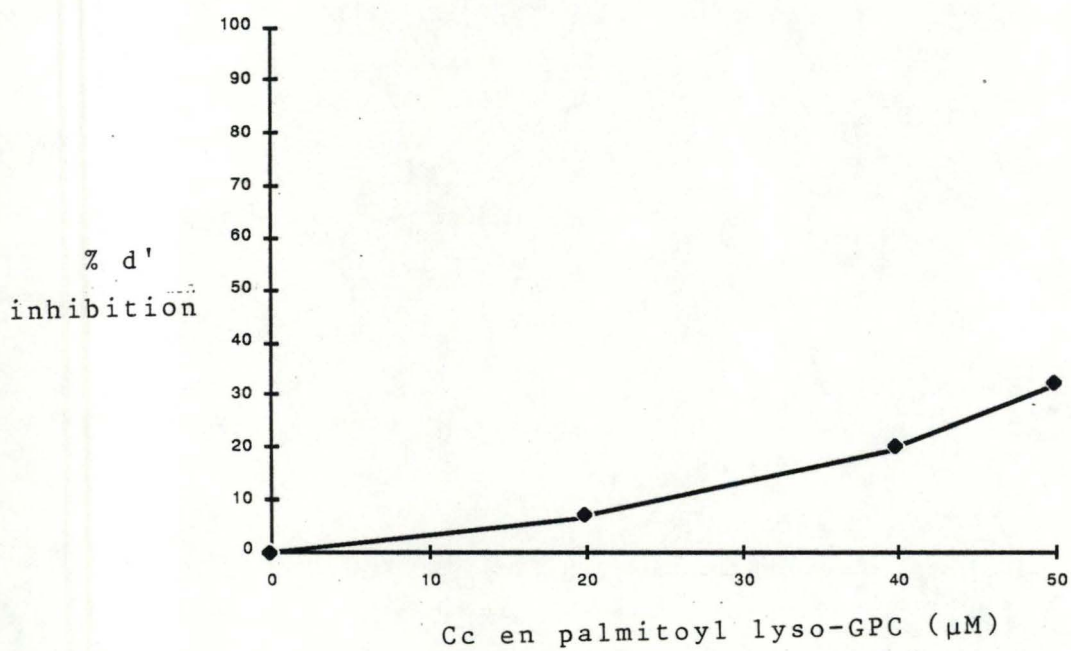


Fig. 10 : Effet de la préincubation des PMN pendant 1 h. en présence de concentrations croissantes en palmitoyl lyso-GPC sur la synthèse du PAF produit après stimulation des PMN par l'ionophore du Ca^{++} .
Les résultats sont exprimés en % d'inhibition de la production du PAF par rapport aux contrôles incubés sans palmitoyl lyso-GPC.

Une fois cette préincubation réalisée, l'on pouvait stimuler les PMN et envisager une compétition endogène entre le palmitoyl lyso GPC et le lyso PAF puisque la phospholipase A₂ hydrolyse également le palmitoyl-2-acyl-GPC (SATOUCI, K., 1985).

A la figure 10, nous avons représenté les résultats d'une telle expérience, c'est-à-dire l'effet de la préincubation pendant une heure des PMN en présence du palmitoyl lyso GPC à diverses concentrations sur la synthèse du PAF.

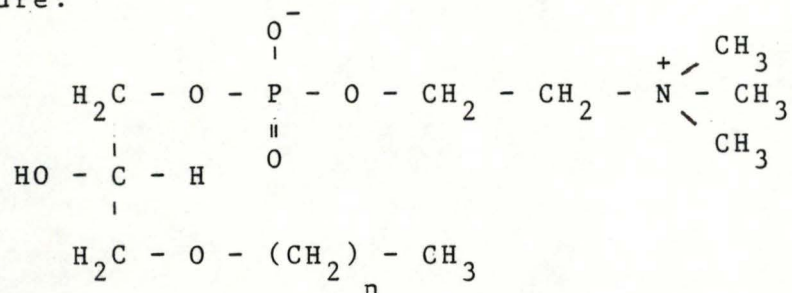
Deux contrôles sans molécule ont été réalisés et sont posés à 0% d'inhibition. Les tests ont été réalisés en double. Nous constatons bien un effet inhibiteur du palmitoyl lyso GPC sur la synthèse du PAF, mais cet effet est faible et ne devient important qu'aux fortes concentrations en palmitoyl lyso GPC.

Or, il faut savoir que les lysophosphoglycérides et leurs analogues acétylés sont des molécules extrêmement toxiques: par leurs propriétés de "détergents", ils peuvent provoquer la lyse des cellules aux fortes concentrations.

En conclusion, l'inhibition de l'acétyl-transférase par le palmitoyl lyso GPC ne nous satisfait pas: elle est insuffisante pour nous permettre d'étudier les mécanismes de l'activation cellulaire et elle a lieu dans une zone de concentration probablement proche de la limite de toxicité de la molécule. Il faut savoir en effet que la zone de toxicité du PAF se situe aux environs de 10^{-5} M (SHAW, J.O., 1981).

I.1.2.Effet du 3-O-alkyl-2-lyso-sn-glycéro-1-phosphorylcholine sur la synthèse de PAF.

Structure:



n = 17 (octadécyl)

= 15 (hexadécyl)

3-O-hexadécyl /octadécyl-2-lyso-sn-glycéro-1-phospho-
choline

=isomère optique du lyso PAF

ou lyso PAF énantiomère

Nous avons voulu tester l'effet de cette molécule sur la synthèse du PAF parce que l'on savait que l'isomère optique du PAF n'a pas d'effet sur l'agrégation et la dégranulation des plaquettes (HANAHAN, D.J., 1981; HADVARY, P., 1983; O'FLAHERTY, J.T., 1983) et que le lyso PAF énantiomère montre une forte inhibition de l'arachidonoyl-coA: 1-palmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine acyltransférerase isolée.(HERRMANN, D.B.J., 1986)

Le lyso PAF énantiomère n'est pas utilisé directement comme substrat de l'acétyl-transférerase pour former du PAF énantiomère, mais on peut supposer qu'il peut bloquer cette enzyme en s'insérant dans son site actif.(WYKLE, R.L., 1980).

