Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Importance du PAF dans le mécanisme d'activation cellulaire des cellules endothéliales

Delbar, Thérèse

Award date:
1990

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.

Download date: 02. May. 2026

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

IMPORTANCE DU PAF DANS LE MECANISME D'ACTIVATION CELLULAIRE DES CELLULES ENDOTHELIALES

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

DELBAR THERESE
1989-1990

Au terme de ce mémoire, je voudrais remercier le Professeur J. Remacle pour avoir bien voulu m'accepter dans son laboratoire et m'avoir guidé tout au long de cette année.

Je remercie également Eric Remy qui, malgré toute ses occupations, était toujours présent lorsque j'en ai eu besoin.

Merci aussi à Carine Michiels qui a bien voulu m'initier à la mise en culture, mais aussi pour son aide plus que précieuse lorsqu'Eric n'était plus disponible. Un grand merci pour avoir veillé à la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire pour la bonne humeur qu'il y font régner, les hôpitaux de Sambreville et de Charleroi pour nous avoir fourni les cordons si indispensables.

Je ne pourrais terminer sans remercier mon père qui m'a permis de réaliser ces études et qui m'a toujours encouragé dans mon travail.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

IMPORTANCE DU PAF DANS LE MECANISME D'ACTIVATION CELLULAIRE DES CELLULES ENDOTHELIALES .

DELBAR Thérèse

Résumé

Le PAF est un phospholipide membranaire qui joue un rôle important en tant que médiateur de l'inflammation, il peut être synthétisé par différents types cellulaires tels que les PMN, les macrophages, mais aussi les cellules endothéliales. Ces cellules, lorsqu'elles sont stimulées avec la thrombine humaine, ont la capacité de synthétiser ce phospholipide mais aussi de réguler sa synthèse tout comme les PMN. Ceci montre donc que les cellules endothéliales jouent un rôle actif en participant aux différents mécanismes de l'inflammation.

En utilisant les cellules endothéliales humaines en culture, nous avons pu étudier la synthèse de PAF chez ces cellules ainsi que sa régulation par les acides gras. Nous avons pu observer que les acides gras insaturés ont un effet inhibiteur sur la synthèse de PAF tandis que les acides gras saturés n'ont eux aucun effet . Ce médiateur joue également un rôle important dans l'adhérence des polymorphonucléaires aux cellules endothéliales. Afin d'étudier l'implication du PAF dans ce processus, nous avons utilisé les inhibiteurs de la synthèse de PAF et nous les avons testé. Cette technique nous a permis montrer qu'en effet le PAF serait bel et bien impliqué dans ce phénomène mais qu'il ne serait pas le seul, un dérivé de la cyclooxygénase ou de la lipoxygénase pouvant également intervenir .

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1990
Promoteur : J. REMACLE

PLAN

INTRODUCTION

A. L'inflammation 1

1.Activation des phagocytes 2

2.Les métabolites de l'acide arachidonique 3

a)activation des cellules et libération d'acide arachidonique 4

b)métabolisme de l'acide arachidonique 5

B.Le Platelet Activating Factor 7

1.Structure 7

2.Synthèse 8

3.Catabolisme 9

4.Association du PAF avec les cellules 10

5.Rôle biologique du PAF 11

C.Les cellules endothéliales 12

1.Le tissu endothélial 12

2.La cellule endothéliale 14

3.Production de PAF par les cellules endothéliales 15

4.Mécanisme d'action de la thrombine 18

5.Stimulation par les espèces oxygénées 19

6.Production de PAF et adhérence des PMN 20

7.Mécanisme d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales 24

a)les molécules d'adhésion des leucocytes 27

b)les molécules d'adhésion des cellules endothéliales 29

D.But de ce travail 34

MATERIEL ET METHODES

A.Isolement des cellules endothéliales à partir de la veine ombilicale humaine 36

Mode opératoire 36
Choix de la veine ombilicale humaine 38

B.Repiquage des cellules endothéliales 38

C.Production de PAF par les cellules endothéliales 39

1.Production de PAF radioactif en vue d'un dosage par comptage radioactif 40
Principe 40
Solutions 40
Méthode : a.Incubation et production de PAF radioactif 41
b.Extraction 41
2.Production de PAF non radioactif en vue d'un dosage par agrégation plaquettaire 43

Principe 43
Solutions 44
Méthode : a.Production de PAF par les cellules endothéliales 44
b.Extraction des lipides 45
c.Séparation des lipides sur HPLC 45
d.Dosage du PAF 46

D.Caractérisation du PAF produit 48

1.Temps de retention 48
2.Caractérisation par la PLA_1 49
Solutions 49
Méthode 49

E.Mise au point du dosage 51

1.Influence du temps d'incubation avec la thrombine
sur la production de PAF 51
Solutions 51
Méthode 52
2.Influence de la concentration en thrombine
sur la production de PAF 53

F.Influence de la concentration en acides gras sur la synthèse de PAF 53

Solutions 53
Méthode 54

G.Test d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales.
Niveau morphologique . 55

Solutions 55
Méthode 56

H.Test d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Niveau quantitatif 56

1.Influence de la concentration en thrombine
sur l'adhérence des PMN 57
Solutions 57
Méthode 57
2.Influence du temps d'incubation sur l'adhérence des PMN 58
Solutions 58
Méthode 59
3.Influence des acides gras sur l'adhérence des PMN
aux cellules endothéliales 59
Solutions 59
Méthode 60
4.Effet du PAF exogène sur l'adhérence des PMN
aux cellules endothéliales 60
Solutions 60
Méthode 61

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CH I : Production de PAF par les cellules endothéliales et dosage 62

1.Dosage de PAF par dosage de PAF radioactif 62
2.Dosage de PAF par agrégation plaquettaire 63
Conclusions 64

CH II : Caractérisation de la biosynthèse du PAF et du PAF produit chez les cellules endothéliales en culture stimulées avec la thrombine 65

1.Caractérisation du PAF produit 65
a.Caractérisation par le temps de retention 65
b.Caractérisation par la PLA_1 66
2.Caractérisation de la biosynthèse 69
a.Influence du temps d'incubation sur la synthèse de PAF 69
b.Influence de la concentration en thrombine sur la synthèse de PAF 70
Conclusions 71

CH III : Inhibition sélective de la synthèse de PAF par les acides gras 72

1.Effet de l'acide arachidonique 72
2.Acide oléique et acide stéarique 73
Conclusions 74

CH IV : Importance du PAF dans le phénomène d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales 76

1.Test d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Niveau morphologique 76
2.Test d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Niveau quantitatif 77
a.Courbe de concentration en thrombine 78
b.Cinétique de temps d'incubation 79

c.Influence des acides gras 80
1)Effet de l'acide arachidonique 80
2)Effet de l'acide oléique 81
3)Effet de l'acide stéarique 81
d.Test avec du PAF exogène 82
Conclusions 82

CONCLUSIONS GENERALES 85

Introduction

A . L'inflammation

Dès que l'on se blesse , différents phénomènes se produisent au niveau de la plaie :

1) La cascade des facteurs de la coagulation du sang va arrêter le saignement et permettre la formation d'un caillot sanguin permettant ainsi l'occlusion des brêches vasculaires .

2) D'un autre côté , via cette cascade , il y a formation de molécules appartenant au système des kinines (la bradykinine) qui vont provoquer une vasodilatation .

3) Il y a activation de la voie du complément :

- voie classique qui dépend de la présence d'anticorps .
- voie alterne activée par des substances étrangères ou par le système des kinines .

Ce qui mène à la libération de molécules appelées anaphylatoxines (C_{3a} , C_{4a} , C_{5a}), capables d'activer les mastocytes . Ceux-ci vont alors libérer différentes substances médiatrices telle que l'histamine qui vont sur les lieux de l'inflammation entraîner la vasodilatation et donc la sortie de plasma , de protéines et de cellules sanguines .

4) Par la vasodilatation , les polymorphonucléaires vont pouvoir passer la barrière endothéliale et se diriger vers les lieux de l'inflammation , activés par les molécules chimiques libérées par l'organisme ou les substances étrangères (= chimiotactisme).

Par cet exemple simple d'une cause d'inflammation , nous avons rencontré les principaux acteurs intervenant dans ce phénomène . Nous allons maintenant décrire plus en détail certains des mécanismes fondamentaux impliqués dans la problématique abordée dans notre travail .

1) Activation des phagocytes

- - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Les premières cellules activées lors d'une inflammation sont les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) . Ils sont attirés par chimiotactisme , arrivent sur les lieux de l'inflammation , et adhèrent à leur proie qui peut être recouverte d'opsonine (protéine permettant aux PMN de reconnaître cette particule) Ils la phagocytent ensuite .Le tout est suivi de deux phénomènes : la dégranulation et l'hyperactivité oxydative . Tous deux participent à la destruction de la proie (Braquet et Braquet , 1983) .

- La dégranulation .

  C'est la fusion entre un lysosome primaire et un phagosome .
  Le lysosome contient beaucoup d'enzymes protéolytiques qui interviennent pour détruire la cible .

- L'hyperactivité oxydative .

  C'est la production par réduction partielle de l'O_2 d'agents bactéricides très puissants . Cette hyperactivité oxydative comprend 4 phénomènes importants :

  une augmentation de la consommation d'O_2 ,
  la production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot(-)}$) ,
  la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ,

l'activation du shunt des pentoses phoshates qui permet la régénération du NADPH puique celui-ci est consommé en grande quantité .

La production de radicaux superoxydes et des autres dérivés oxygénés entraîne une série de dommages aux cellules dont la peroxydation des lipides insaturés qui sont une cible de choix . Ceci mène alors à une perte de la fluidité et de la perméabilité membranaire . Il peut également y avoir des dommages aux acides aminés , aux acides nucléiques (mutation , point de blocage , abérration chromosomique) mais aussi aux protéines.

La mort bactérienne survient grâce à ces deux mécanismes mais cela n'est pas sans conséquences lourdes pour l'organisme puisque la libération du contenu des phagocytes ainsi que des radicaux libres entraîne aussi des lésions tissulaires .

Ces deux mécanismes peuvent être reproduits expérimentalement grâce à des composés particulaires (paroi de cellules de levure , bactéries opsonisées) ou solubles (des lectines , l'ionophore du calcium A23187) (Braquet et Braquet , 1983).

2) Les métabolites de l'acide arachidonique

- -

Outre les phénomènes de dégranulation et d'hyperactivité oxydative , une autre voie est également activée lors de la stimulation des PMN : c'est le métabolisme de l'acide arachidonique .

L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé à la base de la synthèse des médiateurs de l'inflammation . C'est l'acide gras préférentiellement incorporé en

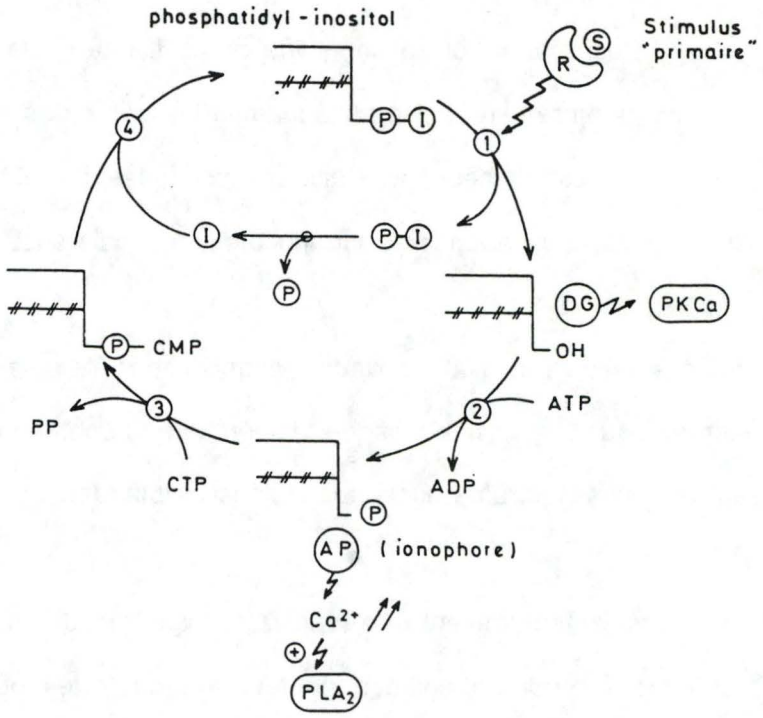


Figure 1 : Cycle du phosphatidyl inositol , d'après Crastes de P ulet (1983) .
1= Phospholipase C ; 2= diglycéride kinase ; 3= CTP phosphatidate cytidyl transférase ; 4= CDP-1,2 diacyl glycérol inositol phosphatidyl transférase .

position Sn-2 des phospholipides , il est largement distribué sur une phosphatidylcholine à chaîne alkyl en position 1 (1-O-alkyl-2-acyl-Sn-glycéro-3-phosphatidylcholine) et peut être libéré lors de l'activation des cellules .

a) activation des cellules et libération d'acide arachidonique

Pour que cet acide arachidonique soit libéré , il faut l'activation d'une phospholipase A_2 . Cette enzyme est localisée dans la membrane plasmique et dans la membrane du réticulum endoplasmique . Cette phospholipase demande pour être activée une augmentation du calcium intracellulaire qui est un des éléments premiers de la réponse cellulaire lors d'un stimulus membranaire .

A l'heure actuelle , il devient de plus en plus évident que l'activation du métabolisme du phosphatidyl inositol (P.I.) jouerait un rôle d'amorce du processus . En effet , dans le métabolisme du P.I. (un phospholipide présent dans la couche interne de la membrane plasmique) , il y a libération suite à un signal externe et via la phospholipase C, d'inositol triphosphate et de diacylglycérol (DG.) (figure 1) . Ce DG est phosphorylé via l'ATP pour donner l'acide phosphatidique . Cet acide phosphatidique a tout comme l'IP_3 la propriété de se comporter comme un ionophore du calcium .

Cette entrée de calcium va alors activer la phospholipase A_2 (PLA_2), et cela via deux mécanismes :

- modification du site actif de l'enzyme par neutralisation de charges .

- neutralisation de la charge du substrat (Crastes de Paulet , 1983).

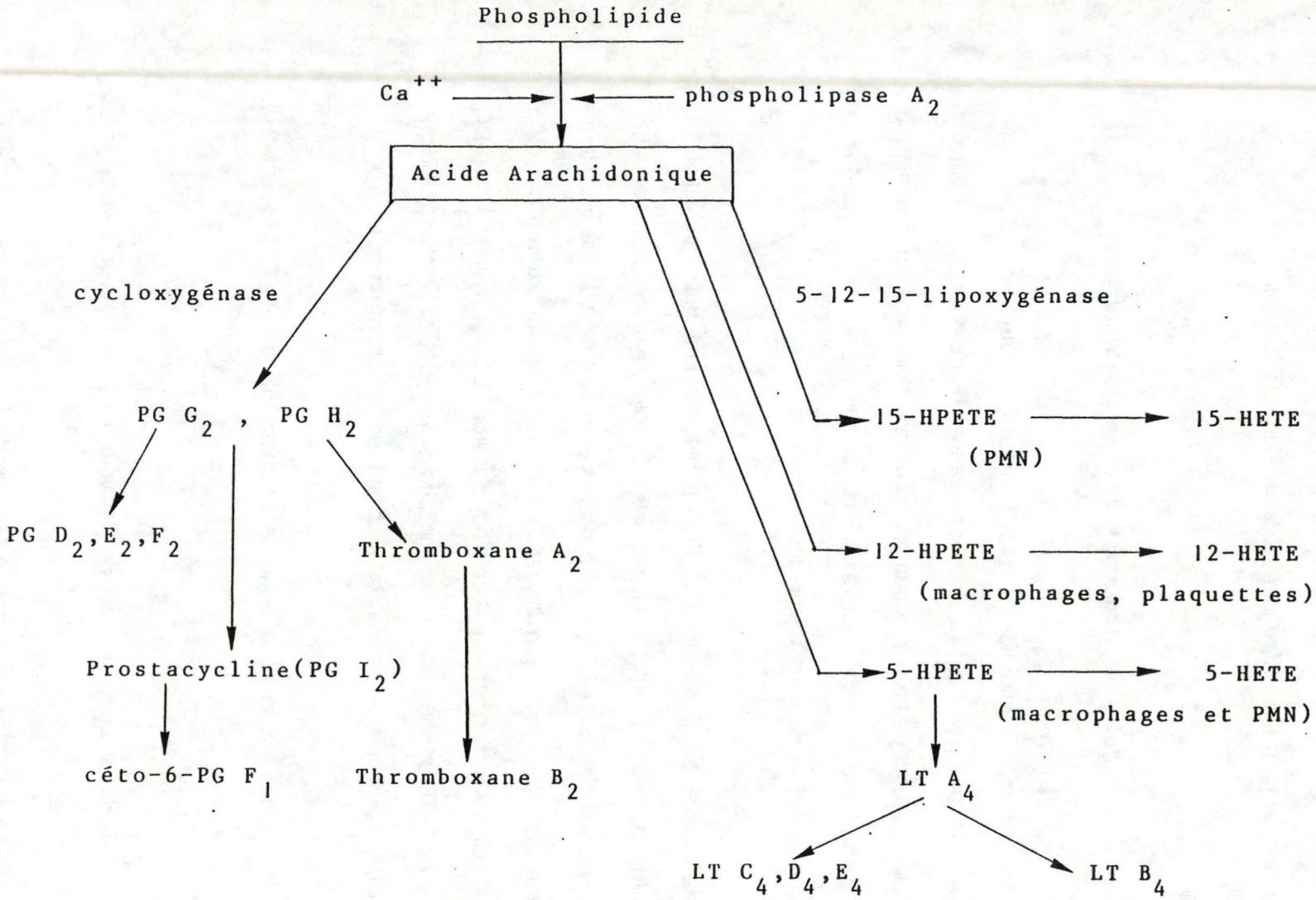


Figure 2 : Schéma général du métabolisme de l'acide arachidonique , d'après Borgeat et al (1983) .
HPETE=acide hydroperoxyéicosatétraénoïque;
HETE=acidehydroxyéicosatétraénoïque .

Il s'en suit une libération en grande partie de l'acide arachidonique puisque c'est l'acide gras ajouté de préférence en position 2, celui-ci sera alors métabolisé pour former les différents médiateurs .

In vitro , la libération d'acide arachidonique et son métabolisme peut être provoqué par l'ajout de l'ionophore du calcium A23187 aux neutrophiles (Benveniste , 1985) ou de thrombine aux cellules endothéliales (Prescott et al., 1984) .

b) métabolisme de l'acide arachidonique (figure 2)

L'acide arachidonique libéré est métabolisé d'une part en prostaglandines et thromboxanes , par la voie de la cyclooxygénase , et d'autre part en leucotriènes et HETE'S (hydroxyéicosatétraénoïque)par la lipoxygénase (Crastes de Paulet , 1983 ; Borgeat et al., 1983) .

- voie de la cyclooxygénase .

La cyclooxygénase est une enzyme membranaire qui , à partir de l'acide arachidonique , forme les différentes prostaglandines (PG) (Crastes de Paulet , 1983).

On forme d'abord la PGG_2 , qui est convertie ensuite en PGH_2 , composé instable .

Cette PGH_2 donnera alors par une première voie , les PGD_2 , E_2 , F_2 .

une deuxième voie , la PGI_2 qui est instable et qui se transforme spontanément en 6 céto $PGF_{1\alpha}$ dépourvue d'activité biologique et pouvant ensuite se transformer en PGE_1 .

une troisième voie , les thromboxanes (TXA_2 instable converti en TXB_2 stable) (Crastes de Paulet , 1983) .

- voie de la lipoxygénase .

Il existe différentes lipoxygénases :

C_5 et C_{15} lipoxygénases des leucocytes .

C_{12} lipoxygénases des plaquettes .

L'acide arachidonique est transformé en 5 hydroperoxyde (5 HPETE) par la 5 lipoxygénase puis en leucotriène A_4 (LTA_4). Ce sont les réactions initiales dans la synthèse des leucotriènes . Le 5 HETE (acide hydroxy 5 éicosatétraénoïque) est le résultat de la réduction du 5 HPETE par les peroxydases . Le LTA_4 est la molécule clé de la voie de LT qui donnera :

leucotriène A_4 (instable) -> leucotriène B_4 via une hydrolase

-> leucotriène C_4 via attaque de l'époxyde par le glutathion

-> leucotriène D_4 par perte de l'acide glutamique .

-> leucotriène E_4 par perte de la glycine .

(Borgeat et al. , 1983 ; Walstra et al. , 1984).

Certains métabolites de l'acide arachidonique ont les uns par rapport aux autres une action antagoniste et peuvent donc ainsi jouer le rôle de régulateurs du processus inflammatoire (Willoughby , 1978) . Lorsque l'acide arachidonique est coupé des phospholipides par la PLA_2 , un autre lysophospholipide est également

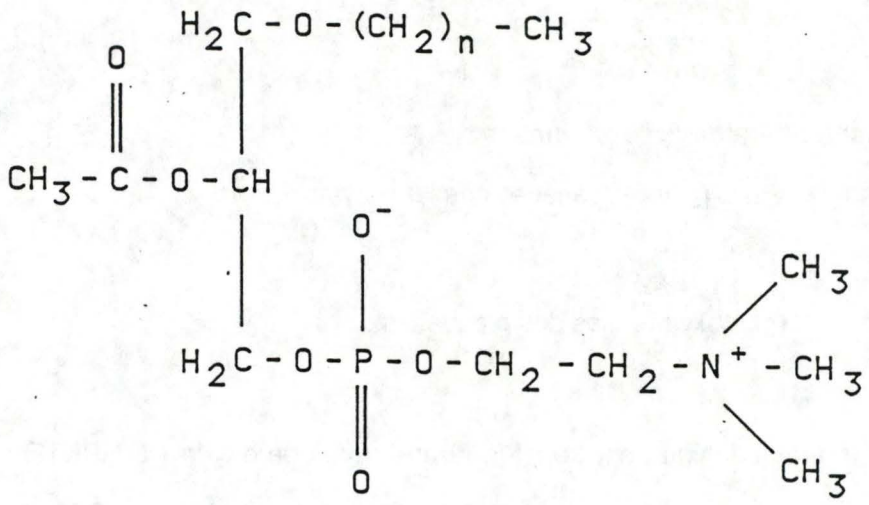


Figure 3 : Structure du PAF : 1-O-alkyl-2-acétyl-glycéro-3-phosphocholine (n=15,17).

libérée et conduit à la formation d'une troisième classe de molécule bioactive : le Platelet Activating Factor . C'est cette molécule que nous allons maintenant décrire .

B . Le Platelet Activating Factor (PAF)

1) Structure (figure 3)

Le PAF est un phospholipide membranaire de structure :

1-O-alkyl-2-acétyl-Sn-glycéro-3-phosphocholine

(Demopoulos et al, 1979) .

Ce phospholipide peut être produit par différentes cellules sous l'influence de différents stimuli (Camussi et al., 1981) . La longueur de la chaîne alkyl peut varier , le produit naturel est en fait un mélange de chaîne C16 et C18 dans les proportions 9/1 (Mallet et al., 1984) .

Le PAF est capable de se lier à l'albumine , est sensible aux phospholipase A_2 , C , D mais pas aux lipases de *Rhizopus arrhizus* (Cazenave et al., 1979) .

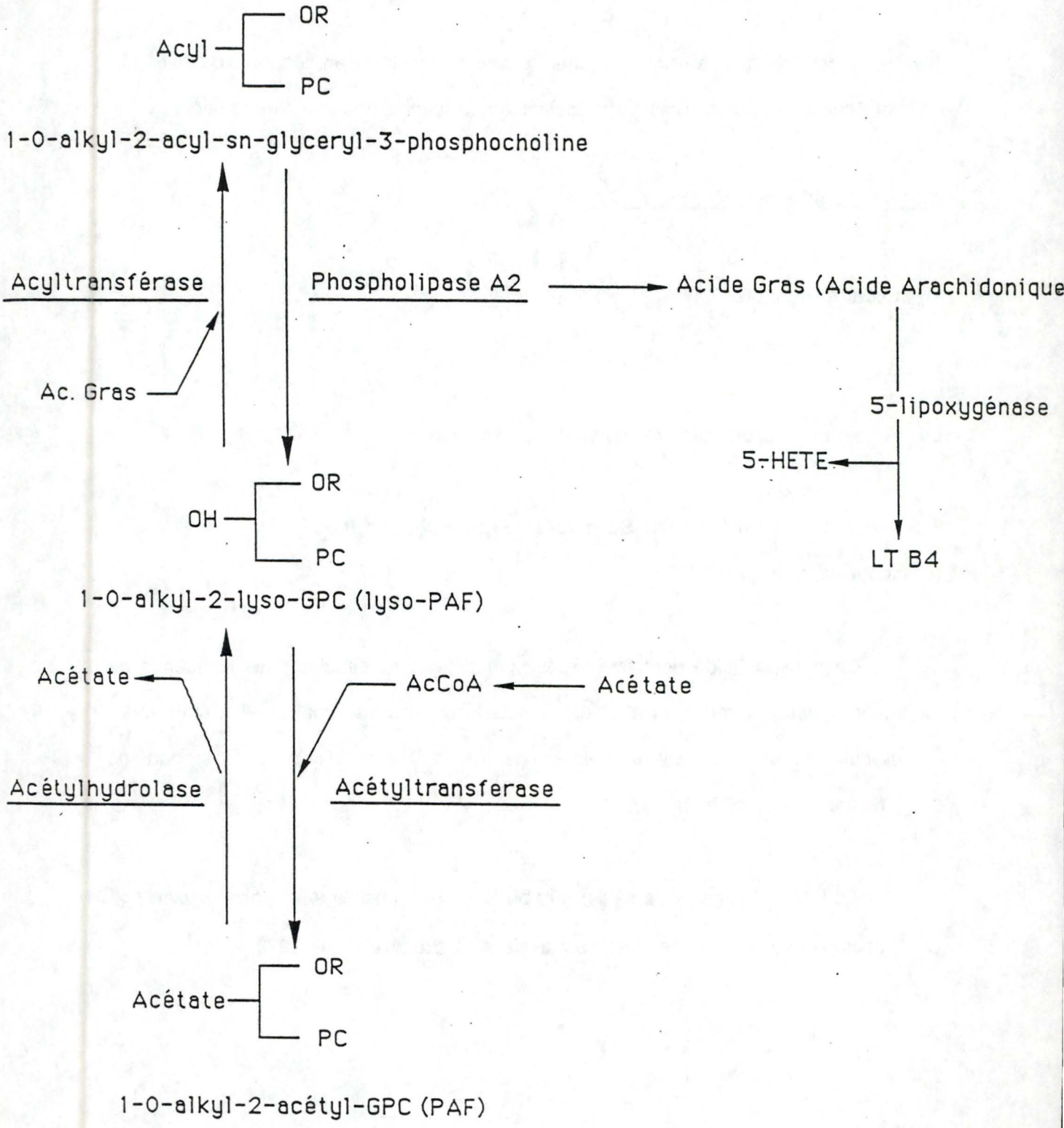


Figure 4 : Représentation schématique du métabolisme du PAF (P.C.=phosphocholine ; R= $(CH_2)_n$-CH_3) .

2) Synthèse (figure 4)

- - - - - - - - - - - - - - - - -

La synthèse de PAF se fait par un mécanisme de déacylation - réacylation (Mueller et al., 1983 ; Wykle et al., 1980 ; Mueller et al., 1984) .