Nous avons donc testé l'effet direct du lyso-PAF énantiomère sur la synthèse de PAF à deux concentrations. Les contrôles ont été réalisés en double.(Fig.11)

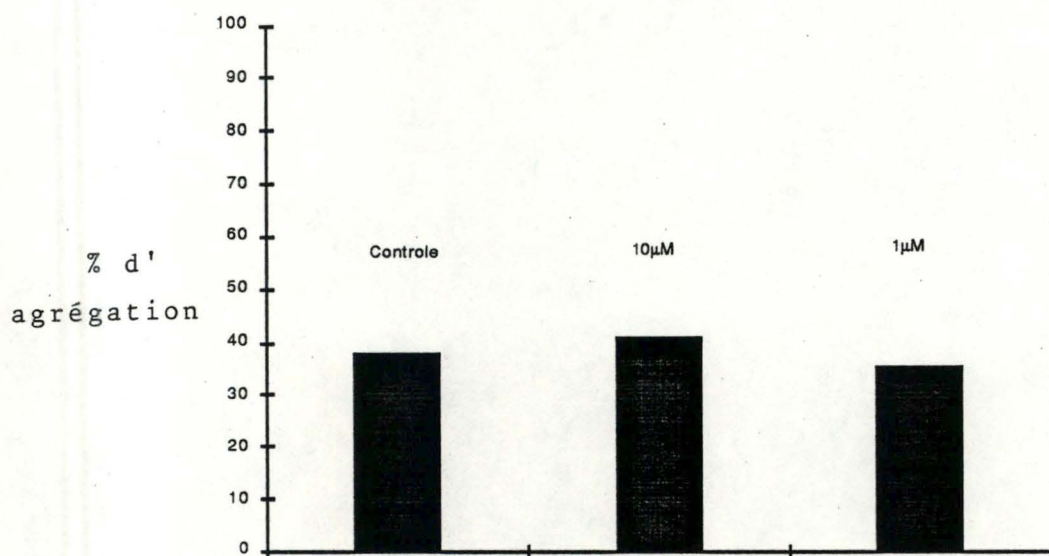


Fig. 11 : Effet du lyso PAF énantiomère sur la synthèse du PAF produit par stimulation des PMN par l'ionophore du Ca^{++} .
La quantité de PAF synthétisée est mesurée par son pouvoir d'agrégation des plaquettes.

Nous constatons que la molécule n'a pas d'effet inhibiteur aux concentrations testées. Il est aussi possible que la molécule n'ait pas été disponible en concentration suffisante à l'intérieur de la cellule. Nous n'avons cependant pas jugé utile de préincuber le lyso PAF énantiomère plus longtemps, parce qu'il est peu probable qu'il soit acylé en phospholipides de membranes et puisse ainsi enrichir le contenu cellulaire.

I.1.3. Conclusion.

Les deux tentatives que nous avons réalisées d'inhiber la synthèse de PAF au moyen de faux substrats de l'acétyl-transférase se sont révélées peu fructueuses: le lyso-PAF énantiomère n'a pas d'effet inhibiteur aux concentrations testées, et le palmitoyl lyso-GPC a un effet inhibiteur trop peu important et dans une zone de concentrations dangereuses pour l'intégrité cellulaire.

Ainsi, bien que cette approche ait été en théorie très séduisante et qu'elle intéresse fortement l'industrie pharmaceutique qui voudrait pouvoir synthétiser des inhibiteurs spécifiques de l'acétyl-transférase du lyso PAF, nous avons dû l'abandonner provisoirement au cours de ce travail et nous tourner vers une approche plus sûre, à savoir: utiliser des inhibiteurs de la PL A₂ et restaurer la disponibilité de l'acide arachidonique indispensable à la synthèse des leucotriènes par un apport exogène.

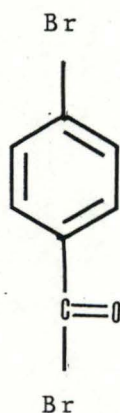
I.2. INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DU PAF PAR DES INHIBITEURS

 DE LA PHOSPHOLIPASE A₂ (PLA₂)

Nous voulions inhiber la synthèse du PAF en inhibant la PLA₂, et restaurer la synthèse des leucotriènes en ajoutant de l'acide arachidonique exogène. Nous avons volontairement exclu les corticostéroïdes, car ils possèdent de nombreux effets non spécifiques: ils agissent par l'intermédiaire de la synthèse d'une protéine, la lipomoduline, qui inhibe non seulement la PLA₂, mais aussi les phospholipases C et D (HIRATA, F., 1983).

I.2.1. Effet du BPB sur la synthèse de PAF.

Structure:



Para-Bromophénacyl Bromide
 ou dibromoacétophénone.

Le BPB est connu et utilisé comme inhibiteur de la PLA₂ (SMOLEN, J.E., 1980). Il faut cependant noter qu'il est peu actif sur les phospholipases A₂ membranaires, ce qui peut s'expliquer par un manque d'accessibilité du site actif à la molécule, dû à un effet stérique ou à la présence de calcium. (DUQUE, R.E., 1986; KYGER, E.M., 1984)

D'autre part, KYGER (1984) a démontré que le BPB pouvait inhiber d'autres enzymes que la phospholipase A₂ en alkylant les résidus histidine, méthionine et cystéine de leurs sites actifs. Cependant, il faut remarquer qu'il travaillait sur des enzymes isolés et qu'il préincubait la molécule pendant deux heures avec l'enzyme avant de tester l'effet de la molécule sur l'activité des enzymes.

On sait aussi que le BPB inhibe la libération des enzymes lysosomiaux et la production d'O₂^{•-} (DUQUE, R.E., 1986). Or, il est vraisemblable que le PAF puisse être impliqué dans ces réactions.

Tous ces résultats publiés dans la littérature scientifique, nous ont décidé à choisir le BPB comme inhibiteur de la phospholipase A₂ et de tester son effet sur la synthèse du PAF.

Nous voulions cependant au préalable nous assurer de l'absence d'effet toxique de cette molécule sur les PMN; pour ce faire nous avons incubé les cellules en présence de deux concentrations en BPB et mesuré la libération d'une enzyme cytoplasmique, la lactate déshydrogenase de ces cellules. Les résultats présentés à la figure 12 n'indiquent pas d'effet cytotoxique du BPB mesuré par cette méthode.

A la figure 13, nous avons représenté l'effet du BPB sur la synthèse de PAF par les PMN stimulés en utilisant comme mesure du PAF l'incorporation de ³H| acétate. Le contrôle ne contenant pas de BPB est posé comme 0% d'inhibition. On constate que le BPB provoque une inhibition importante de la synthèse du PAF qui atteint un maximum à 10⁻⁴M (95% d'inhibition).