La phospholipase A_2 est activée par le calcium et hydrolyse le groupement 2 acyl d'un précurseur 1-O-alkyl-2-O-acyl-Sn-glycéro-3-phosphocholine se trouvant dans les membranes .

Il faut savoir en fait que 50 % des phosphatidylcholines ont un groupement éther à la place du groupement ester en position 1 et ils possèdent l'acide arachidonique en position 2 . Lorsque ce phospholipide est clivé par la PLA_2 , il y a alors formation d'un lysophospholipide : le 1-O-alkyl-2-lyso-Sn-glycéro-3-phosphocholine (appelé aussi lyso-PAF) .

Ce dernier est acétylé en position 2 par une acétyltransférase . Cette enzyme est une enzyme dépendante du calcium qui prend l'acétate à l'acétyl coenzyme A (Ninio et al., 1982) .

L'activation de l'enzyme se ferait en fait par phosphorylation où la protéine kinase C jouerait un rôle non négligeable (Ninio et al., 1987) .

L'acétylation du lysophospholipide intermédiaire est une étape nécessaire et est un point régulateur important dans la synthèse du phospholipide actif (Albert et Snyder , 1983) .

Ce composé lyso peut aussi reformer le précurseur de départ en étant réacylé (Mueller et al., 1983) .

Au laboratoire , E. REMY (1989) a pu montrer que l'acide arachidonique a un effet inhibiteur sur la synthèse de PAF et cela via l'inhibition de l'acétyltransférase par l'arachidonoyl coA .

3) Catabolisme (figure 4)

- - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Etant donné que ce phospholipide est très actif au niveau biologique et très nocif pour la cellule , il existe un contrôle très strict de la quantité de PAF . C'est pourquoi , après quelques minutes , ce PAF est inactivé par différentes enzymes :

- l'acétylhydrolase spécifique , non dépendante du Ca^{++} et se trouvant au niveau du cytosol (Kramer et al., 1984) . Cette enzyme hydrolyse le groupement acétyl pour former le lyso-PAF .

- ce lyso-PAF n'est pas détruit mais est réacylé par des acides gras (Chilton et al., 1984 ; Kramer et al., 1984) via une transacylase membranaire . L'acide arachidonique serait ajouté préferentiellement (Ramesha et al., 1986 ; Chilton et al., 1983 ; Kramer et al., 1984) .

Malgré tout , en absence d'acide arachidonique , l'enzyme peut également utiliser des acides gras diénoïques (Ramesha et al., 1986) .

4) Association du PAF avec les cellules

- -

Certains auteurs (Lynch et al., 1986) ont montré que le PAF ne serait pas relâché dans le milieu mais resterait en grande partie associé aux cellules quel que soit le stimulus , pour autant que les cellules soient stimulées . Chez les cellules non stimulées , on ne mesure pas de PAF associé aux cellules . Pour ce qui est de la faible proportion relarguée , deux hypothèses ont été émises :

- soit le PAF est relâché mais métabolisé et donc on ne peut le détecter , ce qui mène à de faibles proportions de PAF dans le surnageant .

- soit le PAF est relâché mais ensuite reabsorbé

La première hypothèse semble plus adéquate . Il serait en fait possible que les cellules stimulées soient capables de relâcher une ou des enzymes qui puissent métaboliser le PAF . De plus , la réabsorption du PAF est faible et donc , dans le cas de la deuxième hypothèse , la quantité de PAF relarguée serait de toute manière peu importante .

Dans ce cas , plusieurs rôles peuvent être attribués au PAF intracellulaire :

- il peut augmenter la fluidité des membranes et donc favoriser la migration latérale des récepteurs .

- en étant dans les membranes , le PAF est protégé de l'inactivation par les différents enzymes du cytosol . La rétention du PAF est donc un mécanisme protecteur qui potentialise les effets du PAF .

- il faciliterait la formation des phagosomes et des phagolysosomes . Le PAF possède une chaîne acétate et se comporte comme la lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC) qui a des propriétés fusogéniques .

5) Rôle biologique du PAF

L'activité biologique du PAF dépend entre autre du degré d'insaturation de la chaîne greffée en position 1 . Ce qui prouve que la cellule , selon le mode et l'intensité du stimulus , peut réguler la puissance du PAF qu'elle synthétise en choisissant le précurseur (Mueller et al., 1984) .

Les différentes propriétés du PAF sont les suivantes :

- activation des neutrophiles , stimulation du chémotactisme , de l'agrégation , de la dégranulation et du métabolisme oxydatif .

- agrégation et dégranulation des plaquettes .

- agent bronchoconstricteur le plus puissant avec les LT (leucotriène) C_4 , D_4 , E_4 . En injection intratrachéale , il provoque des modifications pulmonaires et circulatoires similaires à celles observées pendant une crise d'asthme .

- exsudation du plasma , hémoconcentration et hypotension .

- arythmie cardiaque (Benveniste , 1985) .

- effet ulcérogénique sur l'estomac .

De plus , comme le précurseur est très souvent l'alkyl arachidonoyl GPC , le PAF est libéré en même temps que l'acide arachidonique . Celui-ci est métabolisé en PG et leucotriènes ce qui augmente donc l'impact sur les cellules .

C . Les cellules endothéliales

Enfin , un dernier acteur important intervenant au niveau des sites inflammatoires doit être étudié : il s'agit des cellules endothéliales .

1) Le tissu endothélial

- - - - - - - - - - - - - - - -

L'endothélium vasculaire est au niveau morphologique assez simple . C'est un épithélium formé d'une assise unicellulaire pavimenteuse qui tapisse le système circulatoire sanguin et lymphatique et qui repose sur une membrane basale (Juncqueira et Carneiro , 1987) . Il est en contact continuel avec le sang circulant et le tissu vasculaire ce qui implique des propriétés et des fonctions spécialisées (Engelberg , 1989) .

Sa surface est très élevée et peut atteindre chez un homme adulte plus ou moins 7000 m^2 tandis que son épaisseur n'est que de quelques micromètres , ce qui le rend apte aux échanges (Cryer , 1983) .

D'un autre côté , on ne peut considérer cet endothélium comme une population homogène fonctionnellement simple . Ce tissu peut présenter des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes selon le site et l'organe considéré . Il peut y avoir des variations au niveau des récepteurs , des protections enzymatiques , des vacuoles d'endocytose , du métabolisme cellulaire ,... (Engelberg , 1989) .

Bien que les cellules endothéliales d'un même lit vasculaire se ressemblent morphologiquement , on peut distinguer des différences régionales . En ultrastructure , on observe 3 types fondamentaux d'endothélium . L'endothélium continu des artères , veines et capillaires musculaires , l'endothélium fenestré des capillaires et l'endothélium discontinu de certains sinusoïdes .

Les caractéristiques fonctionnelles les plus importantes de l'endothélium sont:

- un rôle de barrière endothéliale entre le sang circulant et les tissus . Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans ce processus , mais il semble que la membrane basale ait aussi un rôle à jouer (Duance et Bailey , 1983) .

- une perméabilité sélective aux macromolécules .

- le maintien d'une surface non thrombogénique (= thromborésistance) c'est-à-dire qui ne réagit pas à l'état normal avec les plaquettes sanguines et les facteurs de la coagulation (Thorgeirsson , 1983) .
Les cellules endothéliales , contrairement aux cellules musculaires et aux fibroblastes n'induisent pas l'agrégation plaquettaire . Ceci est du à la secrétion de PGI_2 (prostaglandine I_2 , inhibiteur de l'agrégation) et d'autres inhibiteurs . Ici aussi , la membrane basale joue un rôle important (Duance et Bailey , 1983) .

A part les deux grandes fonctions citées ci-dessus , la membrane basale présente encore une fonction évidente , c'est l'attachement des cellules endothéliales . Celui-ci se fait via la fibronectine et permet une séparation entre le sang et les tissus sous-jacents , ceux-ci ayant une capacité d'agrégation des plaquettes .

Par ailleurs , les cellules endothéliales peuvent synthétiser des enzymes , des glycosaminoglycans , des glycoprotéines , plusieurs types de collagène et ont un rôle évident dans le métabolisme lipidique puisqu'elles possèdent dans leur membrane la lipoprotéine lipase (Cryer , 1983) .

On comprend donc facilement que les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie mais aussi qu'un dysfonctionnement de cet endothélium puisse mener à certaines pathologies telles que l'athérosclérose ou la thrombose .

2) La cellule endothéliale

- - - - - - - - - - - - - - - - - -

En culture , les cellules endothéliales prennent un aspect polygonal . Elles sont aplaties , ont un noyau ovoïde avec plusieurs nucléoles . Leur contenu cytoplasmique est le même que celui des autres types cellulaires (mitochondries , réticulum endoplasmique lisse , réticulum endoplasmique rugueux , appareil de Golgi , ...) mais on peut aussi retrouver des inclusions spécifiques telles que les corps de Weibel Palade (organelle cytoplasmique de 0,1 μ x 3 μ , composé de nombreux tubules de 150 angstroms , parallèles et entourés d'une membrane externe) . Ils sont localisés en périphérie du cytoplasme ou à proximité de l'appareil de Golgi .

Leur rôle fonctionnel reste encore un mystère mais on suppose que ces organelles jouent un rôle dans la coagulation (Thorgeirsson , 1983) . On a pu montrer que le stockage de la protéine de Von Willebrand (ou facteur VIII) se fait au niveau des corps de Weibel Palade . La synthèse de ce facteur est également une propriété spécifique des cellules endothéliales . Ce facteur peut être mis en évidence par les techniques d'immunofluorescence , c'est donc un moyen d'identification des cellules endothéliales en culture .

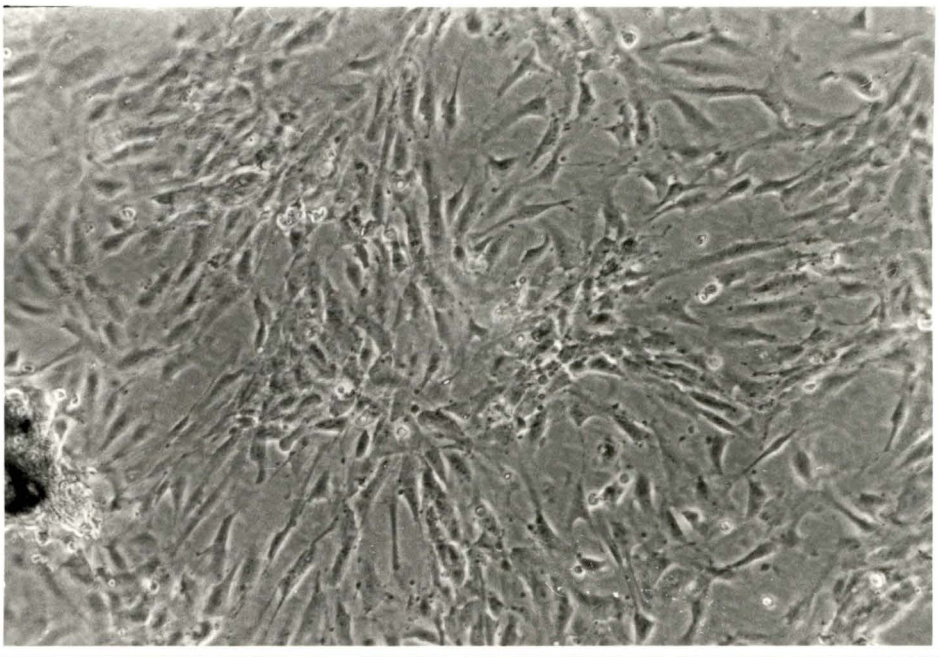


Figure 5 : Photographie de cellules endothéliales en culture à confluence .

Mode de croissance

Les cellules endothéliales en culture prélevées à partir de la veine de cordon ombilical croissent en monocouche , les cellules étant étroitement accollées . Lorsqu'elles arrivent à confluence , les cellules endothéliales arrêtent leurs divisions : c'est l'inhibition de contact (figure 5) .

Elles ont cependant une croissance limitée qui peut s'observer par un processus de dédifférenciation et une perte des caractéristiques propres à ces cellules (Thorgeirsson , 1983) .

Trois modifications sont observées :

- augmentation de la surface d'attachement au substrat .

- diminution des capacités prolifératives de la culture .

- changement au niveau des synthèses de différents facteurs libérés par ces cellules .

3) Production de PAF par les cellules endothéliales

Une des propriétés importantes de l'endothélium est d'être non thrombogénique et cela par production de PGI_2 (Prescott et al., 1984) . Malgré tout , l'endothélium peut perdre cette propriété et mener à la formation d'un thrombus . C'est le cas , par exemple , lors de la stimulation des cellules endothéliales par de la

thrombine . Ceci menant à l'adhérence des PMN (polymorphonucléaires neutrophiles) et des plaquettes . Dans ce cas , le PAF est un médiateur important qui est impliqué dans ces deux phénomènes et qui , par conséquent , joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie . En effet , les plaquettes sont nécessaires à l'intégrité vasculaire (Mc Intyre et al., 1985).

L'addition de thrombine à une monocouche de cellules endothéliales peut mener à la formation de trous dans cette couche . In vivo , cela conduit à une disruption de l'endothélium. En temps normal , le PAF produit et promeut l'adhésion des plaquettes comme moyen de maintien de cette intégrité vasculaire (Prescott et al., 1984) . Mais lorsqu'elle est soutenue , cette production de PAF peut mener à des conditions pathologiques telles que la thrombose ou l'athérosclérose .

Il s'avère maintenant exact que lorsque les cellules endothéliales sont stimulées en présence de thrombine humaine , elles produisent du PAF (0,10 à 0,20 nmole / 10^6 cellules) mais que ce PAF reste associé aux cellules au niveau des sites de liaison (Prescott et al., 1984 ; Hirafuji et al., 1987) avec une partie présente à la surface cellulaire et qu'ilpeut parfois être relâché en conditions pathologiques (Hirafuji et al., 1987) .

Le simple fait de rester associé aux cellules concentre ce médiateur et augmente localement son effet (Mc Intyre et al., 1985) . De plus , grâce à cela , il influence aussi localement la fonction des cellules sanguines comme les PMN et les plaquettes , ce qui est important dans les conditions pathologiques où l'endothélium et les cellules sont en interaction (Hirafuji et al., 1987) . Par conséquent , puisqu'il reste associé , le PAF n'agit donc pas comme une hormone (Mc Intyre et al., 1985) .

Le mécanisme de formation du PAF est identique à la voie enzymatique suivie par les PMN , c'est à dire , activation de la PLA_2 , formation de lyso-PAF et acétylation pour aboutir au PAF . Lors de la stimulation par la thrombine , on peut noter une nette augmentation de l'activité acétyltransférase et PLA_2 (Hirafuji et al., 1987) .

En même temps que le PAF se forme également du PGI_2 . En effet , il semble bien que le PAF et le PGI_2 soient produits par stimulation des mêmes récepteurs (Mc Intyre et al., 1985) . Mais il se peut également que la thrombine induise deux signaux séparés menant à la synthèse de PAF et de PGI_2 . La synthèse de PGI_2 est courte , cela est dû à une autoinactivation de la prostaglandine synthétase , tandis que celle de PAF est plus longue .

D'un côté , cette PGI_2 empêcherait l'action du PAF car ils ont des effets antagonistes , la PGI_2 empêchant l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales tandis que le PAF lui provoque l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles . Tandis qu'à l'opposé , elle prolonge l'effet du PAF par une vasodilatation et une augmentation du flux sanguin . Cette augmentation du flux sanguin apporte sur les lieux plus de cellules sur lesquelles le PAF peut avoir une action . Il s'en suit une agrégation plaquettaire , une adhérence des PMN aux cellules endothéliales , une activation des cellules et donc :

- formation d'un thrombus par agrégation des plaquettes(Mc Intyre et al. , 1985).

- dommages à l'endothélium par dégradation enzymatique et par libération d'espèces radicalaires oxygénées à partir des cellules activées (Mc Intyre et al., 1985 ; Vercellotti et al., 1989) .

- accès des éléments sanguins mais aussi des lipoprotéines à l'espace sous-endothélial par vasodilatation (Mc Intyre et al., 1985 ; Stoll et Spector , 1989). Ce qui peut mener à la libération de PAF mais aussi de TNF (tumor necrosis factor) par des macrophages dans le tissu sous-endothélial . Il semble que ce PAF puisse être métabolisé par les cellules musculaires lisses qui s'activent . Dans le cas où le PAF est relâché continuellement , il peut y avoir des dommages à l'endothélium , ce qui peut aboutir à certaines pathologies comme l'athérosclérose (Stoll et Spector , 1989) .

4) Mécanisme d'action de la thrombine (Whatley et al., 1989)

La thrombine est un stimulus physiologiquement très important pour les cellules endothéliales . Elle agit par voie de récepteurs mais le mécanisme de couplage récepteur - ligand est inconnu .

Certains auteurs (Stoll et Spector , 1989 ; Whatley et al., 1989) ont noté une augmentation du cycle des phosphoinositides lors de la stimulation avec production de messagers secondaires : le diacylglycérol et l'inositol phosphate . Ces deux messagers ayant des effets synergétiques dans les cellules intactes .

Le diacylglycérol agit sur l'activation de la protéine kinase C (enzyme régulateur de beaucoup de processus intracellulaires) . L'inositol phosphate augmente la concentration en calcium intracellulaire par relarguage de calcium à partir des différents stocks mais aussi à partir de calcium extracellulaire .

Les effets sont synergétiques car le diacylglycérol augmente l'affinité de la protéine kinase C pour le calcium .

La production de PAF en réponse aux agonistes dépend du Ca^{++} extracellulaire. Ces agonistes augmentent la perméabilité de la membrane pour le Ca^{++} , il s'en suit un flux de Ca^{++} et une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{++} suffisante pour initier la synthèse de PAF et ce , par activation de la PLA_2 .

Tout ce calcium sert entre autre à activer la PLA_2 , à former le PAF et libérer l'acide arachidonique . Dans une cellule intacte , le calcium est absolument nécessaire pour la première étape : sans ce calcium , le PAF n'est pas formé puisque la PLA_2 est dépendante du calcium . La protéine kinase C est également importante puisqu'il semble que cette protéine jouerait un rôle régulateur au niveau de la PLA_2 . Puisque la protéine kinase C est elle même activée par le diacylglycérol , il semble donc que le diacylglycérol joue un rôle important dans la modulation de la production de PAF et de PGI_2 .

5) Stimulation par les espèces oxygénées

- -

La thrombine n'est pas le seul stimulus augmentant la production de PAF par les cellules endothéliales . Lewis et al. (1988) ont montré que les cellules endothéliales mises en présence d'H_2O_2 pouvaient également produire du PAF avec les mêmes conséquences c'est-à-dire agrégation des plaquettes et adhésion des PMN . Dans ce cas , le PAF reste également associé aux cellules . Malgré tout , les concentrations requises sont élevées , ce phénomène ne se passerait qu'en conditions exceptionnelles telles que lors d'une hyperoxie .

A très forte concentration en H_2O_2 (> 10 mM) la quantité de PAF diminue. En effet , les enzymes sont inactivées , endommagées et subissent une protéolyse intracellulaire. L'H_2O_2 agirait en augmentant la perméabilité des cellules

endothéliales au calcium via la formation de peroxydes lipidiques agissant comme ionophores . Un flux de calcium traverse donc la membrane et les enzymes impliquées (PLA_2 , acétyltransférase) sont activés . Ici aussi , le PAF est formé en même temps que la PGI_2 .

Les conséquences sont assez lourdes , le PAF provoque une agrégation des plaquettes , une adhérence des PMN . Ceux-ci relarguent alors de l'H_2O_2 et amplifient le phénomène .

6) Production de PAF et adhérence des PMN

- -

L'adhésion des PMN à l'endothélium joue un rôle crucial dans les phénomènes inflammatoires et la pathologie vasculaire . Les cellules endothéliales ne sont pas passives lors des processus inflammatoires mais elles joueraient plutôt un rôle important en augmentant la chémotaxie et l'adhérence d'autres cellules , telles les cellules sanguines .

En effet , les cellules endothéliales en culture synthétisent et secrètent un grand nombre de molécules biologiques actives en réponse à différents médiateurs (Gudewicz et al., 1988) .

Certaines études ont montré que les cellules endothéliales peuvent être stimulées par différentes substances et dans ce cas , l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales est fortement augmentée .

Cet effet peut se produire in vitro avec :

- de l'H_2O_2 (Lewis et al., 1988) .

- du PMA (phorbol myristate acétate : analogue du diacylglycérol et agent inflammatoire puissant) (Gudewicz et al., 1988) .

- de la thrombine (Vercellotti et al., 1989 ; Zimmerman et al., 1985) .

- de l'interleukine 1 (IL1) (Breviario et al., 1988) .

Les granulocytes ajoutés aux cellules endothéliales stimulées par différents médiateurs de l'inflammation adhèrent fortement à cet endothélium et sont capables de relarguer des espèces oxygénées hautement toxiques , des protéases lysosomales , qui en retour endommagent l'endothélium où ils sont attachés (Vercellotti et al., 1989) . Ce phénomène étant primordial , différentes études se sont alors portées sur la connaissance du ou des médiateurs responsables de cette adhésion .

Etant donné que dans la plupart des cas , lorsque les cellules endothéliales sont stimulées (avec l'H_2O_2 , l'IL1 , la thrombine , ...) , elles produisent du PAF , ce phospholipide fut le premier médiateur impliqué dans cette adhérence . On sait entre autre que les cellules endothéliales stimulées avec de l'H_2O_2 produisent du PAF (Lewis et al , 1988) . L'H_2O_2 stimule l'adhérence des PMN couplée à une synthèse de PAF , ce qui suggère que le PAF médie les interactions cellules - cellules dans ce cas .

Les cellules stimulées avec de l'IL1 produisent également du PAF et des PGI_2 (Zavoico et al., 1989 ; Breviario et al., 1988) .

Chez les cellules endothéliales stimulées avec de le thrombine , le rôle du PAF est assez bien cerné . En effet , il y a de fortes chances que le PAF produit par les cellules stimulées intervienne dans ce phénomène d'adhérence .

On a en fait remarqué une certaine corrélation entre la synthèse de PAF et le phénomène d'adhérence des PMN notamment au niveau des concentrations stimulantes et de la cinétique . De plus , le PAF est capable de provoquer à lui seul l'adhérence des PMN ce qui prouverait son intervention à ce niveau (Zimmerman et al., 1985 ; Lewis et al., 1989) .

Certaines études (Zimmerman et al., 1985) ont montré que les doses de thrombine du même ordre de grandeur que celles nécessaires pour la formation d'un caillot in vivo pouvaient provoquer l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Cette adhérence est dépendante des cellules endothéliales et est due en partie à leurs secrétions .

La thrombine n'a pas d'effet sur la chémotaxie ou l'adhérence des PMN lorsqu'elle est ajoutée aux PMN . C'est donc un mécanisme qui requiert les cellules endothéliales . L'action se fait via un médiateur dont la synthèse est initiée par l'ajout de thrombine puisque la thrombine n'a pas d'effet direct sur les cellules . Il faut remarquer que des facteurs humoraux tels que le FMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine , stimulateur des cellules) , le LTB_4 , le C_{5a} (fragment de la cascade du complément) peuvent augmenter l'adhésion des PMN en agissant sur l'endothélium . L'activité la plus grande étant au niveau du FMLP et du C_{5a} . Ceci laisse donc supposer que l'adhésion des PMN nécessite non seulement les cellules endothéliales mais aussi un médiateur humoral . La nécessité de la thrombine fait suggérer que cette protéase stimule les cellules endothéliales pour produire un ou plusieurs facteurs qui augmentent l'ahésion des PMN .

Certains arguments tendent à démontrer l'importance du PAF :

- la thrombine stimule l'adhérence des PMN et la production de PAF

- les courbes de synthèse de PAF et d'adhérence des PMN sont similaires .

- le PAF reste associé aux cellules .

- le PAF exogène stimule l'adhérence des PMN .

- le LTC_4 (leucotriène C_4) induit l'adhérence des neutrophiles via un mécanisme qui implique la synthèse de PAF .

Ces observations mènent donc à suggérer que le PAF synthétisé et localisé dans la membrane interagirait avec les neutrophiles adjacents . Cela n'est qu'une suggestion car il se pourrait également que le PAF synthétisé soit associé à l'adhérence des neutrophiles tout en étant qu'un intermédiaire (Zimmerman et al., 1985) .

L'adhérence des neutrophiles à l'endothélium stimulé par la thrombine peut donc provoquer l'accumulation des PMN , ceci est une chose importante dans le recrutement des PMN vers les zones de dommages vasculaires . Les cellules endothéliales ont la capacité de faciliter la formation de la thrombine par la cascade de coagulation et donc en temps normal de provoquer une adhérence modérée des PMN . De plus , les PMN peuvent développer la capacité de synthétiser des facteurs tissulaires et donc d'amplifier la génération locale de la thrombine et donc de l'adhérence (Zimmerman et al., 1985) . Il faut signaler que l'adhérence des PMN à l'endothélium est un prérequis pour leur diapédèse et leur migration vers les sites inflammatoires .

Mais il est aussi possible qu'une réponse non régulée de l'endothélium à la protéine de coagulation ou une adhérence non régulée des PMN puisse mener à une thrombose ou à des dommages vasculaires importants puisque les PMN peuvent altérer l'endothélium par production d'espèces toxiques (Zimmerman et al., 1985 ; Vercellotti et al., 1989 ; Lewis et al., 1988) .

Il faut noter cependant que chez les cellules endothéliales stimulées avec le PMA , l'adhérence des PMN n'est pas due au PAF . Le PMA ne provoquant pas la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales . Le mécanisme impliqué serait plutôt un attachement non spécifique du PMA aux cellules endothéliales .

7) Mécanisme d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales

L'adhérence des neutrophiles circulants à l'endothélium vasculaire est l'étape initiale de la diapédèse , processus par lequel les PMN migrent à travers les vaisseaux sanguins pour s'accumuler aux sites d'inflammation dans les tissus extravasculaires (Tonnesen , 1989) . Lors de la réponse inflammatoire aïgue , l'apport de neutrophiles est le premier mécanisme de défense contre l'infection . La migration des neutrophiles se fait grâce à un gradient chémoattractant de C5a (fragment du complément appelé anaphylatoxine) , FMLP (stimulateur des cellules), LTB_4 , PAF , médiateurs impliqués dans beaucoup de pathologies. Les neutrophiles adhèrent alors à l'endothélium le plus proche de l'inflammation , ce qui suggère que cet endothélium serait plus adhésif.

Trois hypothèses sont envisagées :

- soit l'endothélium est altéré , cela n'est malheureusement pas apparent au microscope électronique . Il est possible que dans ce cas , les altérations de l'endothélium favorisent l'adhésion des PMN .

- soit l'endothélium est intact et les PMN répondent à un gradient chémotactique généré par un stimulus extravasculaire . Le rôle de l'endothélium est alors passif.

- soit l'endothélium joue un rôle de barrière active via la synthèse de différents médiateurs et l'expression à sa surface de molécules d'adhérence .

Dans tous les cas , l'adhérence à l'endothélium est un prérequis pour une migration extravasculaire des neutrophiles au site de l'inflammation et peut être aussi impliqué dans les différentes pathologies vasculaires associées à l'inflammation .