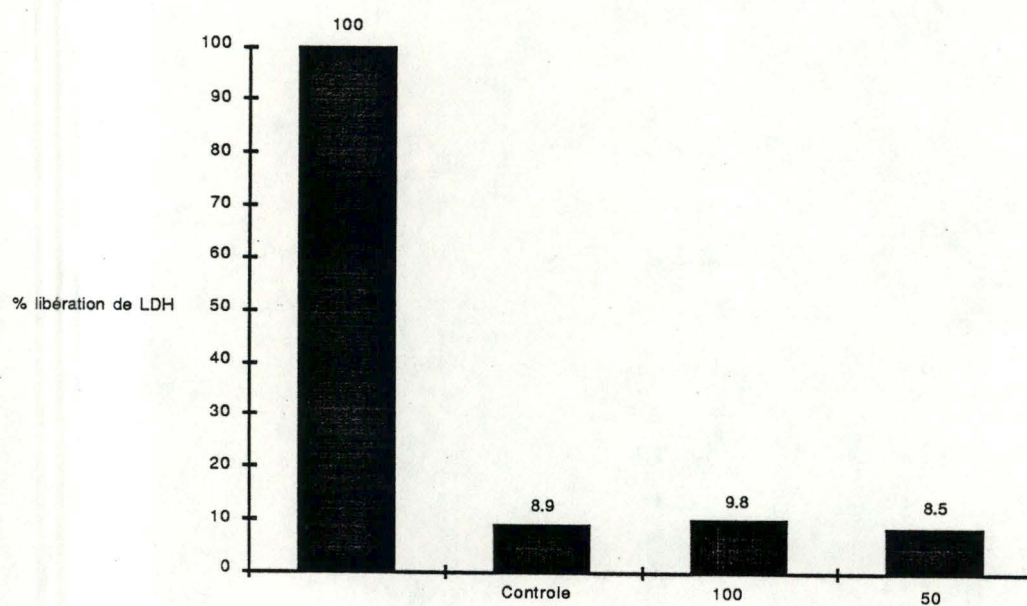


Fig. 12 : Mesure de la cytotoxicité du BPB sur les PMN. L'effet du BPB a été estimé en mesurant le pourcentage de libération de la lactate déshydrogénase des cellules lors de leur incubation pendant 4 min. à 37°C en présence du BPB, ou en son absence pour le contrôle. La quantité totale (100%) de lactate déshydrogénase a été obtenue en effectuant le dosage en présence de Triton X-100 à 0,1 %.

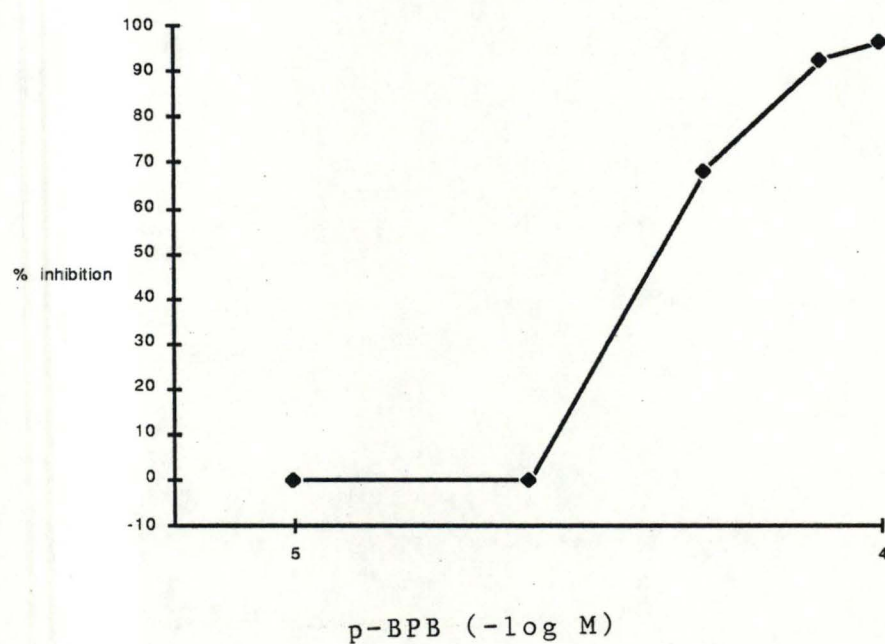


Fig. 13 : Effet du BPB sur la production de PAF par les PMN stimulés par l'ionophore du Ca^{++} .
La quantité de PAF a été mesurée par l'incorporation d'acétate 3H .
Les résultats sont exprimés en % d'inhibition par rapport aux contrôles ne contenant pas de BPB.

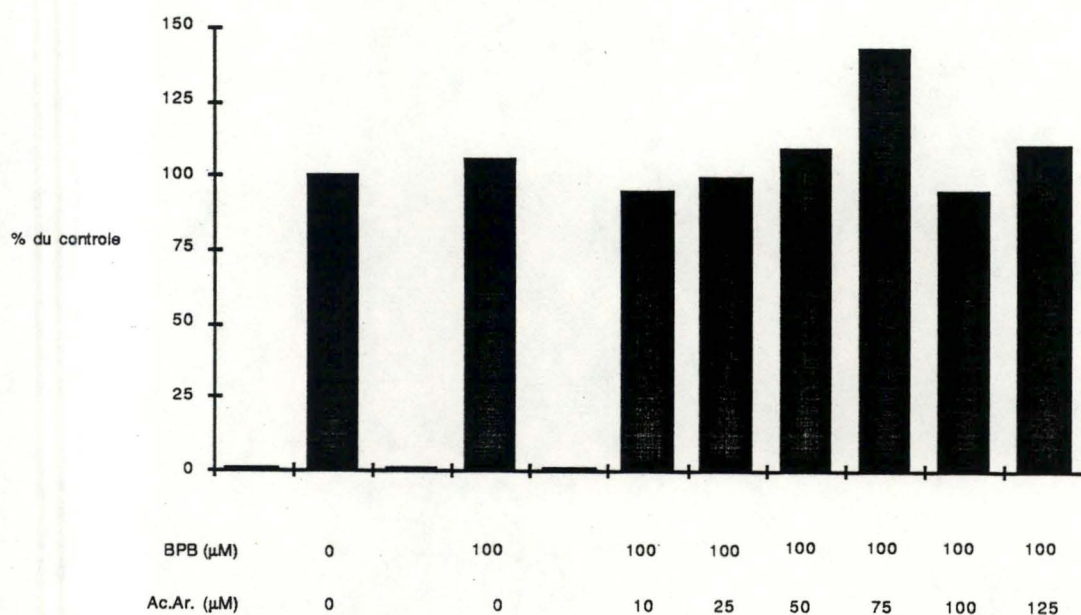


Fig. 14 : Effet du BPB sur la synthèse du LTB₄ par les PMN stimulés par l'ionophore du Ca⁺⁺.
L'acide arachidonique exogène a été ajouté aux tests en concentrations croissantes.
Le LTB₄ est extrait du milieu d'incubation.
Il est purifié sur un appareil HPLC équipé d'une colonne de phase inverse.

Puisque le BPB est décrit comme un inhibiteur de la PLA₂ (V. ci-dessus) et que nous constatons qu'il inhibe la synthèse de PAF, nous devons vérifier son effet sur la synthèse de LTB₄. Nous voulions également pouvoir restaurer éventuellement la synthèse de LTB₄ en ajoutant de l'acide arachidonique exogène au milieu d'incubation.

Les résultats de ces expériences sont indiqués à la figure 14. Un contrôle sans BPB et sans acide arachidonique a été réalisé et a été considéré comme 100% d'activité.

Nous constatons que contrairement à ce que nous attendions, le BPB n'inhibe pas la synthèse des leucotriènes. Nous voyons aussi que l'acide arachidonique a un léger effet activateur sur la synthèse des leucotriènes aux concentrations de 50 et 75 µM.

En conclusion, nous avons montré que le BPB provoquait effectivement une inhibition de la synthèse du PAF dans une zone de concentrations qui n'était pas toxique pour les PMN. Par contre, et contre toute attente, nous n'avons pas observé d'effet inhibiteur sur la synthèse du LTB₄ comme son action sur la phospholipase A₂ aurait pu nous le suggérer.

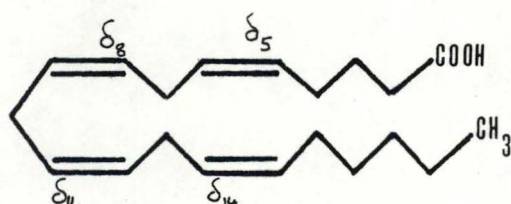
Cette dernière constatation est difficilement explicable par nos connaissances actuelles: existe-t-il une autre réserve d'acide arachidonique que celle mobilisée par la phospholipase A₂, ou au contraire, le BPB n'agirait-il pas sur d'autres enzymes, ce qui aurait conduit certains auteurs à tirer des conclusions trop rapidement quant à son action sur la phospholipase A₂?

Dans cette optique, nous avons été surpris de constater que WYKLE (1980) avait déjà montré un effet inhibiteur à plus de 90% du BPB sur l'activité de l'acétyl-transférase des microsomes de rate. Ce résultat confirme et expliquerait ce que nous avons observé dans ces expériences.

Quelle que soit l'explication, nous avons à notre disposition un outil intéressant puisque nous pouvons obtenir une inhibition de la synthèse du PAF sans diminuer la synthèse des leucotriènes.

I.2.2. Effet de l'acide arachidonique sur la synthèse de PAF.

Structure:



Acide arachidonique
 = acide 5,8,11,14
 icosatétraoïque
 = $C_{20} : 4 (n-6)$

Parallèlement à nos expériences sur le BPB, nous avons recherché un effet inhibiteur plus physiologique et nous avons voulu tester l'effet de l'acide arachidonique sur la synthèse de PAF parce que MARKI et FRANSON (1986) ont montré que la PLA_2 isolée de PMN était inhibée de façon dose dépendante par les acides gras insaturés, et notamment par l'acide arachidonique, alors que les acides gras saturés n'avaient aucun effet inhibiteur.

La figure 15 nous montre l'effet de l'acide arachidonique exogène sur la synthèse de PAF- 3H acétate. Deux contrôles ne contenant pas d'acide arachidonique ont été réalisés et sont posés comme 0% d'inhibition.

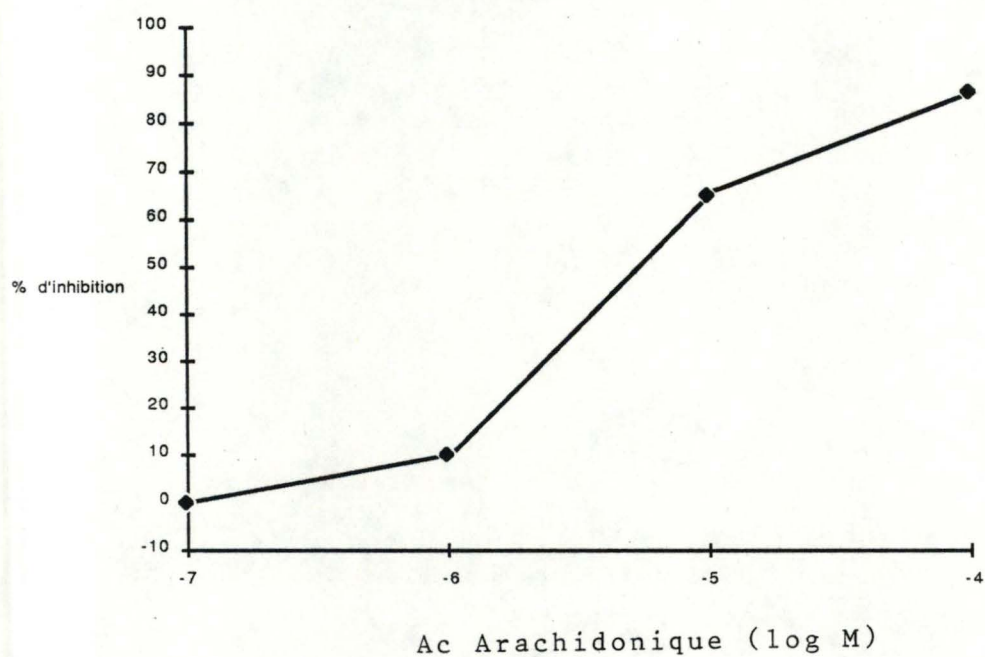


Fig. 15 : Influence de l'acide arachidonique exogène ajouté aux PMN lors de leur activation par l'ionophore du Ca^{++} sur la synthèse du PAF mesurée par incorporation de l'acétate- ^3H .

Nous observons effectivement un effet inhibiteur de l'acide arachidonique sur la synthèse de PAF, qui atteint 86% à 10^{-4} M.

L'acide arachidonique exogène est donc aussi intéressant à considérer dans la perspective recherchée dans ce travail: il inhibe la synthèse de PAF, probablement en inhibant la phospholipase A_2 et, étant lui-même le substrat des lipoxgénases, il n'a pas d'effet inhibiteur sur la synthèse des leucotriènes. (Cf. figure 14 et résultats de E.REMY, non publiés).