Une fois qu'ils adhérent à l'endothélium , les neutrophiles vont alors émettre des pseudopodes pour s'insérer au niveau des jonctions intercellulaires .

Les mécanismes impliqués dans cette migration sont encore inconnus mais il semblerait que des récepteurs spécifiques des neutrophiles pour la laminine , une protéine de la matrice endothéliale , puissent faciliter la diapédèse .
La pénétration du vaisseau sanguin implique que les neutrophiles se frayent un chemin via une relâche limitée d'enzymes protéolytiques à partir des granules spécifiques .

Dès que la barrière endothéliale est passée , les neutrophiles vont alors migrer à travers le tissu et se diriger vers les sites de l'inflammation .

Des études in vitro sur les mécanismes d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales ainsi que d'agrégation de PMN ont montré que :

- Les PMN adhèrent plus facilement aux cellules endothéliales plutôt que d'autres types cellulaires (fibroblastes , cellules musculaires lisses) .

- L'adhésion des PMN aux cellules endothéliales est dépendante des cations .

- Les facteurs chémotactiques augmentent l'adhérence des neutrophiles de manière dépendante du temps et de la dose .

On a pu constater que les neutrophiles , comme les autres cellules , ont à leur surface une charge négative qui les empêche de s'agréger , qui permet la séparation des cellules par répulsion électrostatique et donc empêche l'agrégation des PMN entre eux et aux cellules endothéliales .

Lors de l'activation des neutrophiles par des facteurs chémotactiques , il y a diminution des forces répulsives électrostatiques entre les neutrophiles et les cellules endothéliales , cela permet aux forces attractives de Van Der Walls de promouvoir le contact entre cellules .

Comme les neutrophiles , les cellules endothéliales ont une charge négative à leur surface , la réduction de cette charge nette , induite par un stimuli au site d'inflammation peut permettre l'adhésion . Cependant , des modulations de la charge nette à la surface des neutrophiles n'ont pas été corrélées avec des altérations dans l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales .

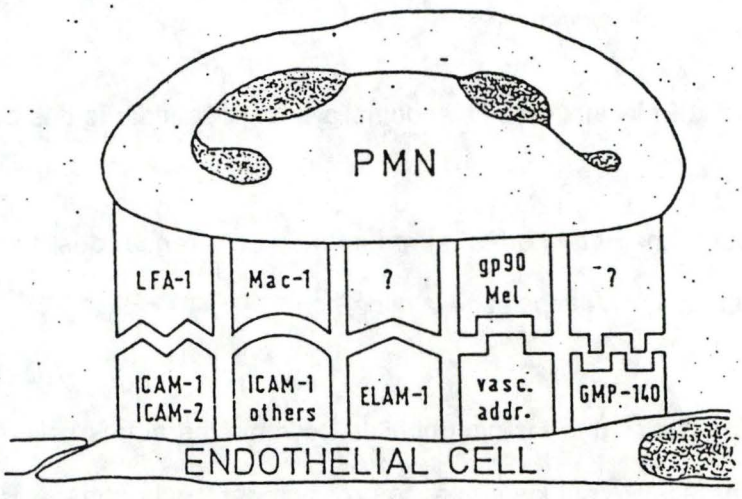


Figure 6 : Récepteurs et ligands impliqués dans l'adhésion des PMN aux cellules endothéliales , d'après Ley (1989) .
Vasc. addr.= vascular addressins , ligand de GP 90 qui est responsable du retour au niveau du tissu lymphoïde .

Différentes observations suggèrent que les granules spécifiques contenus dans les neutrophiles joueraient un rôle important dans l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium :

- la dégranulation diminue la charge de surface négative et augmente l'adhésion des neutrophiles .

- l'exocytose se passe durant l'adhérence in vitro et l'exsudation in vivo .

- les granules spécifiques contiennent des protéines qui pourraient faciliter l'adhérence (la lactoferrine jouerait un rôle important) .

L'adhérence joue donc un rôle important . Des interactions altérées entre les cellules endothéliales et les neutrophiles seraient impliquées dans certains désordres vasculaires . Certaines " injury " peuvent augmenter l'adhérence des neutrophiles : les neutrophiles adhèrent plus vite à une monocouche exposée à l'hyperoxie , à une infection virale , à une protéolyse (Harlan , 1985) .

a) les molécules d'adhésion des leucocytes (figure 6)

Les neutrophiles sont capables d'adhérer aux cellules endothéliales , cette adhérence est augmentée par la stimulation via des agents chémotactiques comme le FMLP , LTB_4 , C5a ou via des activateurs de la protéine kinase C : le PMA ou l'ionophore du calcium .

Cette activation est associée à une surrégulation de l'expression de récepteurs à la surface des leucocytes : ce sont les LEUCAM (leukocyte adhésion molécule) , complexe glycoprotéique d'adhésion . Dans une cellule non stimulée , un certain nombre de PMN adhèrent aux cellules endothéliales (un faible nombre) mais chez les cellules

stimulées , les molécules d'adhésion prennent une conformation tout à fait différente , ce qui fait qu'un plus grand nombre de PMN peuvent adhérer aux cellules endothéliales .

Les molécules LEUCAM font partie de la famille des récepteurs qui comprennent aussi les récepteurs cellulaires pour la fibronectine , vitronectine , collagène , laminine et autre (= intégrines) (Ley , 1989) .

Le complexe glycoprotéique d'adhésion comprend une famille de trois hétérodimères assez proches au niveau structurel et fonctionnel . Chacun comprenant une sous unité alpha différente de haut poids moléculaire CD11 (a,b,c) associé avec une sous unité béta commune de faible poids moléculaire (CD18) (Tonnesen , 1989).

- CD11 a détermine l'antigène associé à la fonction lymphocytaire , LFA1 , qui est impliqué dans l'adhésion des cellules (Ley , 1989) et la cytotoxicité impliquant les lymphocytes (Tonnesen , 1989) .

- CD11 b / CD18 encore appelé MAC1 est aussi le récepteur pour C3bi (Tonnesen ,1989 ; Ley , 1989) .
Il est exprimé sur les granulocytes , monocytes , cellules natural killer et médie les fonctions d'adhésion comprenant l'agrégation , la chémotaxie , la cytotoxicité , l'interaction avec C3bi (Tonnesen , 1989) .

- CD11 c / CD18 ou p150,95 est présent sur les granulocytes , les monocytes et est impliqué dans l'adhésion des monocytes .

Par utilisation d'anticorps , clonage et séquençage , on a pu constater que les 3 sous - unités α sont des polypeptides transmembranaires avec un long domaine extracellulaire (Tonnesen , 1989) . La sous - unité ß est un polypeptide de la membrane , riche en cystéine , homologue des récepteurs à la fibronectine et la

vitronectine qui de plus est un membre de la famille des récepteurs intégrines impliqués dans les interactions cellules - cellules et cellule - matrice (Tonnesen , 1989) .

Via l'utilisation d'anticorps monoclonaux , on a pu montrer que l'effet inhibiteur sur l'adhésion des granulocytes est plus important si l'anticorps est dirigé contre MAC1 . On a pu également montrer qu'un site actif de MAC1 est impliqué dans l'adhérence des neutrophiles stimulés avec le PMA ou l'ionophore A23187 (dans ce cas , on augmente l'expression de CD11 b / CD18 de 2 à 14 fois). Cette surrégulation se passe via la mobilisation de glycoprotéines préformées à partir d'un compartiment vésiculaire intracellulaire (probablement les granules spécifiques) par fusion avec la membrane plasmique (Tonnesen , 1989) .

b) les molécules d'adhésion des cellules endothéliales (figure 6)

Les molécules d'adhésion LEUCAM reconnaissent certains ligands sur les cellules endothéliales .

- L'interaction la plus connue est celle entre LFA1 des leucocytes et ICAM1 (intercellular adhesion molecule) ou CD54 des cellules endothéliales (exprimé en faible quantité) (Smith et al., 1989 ; Ley , 1989) .

ICAM1 est une glycoprotéine de surface inductible , présente sur les cellules endothéliales , les fibroblastes , les cellules épithéliales , ... et qui est le ligand de LFA1 . C'est une protéine intégrale dans la membrane avec un domaine extracellulaire comprenant 5 régions Ig - like . ICAM1 est classé dans la super famille immunoglobulinique (Tonnesen , 1989) .

Chez les cellules endothéliales non stimulées , ICAM1 est présent en faible quantité . Après stimulation par l'IL1 , le TNF (Tumor Necrosis Factor) ou les LPS (lipopolysaccharides) , son expression est fortement augmentée . ICAM 1 pourrait aussi être un ligand alternatif pour MAC 1 .

Récemment , une deuxième ICAM , ICAM2 , a été décrit comme un ligand alternatif pour LFA1 .

- Une deuxième molécule responsable de l'adhésion est ELAM1.
ELAM1 (endothelial leukocyte adhesion molecule) n'est pas présent chez les cellules endothéliales non stimulées (Tonnesen , 1989 ; Ley , 1989) .
La stimulation des cellules endothéliales induit l'expression de cette protéine de surface après 4 à 6 heures . Son ligand sur les PMN n'a pas encore été identifié .

- GMP140 : glycoprotéine membranaire des plaquettes et des corps de Weibel Palade des cellules endothéliales . Après stimulation par la thrombine , la GMP140 est extériorisée en quelques minutes et sert de molécule d'adhésion . La GMP140 fait partie de la famille des sélectines vasculaires comme ELAM1 et MEL14 .

- L'antigène MEL14 est un antigène impliqué dans la recirculation des lymphocytes au niveau des nodules lymphoïdes . C'est le récepteur qui les fait retourner ("homing récepteur ") et les fait lier aux cellules endothéliales des veinules post - capillaires .

Toutes ces molécules interviennent donc dans l'attachement des PMN aux cellules endothéliales . Mais il ne faut pas perdre de vue que lorsque les PMN sont attirés vers les foyers inflammatoires , ils sont activés . Par cette activation , ils sont alors capables de relâcher différentes substances qui ont la capacité d'endommager les

cellules endothéliales : ceci inclut les espèces dérivées de la réduction de l'oxygène moléculaire , des protéases neutres comme l'élastase .

Ces substances peuvent alors endommager les cellules endothéliales aux sites d'attachement des PMN : il y aurait ensuite une augmentation de la perméabilité vasculaire , des changements métaboliques et même perte de cellules endothéliales .

Pour éviter ces désagréments , il semble que les cellules endothéliales aient mis en jeu un moyen de se protéger des PMN . Elles évitent donc et limitent les dommages par modulation de l'activité des neutrophiles et permettent ainsi une expression plus forte du pouvoir bactéricide des neutrophiles dans le milieu extravasculaire après diapédèse .

En fait , les cellules endothéliales peuvent simultanément permettre la migration des PMN à travers l'endothélium tout en se protégeant des espèces oxygénées (Rinaldo et Basford , 1987) . On a en fait remarqué que des cellules endothéliales incubées avec des neutrophiles inhibent fortement la relâche d'anions superoxydes in vitro mais aussi le relarguage des granules et l'activation du shunt de l'hexose monophosphate (Hoover et al. , 1982) . Plus récemment , on a montré que le surnageant de cellules endothéliales stimulées par l'ionophore du calcium contient un facteur qui inhibe la chémoluminescence des neutrophiles (Rinaldo et Basford , 1987).

Trois mécanismes ont été proposés pour décrire la manière dont les cellules se protègent :

- Le contact cellule - cellule et / ou l'adhérence entre neutrophiles et cellules endothéliales limite l'expression complète de l'activation des neutrophiles .

- Des médiateurs solubles produits par les cellules endothéliales peuvent moduler l'activation des neutrophiles .

- Les cellules endothéliales seraient capables de produire des "scavengers" de radicaux libres et des antioxydants pour se protéger .

Première hypothèse :

Cette hypothèse est assez controversée . Certains auteurs disent que l'adhérence aux membranes biologiques a une influence modulatrice sur les facteurs qui induisent l'activation des neutrophiles , d'autres disent par contre que l'adhérence des neutrophiles est nécessaire pour leur activation et l'altération des cellules endothéliales.

Deuxième hypothèse :

Il est évident que certains médiateurs solubles peuvent être produits par les cellules endothéliales et contribuent ainsi à inhiber la poussée d'activité respiratoire des neutrophiles . Le surnageant de cellules en culture inhibe l'activation des neutrophiles même lorsqu'il n'y a pas de contact .
Les inhibiteurs produits seraient :

les prostacyclines et la PGE_2 mais les inhibiteurs de la cyclooxygénase ne restaurent pas l'effet .

l'adénosine , un anti-inflammatoire relâché par les cellules endothéliales et d'autres tissus , est capable de moduler la production d'anions superoxydes générés par les neutrophiles , son effet pourrait aussi se faire au niveau de l'adhérence .

Troisième hypothèse :

Les cellules endothéliales se protègent elles-mêmes par des "scavengers" de H_2O_2 et d' $O_2^{\cdot(-)}$. Lorsque cette capacité de dégradation est excédée , des dysfonctionnements apparaissent . La dégradation se fait via le cycle de la glutathione peroxydase et de la catalase mais aussi via la superoxyde dismutase (Rinaldo et Basford , 1987) .

D. But de ce travail

Comme nous venons de le voir , le PAF est un médiateur important qui joue un rôle essentiel dans les processus inflammatoires . Ce phospholipide peut être produit par différents types de cellules y compris les neutrophiles et les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales en culture sont , comme l'ont montré certains auteurs (Hirafuji et al., 1987 ; Whatley et al., 1988) , capables de synthétiser du PAF lorsqu'elles sont stimulées avec de la thrombine mais aussi de l'H_2O_2 , de l'IL1 , ... Les cellules endothéliales ont donc un rôle actif dans les mécanismes inflammatoires . Nous nous interesserons esentiellement à la synthèse de PAF chez des cellules endothéliales humaines en culture stimulées avec de la thrombine . Dans ces conditions , le PAF et différentes prostaglandines peuvent être synthétisés .

La première partie du travail concernera la mise au point d'une méthode de production de PAF par les cellules endothéliales et de son dosage . Des études (Whatley et al., 1988) ont en fait montré que la production de PAF est maximale après 5 minutes d'incubation avec de la thrombine à concentration de 2 unités / ml . Ces études nous serviront de base pour notre mise au point .

La deuxième partie du travail visera une étude de la régulation de la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales . En fait , E.REMY (1989) a déjà montré que chez les PMN , les acides gras insaturés avaient un effet inhibiteur sur la synthèse de PAF tandis que les acides gras saturés n'avaient eux aucun effet . Puisqu'il semble que la voie de synthèse du PAF soit identique chez les PMN et les cellules endothéliales (Hirafuji et al., 1987) , l'effet inhibiteur pourrait être le même chez ces deux types cellulaires . Cette hypothèse sera donc vérifiée .

La troisième partie du travail concernera l'étude de l'importance du PAF dans une fonction biologique telle que l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . En effet ce phénomène est fort intéressant à étudier puisque c'est celui qui est le premier impliqué lors de l'inflammation mais aussi dans les différentes pathologies inflammatoires . Certains auteurs ont en fait déjà suggéré que le PAF serait un médiateur impliqué dans ce phénomène (Zimmerman et al., 1985) . Afin de mieux cerner quel est le rôle du PAF , nous nous attacherons essentiellement à des comparaisons entre les différentes cinétiques que nous obtiendrons lors de la synthèse de PAF et celles obtenues lors des tests d'adhérence que nous réaliserons . De même , les acides gras saturés et insaturés seront testés à ce niveau pour voir si leur effet inhibiteur de la synthèse de PAF est parallèle à leur effet sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales .

MATERIEL ET METHODES

A. Isolement des cellules endothéliales à partir de la veine ombilicale humaine

La méthode utilisée est adaptée d'une procédure décrite pour la première fois en 1963 par Maruyama (Jaffe et al., 1973) . Cette mise en culture nécessite l'emploi de matériel stérilisé (stérilisateur - autoclave) et un travail sous hotte à flux laminaire .

Le cordon ombilical est placé tout de suite après la naissance dans un milieu de conservation de composition :

KCl 4mM , NaCl 140 mM , tampon HEPES 10 mM (Janssen chemica) , D glucose 1mM , streptomycine (Sigma) 1OO µg / ml , fungizione (Gibco Scotland) 0,25 µg / ml , pénicilline 100 µg /ml (Sigma) .

Le milieu est porté à pH 7,3 et conservé à 4°C en chambre froide . Cette solution est stérilisée par filtration (pompe péristaltique filtre 0,22 µ millipore) , puis collectée dans des récipients stérilisés à l'alcool et conservés à 4°C .

Mode opératoire

Un cathéter est introduit dans la veine ombilicale puis fixé par un serre joint en plastique . Le cordon est rincé avec une seringue de 50 ml (Terumo , Ribbon Pack , U.S.A.) qui contient une solution de NaCl 0,15 M tamponnée par du phosphate 10 mM pH 7,4 (PBS) stérile ainsi que de la fungizione et des antibiotiques de même type et même concentration que le milieu de récolte des cordons .Après rinçage , l'autre extrémité est ligaturée avec un deuxième serre joint . Un bouchon (Travenol laboratoires , U.S.A.) est placé sur le cathéter .

Avec une seringue de 5 ml avec aiguille , on introduit au travers du bouchon une solution de collagénase à O,05 % (Sigma type II) et ce afin de détacher les cellules de la membrane basale . Le cordon est alors placé dans une boîte de pétri en verre et incubé pendant 35 minutes à 37°C en chambre chaude .

Après ce temps , le cordon est suspendu par une extrémité à un statif dont la pince est rincée à l'alcool . On récolte la solution de collagénase et les cellules endothéliales . Le cordon est rincé avec 10 ml de M199 + S

- M199 : milieu en poudre (Gibco , Paris) avec des sels de Hanks , de la L-glutamine 100 g / ml (Sigma) , de l'HEPES 10 mM , du NaHCO3 1,75 gr / l . Le tout porté à pH 7,2 avec du NaOH 2N .

- S : sérum de veau foetal (Gibco , Paris) . Représente 20 % du volume final .

afin de récupérer le maximum de cellules et inhiber l'action de la collagénase .

La solution recueillie est centrifugée (1000 rpm , 10 min , Hettich universal) . Les tubes sont décantés , le culot est resuspendu dans 5 ml de M199 + S et transféré dans une boîte de culture de 25 cm^2 (Cell Cult , Sterilin , Angleterre) recouverte d'une fine couche de gélatine à 0,2 % . En effet , les cellules ont besoin d'un substrat organique pour pouvoir s'y accrocher d'où la nécessité de gélatiniser les boîtes .

Le lendemain , on change le milieu afin de retirer les globules rouges et les cellules mortes . La surveillance du milieu de culture se fait grâce à l'indicateur de pH qu'il contient et qui nous renseigne sur le moment opportun pour le renouveler .

Choix de la veine ombilicale

Dans un cordon ombilical , on trouve une veine et deux artères . Le diamètre de la veine est plus grand que celui des artères . De plus , les artères sont plus musculeuses et pourraient donc subir une vasoconstriction importante . Ce choix est donc purement d'ordre pratique .

Il faut savoir également que l'âge du cordon , c'est à dire le temps entre sa récolte et sa mise en culture , est un facteur important qui influence la qualité des cellules et la rapidité avec laquelle la confluence est atteinte . Des cordons ombilicaux de plus de 7 jours peuvent encore libérer des cellules mais celles-ci pousseront beaucoup plus lentement .

B. Repiquage des cellules endothéliales

Pour la facilité des expériences et afin de ne pas utiliser un trop grand nombre de cellules endothéliales à chaque expérience , celles-ci sont repiquées dans des boîtes multipuits (Cell Cult , Sterilin , Angleterre) à 6 de 9 cm^2 ou 24 puits de 2 cm^2 de la manière suivante :

Après avoir rincé la boîte avec du milieu sans sérum deux fois pendant 2 minutes , on ajoute 3 ml de trypsine à 0,25 % + EDTA à O,2 mg / ml (Gibco , Paisley , Scotland) et on incube à 37°C .

L'évolution du détachement des cellules est suivi en microscopie optique .

Lorsque les cellules commencent à se détacher , on ajoute deux fois 3 ml de M199 + 20 % de sérum et on récupère les cellules . Les cellules sont alors centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm , récupérées et replacées dans le type de boîte nécessaire , boîte préalablement recouverte de gélatine .

C. Production de PAF par les cellules endothéliales

La découverte de la production de PAF par les cellules endothéliales étant assez récente , il nous fallait tout d'abord trouver les conditions où les cellules endothéliales produisent ce PAF mais aussi les conditions de dosage .

On savait par la littérature que les cellules endothéliales sont capables de synthétiser du PAF lorsqu'elles sont stimulées avec de la thrombine . Le maximum de production se situant à 5 minutes de temps d'incubation avec de la thrombine à concentration de 2 unités / ml (Hirafuji et al., 1987 ; Whatley et al., 1988) .

Afin d'être sûr que la quantité de PAF produite est suffisante que pour être dosé , on travaille sur boîtes de culture de 25 cm^2.

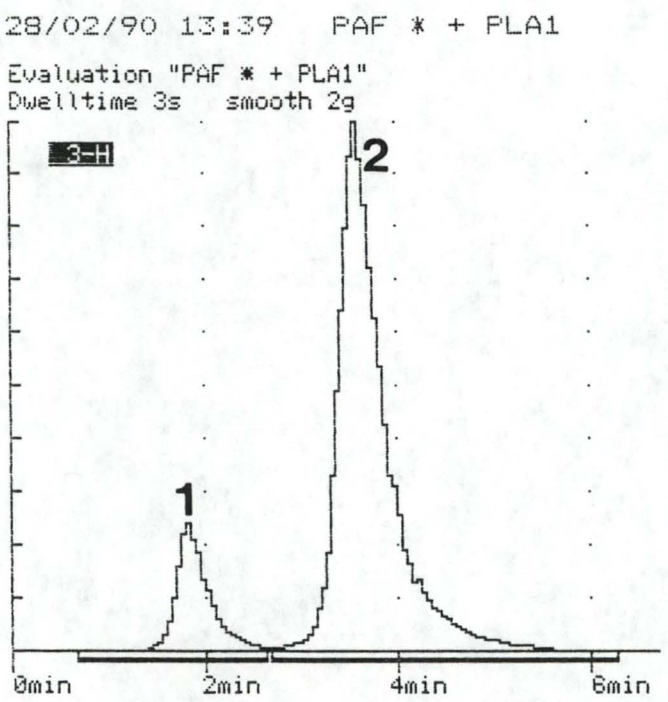
Au niveau du dosage deux méthodes sont envisageables :

- la première est une méthode de dosage à l'HPLC (high pressure liquid chromatography) et qui est basée sur une détection de PAF radioactif .

- la deuxième méthode se base sur un dosage de PAF par agrégation plaquettaire .

#	Name	from	R.T.	to	3-H [cts]	% ROI	% all
			Radioactive				
1	2-2	0000m39s	0001m48s	0002m36s	4773.0	13.9	13.9
2	3-3	0002m39s	0003m33s	0006m15s	29481.0	86.1	85.6

Gross total	:	34422.0
Net total	:	34422.0
Gross total in ROI	:	34254.0
Net total in ROI	:	34254.0

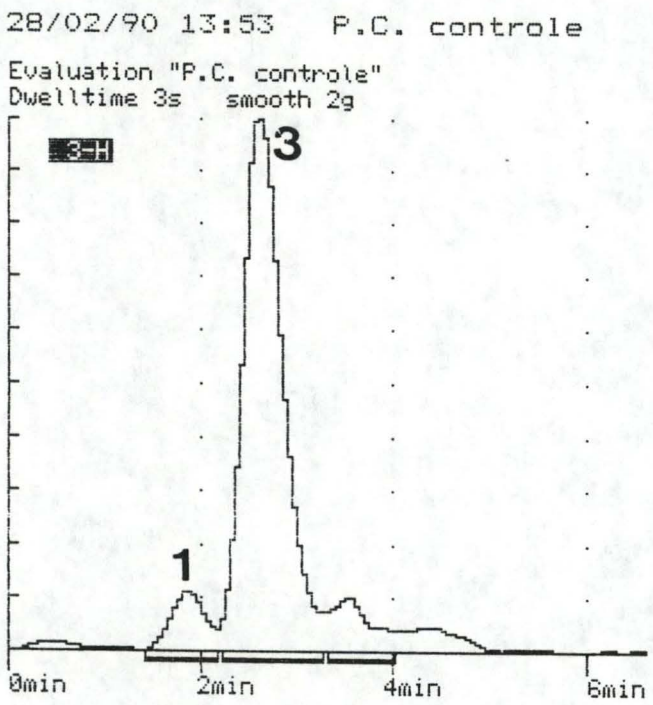


b) PAF standard avec PLA_1 injecté à l'HPLC .

1=volume d'élution ; 2=pic de PAF

#	Name	from	R.T.	to	3-H [cts]	% ROI	% all
			Radioactive				
1	4-4	0001m24s	0001m51s	0002m09s	123.6	8.2	7.4
2	5-5	0002m12s	0002m36s	0003m15s	1246.5	83.1	75.0
3	6-6	0003m18s	0003m30s	0004m00s	130.7	8.7	7.9

Gross total	:	1661.3
Net total	:	1661.3
Gross total in ROI	:	1500.8
Net total in ROI	:	1500.8



c) P.C. standard sans PLA_1 injecté à l'HPLC .

1=volume d'élution

3= pic de P.C.

1) Production de PAF radioactif en vue d'un dosage par comptage radioactif

---

Principe

Les cellules endothéliales , lorsqu'elles sont stimulées , ont la capacité d'incorporer dans le PAF , l'acide acétique radioactif présent dans le milieu d'incubation tout comme cela se fait chez les PMN . 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 .

Solutions

- HBSS (Hanks balance salt solution)

  NaCl 0,2 M , glucose 5 mM , KCl 5 mM , $NaHCO_3$ 4 mM , $MgSO_4$ $7H_2O$ 0,4 mM , $MgCl_2$ $6H_2O$ 0,4 mM , Na_2HPO_4 $2H_2O$ 0,3 mM , KH_2PO_4 0,4 mM .

  Porter à pH7,4 .

- HBSS + $CaCl_2$ 0,2 M (conc . finale = 1 mM) .

- HBSS + $CaCl_2$ + thrombine + acide acétique radioactif .

  40 µCi / ml d'acide acétique radioactif (Amersham , Belgique) dans HBSS $CaCl_2$.

  2 U / ml de thrombine (Sigma Chemical Company , St Louis) dans HBSS $CaCl_2$.

- Solution 0,1 M d'acétate de sodium .

- Solution 50 mM d'acide acétique dans le méthanol .

Méthode

Cette méthode est adaptée de celle de Mueller et al.(1983) .

a . Incubation et production de PAF radioactif

Les cellules endothéliales sont débarassées du milieu de culture et rinçées deux fois avec 5 ml d'HBSS $CaCl_2$. Elles sont préincubées durant 10 minutes avec 1,5 ml d'HBSS $CaCl_2$.

Elles sont ensuite stimulées avec 500 µl du mélange HBSS $CaCl_2$ - acide acétique radioactif - thrombine préalablement incubé à 37°C . On incube durant 5 minutes puis on ajoute 1 ml de méthanol contenant 50 mM d'acide acétique pour stopper la réaction .

b . Extraction

La procédure d'extraction est tirée de la méthode de Bligh et Dyer (1959) .

Une fois la réaction stoppée , on racle les cellules et on les récupère .
On rince deux fois la boîte avec 2 ml de méthanol .
On ajoute 5 ml de chloroforme et on agite durant 3 minutes .

Le mélange reçoit alors 5 ml de chloroforme et est agité durant 30 secondes , il reçoit ensuite 5 ml d'eau contenant 0,1 M d'acétate de sodium et est agité 30 secondes .

La phase chloroforme , séparée de la phase supérieure est lavée avec 19 ml de méthanol / eau (10 / 9 ; V / V) pour enlever le ^{3}H acétyl coA et le ^{3}H acétate résiduels . Elle est ensuite évaporée sous un flux d'azote .

Les lipides sont resuspendus dans 400 µl de chloroforme / méthanol (4 / 1 ; V / V) pour être ensuite injectés à l'HPLC .

L'HPLC (high pressure liquid chromatography) est un appareil Kontron HPLC System 600 équipé d'une colonne lichrosorb DIOL Si 60 , 5 µ , 4,6 X 250 nm(phase inverse) (Alltech) . La radioactivité est mesurée en continu à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Model LB 506 , Berthold , FRG.) connecté en série avec l'HPLC .

Composition de la phase mobile :

acétonitrile / méthanol / acide phosphatidique (780 / 30 / 8 ; V / V) .

Le débit est réglé sur 2 ml / min .

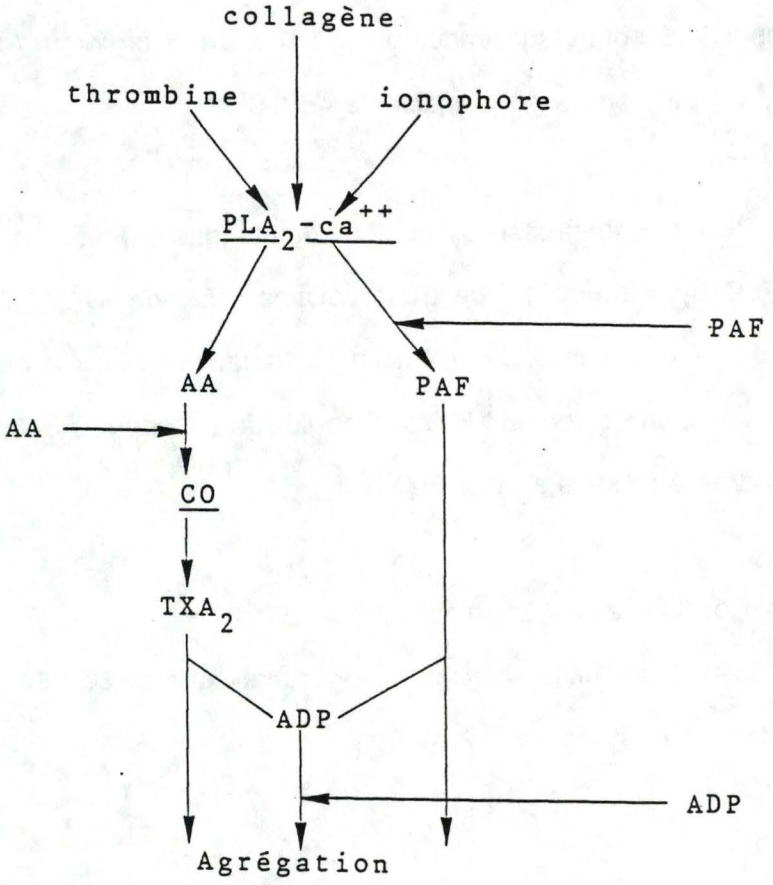


Figure 7 : Schéma des divers métabolites intervenant dans l'agrégation des plaquettes PLA_2= phospholipase A_2 ; CO= cyclooxygénase ; AA= acide arachidonique ; TXA_2= thromboxane A_2 ; PAF= platelet activating factor.

2) Production de PAF non radioactif en vue d'un dosage par agrégation plaquettaire

---

Principe

Trois médiateurs intracellulaires : l'ADP , le thromboxane (TXA_2) et le PAF sont responsables de l'agrégation des plaquettes provoquée par la thrombine , le collagène ou l'ionophore du calcium (en présence de calcium) .

La PLA_2 , activée par ces différents agents stimulateurs (thrombine , collagène , ionophore) libère l'acide arachidonique et le PAF .

L'acide arachidonique génère du TXA_2 qui provoque l'agrégation directement ou indirectement via l'ADP .Le même mécanisme est applicable au PAF , il peut agir directement ou indirectement via l'ADP (figure 7).

Dans le cas où la PLA_2 est inhibée , l'agrégation n'a pas lieu mais l'inhibition de l'agrégation peut être courcircuitée par addition directe de PAF ou d'acide arachidonique .

Si la cyclooxygénase est inhibée (par l'indométhacine) l'agrégation peut encore avoir lieu via le PAF .

Il faut tenir compte dans cet ensemble de la PLC (phospholipase C), de l'acide phosphatidique et l'acide lysophosphatidique qui peuvent jouer un rôle dans l'agrégation (Vargaftig , 1981) .

Solutions

- Solution d'HBSS $CaCl_2$ (composition voir p. 25) .
- thrombine (Sigma) .

  2 U / ml d'HBSS $CaCl_2$.
- Solution 50 mM d'acide acétique dans le méthanol .
- Solution citrate : 3,8 % de tri-sodium citrate + 2 % de D-glucose dans l'eau distillée .
- Tampon tyrode (TG) :

  2,6 mM KCl , 1 mM $HgCl_2$ $6H_2O$, 24 mM $NaHCO_3$, 137 mM NaCl , glucose 0,1 % , gélatine 0,25 %

  TG + $CaCl_2$: 1,3 mM $CaCl_2$ $6H_2O$ dissous dans TG , porter à pH 7,3 .

  TG + EGTA : 0,2 mM EGTA dissous dans TG , porter à pH 6,5 .
- indométhacine (Sigma) 1,5 mg / ml dans l'éthanol .

Méthode

a . Production de PAF par les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont débarassées du milieu de culture et lavées deux fois avec 5 ml d'HBSS $CaCl_2$.

On ajoute ensuite 1,5 ml d'HBSS $CaCl_2$ et on incube durant 10 minutes à 37°C.

On ajoute ensuite 500 µl du mélange HBSS $CaCl_2$ - thrombine prélablement incubé à 37°C .

Après 5 minutes d'incubation , on stoppe la réaction en ajoutant 1 ml de méthanol contenant 50 mM d'acide acétique .

On racle les cellules et on les récupère . On rinçe deux fois la boîte avec 2 ml de méthanol et on récupère les cellules restantes .

b . Extraction des lipides

Extraction de Bligh et Dyer (1959)

On ajoute aux cellules 2,5 ml de chloroforme et on agite durant 3 minutes .
On ajoute au mélange 2,5 ml de chloroforme , on agite durant 30 secondes . Le mélange reçoit alors 2,5 ml d'eau et est agité durant 30 secondes .
Ici , pas de lavage . On récupére la phase inférieure contenant les lipides .
On évapore le chloroforme sous un flux d'azote .
On resuspend les lipides dans 500 µl de la phase mobile qui sera utilisée lors de l'HPLC .

c . Séparation des lipides sur HPLC

L'appareil HPLC est un appareil Kontron HPLC System 600 , il est équipé d'une colone lichrosorb DIOL (phase inverse) .

Phase mobile de composition :

t-butyl méthyl éther / méthanol / H2O / NH4OH

(200 / 100 / 10 / 0,2 ; V / V) .

Le débit est réglé sur 2 ml / minutes .
Le volume d'élution du PAF est connu par un étalonnage avec du ^{3}H PAF standard (Amersham , Belgique) .

On récolte la fraction correspondant au volume d'élution du PAF . Le solvant est évaporé sous un flux d'azote .

On resuspend le PAF dans 100 µl d'éthanol + 500 µl de TG $CaCl_2$ contenant 0,25 % de Serum Albumine Bovine (SAB) délipidée (Sigma) .

d . Dosage du PAF

La méthode est tirée de celle de Benveniste et al.(1972) qui a été légèrement modifiée.

Préparation des plaquettes :

Dans 8 tubes , mettre 0,5 ml de solution citrate .

Y ajouter 4,5 ml de sang de lapin .

On centrifuge directement après à 200 g pendant 15 minutes .

On rassemble les surnageants contenant les plaquettes dans 4 tubes et on centrifuge à 1500 g pendant 15 minutes .

Les plaquettes sont resuspendues dans 2,5 ml de TG EGTA et rassemblées dans deux tubes .

Elles sont ensuite centrifugées 15 minutes à 1500 g .

Après centrifugation , elles sont resuspendues dans 2 ml de TG EGTA et rassemblées dans un seul tube .

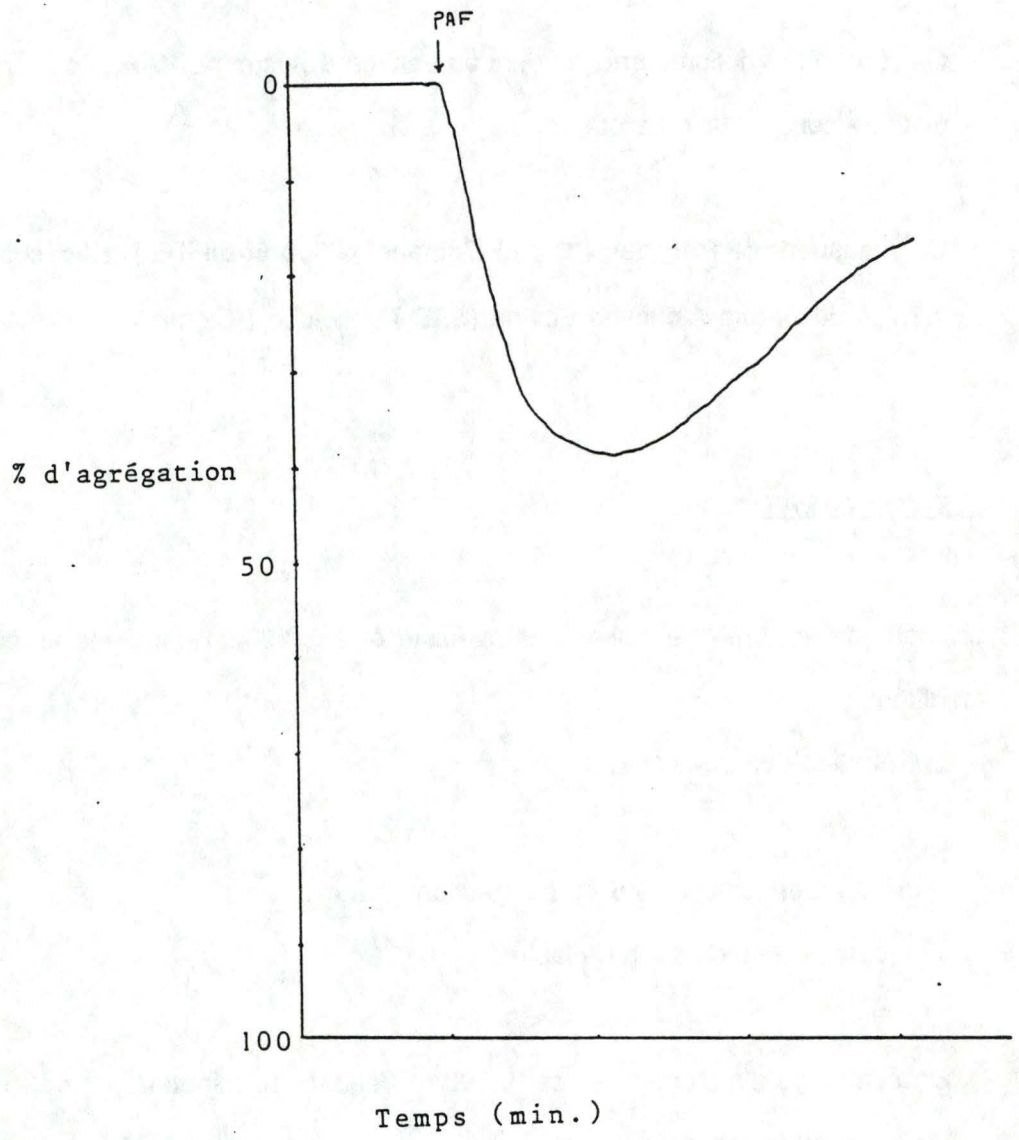


Figure 8 : Réponse typique d'agrégation des plaquettes obtenue par addition d'un échantillon de PAF .

Dosage :

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

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

Placer dans la cuvette pour le blanc : 2 ml de TG $CaCl_2$ (Ph 7,3)

pour le test : 1,6 ml de TG $CaCl_2$, O,4 ml de plaquettes , 25 µl d'indométhacine .

Après une préincubation de 5 minutes , la réaction est démarrée en ajoutant 25 µl de la solution de PAF à tester .

Mesures et calculs :

L'agrégation est quantifiée en % de la variation maximale d'absorbance , en considérant la suspension plaquettaire de départ comme étant le zéro d'agrégation et l'absorbance obtenue avec le tampon seul comme 100 % (figure 8) .

Droite d'étalonnage :

L'effet de différentes concentrations en PAF standard sur l'agrégation plaquettaire est indiqué à la figure 9 .

On observe que le % d'agrégation est proportionnel à la quantité de PAF entre 0 et 40 % d'agrégation .

L'aliquot contenant le PAF produit par les cellules endothéliales sera dilué de telle sorte que l'on se trouve dans cette zone linéaire .

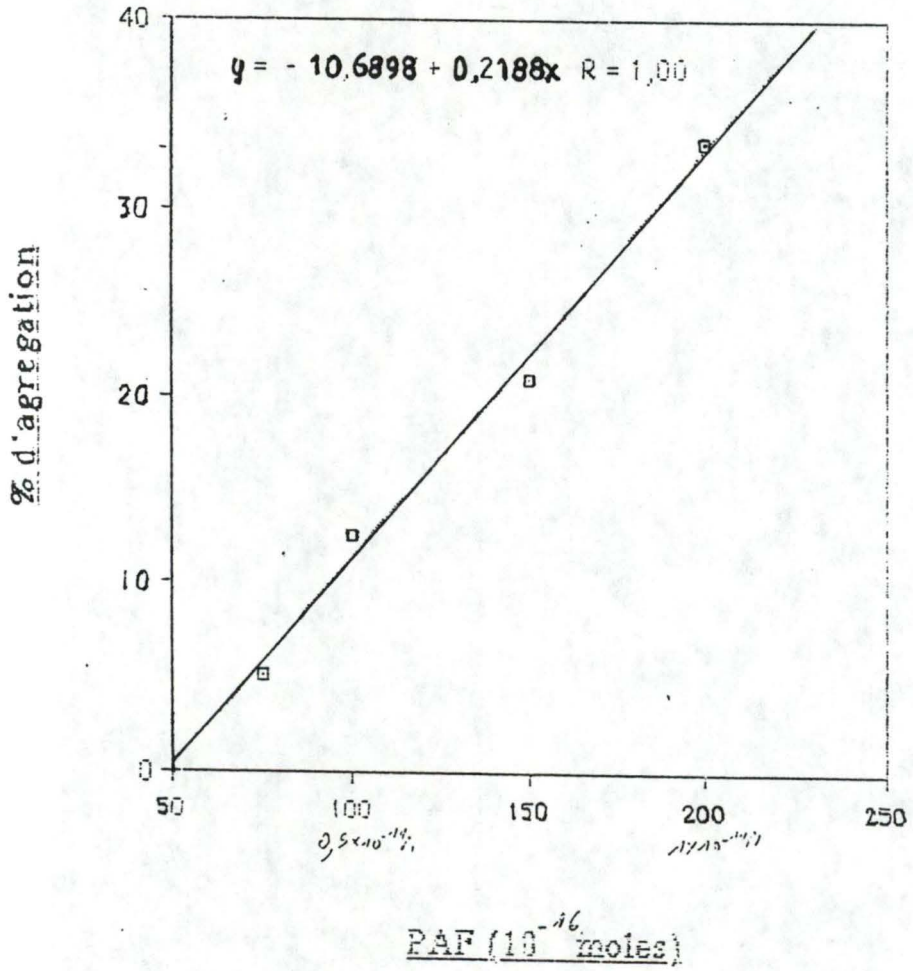


Figure 9 : Droite d'étalonnage donnant le % d'agrégation des plaquettes en fonction de la quantité de PAF entre 0 et 40 % d'agrégation qui est la zone linéaire . D'après REMY (1990) .

D . Caractérisation du PAF produit

1) Temps de retention

- - - - - - - - - - - - - - - -

Les cellules sont stimulées avec de la thrombine à 2 U / ml pendant 7 minutes. Le PAF provenant de 4 puits est récolté et mis dans un tube corex (Corex , U.S.A.) .

L'extraction se fait avec 5 ml de chloroforme . On agite pendant 3 minutes puis on ajoute 5 ml de chloroforme , on agite de nouveau 30 secondes . Le mélange reçoit alors 5 ml d'eau et est de nouveau agité durant 30 secondes .

La phase inférieure est mise sous un flux d'azote pour évaporer le chloroforme. Puis les lipides sont resuspendus dans 500 µl de phase mobile utilisée lors de l'HPLC :

t- butyl méthyl ether / méthanol / H_2O / NH_4OH

(200 / 100 / 10 / 0,2 ; V / V) .

Les lipides sont injectés sur l'HPLC . On récolte les lipides en fraction de 30 secondes en 30 secondes et ce jusque 8 minutes après injection . Chaque fraction est évaporée sous N_2 puis resuspendue dans 0,5 ml de TG $CaCl_2$ contenant 0,25 % de SAB délipidée + 100 µl d'éthanol pour un dosage par agrégation plaquettaire .

2) Caractérisation par la phospholipase A_1

Cette méthode est adaptée de la méthode de Mueller et al.(1983) . Ici , le PAF produit provient d'une boîte de 25 cm^2 et de 4 puits de 9 cm^2. Les cellules sont stimulées de la même façon que précédemment , la phase lipidique est extraite , évaporée sous N_2 , resuspendue dans la phase mobile et injectée à l'HPLC . Le PAF est récolté au temps prévu par le standard .

Solutions

- phosphatidylcholine (P.C.) ^{14}C solution standard (Dupont , Nen product , Boston mass) .
- PAF ^{3}H solution standard (Amersham , Belgique) .
- PAF (Sigma) .
- phospholipase A_1 de Rhizopus arrhizus (Boehringer , Manheim , RFA .) .
- tampon borate : acide borique 0,1 M , déoxycholate 1 mg / ml , SAB délipidée 0,4 mg / ml . Porter à pH 6,5 .

Méthode

- P.C. radioactive :

prendre 2 X 100 µl de solution stock , évaporer chaque tube sous N_2 , resuspendre dans 1 ml de tampon borate .

- PAF radioactif :

prendre 20 µl de solution stock , le mettre dans 2 ml de chloroforme / méthanol (4 / 1) . En prélever 5 µl , le mettre dans 2 ml de chloroforme / méthanol (4 / 1) .

Ajouter 3 µl de PAF radioactif .

Prendre 2 X 400 µl de ce mélange , mettre dans 2 tubes . Evaporer chaque tube sous N_2 , resuspendre dans 1 ml de tampon borate .

- PAF produit par les cellules .

Il est réparti en 4 fractions égales . Chaque tube est évaporé sous N_2 et resuspendu dans 1 ml de tampon borate .

Chaque tube est mélangé pendant 15 secondes .

On ajoute 10 µl de $CaCl_2$ 1 M (concentration finale = 10 mM) .

Démarrer la réaction avec 28 µl de PLA_1 solution stock (0,1 mg / ml) .

Mettre les tubes sur une table d'agitation , agiter durant 18 heures à température ambiante .

Après 18 heures , ajouter 3,75 ml de chloroforme / méthanol (1/2) pour stopper la réaction .

Pour l'extraction des lipides :

On ajoute à chaque tube 1,25 ml de chloroforme , on agite 30 secondes puis on ajoute 1,25 ml d'eau et on agite 30 secondes .

On récupére la phase chloroforme , on évapore le chloroforme sous N_2 .

Le PAF radioactif et la P.C. radioactive sont resuspendus dans la phase mobile de l'HPLC et injectés .

Composition de la phase mobile :

t- butyl méthyl éther / méthanol / H_20 / NH_4OH

(200 / 100 / 10 / 0,2 ; V / V) .

Le PAF produit par les cellules est lui resuspendu dans 0,5 ml de TG $CaCl_2$ contenant 0,25 % de SAB délipidée + 100 µl d'éthanol pour un dosage par agrégation plaquettaire.

E . Mise au point de la production de PAF par les cellules endothéliales

Pour la facilité des expériences , les cellules endothéliales sont repiquées dans des boîtes multipuits à 6 puits (Cell Cult , Sterilin , Angleterre) .

1) Influence du temps d'incubation avec la thrombine sur la production de PAF

Solutions

- Solution d'HBSS (composition voir page 25) .
- Solution d'HBSS avec calcium .
- Thrombine (Sigma) : 2 unités/ml d'HBSS $CaCl_2$.
- Solution 50 mM d'acide acétique dans le méthanol .

Méthode

On enlève le milieu de culture et on rince les cellules deux fois avec 2,5 ml d'HBSS avec calcium .

On ajoute 0,75 ml d'HBSS $CaCl_2$ et on incube 10 minutes à 37°C .

On ajoute alors 250 µl du mélange HBSS $CaCl_2$ thrombine (préalablement incubé à 37°C) et on incube différents temps : O minutes (= sans thrombine) , 1 , 2 , 3 , 5 , 7 , 10 , 20 minutes .

On ajoute , pour stopper la réaction , 0,5 ml de méthanol contenant 50 mM d'acide acétique . On racle les cellules et on les récupère .

On rinçe deux fois avec 1 ml de méthanol seul et on récupère les cellules restantes .

L'extraction se fait en ajoutant 1,25 ml de chloroforme , on agite 30 secondes .

1,25 ml d'eau , on agite de nouveau 30 secondes .

La couche inférieure contenant les lipides est gardée .

Les lipides sont séparés sur HPLC (p.45) et le PAF est dosé par agrégation plaquettaire (p.46) .

Cette expérience donnant un maximum de production de PAF après 7 minutes (voir résultats) , nous garderons ce temps d'incubation pour les stimulations suivantes.

2) Influence de la concentration en thrombine sur la production de PAF

Les solutions et la méthode sont identiques à celle utilisées pour l'influence du temps d'incubation , mis à part que le temps d'incubation est de 7 minutes et que les différentes concentrations en thrombine sont les suivantes :

2 u/ml ; 1 u/ml ; 0,5 u/ml ; 0,2 u/ml ; 0,1 u/ml ; 0,05 u/ml ; 0,01 u/ml .

Les procédures d'extraction des lipides , de séparation sur HPLC et de dosage sont identiques .

Le maximum de production de PAF se situe à une concentration en thrombine de 2 u/ml (voir résultats) , c'est donc cette concentration que nous utiliserons dans la suite de nos expériences .

F . Influence de la concentration en acide gras sur la synthèse de PAF

Solutions

- acide arachidonique : C18:4 (Sigma)

Prelever 500 µl de solution stock . Evaporer sous N_2 et resuspendre dans 330 µl d'éthanol .

En mettant 4 µl de cette solution dans 1,8 ml d'HBSS $CaCl_2$, la concentration finale est de 100 µM .

- acide oléique : C18:1 (Sigma)

Prélever 0,1 gr de solution stock . Resuspendre dans 5 ml de chloroforme (concentration finale = 0,0757 M) .

Mettre 500 µl de cette solution à évaporer sous N_2 . Resuspendre dans 750 µl d'éthanol .

En mettant 2 µl de cette solution dans 1 ml d'HBSS $CaCl_2$, la concentration finale est de 100 µM .

- acide stéarique : C18:0 (Sigma)

Prélever 0,1 gr de solution stock , resuspendre dans 5 ml de chloroforme (concentration finale = 0,0703 M) .

Mettre 500 µl de solution à évaporer sous N_2 , resuspendre dans 700 µl d'éthanol .

En mettant 2 µl de cette solution dans 1 ml d'HBSS $CaCl_2$, la concentration finale est de 100 µM .

Méthode

Les cellules endothéliales sont débarassées du milieu de culture , elles sont rincées deux fois avec de l'HBSS $CaCl_2$ puis préincubées durant 10 minutes à 37°C avec O,9 ml des différentes concentrations en acides gras :

100 µM , 25 µM , 10 µM , 5 µM , 1 µM , 0,1 µM .

Elles sont ensuite stimulées avec 100 µl de thrombine (concentration finale 2 U / ml) à 37°C .

Après arrêt de la réaction avec 0,5 ml de méthanol contenant 5O mM d'acide acétique et rinçage avec 2 X 1 ml de méthanol , les cellules sont reprises .

Les lipides sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1959) de la manière suivante :

ajouter 1,25 ml de chloroforme , agiter 3 minutes

ajouter 1,25 ml de chloroforme , agiter 30 secondes

ajouter 1,25 ml d'eau , agiter 30 secondes .

La phase lipidique est reprise , le chloroforme est évaporé sous N_2 , les lipides sont resuspendus dans 500 µl de phase mobile

t- butyl méthyl ether / méthanol / H_20 / NH_4OH

(200 / 100 / 10 / 0,2 ; V / V)

et injectés à l'HPLC .

La fraction contenant le PAF est reprise , la phase mobile est évaporée sous N_2 et le PAF est resuspendu dans 0,5 ml de TG $CaCl_2$ contenant 0,25 % de SAB délipidée + 100 µl d'éthanol . Il est ensuite dosé par agrégation plaquettaire .

G . Test d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales (Niveau morphologique)

Deux méthodes (Zimmerman et al., 1985) sont envisageables .

Les cellules endothéliales sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 8 cm^2 (Falcon) .

Solutions

- HBSS $CaCl_2$ pH 7,4 .
- PMN bovins resuspendus à concentration de 3 à 5 10^6 / ml dans la solution de Hanks sans calcium .
- thrombine 2 U / ml dans HBSS avec calcium .

Méthodes

a . Rincer les cellules endothéliales avec l'HBSS $CaCl_2$.

Ajouter O,9 ml de PMN

0,1 ml de thrombine ou d'HBSS $CaCl_2$ (contrôle) .

Incuber durant 7 minutes .

Aspirer les PMN , rincer plusieurs fois .

Examiner au microscope optique à contraste de phase .

b . Rincer les cellules endothéliales avec de l'HBSS $CaCl_2$.

Ajouter 0,9 ml d'HBSS $CaCl_2$

O,1 ml de thrombine ou d'HBSS $CaCl_2$ (contrôle) .

Incuber durant 7 minutes .

Retirer le liquide , rincer les cellules endothéliales .

Ajouter 1 ml de PMN , incuber pendant 5 minutes .

Retirer les PMN , rincer les cellules .

Examiner au microscope optique à contraste de phase .

H . Test d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales (Niveau quantitatif)

Cette méthode est adaptée de celle de Gudewicz et al.(1988) .

Les cellules endothéliales sont repiquées dans des boîtes multipuits à 24 puits de 2 cm^2.

1) Influence de la concentration en thrombine sur l'adhérence des PMN

Solutions

- HBSS $CaCl_2$ pH 7,4 .
- HBSS sans $CaCl_2$ pH 7,4 .
- ^{51}Cr (Amersham , Belgique) .
- thrombine à concentration de 2 U / ml , 1 U / ml , 0,5 U / ml , 0,2 U / ml , 0,1 U / ml , 0,05 U / ml , 0,01 U / ml .
- NaOH 1 N .