Dans la suite de ce travail, nous allons utiliser les résultats obtenus sur l'effet du BPB et de l'acide arachidonique sur la synthèse du PAF afin d'essayer de comprendre quel est son rôle dans l'activation cellulaire.

II. EFFET DES INHIBITEURS "SPECIFIQUES" DE LA SYNTHÈSE DU ----- PAF SUR L'ACTIVATION DES PMN. -----

II.1. EFFET DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE. -----

Nous avons représenté à la figure 16 la courbe d'inhibition de la production des dérivés de l' O_2 produits lors de l'activation de PMN en présence de concentrations croissantes en acide arachidonique. Nous observons une inhibition croissante de la production de dérivés de l' O_2 dans une zone de concentration allant de 10^{-6} M à 10^{-4} M. Nous avons superposé sur le graphique la courbe d'inhibition de la synthèse de PAF décrite précédemment. Les deux courbes d'inhibition se trouvent situées dans une même zone de concentrations et présentent une grande similitude de comportement.

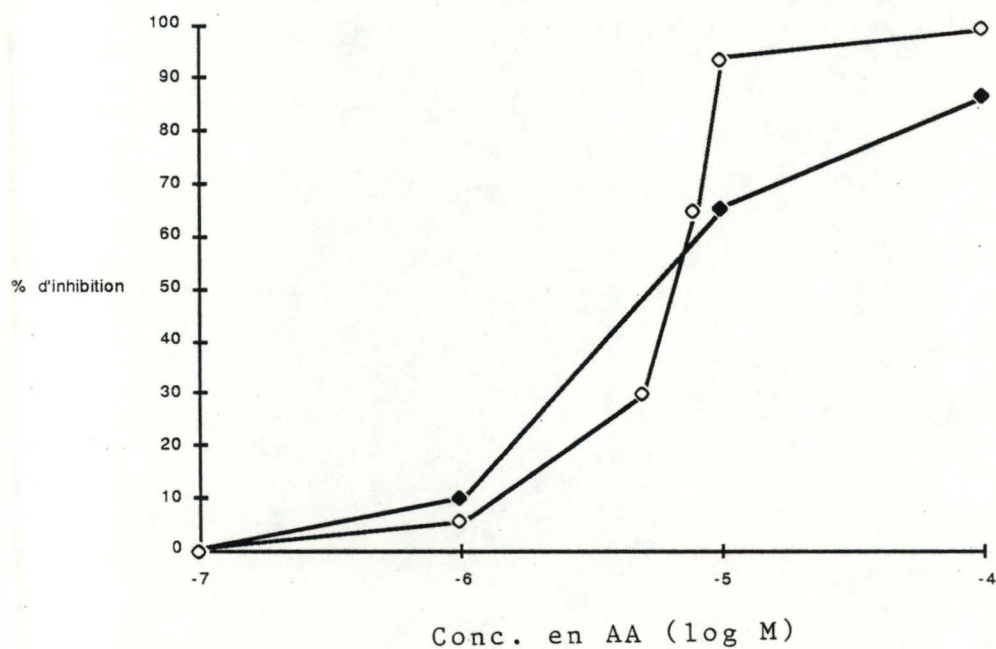


Fig. 16 : Comparaison de l'effet de l'acide arachidonique exogène sur la synthèse de PAF (◆) et sur la production de H₂O₂ (◇) produits après stimulation des PMN par l'ionophore et du Ca⁺⁺. Les résultats sont exprimés en % d'inhibition par rapport aux cellules incubées en absence d'acide arachidonique.

En conclusion, il apparaît donc que l'inhibition de la synthèse de PAF par l'acide arachidonique pourrait entraîner l'inhibition de la production des dérivés oxygénés. Nous avons voulu confirmer cette hypothèse en testant également l'effet du BPB.

II.2. EFFET DU BPB.

II.2.1. Effet du BPB sur la production de dérivés de l'oxygène.

Nous avons représenté à la figure 17 la courbe d'inhibition de la production de dérivés de l'O₂ par le BPB. Nous observons une inhibition croissante de la production des dérivés de l'O₂ par le BPB, qui commence à 10⁻⁷ M et qui est maximale à 10⁻⁶ M.

Sur le même graphique, nous avons reproduit la courbe d'inhibition de la synthèse de PAF décrite à la figure 13. Nous constatons que les deux courbes d'inhibition ne coïncident pas: l'inhibition de la synthèse de PAF a lieu à des concentrations 100 x plus élevées que l'inhibition de la production des dérivés de l'O₂.

Le décalage entre ces deux courbes pourrait être dû à un effet direct du BPB sur les dérivés de l'O₂. Pour nous en assurer, nous avons testé l'effet anti-oxydant ou capteur de radicaux du BPB sur les O₂^{•-} produits par la xanthine oxydase (figure 18). Le contrôle ne contenant pas de BPB est posé à 0% d'inhibition.

Nous constatons que le BPB a bien un léger effet inhibiteur sur la quantité d'O₂^{•-}; celui-ci commence à 10⁻⁶ M et augmente avec la concentration, mais il ne dépasse pas 32% de la production de radicaux

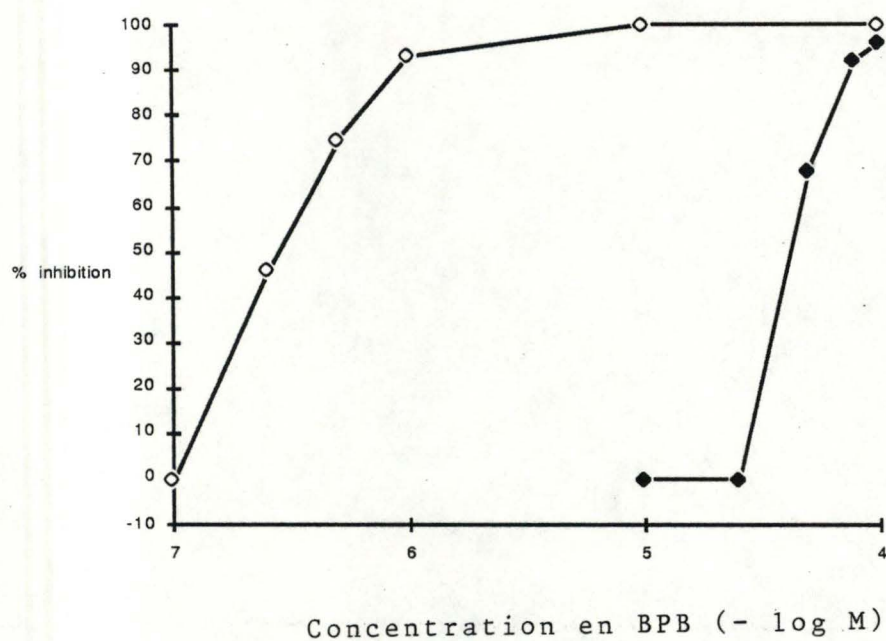


Fig. 17 : Comparaison de l'effet du BPB sur la synthèse de PAF (\blacklozenge) et sur la production de H_2O_2 (\circ) produits après stimulation des PMN par l'ionophore et le Ca^{++} . Les résultats sont exprimés en % d'inhibition par rapport aux cellules incubées en absence de BPB.