Méthodes

a . Marquage des PMN :

Les PMN sont resuspendus à concentration de 3 à 5 10^6 / ml dans l'HBSS sans $CaCl_2$.

On ajoute 20 µCi / ml de ^{51}Cr . On incube 1 heure à 37°C .

Après incubation , on centrifuge les PMN pendant 8 minutes à 1250 rpm , on récupère les PMN , on les lave 3 X avec l'HBSS sans $CaCl_2$ et on les resuspend dans ce même tampon à la même concentration que celle de départ .

b . Test d'adhérence :

On rince les cellules endothéliales ave l'HBSS $CaCl_2$.

On ajoute 450 µl d' HBSS $CaCl_2$ + 50 µl des différentes concentrations en thrombine .

On incube durant 7 minutes à 37°C , on retire le liquide , on rince les cellules endothéliales et on ajoute 0,5 ml de PMN marqués .

On incube 5 minutes à 37°C .

On aspire alors les PMN restants , on lave les cellules 4 X avec l'HBSS $CaCl_2$.

On récupère les PMN et le liquide à chaque lavage , on le met dans de petits tubes allant au compteur gamma (Gamma counter , 1275 minigamma , LKB Wallac)

Dans chaque puit contenant les cellules endothéliales et les PMN restants accrochés , on ajoute 0,5 ml de NaOH 1 N pendant une nuit .

On récupère le lysat et on le met également à compter au compteur gamma .

2) Influence du temps d'incubation sur l'adhérence des PMN

- -

Solutions

- solution de thrombine 2 U/ ml dans l'HBSS $CaCl_2$.
- PMN resuspendus à concentration de 3 à 5 10^6/ ml dans l'HBSS et marqués au ^{51}Cr.
- ^{51}Cr (Amersham , Belgique).
- Solution d'HBSS avec et sans calcium .

Méthode

Les cellules endothéliales sont débarassées du milieu de culture et rincées deux fois avec de l'HBSS avec calcium .On ajoute ensuite 450 µl d'HBSS $CaCl_2$ et on incube 10 minutes à 37°C .

Elles sont ensuite stimulées avec 50 µl de thrombine et incubées différents temps :

0 minutes (= sans thrombine) , 3 , 5 , 7 , 10 , 15 minutes .

Après incubation , le liquide est enlevé et les cellules sont rinçées avec l'HBSS $CaCl_2$.

On ajoute 0,5 ml de PMN radioactifs et on incube 5 minutes à 37°C . On aspire alors les PMN et les cellules sont rincées 4 fois . Les PMN et le liquide de rinçage sont récupérés et mis au compteur gamma . On ajoute aux cellules et aux PMN restants 0,5 ml de NaOH 1 N pendant une nuit . Le lendemain , le lysat est aspiré et mis au compteur gamma .

3) Influence des acides gras sur l'adhérence des PMN

- -

Solutions

- acide arachidonique

préparation voir page 53 .

- acide oléique

préparation voir page 54 .

- acide stéarique

préparation voir page 54 .

Méthode

Les cellules endothéliales sont débarassées du milieu de culture et rincées avec l'HBSS $CaCl_2$, elles sont préincubées 10 minutes avec 450 µl des différentes concentrations en acides gras (100 , 25 , 10 , 5 , 1 , 0,1 µM) .

Après cette préincubation , elles sont stimulées avec 50 µl de thrombine (concentration finale de 2 U / ml) pendant 7 minutes .

On enlève ensuite le liquide , on rince alors les cellules endothéliales et on ajoute 0,5 ml de PMN marqués , on incube 5 minutes à 37°C .

On aspire alors les PMN , on lave les cellules 4 X avec l'HBSS $CaCl_2$, on récupère les PMN et le liquide de rinçage dans des petits tubes allant au compteur gamma .

On ajoute aux cellules 0,5 ml de NaOH 1 N pendant une nuit , on récupère le lysat et on le met au compteur gamma .

4) Effet du PAF exogène sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales

---

Solutions

- Solution 100 µM d'acide arachidonique (préparation voir page 53) .
- PMN resuspendus à concentration de 3 à 5 10^6 / ml dans l'HBSS et marqués au ^{51}Cr.
- Solution d'HBSS avec et sans calcium .
- PAF exogène 10^{-9} M (Sigma).

Méthode

Après avoir débarassé les cellules endothéliales du milieu de culture , on les rince avec l'HBSS avec calcium . On les préincube ou non avec de l'acide arachidonique 100 µM . Les cellules ne sont pas stimulées avec de la thrombine . En même temps que les PMN , on ajoute le PAF exogène (la concentration de ce PAF est identique à celle du PAF synthétisé par les cellules endothéliales) . On incube alors 5 minutes à 37°C . On rince les cellules , on récupère les PMN et le liquide de rinçage que l'on met ensuite au compteur gamma .

On ajoute dans chaque puit 0,5 ml de NaOH 1 N pour une nuit . On récupère le lysat que l'on met au compteur gamma .

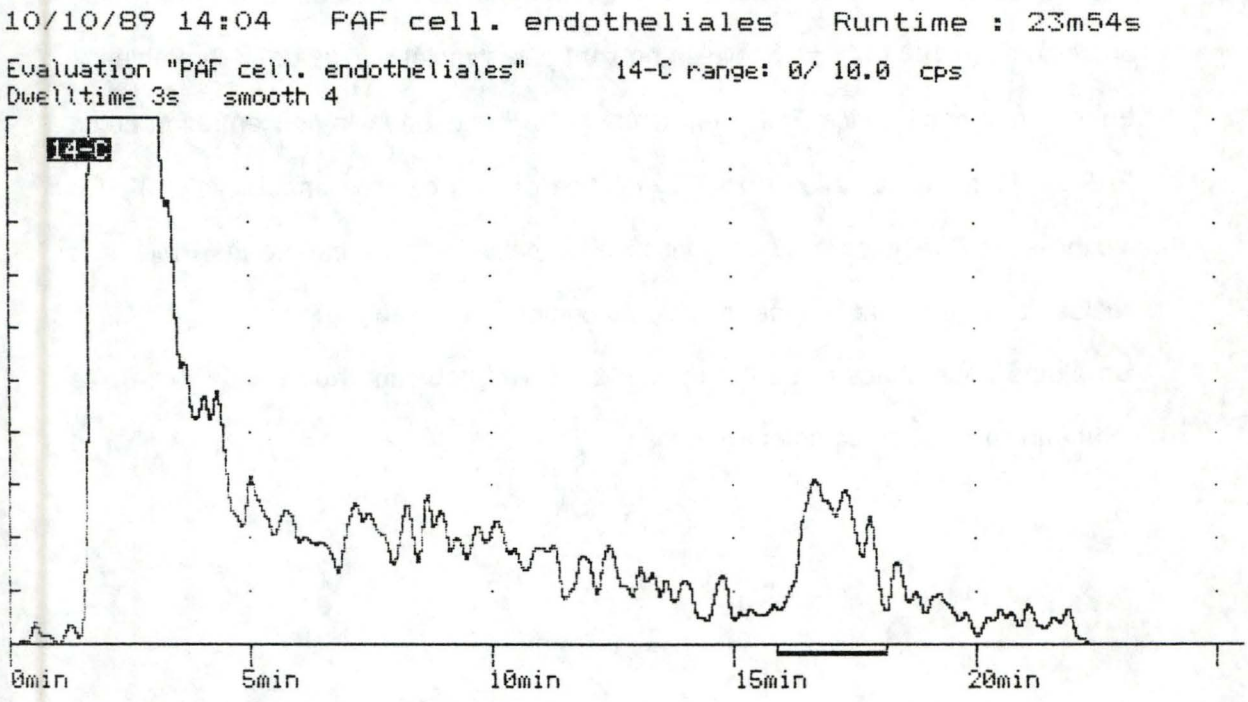


Figure 10 : Pic de PAF radioactif obtenu par préincubation des cellules endothéliales avec l'acide acétique radioactif et stimulation avec la thrombine à 2 unités /ml . Les lipides récoltés ont été injectés à l'HPLC . Le temps de retention est de 15 min. 54 sec.

Resultats et discussions

Les premières expériences nécessaires au bon déroulement ce mémoire étaient de s'assurer que les cellules endothéliales étaient bel et bien capables de produire du PAF . C'est pourquoi , à partir d'un assez grand nombre de cellules (2 boîtes confluentes) nous avons tenté de produire du PAF et de trouver une méthode de dosage appropriée .

CHAPITRE I : PRODUCTION DE PAF PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES ET DOSAGE .

1) Dosage de PAF par dosage de PAF radioactif

Cette méthode de dosage de PAF est basée sur une détection de PAF radioactif via une HPLC en phase inverse . Les cellules endothéliales sont mises en présence d'acide acétique radioactif . Cet acétate tritié va être utilisé par la cellule et incorporé dans l'acétylcoA . Lors de la stimulation des cellules par la thrombine , cet acétylcoA radioactif est utilisé pour former du PAF radioactif . Le PAF produit par les cellules est récolté puis injecté à l'HPLC avec les autres lipides . Lui seul est radioactif et donc il sera le seul détectable . Via un étalonnage par du PAF standard , on peut savoir exactement quel est le temps de retention du PAF avec la phase mobile utilisée .

Il faut savoir aussi que la surface du pic obtenu est proportionnelle à la quantité de PAF présent dans l'échantillon .

A la figure 10 est représenté le pic de PAF obtenu à partir de deux boîtes de cellules endothéliales confluentes contenant chacune environ 1 million de cellules dont les lipides ont été injectés sur HPLC . Cette HPLC permet une bonne séparation entre le PAF et le lyso-PAF (non vu ici) mais aussi les autres classes de phospholipide . Le front de solvant comprend le phosphatidyl inositol , les acides gras et les lipides

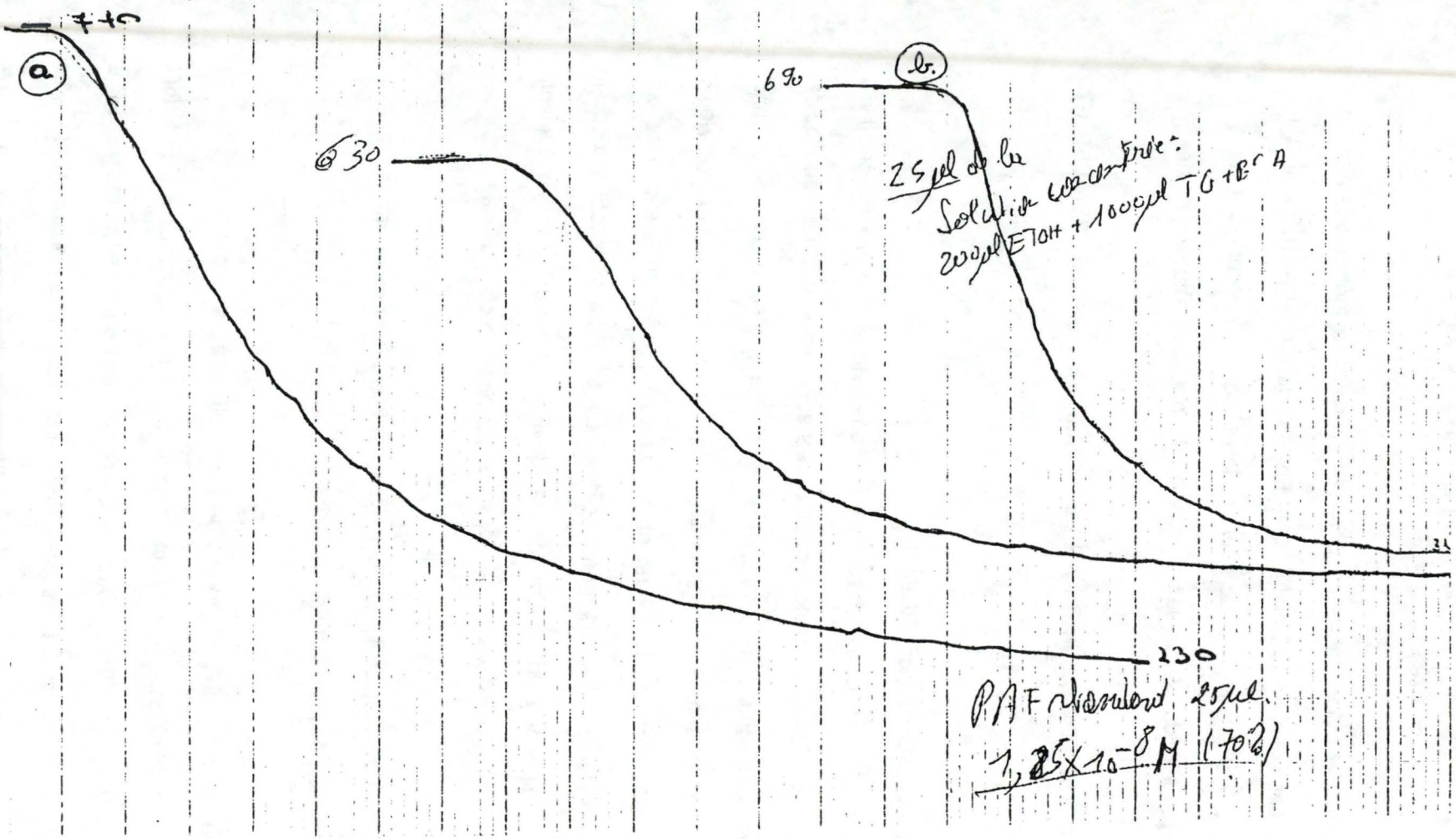


Figure 11 : Agrégation des plaquettes par a) 25 µl de PAF standard 1,25 10^{-8} M
b) 25 µl de PAF provenant des cellules endothéliales stimulées avec la thrombine à 2 u/ml pendant 5 minutes .

neutres (mono-, di-, triglycérides et le cholestérol) (REMY , 1990) . Le PAF est détecté entre 15 et 18 minutes après son injection . Il faut noter que le temps de retention est différent du cas où le PAF produit est radioactif , ceci est dû à la phase mobile qui est différente . Le pic de PAF obtenu est assez faible , il ne compte en fait que 280 coups , ce qui représente 2240 cpm réellement présents dans ces fractions .

La quantité de radioactivité étant faible , nous abandonnerons cette méthode pour nous tourner vers une méthode de dosage par agrégation plaquettaire qui est plus sensible . En fait , la quantité de PAF produit comparé au nombre de cellules utilisées pour cette quantité est faible . Il nous faudrait donc beaucoup trop de cellules endothéliales pour avoir une quantité de PAF suffisante pour être détectée .

2) Dosage du PAF par agrégation plaquettaire

Les premières expériences ont été réalisées sur une boîte de cellules endothéliales confluentes . Le PAF produit est non radioactif et est dosé par une méthode de mesure biologique qui est basée sur la capacité du PAF à stimuler l'agrégation des plaquettes sanguines . Il faut savoir en fait que les trois médiateurs capables d'activer les plaquettes sont le TXA_2 , l'ADP et le PAF . Dans notre cas , la formation de thromboxane est empêchée par ajout d'indométhacine qui inhibe la cyclooxygénase . L'ADP n'est pas présent puisque le tampon est neutre et que le sérum est enlevé par lavage des cellules . Seul le PAF exogène serait donc dans ces conditions capable d'induire l'agrégation des plaquettes .

Pour tester la sensibilité des plaquettes au PAF , on teste d'abord l'effet d'un standard de PAF puis seulement après l'échantillon . Les résultats sont représentés à la figure 11 . Le standard nous permet aussi d'estimer la quantité de PAF produite par les cellules endothéliales .

On remarque que le dosage est très sensible puisque la préparation des cellules donne une réponse extrêmement forte sur les plaquettes . A partir de la droite d'étalonnage , on peut calculer la concentration du PAF produit par les cellules . Dans ce cas , cette concentration est de 6,672 10^{-11} mole / 10^{6} cellules . Cette quantité est un peu plus faible que celle obtenue par Prescott et al.(1984) lors de leur expérience. Dans leur cas , la production était de 0,1 à 0,2 nanomole / million de cellules .

Nous garderons donc cette méthode pour le dosage du PAF dans les diverses expériences .

CONCLUSION :

Après stimulation des cellules endothéliales avec de la thrombine , il semble bel et bien que ces cellules puissent synthétiser du PAF . Nous pouvons le démontrer par le fait que le phospholipide radioactif obtenu a le même temps de retention que du PAF standard mais aussi par la capacité du phospholipide injecté sur HPLC (non radioactif , obtenu selon la deuxième méthode) de stimuler l'agrégation plaquettaire .

Si la quantité de PAF avait été plus importante , la méthode de dosage par HPLC aurait pu être satisfaisante puisque le PAF est nettement séparé des autres phospholipides et donc purifié mais aussi facilement quantifié par un comptage radioactif .

Cependant , puisque la quantité de PAF produite est faible , la méthode de dosage la plus appropriée est l'agrégation plaquettaire . De plus , le matériel biologique purifié par HPLC possède une activité d'agrégation plaquettaire et donc cette méthode apparaît parfaitement valable malgré qu'elle soit plus longue . Elle permet également la quantification du PAF produit par comparaison avec une droite d'étalonnage .

CHAPITRE II : CARACTERISATION DE LA BIOSYNTHESE DU PAF ET DU PAF PRODUIT CHEZ LES CELLULES ENDOTHELIALES EN CULTURE STIMULEES AVEC DE LA THROMBINE .

Bien que l'identité au niveau du temps de retention entre le PAF de référence et la molécule , synthétisée par les cellules endothéliales stimulées par la thrombine , qui provoque l'agrégation des plaquettes indique que cette molécule est bien du PAF , nous devons cependant le vérifier par la caractérisation biochimique de ce produit . C'est ce que nous avons réalisé dans la suite de ce travail .

1) Caractérisation du PAF produit

Lorsque l'on stimule les cellules endothéliales , on en extrait les lipides , on les injecte ensuite à l'HPLC pour ne récolter qu'une partie de l'éluat devant contenir le PAF et on le dose ensuite par agrégation plaquettaire. Mais il fallait cependant vérifier si c'est bien le PAF qui est responsable de l'agrégation des plaquettes , s'il en est le seul responsable ou si d'autres phospholipides interviennent dans cette agrégation .

a . Caractérisation par le temps de retention

- -

Le but de cette expérience est en fait de montrer qu'il existe une corrélation entre la présence de PAF et l'agrégation plaquettaire .

On injecte au préalable un échantillon de PAF standard à l'HPLC pour connaître le temps de retention du PAF (ici , ce temps est de 3 minutes) . D'un autre côté , on injecte à l'HPLC les lipides récoltés après stimulation des cellules endothéliales . Une fois injectés , on récupère les lipides en fraction de 30 secondes en

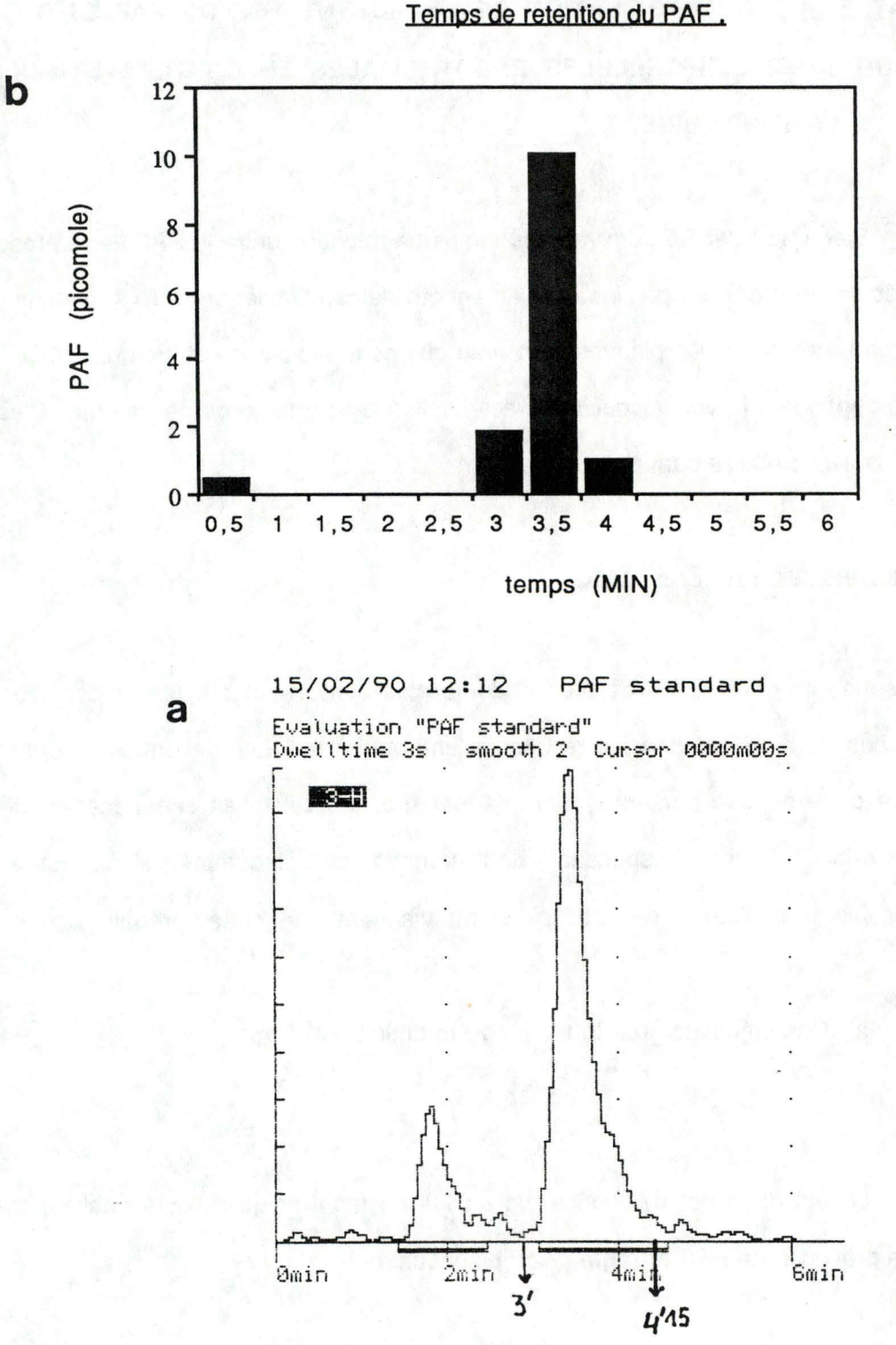


Figure 12 : a) pic de PAF obtenu par injection d'un standard à l'HPLC .
b) quantité de PAF obtenue dans chaque fraction de 30 secondes . Le PAF a été dosé par agrégation plaquettaire .

30 secondes et ce jusque 8 minutes après injection . Chaque fraction est ensuite dosée par agrégation plaquettaire .

En mettant en parallèle les graphes obtenus dans chaque cas (voir figure 12) , on peut montrer qu'il existe une corrélation entre le PAF et l'agrégation plaquettaire . On remarque en fait que lorsque le pic de PAF commence , le % d'agrégation augmente . Lorsque le pic de PAF est maximum , l'agrégation plaquettaire est aussi à son maximum.

Le pic de PAF commence à plus ou moins 3 minutes pour atteindre un maximum à 3 min. 30 sec. et diminuer ensuite jusque 4 min. 15 sec. environ . L'agrégation plaquettaire est détectable à partir de l'intervalle 2 min. 30 sec. - 3 min. pour atteindre un maximum entre 3 min. et 3 min. 30 sec. et diminuer jusque 4 min.

Ces résultats nous prouvent donc que le PAF intervient en grande partie dans l'agrégation plaquettaire , il en est donc un responsable . Mais est-il le seul ?

b . Caractérisation via la PLA_1

- -

Les deux phospholipides pouvant avoir une action au niveau de l'agrégation plaquettaire plaquettaire sont le PAF et la phosphatidylcholine (P.C.) . Nous aimerions donc savoir dans quelle proportion ces deux phospholipides interviennent afin de s'assurer de la validité de nos mesures .

Le PAF et la P.C. diffèrent entre eux par le fait qu'en position 1 le PAF possède une liaison éther tandis que la P.C. possède une liaison ester .

#	Name	from	R.T.	to	3-H [cts]	% ROI	% all
			Radioactive				
1	2-2	0000m12s	0001m51s	0002m39s	4098.0	14.6	14.5
2	???	0002m54s	0003m36s	0005m06s	23921.0	85.4	84.8

Gross total	:	28224.0
Net total	:	28224.0
Gross total in ROI	:	28019.0
Net total in ROI	:	28019.0

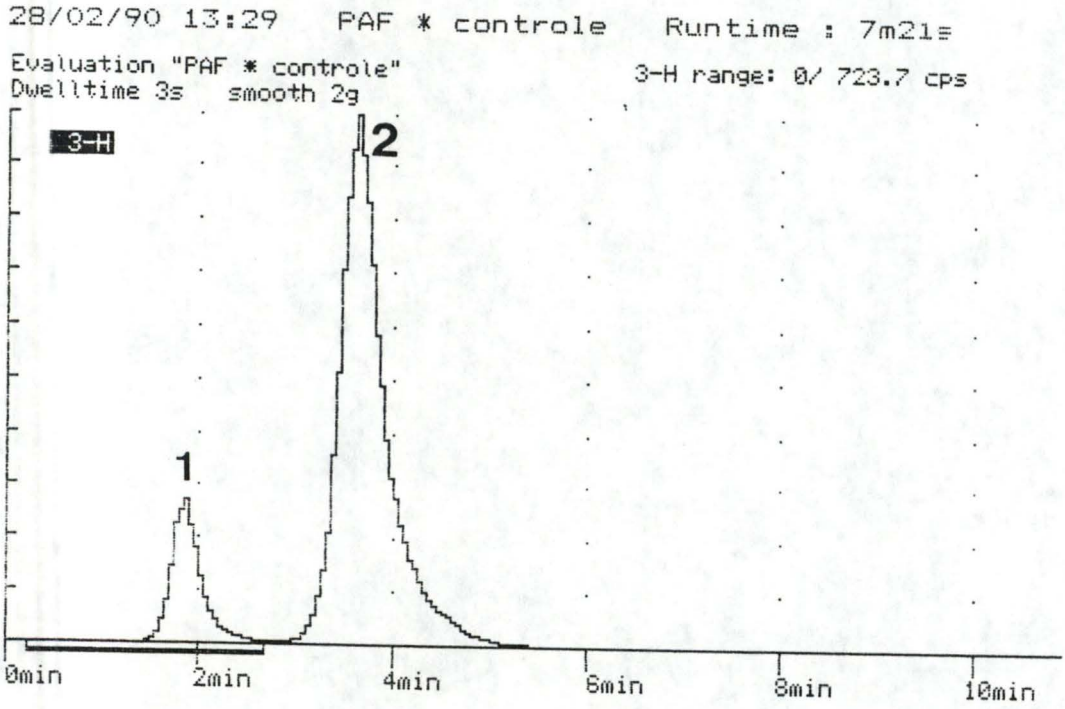
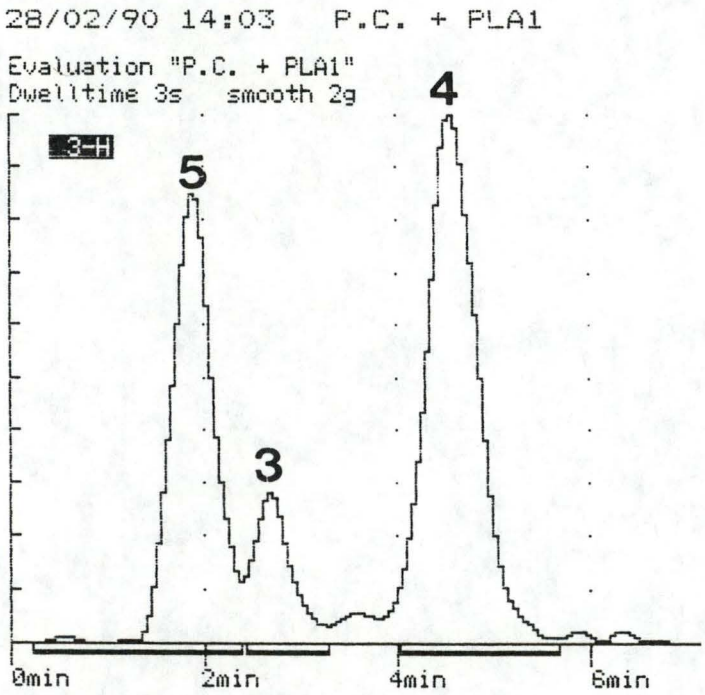


Figure 13 : a) PAF standard sans PLA_1 injecté à l'HPLC .

1=volume d'élution ; 2=pic de PAF

#	Name	from	R.T.	to	3-H	% ROI	% all
			Radioactive		[cts]		
1	2-2	0000m12s	0001m51s	0002m21s	539.0	36.4	34.2
2	3-3	0002m24s	0002m39s	0003m15s	165.0	11.2	10.5
3	6-6	0004m00s	0004m33s	0005m39s	775.0	52.4	49.2

Gross total	:	1576.0
Net total	:	1576.0
Gross total in ROI	:	1479.0
Net total in ROI	:	1479.0



d) P.C. standard avec PLA_1 injecté à l'HPLC .

3= pic de P.C.; 4=pic de P.C. hydrolysée

5= volume d'élution ♣produit de dégradation du lyso P.C.

Lors de l'injection sur HPLC des lipides récoltés , on a dans l'ordre de sortie : P.C. , PAF , lyso PAF . On sait en fait que la colonne est polaire (colonne de Silice) et le solvant est hydrophobe . La P.C. est moins polaire que le PAF , leurs chaînes sont différentes . Le lyso PAF sort le dernier car il a une chaîne carbonée en moins et est donc plus polaire . Il se pourrait cependant que le PAF récolté soit contaminé par la P.C.

Un des moyens possible pour différencier le PAF et la P.C. est en fait l'action de la PLA_1 de *R. arrhizus* . La PLA_1 de *R . arrhizus* hydrolyse la liaison qui se trouve en position 1 . Cette enzyme est capable d'hydrolyser la liaison ester de la P.C. mais pas la liaison éther du PAF . De plus , après action de la PLA_1 , la P.C. n'a plus d'activité agrégante sur les plaquettes . Cette propriété est donc utile afin de pouvoir quantifier la proportion de P.C. présente avec le PAF .

La figure 13 donne les résultats obtenus .

Afin de s'assurer que le PAF fonctionne bien sur la P.C. et non sur le PAF , on a utilisé comme contrôle du PAF et de la P.C. radioactifs avec et sans ajout de PLA_1 . Les 4 échantillons sont injectés à l'HPLC et l'on peut donc visuellement estimer si la PLA_1 a bien fonctionné .

Contrôle de PAF sans PLA_1 (a).

On obtient 2 pics en chromatographie HPLC en phase inverse :

Le front de solvant qui contient tous les produits de dégradation du PAF et les lipides neutres .

Le pic de PAF qui commence vers 4 minutes.

La radioactivité totale compte 28224 coups , le pic de PAF compte à lui seul 23921 coups , c'est à dire 84,75 % de la radioactivité totale .

Contrôle de PAF avec PLA_1 (b).

La PLA_1 n'a normalement pas d'action sur le PAF .

On obtient toujours deux pics :

Le front de solvant avec les lipides neutres et les produits de dégradation du PAF .

Le pic de PAF .

La radioactivité totale est de 34422 coups , le pic de PAF compte à lui seul 29481 coups c'est à dire 85,6 % de la radioactivité totale .

Ce qui nous montre bien que la PLA_1 n'a pas d'effets sur le PAF .

	PAF	Total	% du PAF
Sans PLA_1	23921	28224	84,75 %
Avec PLA_1	29481	34422	85,6 %

Contrôle P.C. sans PLA_1 (c).

La P.C. sort aux environs de 2 min.12 sec.jusque 3 min.15 sec. et compte 1246 coups sur un total de 1661 coups (= 75 %) . Les deux petits pics sont négligeables .

Contrôle de P.C. avec PLA_1 (d).

Après action de la PLA_1 , on remarque que l'on a 3 pics :

Le pic de lyso P.C. de 4 min. à 5 min.39 sec.

Le pic de P.C. de 2 min.24 sec.à 3 min.15 sec.

Un pic contenant les produits de dégradation de la lyso P.C. qui est instable .

Le pic de P.C. fait 165 coups par rapport à un total de 1576 coups (= 10,5 %) . Le pic de lyso P.C. fait 775 coups par rapport à un total de 1576 coups (= 49,2 %) .

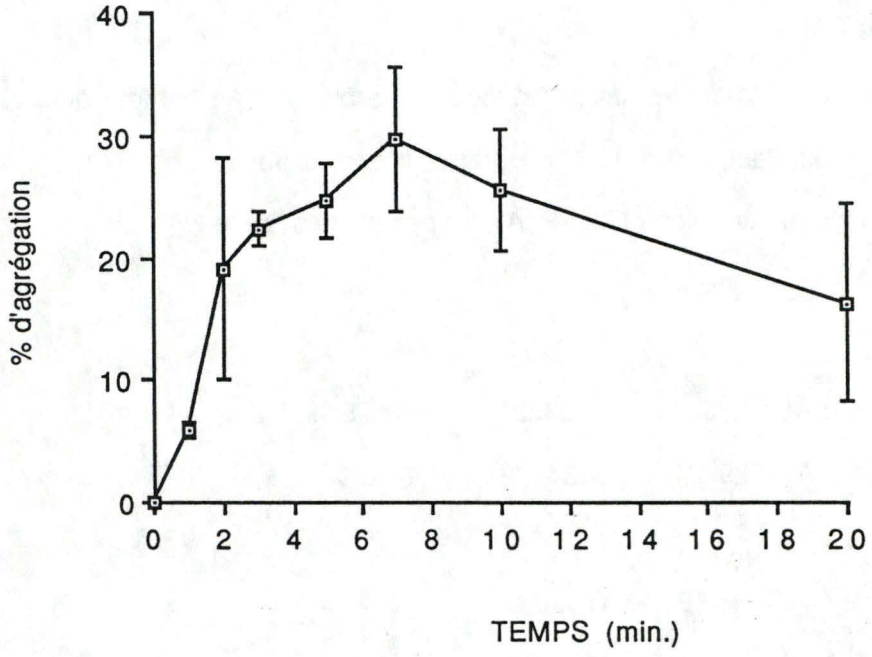


Figure 14 : Influence du temps d'incubation sur la synthèse de PAF produit par les cellules endothéliales stimulées par la thrombine à 2 u/ml . Le PAF a été dosé par agrégation plaquettaire , le % d'agrégation est donc directement proportionnel à la quantité de PAF présente . Les résultats sont donnés en % d'agrégation ± 1 écart type , les mesures ont été effectuées en double .

La PLA_1 agit donc bien sur la P.C. et hydrolyse de 80 à 90 % de la P.C. présente .Puisque l'on est certain de l'action de la PLA_1 sur la P.C. , on peut alors doser le PAF récolté et provenant des cellules endothéliales et examiner s'il existe une différence avant ou après action de la PLA_1 afin de pouvoir quantifier la proportion de P.C. présente dans les échantillons .
Après dosage , on obtient :

PAF contrôle sans PLA_1 : 13,7 % d'agrégation .

PAF avec PLA_1 : 14 % d'agrégation .

On peut conclure que le traitement avec la PLA_1 n'a pas modifié le test d'agrégation des plaquettes ; les différences de 0,3 % sont dues à des différences de reproductibilité . Ceci montre donc bien que tout ce qui agrège les plaquettes est bien du PAF sinon la dégradation des phospholipides comme la P.C. aurait dû diminuer cette activité . Dans nos échantillons , on a quasiment 100 % de PAF .

2) Caractérisation de la biosynthèse

a . Influence du temps d'incubation sur la synthèse de PAF

- -

Après incubation des cellules pendant différents temps avec la thrombine à concentration de 2 unités/ml , on remarque sur la figure 14 que :

- Sans thrombine , il n'y a pas de PAF produit . Au temps 0 minutes , le % d'agrégation est nul . La thrombine est donc un stimulus nécessaire pour cette production de PAF .

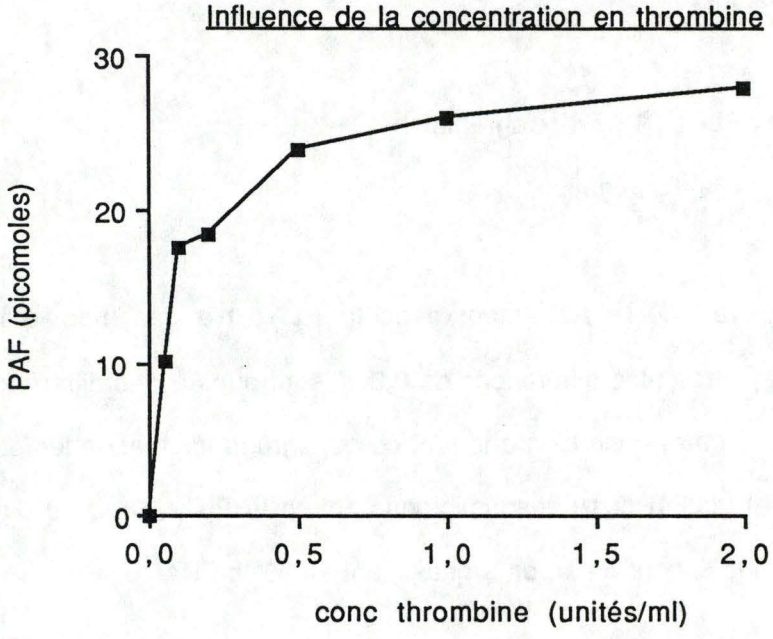


Figure 15 : Influence de la concentration en thrombine sur la synthèse de PAF produit par les cellules endothéliales . Le temps d'incubation est de 7 minutes . Le PAF a été dosé par agrégation plaquettaire .

- La production de PAF suit une cinétique dépendante du temps . La quantité de PAF produite est maximale après 7minutes d'incubation puis diminue . Les cellules endothéliales seraient donc capables de réguler leur production de PAF tout comme les PMN peuvent le faire et ce , afin d'éviter tous les dommages liés au PAF .

Pour la suite des expériences , nous garderons comme optimum ce temps de 7 minutes d'incubation puisqu'il correspond aux conditions optimales de cette production.

b . Influence de la concentration en thrombine sur la synthèse de PAF

- - - -

CONCLUSION :

Puisqu'il existe peu de littérature sur la production de PAF par les cellules endothéliales et que ces expériences n'avaient encore jamais été réalisées au laboratoire , il nous fallait avant toute chose caractériser le phospholipide produit par les cellules endothéliales mais aussi la biosynthèse de ce qui se révèle être du PAF pour pouvoir se situer dans les expériences suivantes dans les conditions optimales de production .

Sur base de ses propriétés chromatographiques (voir CH I a) et de son activité biologique (voir CH I b) nous pouvions déjà penser que le phospholipide produit était bel et bien du PAF .

Des expériences supplémentaires telles que la dégradation par la PLA_1 mais aussi le temps de retention nous prouvent que le produit synthétisé par les cellules endothéliales en culture en présence de thrombine humaine est du PAF et de plus , il n'est quasiment pas contaminé par les autres phospholipides lors de sa purification à l'HPLC .

Nous avons également suivi l'évolution de la synthèse du PAF en fonction de la concentration en thrombine et en fonction du temps de stimulation . Nous obtenons ainsi un optimum pour 2 unités/ml de thrombine pendant 7 minutes . Ces résultats sont compatibles avec ceux déjà décrits dans la littérature par Whatley et al.(1988) . Ces auteurs trouvant un maximum de production de PAF pour une concentration en thrombine de 2 u/ml et un temps d'incubation de 5 minutes environ . Dans leur cas , la production de PAF se faisait à 25°C .

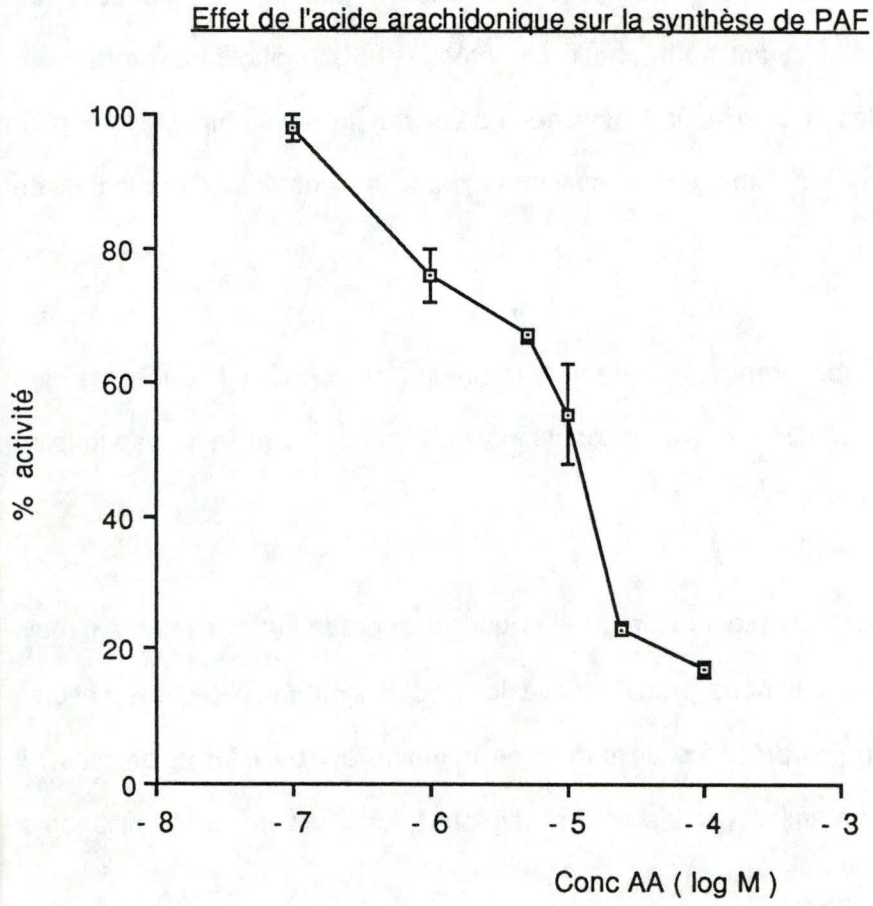


Figure 16 : Influence de l'acide arachidonique exogène sur la synthèse de PAF . Les cellules ont été préincubées 10 minutes avec l'acide arachidonique avant stimulation par la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Le PAF est dosé par agrégation plaquettaire , deux contrôles sans acide arachidonique sont réalisés et posés comme 100 % d'activité . Chaque point représente la moyenne de deux dosages ± 1 écart type .

CHAPITRE III : INHIBITION SELECTIVE DE LA SYNTHESE DE PAF PAR LES ACIDES GRAS .

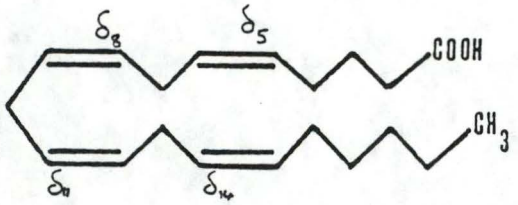
1) Effet de l'acide arachidonique

E. REMY (1989) a montré pour la première fois que l'acide arachidonique exogène avait un effet inhibiteur sur la synthèse de PAF chez les PMN stimulés par l'ionophore du calcium .

Structure de l'AA.:

= acide 5,8,11,14 icosatétraénoïque .

= $C_{20:4}$ (n-6)



L'acide arachidonique exogène serait en fait incorporé dans l'arachidonoylcoA et c'est cet arachidonoylcoA qui inhiberait l'acétyltransférase . Cette inhibition est dépendante de la dose . L'acide arachidonique est donc un inhibiteur physiologique qu'il serait intéressant de tester sur les cellules endothéliales en culture pour pouvoir étendre les conclusions d'E.REMY à un autre type cellulaire .

La figure 16 nous montre l'effet de l'acide arachidonique exogène sur la synthèse de PAF lorsque les cellules sont préincubées durant 10 minutes avec l'acide gras avant stimulation par la thrombine . Le PAF est dosé par agrégation plaquettaire . Deux contrôles ne contenant pas d'acide arachidonique ont été réalisés et sont posés comme 100 % d'activité .

On remarque en fait que , comme chez les PMN , l'acide arachidonique exogène a un effet inhibiteur très net sur la synthèse de PAF . Cette inhibition atteint plus de 80 % à 100 µM et est quasiment nulle à 0,1 µM .

2) Acide oléique et acide stéarique

E.REMY (1989) a également montré que l'acide oléique , un autre acide gras insaturé était aussi capable d'inhiber la synthèse de PAF chez les PMN de manière similaire à l'inhibition par l'acide arachidonique . Tandis que l'acide stéarique , un acide gras saturé , n'affecte pas la synthèse de PAF chez les PMN .

Puisque l'acide arachidonique a un effet inhibiteur sur la synthèse de PAF , l'acide oléique et l'acide stéarique sont deux acides gras intéressant à tester chez les cellules endothéliales . Nous pouvions en fait penser que ces acides gras agiraient de la même manière chez les cellules endothéliales et chez les PMN puisqu'il semble que le PAF soit synthétisé de la même manière .

La figure 17 représente l'effet de l'acide oléique sur la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales préincubées 10 minutes avec l'acide oléique à différentes concentrations et stimulées ensuite par de la thrombine (2 U / ml , pendant 7 minutes) .

La figure 18 représente l'effet de l'acide stéarique sur la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales préincubées 10 minute avec cet acide gras et stimulées de la même manière .

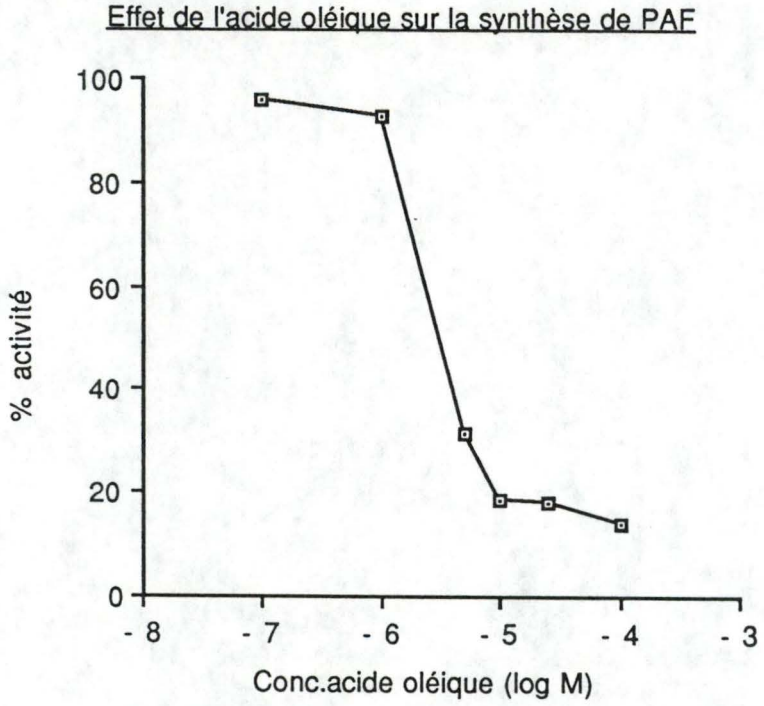


Figure 17 : Influence de l'acide oléique exogène sur la synthèse de PAF . Les cellules ont été préincubées 10 minutes avec l'acide oléique avant stimulation par la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Le PAF est dosé par agrégation plaquettaire , deux contrôles sans acide oléique sont réalisés et posés comme 100 % d'activité .

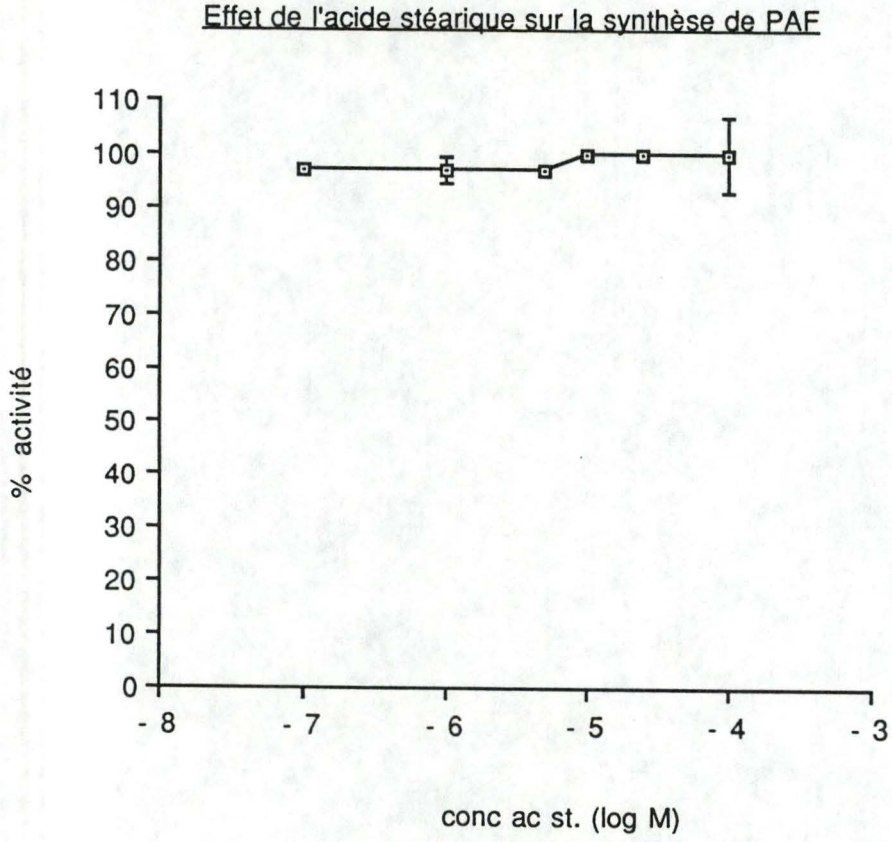


Figure 18 : Influence de l'acide stéarique exogène sur la synthèse de PAF . Les cellules ont été préincubées 10 minutes avec l'acide stéarique avant stimulation par la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Le PAF est dosé par agrégation plaquettaire . Deux contrôles sans acide stéarique sont réalisés et posés comme 100 % d'activité . Chaque point représente la moyenne de deux dosages ± 1 écart type .

Dans les deux cas , le PAF est dosé par agrégation plaquettaire , deux contrôles sont réalisés sans acides gras et sont posés comme 100 % d'activité .

On peut constater que chez les cellules endothéliales en culture , l'acide oléique inhibe également la synthèse de PAF . Cette inhibition dépend de la concentration en acide gras présent , elle vaut 85 % à 100 µM et 4 % à 0,1 µM .

L'acide stéarique , chez les cellules endothéliales comme chez les PMN n'a aucun effet inhibiteur sur la synthèse de PAF .

CONCLUSION :

Dans ce chapitre , nous montrons que l'acide arachidonique est un excellent inhibiteur de la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales en culture stimulées avec de la thrombine . Les résultats montrent également que l'acide oléique a le même effet dans les mêmes zones de concentration mais que l'acide stéarique n'inhibe pas du tout la synthèse de PAF . Puisqu'il semble apparemment que la voie de synthèse du PAF chez les cellules endothéliales soit identique à la voie enzymatique suivie par les PMN (Hirafuji et al., 1987) on pourrait penser que l'inhibition de la synthèse du PAF par les acides gras insaturés puisse se faire de manière similaire chez ces deux types cellulaires . L'acide arachidonique fourni à la cellule serait donc incorporé dans l'arachidonoyl coA , celui-ci inhiberait alors l'acétyltransférase comme chez les PMN (REMY , 1990) . L'effet de l'acide oléique se ferait aussi de la même façon mais via l'oleyl coA .

L'acétyltransférase étant considéré comme l'enzyme clé dans le contrôle de la synthèse du PAF , son inhibition par les acides gras insaturés constitue un facteur essentiel de la régulation de cette synthèse . La libération d'acides gras insaturés (surtout l'acide arachidonique) suite à l'activation de la PLA_2 pourrait moduler la synthèse de PAF par l'intermédiaire de l'inhibition de l'activité de l'acétyltransférase . Ceci pourrait être très important dans la régulation de l'activation cellulaire .

CHAPITRE IV : IMPORTANCE DU PAF DANS LE PHENOMENE D'ADHERENCE DES PMN AUX CELLULES ENDOTHELIALES .

Ayant montré que les cellules endothéliales en culture produisent un phospholipide qui se révèle être du PAF , nous voulions examiner une des fonctions biologiques du PAF produit par les cellules endothéliales , à savoir , son rôle dans l'adhérence des PMN .

Certains auteurs (Vercellotti et al. , 1989 ; Zimmerman et al. , 1985) avaient déjà émis l'hypothèse que le PAF synthétisé chez les cellules endothéliales en culture et stimulées par de la thrombine jouerait un rôle dans l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales (et donc à l'endothélium vasculaire) . Ils fournissaient entre autre comme preuve le fait que :

- les cinétiques de production de PAF et d'adhérence des PMN sont similaires .
- le PAF est capable à lui seul de promouvoir l'adhérence des PMN .

Comme nous étions en possession des différentes cinétiques de production de PAF (réalisées durant ce mémoire) nous avions déjà une partie des outils nécessaires à l'étude de l'importance du PAF dans l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . L'autre partie nous a été fournie par les inhibiteurs sélectifs de la synthèse de PAF (acide arachidonique et oléique) .

1) Tests d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Niveau morphologique

Pour commencer, nous avons d'abord voulu savoir s'il existait une différence entre des cellules stimulées et non stimulées au niveau de l'adhérence. C'est pourquoi , nous avons mis en présence des PMN et des cellules endothéliales stimulées ou non par de la thrombine (selon les deux méthodes decrites par Zimmerman et al., 1985) . On

sait que dans ces conditions les cellules synthétisent du PAF et un dérivé de l'acide arachidonique via la lipoxygénase (non encore identifié) . Après quelques lavages , et ce afin d'éliminer les fixations non spécifiques des PMN sur le plastique (toutefois le PAF restant associé aux cellules , celui-ci ne sera pas éliminé), nous examinons en morphologie la fixation des PMN sur les cellules endothéliales .