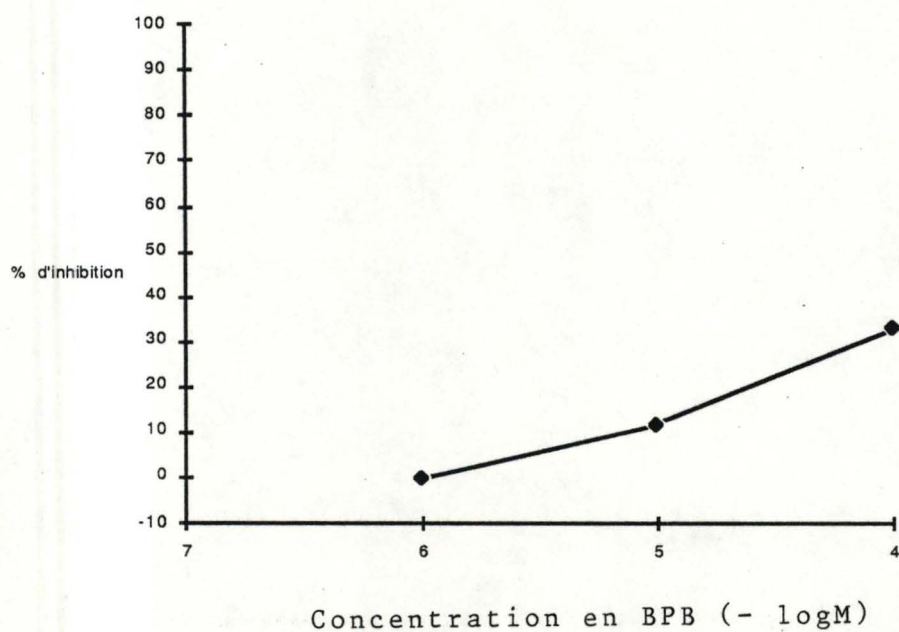


Fig. 18 : Effet du BPB sur les $O_2^{\cdot -}$ produits par la xanthine oxydase.

Les résultats sont exprimés en % d'inhibition par rapport au contrôle ne contenant pas de BPB.

$O_2^{\cdot-}$ à $10^{-4}M$, concentration pour laquelle l'inhibition de la chémoluminescence était de 100%.

Nous avons également testé l'effet antioxydant du BPB sur les H_2O_2 produits par la glucose oxydase selon la méthode de chémoluminescence utilisant le luminol, mise au point par Manoëlle DOYE (1987) au cours de son mémoire. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet inhibiteur du BPB sur la production d' H_2O_2 jusque $10^{-4}M$.

Par conséquent, on ne peut pas expliquer le décalage entre les courbes d'inhibition de la production de radicaux oxygénés et de la synthèse de PAF par un effet direct du BPB sur les dérivés de l' O_2 produits par les PMN.

L'absence d'effet du BPB sur les dérivés de l' O_2 produits par la xanthine oxydase et par la glucose oxydase n'exclut pas un effet du BPB à un autre niveau de la production de ces radicaux par les PMN. En fait DUQUE (1986) suggère effectivement que le BPB inhiberait la production des $O_2^{\cdot-}$ en empêchant l'assemblage du complexe NADPH oxydase lors d'un stimulus, sans affecter significativement les protéines de structure de ce complexe.

Ceci expliquerait l'effet inhibiteur important du BPB que nous observons sur la production des dérivés de l' O_2 . Il nous fallait donc trouver un autre test pour mesurer l'activation cellulaire et nous avons décidé de mesurer la dégranulation des neutrophiles en mesurant la libération de la N-acétyl- β -glucosaminidase.

II.2.2. Effet du BPB sur la dégranulation des neutrophiles.

Nous avons représenté à la figure 19 l'effet du BPB sur la dégranulation des PMN. Deux contrôles, sans la molécule, ont été réalisés, ainsi qu'un blanc, non stimulé, qui nous permet de contrôler le faible niveau de la dégranulation basale. On soustrait la valeur de ce blanc pour calculer le pourcentage d'inhibition.

Nous observons un effet inhibiteur du BPB sur la libération de la N-Ac- β -glucosaminidase par les PMN. Cette inhibition commence à 10^{-6} M, augmente avec la concentration et atteint 73% à 10^{-4} M.

Nous avons comparé cet effet à ceux obtenus sur la synthèse de PAF et sur la production de dérivés de $l'O_2$, décrits antérieurement. Comme nous pouvons le constater, la courbe d'inhibition de la dégranulation par le BPB ne correspond à aucune des deux autres courbes. Elle est toutefois plus proche de la courbe d'inhibition de la synthèse de PAF que de la courbe d'inhibition de la production de dérivés de $l'O_2$: les 50% d'inhibition de la synthèse de PAF, de la dégranulation et de la production de dérivés de $l'O_2$ sont respectivement situés entre 3 et $6 \cdot 10^{-5}$ M, 2 et $5 \cdot 10^{-5}$ M et 2,5 et $5,5 \cdot 10^{-7}$ M.

On peut donc conclure à une certaine analogie entre l'effet du BPB sur la synthèse du PAF et son action sur la dégranulation des cellules.