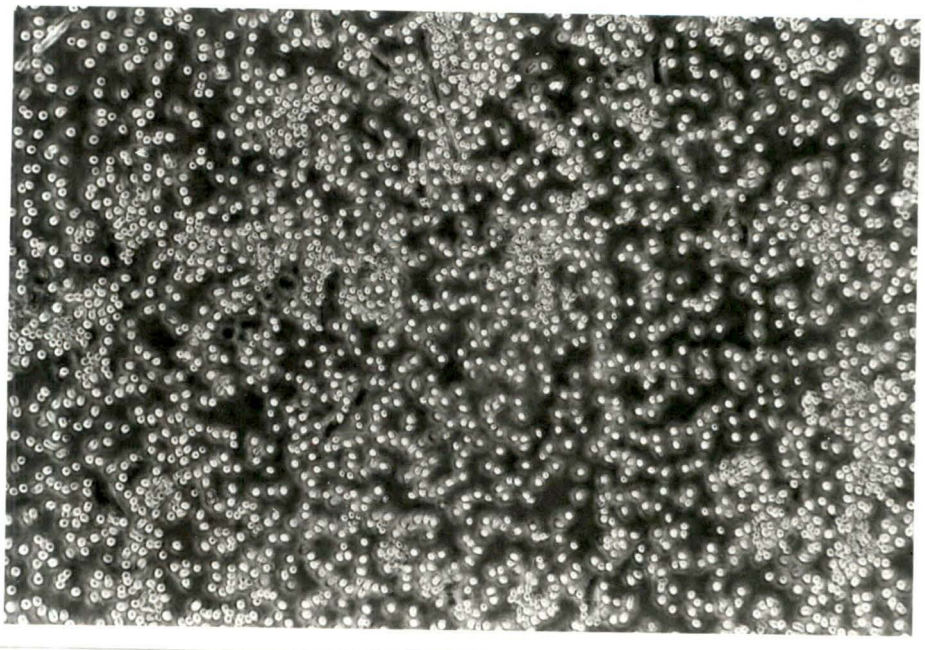
Les figures 19,20,21,22 nous donnent un aperçu des deux expériences réalisées . La première est celle où les PMN sont ajoutés en même temps que la thrombine . La seconde est celle où les PMN sont ajoutés après rincage des cellules endothéliales .

On remarque en fait que la deuxième méthode est nettement plus satisfaisante car il y a moins d'absorption non spécifique sur le plastique . Dans la deuxième méthode , les PMN sont ajoutés après rincage des cellules endothéliales . Peut être pourrions-nous penser qu'en rinçant les cellules endothéliales , on élimine une substance qui serait relarguée dans le milieu . Cette substance interviendrait peut être dans l'adhésion des PMN aux cellules endothéliales (en l'enlevant on empêche l'adhésion) . Dans le cas de la première méthode , on peut penser que puisque les PMN ont été plus longtemps au contact des cellules et du plastique , ils sont fixés plus fortement aux cellules et au plastique (fixation non spécifique) et donc il est plus difficile de les éliminer .

2) . Tests d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Niveau quantitatif

Pour pouvoir quantifier l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales , les PMN sont marqués au ^{51}Cr . L'incorporation de la radioactivité se fait au niveau du cytoplasme des PMN . En récupérant les PMN attachés aux cellules endothéliales et ceux qui n'y sont pas attachés , il est possible de quantifier le % d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales .

Figure 19 : Photographie de PMN adhérents aux cellules endothéliales non stimulées (= contrôle) après 8 rinçages . Les PMN ont été ajoutés en même temps que la thrombine .



igure 20 : Photographie de PMN adhérents aux cellules endothéliales , stimulées pendant 7 minutes avec la thrombine à 2 u/ml , après 8 rinçages . Les PMN ont été ajoutés en même temps que la thrombine .

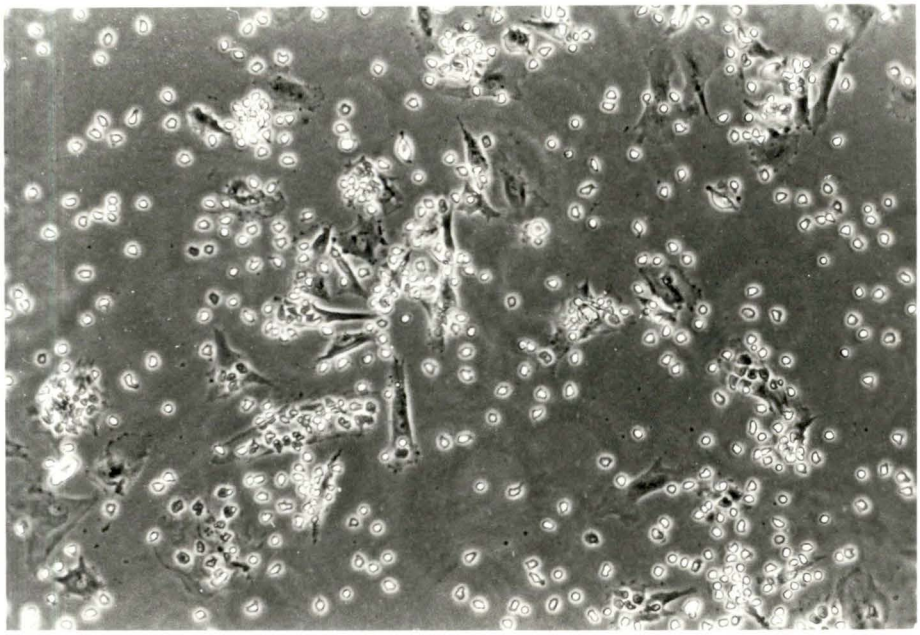


Figure 21 : Photographie de PMN adhérents aux cellules endothéliales non stimulées (= contrôle) après 4 rinçages . Les PMN ont été ajoutés après rinçage des cellules endothéliales .

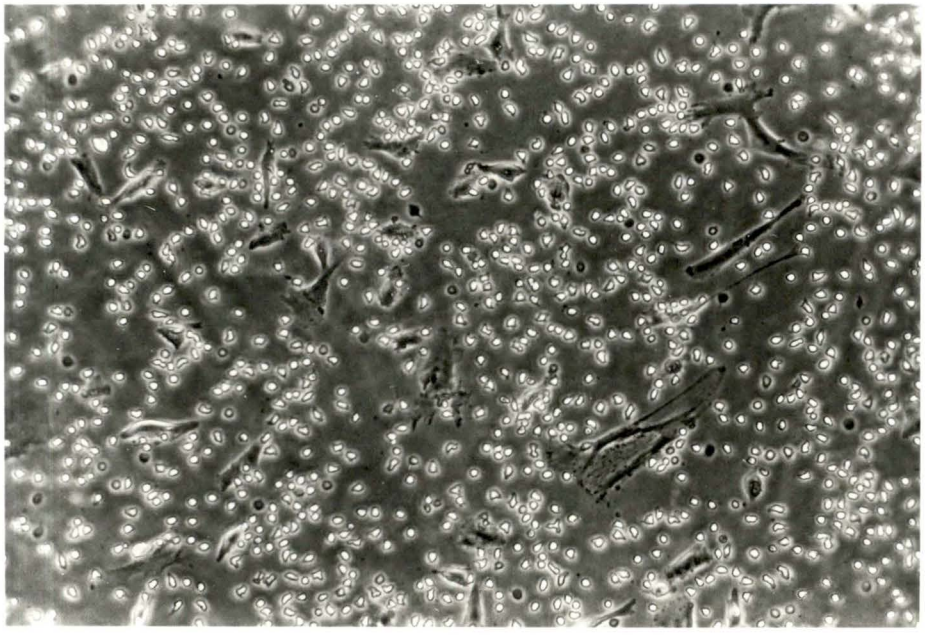


Figure 22 : Photographie de PMN adhérents aux cellules endothéliales , stimulées par la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes , après 4 rinçages . Les PMN ont été ajoutés après rinçage des cellules endothéliales .

Si la radioactivité des différents lavages récoltés = A (PMN non attachés aux cellules endothéliales) .

Si la radioactivité du lysat = B (PMN adhérents aux cellules endothéliales) .

% adhérence = B / B+A .

Puisque l'on soupçonne le PAF d'être un médiateur important dans l'adhérence des PMN , il serait intéressant de pouvoir comparer la synthèse du PAF et l'adhérence des PMN en fonction du temps de stimulation et de la concentration en thrombine . Si les corrélations sont assez bonnes , ce serait alors un argument en faveur du rôle du PAF au niveau de l'adhérence .

a . Courbe de concentration en thrombine

- -

On sait que lorsque la concentration en thrombine augmente la synthèse de PAF augmente également pour atteindre un maximum à 2 unités / ml . Si le PAF est un médiateur impliqué dans l'adhérence des PMN , les courbes de concentration en thrombine pour la synthèse de PAF et l'adhérence devraient être similaires (identiques si le PAF intervient seul) .

La figure 23 nous donne l'adhérence des PMN en fonction de la concentration en thrombine croissante . De même que la synthèse de PAF suivait une courbe de saturation avec un accroissement important de la synthèse de PAF entre 0,1 et O,5 unités / ml et un maximum à 2 unités / ml en thrombine (figure 15) , le % d'adhérence suit également une courbe de saturation avec une augmentation importante de l'adhérence située aussi entre 0,1 et 0,5 unités / ml en thrombine. La saturation obtenue à 2 unités / ml dans le cas de la synthèse de PAF ne s'observe pas ici mais ce maximum est peut-être masqué par la forte variabilité des résultats de ce test . Les figures 24 , 25 , 26 nous donnent un aperçu en

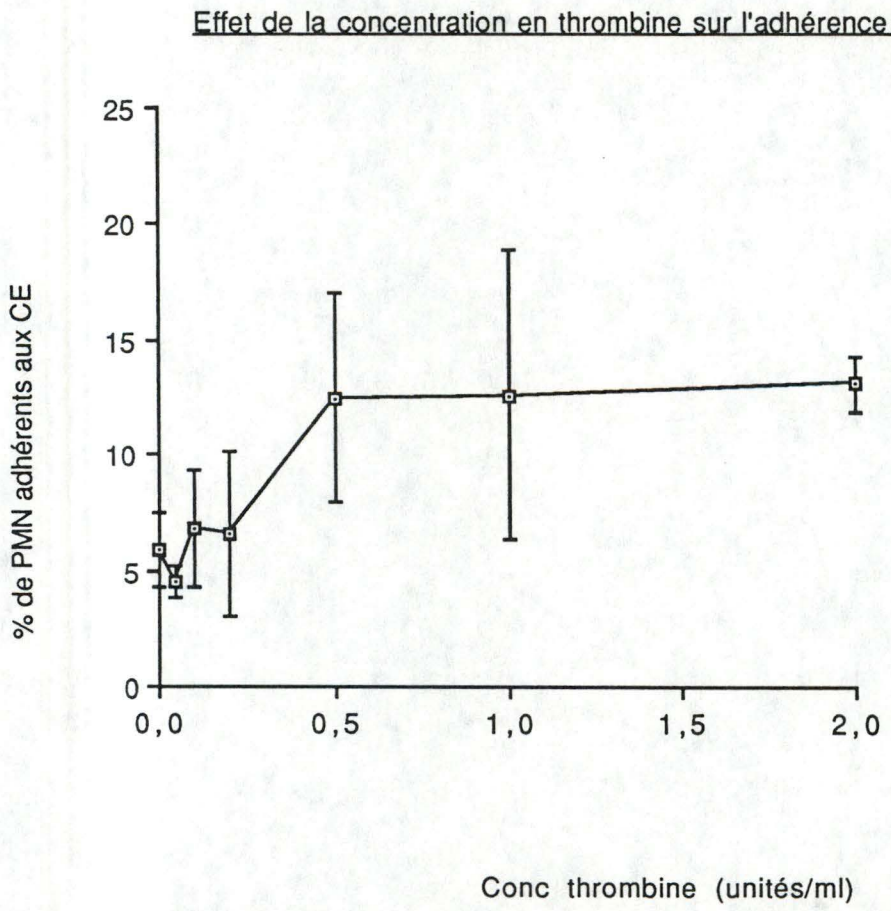


Figure 23 : % de PMN adhérents aux cellules endothéliales stimulées avec des concentrations croissantes en thrombine pendant 7 minutes . L'expérience a été réalisée en triple . Chaque point représente donc la moyenne de 3 expériences ± 1 écart type .

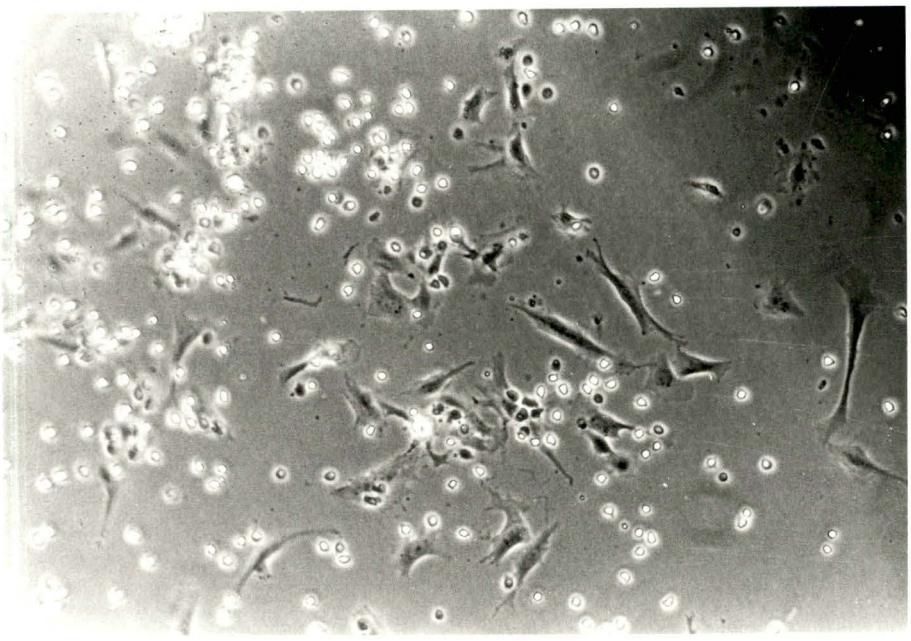


Figure 24 : Photographie de PMN adhérents aux cellules endothéliales non stimulées (= contrôle) .

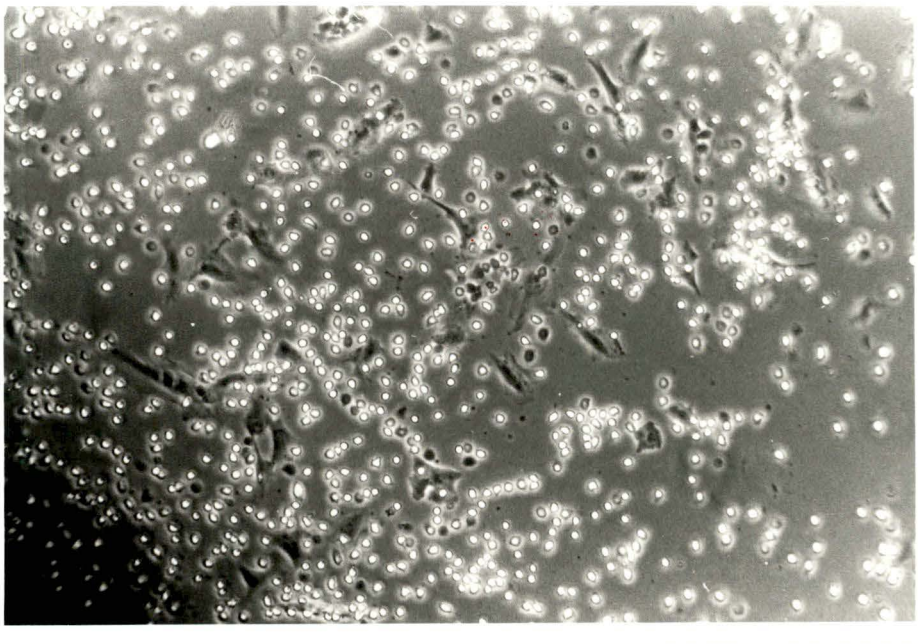


Figure 25 : photographie de PMN adhérents aux cellules endothéliales stimulées pendant 7 minutes avec la thrombine à 0,2 u/ml .

Figure 26 : Photographie de PMN adhérents aux cellules endothéliales stimulées pendant 7 minutes avec la thrombine à 2 u/ml .

microscopie optique à contraste de phase de cette adhérence en fonction de la concentration en thrombine croissante .

Ces observations sont un premier argument montrant que le PAF pourrait intervenir dans ce phénomène .

b . Cinétique de temps d'incubation

- -

Lorsque le PAF est synthétisé par les cellules endothéliales , nous avons vu qu'après un certain temps , en l'occurence 7 minutes , la synthèse de PAF passait par un maximum pour ensuite diminuer car la cellule met en place des mécanismes nécessaires pour inactiver ce PAF (en le réincorporant dans les phospholipides) et éviter ainsi des dommages importants .

Ici aussi , d'après la figure 27 , on remarque que le % d'adhérence suit la même cinétique que la synthèse de PAF (figure 14) . On arrive à un maximum d'adhérence après 7 minutes . Cette adhérence diminue ensuite pour atteindre le même niveau que le contrôle après 10 minutes .

Ce deuxième test est donc un argument supplémentaire de l'implication du PAF dans ce phénomène . Il faut cependant être prudent dans ces comparaisons puisque les résultats ne se superposent pas : lors de l'influence du temps d'incubation sur la synthèse du PAF , on retrouve encore après 20 minutes une quantité de PAF égale à 50 % du maximum (figure 14) alors que dans le cas de l'adhérence , on est déjà revenu au niveau du contrôle après 10 minutes d'incubation (figure 27) .

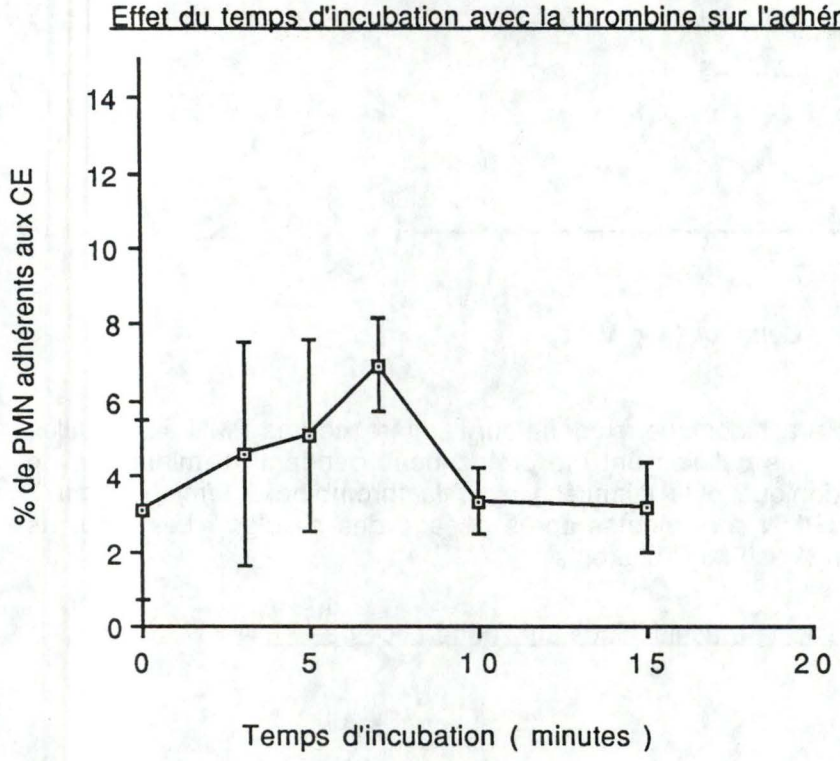


Figure 27 : % de PMN adhérents aux cellules endothéliales stimulées avec de la thrombine 2 u/ml pendant différents temps d'incubation . L'expérience a été effectuée en triple , chaque point représente donc la moyenne de 3 expériences ± 1 écart type .

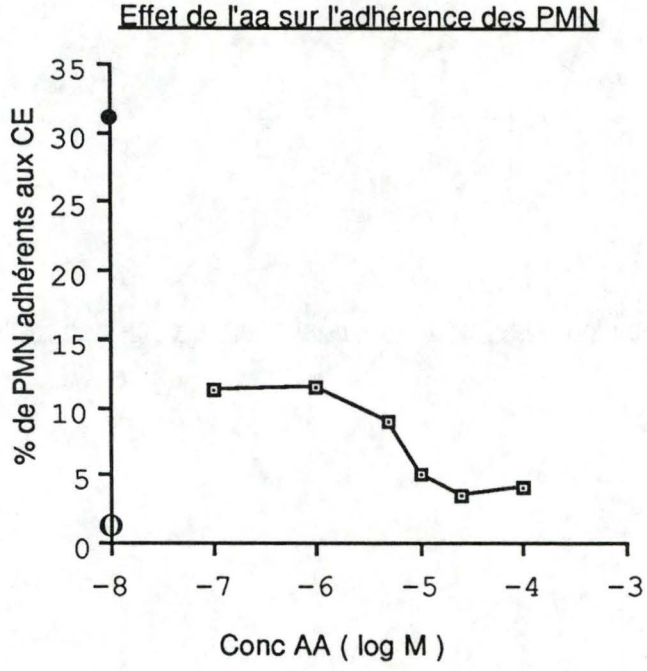


Figure 28 : Effet de l'acide arachidonique exogène sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Les cellules ont été préincubées pendant 10 minutes avec l'acide arachidonique puis stimulées avec la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Les PMN sont ajoutés après rinçage des cellules . Les résultats sont donnés en % de PMN adhérents .

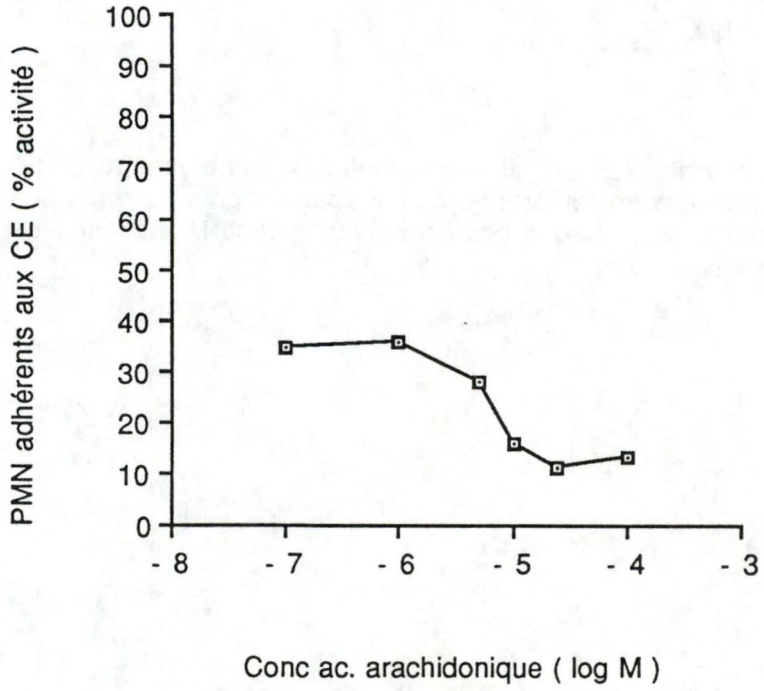


Figure 29 : Effet de l'acide arachidonique exogène sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Les cellules ont été préincubées 10 minutes avec l'acide arachidonique puis stimulées avec la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Les résultats sont donnés en % d'activité . Un contrôle sans acide arachidonique est réalisé et posé comme 100 % d'activité , un autre sans thrombine ni acide arachidonique est posé comme 0 % d'activité .

c . Influence des acides gras

- - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Dans le chapitre III , nous avons montré que la synthèse de PAF pouvait être inhibée par les acides gras insaturés mais que les acides gras saturés n'avaient pas d'effet . Dans le cadre de l'étude de l'importance du PAF dans l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales , ces acides gras deviennent des outils intéressants . En effet , puisque ces acides gras inhibent la synthèse de PAF , on peut penser , si le PAF est un médiateur important dans l'adhérence des PMN que ces mêmes acides gras pourraient inhiber de la même façon l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales .

1. Effet de l'acide arachidonique .

La figure 28 montre l'effet de l'acide arachidonique au niveau de l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales stimulées en conditions optimales. On remarque que l'acide arachidonique a aussi un effet inhibiteur au niveau de l'adhérence avec un effet important entre 10^{-6} et 10^{-5} M qui est la zone de concentration à laquelle il inhibe aussi fortement la synthèse de PAF . Cependant , le graphique donne une valeur d'agrégation de 10 % pour les très faibles concentrations en acide arachidonique , ce qui représente malgré tout déjà une inhibition de 65 % par rapport à la stimulation avec la thrombine seule , c'est à dire en absence d'acide arachidonique . Ceci peut être visualisé à la figure 29 dans laquelle les résultats sont exprimés en % d'activité par rapport au test réalisé avec la thrombine seule et au test réalisé sans acide arachidonique.

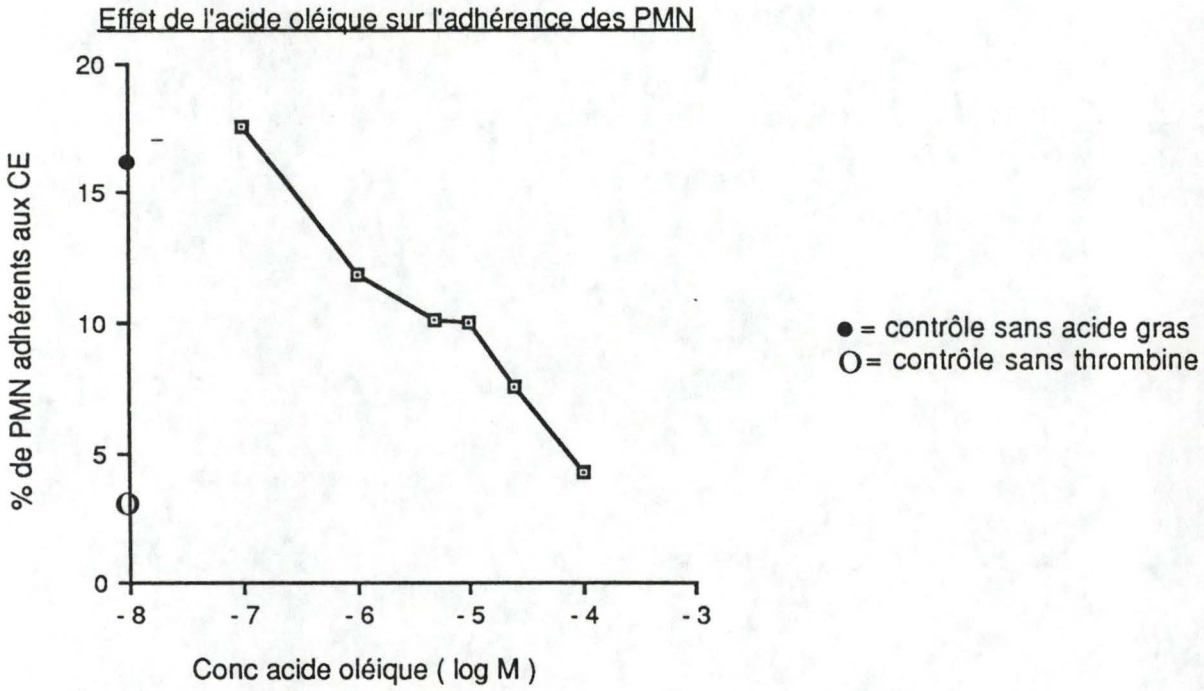


Figure 30 : Effet de l'acide oléique exogène sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . les cellules ont été préincubées 10 minutes avec l'acide oléique puis stimulées avec la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Les PMN sont ajoutés après rinçage des cellules . Les résultats sont donnés en % de PMN adhérents .