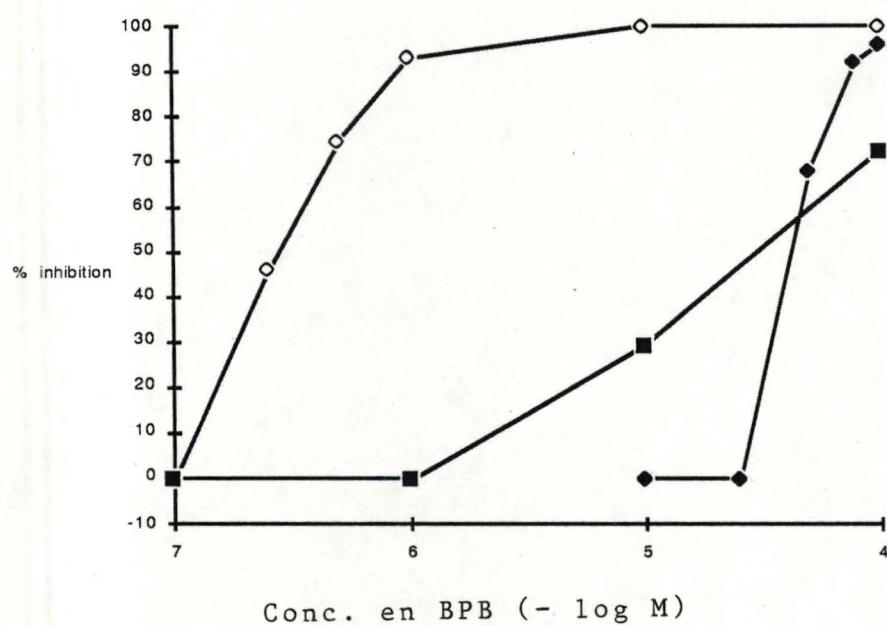


Fig. 19 : Comparaison de l'effet du BPB sur la synthèse de PAF (\blacklozenge), sur la production de H_2O_2 (\diamond) et sur la dégranulation (\blacksquare) des PMN stimulés par l'ionophore et le Ca^{++} .

Les résultats sont exprimés en % d'inhibition par rapport aux cellules incubées en absence de BPB.

III. DISCUSSION..

Puisque les molécules qui inhibent la voie de synthèse du PAF inhibent également la production de dérivés de l' O_2 , nous pouvons suggérer que le PAF est un médiateur important de la production de dérivés de l' O_2 : c'est le cas très clairement pour l'acide arachidonique.

Le décalage observé, dans le cas du BPB, entre les courbes d'inhibition de la synthèse de PAF et de la production des dérivés de l' O_2 est probablement dû à un effet non spécifique de la molécule sur le système de production des radicaux; il semble, en effet, que le BPB agisse sur l'assemblage du complexe NADH^P oxydase.

Effectivement, lorsque l'on teste son effet sur la dégranulation des PMN, la zone de concentration de son activité inhibitrice est proche de l'inhibition de la synthèse de PAF. On ne peut pas exclure cependant, comme souligné plus haut, que le BPB agisse aussi sur d'autres enzymes cellulaires.

Il semble que les phénomènes de dégranulation et de production des dérivés oxygénés soient activés par l'action de médiateurs communs: par exemple ils sont tous deux inhibés lorsque la synthèse de PAF est inhibée. Pour confirmer cette hypothèse, il aurait été intéressant de vérifier l'effet de l'acide arachidonique sur la dégranulation des PMN.

En ce qui concerne les mécanismes d'activation des PMN, nos résultats indiquent clairement un rôle prépondérant du PAF synthétisé par les cellules suite à leur stimulation.

Des expériences indirectes avaient déjà été réalisées dans ce sens. Par exemple, O'FLAHERTY (1983) avait pu induire la dégranulation des PMN en présence de PAF exogène. Plus tard, O'FLAHERTY (1985) a pu montrer, grâce à des expériences de désensibilisation des cellules, qu'il intervenait dans la médiation de la dégranulation provoquée par l'ionophore du Ca^{++} . Cependant dans ces expériences, il montrait un rôle similaire pour le LTB_4 , mais non pour le 5-HETE.

Nous ne pouvons donc pas exclure l'influence du LTB_4 sur cette activation puisque l'inhibition de la 5-lipoxygénase provoque aussi l'inhibition de la production radicalaire. On pourrait donc suggérer, à la suite de toutes ces données, que les deux molécules, c'est-à-dire le LTB_4 et le PAF devraient être présentes pour que l'activation cellulaire puisse effectivement se faire.

Cette conclusion devrait être vérifiée dans des travaux ultérieurs, en mettant à profit les possibilités d'inhibition des enzymes que nous avons mises en évidence dans ce travail.

BIBLIOGRAPHIE.

BABIOR B.M. (1973)

J. Clin. Invest., 52 , 741-744

Réf. citée par BRAQUET et BRAQUET (1983).

BENVENISTE J. (1985)

Paf-acether (Platelet-Activating factor)

Adv. in Prostaglandin Thromboran and Leucotriene
Res. , Vol. 13, pp11-18.

BLIGH E.G., DYER W.J. (1959)

A rapid method of total lipid extraction and
purification.

Canadian Journal of Biochemistry and Physiology
Vol 37, n° 8, pp 911-917.

BORGEAT P., FRUTEAU DE LACLOS B., CRASTES DE PAULET A.,
MACLOUF J. (1983)

Biochimie des leucotriènes ,

Biochimie de l'inflammation, Masson, pp 40-60.

BRAQUET P., BRAQUET M; (1983)

Phagocytose et stimulation des processus d'oxy-
dation cellulaire des macrophages

Biochimie de l'inflammation, Masson, pp 67-92.

CAMUSSI G., AGLIETTA M., CODA R., BUSSOLINO F., PIACIBELLO W.,
TETTA C. (1981)

"Release of platelet-activating factor (PAF) and
histamine"

II. The cellular origin of human PAF: monocytes,
polymorphonuclear neutrophils and basophils.

Immunology, 42 , pp 191-199.

CHILTON F.H., O'FLAHERTY J.T., ELLIS J.M., SWENDSEN C.L.,
WYKLE R.L. (1983)

Selective acylation of lyso platelet-activating
factor by arachidonate in human platelets.
J. Bioch. Chem., Vol 258, n°12, pp7268-7271.

CHILTON F.H., ELLIS J.M., OLSON S.C., WYKLE R.L. (1984)

1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phospho-
choline: a common source of platelet-activating
factor and arachidonate in human polymorphonuclear
leucocytes
J. Bioch. Chem., Vol 259, n° 19, pp 12014-12019.

CLARK P.O., HANAHAHAN D.J., PINCKARD R.N. (1980)

Physical and Chemical properties of platelet-
activating factor obtained from human neutrophils
and monocytes and rabbit neutrophils and basophils
Biochem. et Biophys. acta, 628, pp 69-75.

CRASTES DE PAULET A. (1983)

Les grandes voies métaboliques de l'acide arachi-
donique
Biochimie de l'inflammation, masson, pp 1-43.

DEMOPOULOS C.A., PINCKARD R.N., HANAHAHAN D.J. (1979)

Platelet-activating factor: évidence par
1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycéryl-3-phosphoryl
choline as the active component (a new class of
lipid chemical mediator)
J. Biol. Chem., Vol 254, n° 19, pp9355-9358.

DOYE M. (1987)

Utilisation de la détection d' H_2O_2 en chémolumi-
nescence pour la mise au point de dosages sensi-
bles de la catalase et de la glutathione peroxy-
dase
FNDP, Mémoire.

DUQUE R.E., FANTOM J.C., KRAMER C., MARASCO W.A.,
PHAN S.H. (1986)

Inhibition of neutrophil activation by p-bromo-
phenacyl bromide and its effects on phospholipase A₂
Br. J. Pharmac., 88, pp463-472.

FRIDOVITCH (1975)

Ann. Rev. Biochem., 44, 147-159

Ref. citée par BRAQUET et BRAQUET (1983).

HADVARY P., BAUMGARTNER H.R. (1983)

Activation of human and rabbit blood platelets
by synthetic structural analogues of platelet-
activating factor

Thrombosis Research, 30 n° 2 , 143-156.

HANAHAHAN D.J., MUNDER P.G., SATOUCHI K., Mc MANUS L.,
PINCKARD N. (1981)

Potent platelet stimulating activity of enantio-
mers of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine
and its methoxy analogues

Biochem. and Biophys. Res comm. Vol. 99 n° 1,
pp 183-186.

HERRMANN D.B.J., FERBER E., MUNDER P.G. (1986)

Ether phospholipids as inhibitors of the arachi-
donoyl-coA : l-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine
acyl transferase in macrophages

Biochem and Biophys. Acta, 876, pp 28-35.

HIRATA F. (1983)

Lipomoduline et régulation des phospholipases
cellulaires

Bioch. de l'inflammation, Masson, pp 61-66.

- KRAMER R.M., PATTON G.M., PRITZKER C.R., DEYKIN D. (1984)
Metabolism of platelet activating factor in human platelets: transacylase-mediated synthesis of 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
J. Biochem. Chem. Vol. 259, n° 21, pp 13316-13320.
- KYGER E.M., FRANSON R.C. (1984)
Non specific inhibition of enzymes by p.Bromo-phenacyl Bromide. Inhibition of human platelets phospholipase C and modification sulphhydryl groups
Biochem. and Biophys. Acta, 794, 96-103.
- KORNECKI E., EHRLICH Y.H., LENOX R.H. (1984)
Platelet-Activating Factor-Induced aggregation of human platelets specifically inhibited by triazolobenzo-diazepines
Science, vol226, pp 1454-1456.
- MARKI F., FRANSON R. (1986)
Endogenous suppression of neutral-active and calcium-dependant phospholipase A₂ in human polymorphonuclear leucocytes
Biochimica et Biophysica acta, Vol 879, pp 149-156.
- MUELLER H.W., O'FLAHERTY J.T., WYKLE R.L. (1983)
Biosynthesis of platelet-activating factor in rabbit polymorphonuclear neutrophils
J. Biochem. Chem., Vol 258, n° 1, pp6213-6218.
- MÜLLER-PEDDINGHAUS R. (1984)
In vitro determination of phagocyte activity by luminol and lucigenin-amplified chemiluminescence
Int. J. Immunopharmac., Vol 6, n°5, pp455-466.
- O'FLAHERTY J.T., WYKLE R.L. (1983)
Biology and biochemistry of platelet-activating factor
Clin. Rev. Allergy, 1, 353-367.

O'FLAHERTY J.T., SALTZER W.L., COUSART S., Mc CALL C.L.,
PIANTADOSI C., SURLES J.R., HAMMET M.J., WYKLE R.L. (fév. 1983)
Platelet-activating factor and analogues: comparative studies with human neutrophils and rabbit platelets
Res. comm. in chem. path. and pharmac.
Vol 39 n° 2, pp291-307.

O'FLAHERTY J.T., THOMAS M.J., Mc CALL C.E., WYKLE R.L.
(juin 1983)
Potentiating actions of hydroxyeicosatetraenoates on human neutrophil degranulation responses to leucotriene B₄ and phorbol myristate acetate
Res. comm. in chem. Pathology. and pharmac.
Vol 40 , n° 3, pp 475-485.

O'FLAHERTY J.T. (1985)
Neutrophil degranulation: Evidence pertaining to its mediation by the combined effects of leucotriene B₄ , Platelet-activating factor and 5-HETE
J. Cell physiology, 222, 229-239.

REMY E. (1985)
Etude de la relation entre la production des leucotriènes et la production de radicaux superoxydes par les leucocytes morphonucléaires bovins et les macrophages murins
FNDP, Mémoire.

REMY E. (1986)
Etude des mécanismes d'activation des cellules inflammatoires: importance du platelet-activating factor et des leucotriènes
Rapport d'activité, 1986.

ROOT et METCALF (1977)
J. Clin. Invest., 60, 1266-1279
Ref. citée par BRAQUET et BRAQUET (1983)

- ROSAM A.C., WALLACE J.L., WHITTLE B.J.R. (1986)
Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach
Nature, Vol 319, pp 54-56.
- SATOUCHE K., ODA M., YASUNAGA K., SAITO K. (1985)
Evidence for production of 1-acyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine concomittantly with platelet-activating factor
Biochem. and Biophys. Res. comm.,
Vol 128 n° 3, pp 1409-1417.
- SHAW J.O., PINCKARD R.N., FERRIGNI K.S., Mc MANUS L.M., HANAHAN D.J. (1981)
Activation of human neutrophils with 1-O- hexadecyl/ octadecyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine Pltelet-activating factor)
J. of immunology, Vol 127 n°3, 1250-1255.
- SMOLEN J.E., WEISSMANN G (1980)
Effects of indomethacin, 5, 8, 11, 14-eicosatetracynoic acid, and p-Bromophenacyl Bromide on lysosomal enzyme release and superoxide anion generation by human polymorphonuclear leucocytes
Biochem. Pharmac., Vol 29, pp533-535.
- SWENDSEN C.L., ELLIS J.M., CHILTON F.H., O'FLAHERTY J.T., WYKLE R.L. (1983)
1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine: a novel source of arachidonic acid in neutrophils stimulated by the calcium ionophore A23187
Biochem. and Biophys. res.comm.
Vol 113, n° 1 , pp 72-79.
- VARGAFTIG B.B., CHIGNARD M., BENVENISTE J., (1981)
Commentary; Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation
Biochem. Pharmac. , Vol 30 , pp 263-271.

WYKLE R.L., MALONE B., SNYDER F. (1980)

Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid

J. Biochem. Chem., Vol 255 n° 1, pp 10256-10260.