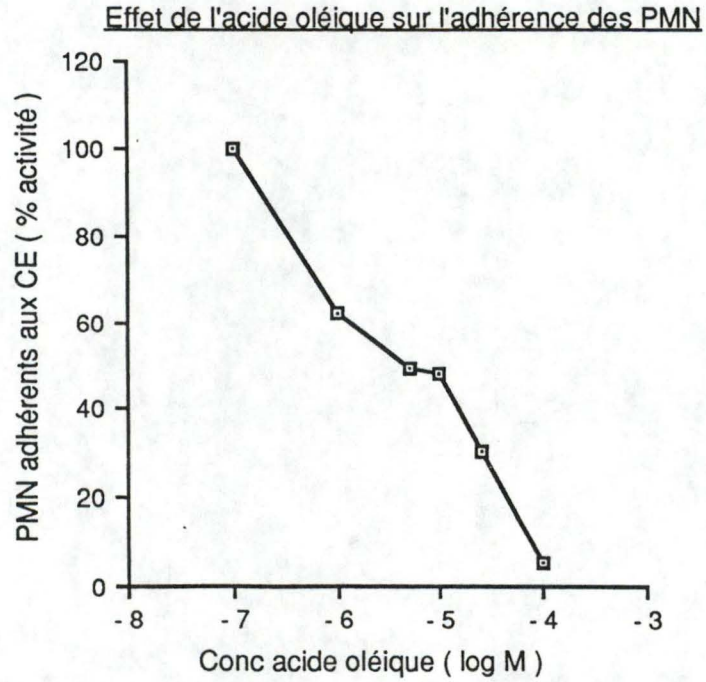


Figure 31 : Effet de l'acide oléique exogène sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Les cellules ont été préincubées 10 minutes avec l'acide oléique puis stimulées avec la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Les résultats sont donnés en % d'activité . Un contrôle sans acide oléique est réalisé et posé comme 100 % d'activité , un autre sans thrombine ni acide oléique est posé comme 0 % d'activité .

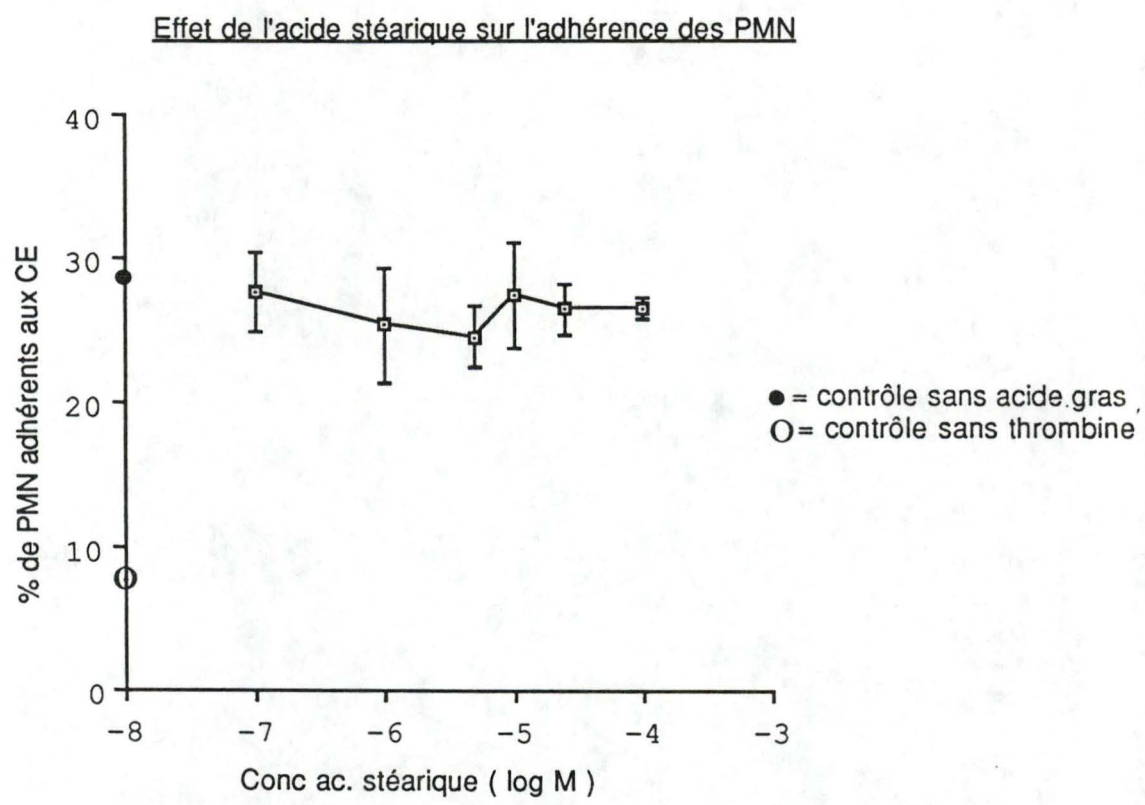


Figure 32 : Effet de l'acide stéarique exogène sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Les cellules ont été préincubées 10 minutes avec l'acide stéarique puis stimulées avec la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Les PMN sont ajoutés après rinçage des cellules . Les résultats sont donnés en % de PMN adhérents .

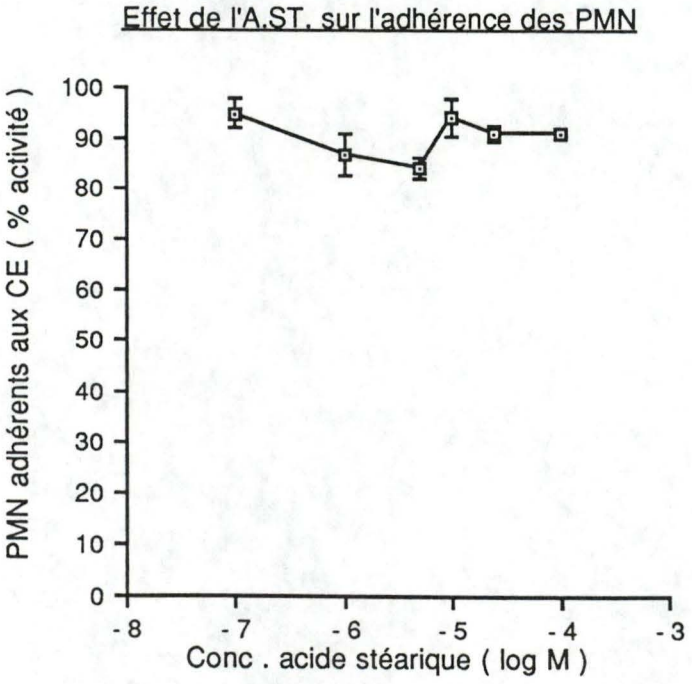


Figure 33 : Effet de l'acide stéarique exogène sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Les cellules ont été préincubées 10 minutes avec l'acide stéarique puis stimulées avec la thrombine 2 u/ml pendant 7 minutes . Les résultats sont donnés en % d'activité . Un contrôle sans acide stéarique est rélisé et posé comme 100 % d'activité , un autre sans thrombine ni acide stéarique est posé comme 0 % d'activité .

2 . Effet de l'acide oléique .

Puisque l'acide arachidonique montre un effet inhibiteur sur l'adhérence des PMN , on peut penser que l'acide oléique pourrait lui aussi inhiber l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales puisqu'il inhibait aussi la synthèse de PAF (figure 17) .

Les figures 30 et 31 nous montrent l'effet obtenue avec l'acide oléique . L' inhibition atteint 94 % à 100 µM et se prolonge jusqu'à 0,1 µM . Cette zone d'activité de l'acide oléique correspond aussi à celle d'inhibition de la synthèse du PAF mais la courbe d'inhibition est ici beaucoup plus étalée .

3 . Effet de l'acide stéarique .

Tout comme chez les PMN , l'acide stéarique n'inhibe pas la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales . Il n'inhibe pas non plus l'adhérence des PMN

Les figures 32 et 33 nous montrent cette absence d'effet de l'acide stéarique.

d . Test avec du PAF exogène

- - - - - - - - - - - - - - - - - - -

Afin de pouvoir corréler ces résultats sur l'adhérence avec un effet quantitatif du PAF , nous avons examiné l'effet direct de PAF exogène (de concentration identique à la concentration synthétisée par les cellules endothéliales , c'est à dire la nanomole) sur l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales non stimulées . Les résultats sont repris ci dessous .

	% d'adhérence
cellules non stimulées et sans PAF exogène	3,1 $\pm$ 2,39
+ PAF exogène	14,83 $\pm$ 0,25
+ PAF + AA 100 µM	11,1 $\pm$ 3,51

On remarque en fait que le PAF exogène est bien capable à lui seul de provoquer une augmentation d'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . En ajoutant de l'acide arachidonique 100 µM , on remarque que le % d'adhérence ne varie presque pas , ce qui montre que l'acide arachidonique n'a rien modifié et que l'adhérence est bien due au PAF exogène .

CONCLUSION :

Puisque certains auteurs soupçonnent le PAF d'être responsable de l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales , nous avons essayé d'établir une relation entre le PAF et l'adhérence en mettant en parallèle les différentes courbes de synthèse . Nous avons montré entre-autres que le PAF exogène est capable à lui seul de provoquer l'adhérence des PMN , ce qui prouve qu'il est impliqué dans ce phénomène .

En comparant ensuite les courbes de production de PAF et d'adhérence des PMN , on remarque que les deux coincident assez bien . En effet , la cinétique d'adhérence des PMN atteint , comme la synthèse de PAF , un maximum à 7 minutes d'incubation pour une zone de concentrations en thrombine identique .

De même que nous avions montré que les acides gras insaturés inhibent la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales , on a pu aussi montrer que ces mêmes acides gras aux mêmes concentrations ont la même influence au niveau de l'adhérence des PMN . Les acides gras saturés n'ayant aucun effet dans les deux cas .

Les corrélations entre les zones d'inhibition sont bonnes dans le cas de l'acide stéarique , l'acide oléique et l'acide arachidonique . Dans ce dernier cas , il existe une différence de comportement aux faibles concentrations . Pour essayer d'expliquer cette différence , on peut penser que l'acide arachidonique fourni à la cellule pourrait être utilisé par cette même cellule pour produire un autre dérivé , de la cycloxygénase ou de la lipoxygénase par exemple , qui pourrait interférer au niveau de l'adhérence . Puisqu'il y a interférence avec d'autres molécules , l'acide arachidonique n'est pas le meilleur inhibiteur .

Aux très faibles concentrations en acide arachidonique , l'acétyltransférase n'est pas inhibée et donc le PAF et synthétisé et provoque l'adhérence , mais ce dérivé le serait aussi et provoquerait une inhibition de l'adhérence . Aux fortes concentrations en acide arachidonique , le PAF est inhibé par inhibition de l'acétyltransférase mais ce dérivé serait synthétisé , ce qui augmenterait encore l'inhibition . Ceci pourrait expliquer , peut-être , le léger décalage vers les faibles concentrations en acide arachidonique de l'inhibition de l'adhérence (figure 29) par rapport à la synthèse de PAF (figure 16) . Par contre , dans le cas de l'acide oléique , ce dérivé ne serait pas formé puisque ce serait un dérivé de l'acide arachidonique et donc l'inhibition de la synthèse de PAF et de l'adhérence correspondent bien . Pour tester l'éventualité d'un tel

dérivé et essayer de l'identifier , on pourrait utiliser l'identification en GC-MS (chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse) mais aussi utiliser des inhibiteurs spécifiques et des antagonistes .

CONCLUSIONS GENERALES

Chez les PMN , le PAF et les métabolites de la PLA_2 jouent un rôle important dans les phénomènes inflammatoires et leur régulation . Ces médiateurs interviennent entre autre dans l'activation des cellules .

Tout récemment , il a été suggéré que les cellules endothéliales , contrairement à la vision passive qu'on leur prêtait pouvaient également intervenir dans ces différents phénomènes inflammatoires en synthétisant du PAF .

La première partie du mémoire s'est donc portée sur la production et la caractérisation du lipide produit par les cellules endothéliales lors de leur stimulation avec la thrombine humaine . Après caractérisation du lipide par son temps de retention , son schéma de dégradation par la PLA_1 et son pouvoir d'agrégation des plaquettes , nous avons pu nous assurer que le lipide produit dans ces conditions et purifié par chromatographie HPLC en phase inverse était bel et bien du PAF . Puis nous nous sommes interessés à la concentration en thrombine et au temps d'incubation nécessaires pour avoir une production optimale de PAF . Nous avons trouvé une concentration de 2 unités/ml et un temps de 7 minutes .

Ceci étant fait , nous voulions savoir si , comme chez les PMN , les acides gras pouvaient avoir chez les cellules endothéliales un effet inhibiteur sur la synthèse de PAF . Nous avons pu constater que les acides gras polyinsaturés inhibent bien la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales tandis que les acides gras saturés n'ont eux aucun effet . Il faut donc envisager que la voie de synthèse de PAF soit identique chez les deux types cellulaires , et en tout cas que l'acétyltransférase se comporte de manière identique . La régulation par les acides gras est importante pour la cellule . On peut supposer que cette régulation soit un moyen pour la cellule de réguler sa synthèse

de PAF . En fait , puisque l'acide arachidonique est l'acide gras préférentiellement incorporé en position 2 , c'est lui qui est également le plus souvent libéré lors de l'activation par la PLA_2 . On peut donc penser que , lors de l'activation de la cellule , la quantité de PAF formé puisse devenir abondante . A ce moment , la cellule pourrait elle-même réguler sa synthèse via les enzymes de dégradation du PAF mais l'acide arachidonique libéré pourrait également , via l'inhibition de l'acétyltransférase , inhiber la synthèse de PAF .

Dans un troisième temps , nous avons envisagé le fait que le PAF puisse jouer un rôle dans l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . Par un simple ajout de PAF exogène aux cellules endothéliales , nous avons pu remarquer que le PAF est capable à lui seul de provoquer l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales . De plus , tout comme la synthèse de PAF atteint un maximum pour une concentration en thrombine de 2 unités / ml avec un temps d'incubation de 7 minutes , l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales est également maximale après 7 minutes d'incubation avec la thrombine à 2 unités / ml , ceci est donc encore une preuve du rôle du PAF dans ce phénomène d'adhérence , mais est-il le seul médiateur qui intervient dans ce phénomène ? . Puisque nous avions en notre possession les outils nécessaires à la régulation de la synthèse de PAF , en occurence les acides gras , nous les avons testés à ce niveau . Nous avons remarqué que , de la même manière qu'ils inhibent la synthèse de PAF , les acides gras polyinsaturés inhibent également l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales (La corrélation étant parfaite pour l'acide oléique , moins parfaite pour l'acide arachidonique) . Dans le même contexte , les acides gras saturés qui n'inhibaient pas la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales n'inhibent pas non plus l' adhérence des PMN . Nous pouvons donc suggérer que le PAF est un médiateur essentiel et peut-être même le plus important dans l'adhérence des PMN aux cellules endothéliales .

Si l'on se souvient que dans le mode opératoire suivi , les cellules endothéliales sont lavées après stimulation , on doit donc admettre que le PAF synthétisé s'est fixé à la surface des cellules et que c'est sous cette forme qu'il permet l'adhésion des PMN . Nous avons vu , dans l'introduction , que le mécanisme d'action du PAF dans le phénomène d'adhérence n'est pas encore connu . On sait aussi que les cellules endothéliales activées à la thrombine augmentent fortement l'expression de plusieurs molécules d'adhésion à leur surface (LEUCAM) . Il serait intéressant à l'avenir d'examiner dans quelle mesure l'inhibition de la synthèse de PAF joue aussi un rôle dans l'expression de ces molécules d'adhésion . On pourrait alors ajouter du PAF exogène et tester l'hypothèse d'une fixation du PAF sur les récepteurs pour réaliser l'adhésion des PMN .

D'autre part , on a vu qu'aux faibles concentrations en acide arachidonique existait déjà une inhibition de l'adhésion . Il est fort possible qu'un dérivé de l'acide arachidonique , peut-être la PGI_2 , puisse aussi participer à l'inhibition de l'adhérence. Ceci pourrait aussi être testé en ajoutant après identification de ces dérivés des molécules exogènes et en vérifiant leur effet sur l'adhérence des PMN .

On le voit , ce travail s'il a permis de montrer l'importance du PAF dans ce phénomène d'interaction cellulaire, laisse de nombreuses questions en suspens par rapport au mécanisme d'action de ce phénomène et permet d'envisager une série d'expériences pratique pour les aborder .

BIBLIOGRAPHIE

ALBERT, D.H. , SNYDER, F. (1983).

Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-Sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-Sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages . Phospholipase A_2 and acetyl transferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation.
The journal of biological chemistry , 258 (1) ,97-102.

BENVENISTE, J. (1985) .

PAF acether.
Advances in prostaglandin, thromboxane and leukotriène research ,13 , 11-18 .

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

A rapid method of total lipid extraction and purification .
Can . J. Biochem . Physiol . , 37 (8) , 911 -917 .

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

Biochimie des leucotriènes .
Biochimie de l'inflammation , Edition Masson , 44-60 .

BRAQUET, P. , BRAQUET, M. (1983) .

Phagocytose et stimulation des processus d'oxydation cellulaire des macrophages.
Biochimie de l'inflammation , Edition Masson , 67-92.

BREVIARIO, F. , BERTOCCHI, F. , DEJANA, E. , BUSSOLINO, F. (1988).

IL-1 induced adhesion of polymorphonuclear leukocytes to cultured human endothelial cells .
Role of platelet activating factor .
The journal of immunology , 141 (10) , 3391-3397 .

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 , 191-199 .

CAZENAVE, J.P. , BENVENISTE, J . , MUSTARD, J.F. (1979).

Agregation of rabbit platelets by platelet activating factor is independent of the release and the arachidonate pathway and inhibited by membranes actives drugs .
Laboratory investigation , 41 (3) , 275-285 .

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 neutrophis .
The journal of biological chemistry , 258 (12) , 7268-7271 .

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

1-O-alkyl-2-arachidonoyl-Sn-glycero-3-phosphocholine : a common source of platelet activating factor and arachidonate in human polymorphonuclear leukocytes .
The journal of biological chemistry , 259 (19) , 12014-12019 .

CRASTES DE PAULET, A. (1983) .

Les grandes voies métaboliques de l'acide arachidonique .
Biochimie de l'inflammation , Edition Masson ,1-43

CRYER, A. (1983) .

Scale and diversity of interactions at the vascular endothelium
in : "Biochemical interactions at the endothelium " ed by Cryer , A. ,
Elsevier Science Publishers , Amsterdam , 1-3 .

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

Platelet activating factor.
Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-Sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediator) .
The journal of biological chemistry , 254 (19) , 9355-9358 .

DUANCE, V.C. ,BAILEY, A.J. (1983) .

The nature , structure and fonction of the vascular basement membrane .
in : "biochemical interactions at the endothelium " ed by Cryer , A. ,
Elsevier Science Publishers , Amsterdam , 41 - 78 .

ENGELBERG, H . (1989) .

Endothelium in health and disease .
Seminars in thrombosis and hemostasis , 15 (2) , 178-183 .

GUDEWICZ, P.W. , WEAVER, M.B. , DEL VECCHIO, P.J. , SABA, T.M. (1988).

Phorbol myristate acetate treated endothelium stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion and superoxide secretion .
J. lab . clin . med . ,113 (6) , 708-716 .

HARLAN, J.M. , (1985) .

Leukocytes - endothélial interactions .
The journal of American Society of Hematology . Blood , 65 (3) , 513-525 .

HIRAFUJI,M. ,MENCIA-HUERTA, J-M . , BENVENISTE, J. (1987).

Regulation of PAF acether (platelet activating factor) biosynthesis in cultured human vascular endothelial cells stimulated with thrombin .
Biophysica et Biophysica Acta , 930 , 359-369 .

HOOVER ET AL, (1982) .

Référence citée par RI NALDO ET BASFORD , 1987 .

JAFFE, A. , NACHMAN, R.L. , BECKER, C.G. , MINICK, F.R. (1973).

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins
Identification by morphologic and immunologic criteria .
The journal of clinical investigation , 52 , 2745-2756 .

JUNQUEIRA, L.C. , CARNEIRO, J. (1987) .

Chapitre 12 : Le système circulatoire .
Histologie , 3° édition ., 255-269 , 1987 . Edité par PICCIN .

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 .
The journal of biological chemistry ,259 (21) ,13316-13320 .

LEWIS, M.S. ,WHATLEY, R.E. , CAIN, P. , MC INTYRE, T. , PRESCOTT, S.M. , ZIMMERMAN, G.A. (1988).

Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet activating factor by endothelium and induces endothelial cell - dependent neutrophil adhesion .
The american society for clinical investigation , inc . , 82 , 2045-2055 .

LEY, K. (1989) .

Granulocyte adhésion to microvascular and cultured endothélium .
Studia Biophysica , 134 (1-2) , 179 - 184 .

LYNCH, J.M. , HENSON, P.M. (1986).

The intracellular retention of newly synthesized platelet activating factor .
The journal of immunology , 137 (8) , 2653-2661 .

MALLET, A.I. , CUNNINGHAM, F.M. , DANIEL, R. (1984).

Rapid isocratic high performance liquid chromatographic purification of platelet activating factor (PAF) and lyso PAF from human skin .
The journal of chromatography , 309 , 160-164 .

MC INTYRE, T.M. , ZIMMERMAN,G.A. , SATOH, K. , STEPHEN, M.P. (1985).

Cultured endothelial cells synthesize both platelet activating and prostacyclin in response to histamine , bradykini and adenosine triphosphate .
The American society for clinical investigation , inc . , 76 , 271-280 .

MUELLER, H.W. , O ' FLAHERTY, J.T. , WYKLE, R. (1983).

Biosynthesis of platelet activating factor in rabbit polymorphonuclear neutrophils .
The journal of biological chemistry , 258 (10) , 6213-6218 .

MUELLER, H.W. , O ' FLAHERTY, J.T. , WYKLE, R.L. (1984) .

The molecular species distribution of platelet activating factor synthesized by rabbit and human neutrophils .
The journal of biological chemistry , 259 (23) , 14554-14559 .

NINIO, E. , MENCIA-HUERTA, J-M . , HEYMANS, F. , BENVENISTE, J. (1982).

Biosynthesis of platelet activating factor.
I.Evidence for an acetyltransferase activity in murine macrophages.
Biochemica et Biophysica Acta , 710 , 23-31 .

NINIO, E. , JOLY, F. , HIEBLOT, C. , BESSOU, G. , MENCIA-HUERTA, M., BENVENISTE, J. (1987) .

Biosynthesis of PAF acether.
IX. Role for a phosphorylation - dependent activation of
acetyltransferase in antigen - stimulated mouse mast cells .
The journal of immunology , 139 , 154-160 .

PRESCOTT, S. , ZIMMERMAN, G.A. , MC INTYRE, T.M. (1984) .

Human endothelial cells in culture produces PAF when stimulated
with thrombin .
Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 81 , 3534-3538 .

RAMESHA, C.S. , PICKETT, W.C. (1986) .

Metabolism of platelet activating factor by arachidonic acid depleted rat polymorphonuclear leukocytes .
The journal of biological chemistry , 261 (33) , 15519-15523 .

REMY, E. , LENOIR, G. , HOUBEN, A. , VANDESTEENE, C. , REMACLE, J. (1989) .

Inhibition of platelet activating factor biosynthesis via the
acetyltransferase by arachidonic and oleic acids in ionophore A23187 stimulated bovine neutrophils .
Biochemica et Biophysica Acta , 1005, 87-92 .

REMY, E (1990) .

Importance du PAF et des leucotriènes dans la médiation et la régulation des fonctions cellulaires des polymorphonucléaires neutrophiles .
Dissertation présentée pour l'obtention du grade de docteur en sciences .

RINALDO, J.E. , BASFORD, R.E. (1987) .

Neutrophil endothélial interactions : modulation of neutrophil activation response by endothelial cells .
Tissue and Cell , 19 (5) , 599 - 606 .

SMITH, C.W. , MARLIN, S.D. , ROTHLEIN, R. , TOMAN, C. , ANDERSON,D.C. (1989) .

Coopérative interaction of LFA1 and MAC1 with intercellular adhésion . Molécule 1 in faciliting adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vivo .
J . Clin . Invest . , 33 , 2008 - 2017 .

STOLL, L.L. , SPECTOR, A.A. (1989) .

Interaction of platelet activating factor with endothelial and vascular smooth muscle cells in coculture .
Journal of cellular physiology , 139 , 253-261 .

THORGEIRSSON, G. (1983) .

Structure and morphological features of vascular endothelium .
in : "Biochemical interactions at the endothelium " ed by Cryer , A. ,
Elsevier Science Publishers , Amsterdam , 5 - 39 .

TONNESEN, M.G. (1989) .

Neutrophil - endothélial cell interactions : méchanisms of neutrophil adhérence to vascular endothelium .
The journal of investigate dermatology , 93 , 53s - 58s .

VARGAFTIG, B.B. , CHIGNARD, M. , BENVENISTE, J. (1981) .

Commentary . Present concepts on the mecanisms of platelet aggregation .
Biochemical pharmacology , 30 , 263-271 .

VERCELLOTTI, G.M. , WICKHAM, N.W.R. , GUSTAFSON, K.S. , YIN, H.Q. , HEBERT, M. , JACOB, H.S. (1989) .

Thrombin treated endothelium primes neutrophil functions : inhibition by platelet activating factor receptor antagonists .
Journal of leukocyte biology , 45 , 483-490 .

WALSTRA, P. , VERHAGEN, J. , VELDINK, G.A. , VLIEGENTHART, J.F.G. (1984) .

Leukotriene formation by bovine polymorphonuclear leukocytes .
Biochemica et Biophysica Acta , 795 , 499-503 .

WHATLEY, R.E. , NELSON, P. , ZIMMERMAN, G.A. , STEVENS, D.L. , PARKER, C.J. , MC INTYRE, T.M. , PRESCOTT, S.M. (1989) .

The regulation of platelet activating factor production in endothelial cells .
The role of calcium and proteine kinase C .
The journal of biological chemistry , 264 (11) , 6325-6335 .

WILLOUGHBY, D.A. (1978) .

L'inflammation .
La recherche , 9 (85) , 28-36 .

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 .
The journal of biological chemistry , 255 (21) , 10256-10260 .

ZAVOICO, G.B. , EWENSTEIN, B.M. , SCHAFER, A.I. , POBER, J.S. (1989).

IL-1 and related cytokines enhance thrombin stimulated PGI2 production in cultured endothelial cells without affecting thrombin stimulated Von Willebrand factor secretion or platelet activating factor biosynthesis .
The journal of immunology , 142 (11) , 3993-3999 .

ZIMMERMAN, G.A. , MC INTYRE, T.M. , PRESCOTT, S.M. (1985) .

Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro .
J. Clin . Invest . , 76 , 2235-2246 .