



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Influence des molécules capto-datives sur la production de radicaux libres par les macrophages

Marbaix, Jean

Award date:
1988

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.

1988



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

INFLUENCE DES MOLECULES CAPTO-DATIVES SUR
LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES PAR LES
MACROPHAGES

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

MARBAIX, Jean

Mes remerciements s'adressent en tout premier lieu à Monsieur le Professeur Remacle qui m'a accueilli dans son laboratoire et prodigué une aide attentive tout au long de ce travail.

Je tiens ensuite à présenter mes plus vifs remerciements à Madame Andrée Houbion pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Qu'il me soit enfin permis d'exprimer toute ma gratitude envers tous les membres du laboratoire pour leur sympathie et leur collaboration enthousiaste.

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION :

I. MECANISMES DE PHAGOCYTOSE CHEZ LES MACROPHAGES.

I.1. Poussée d'activité respiratoire.

I.2. Induction de la P.A.R.

I.3. Interaction entre les quatre phénomènes de la P.A.R.

I.4. Mécanismes de défense contre les radicaux libres.

I.5. Effets délétères de la P.A.R. :

I.5.1. Système H_2O_2 - Myéloperoxydase - Halide

I.5.2. Peroxydation des lipides

I.5.3. Attaques des acides nucléiques.

II. CHEMOLUMINESCENCE.

III. SUBSTITUTION CAPTO-DATIVE.

IV. BUT DU TRAVAIL.

MATERIEL ET METHODES :

I. PRELEVEMENTS DES MACROPHAGES.

II. TEST DE CHEMOLUMINESCENCE :

II.1. Solutions.

II.2. Méthode.

III. SYSTEME XANTHINE-XANTHINE OXYDASE :

III.1. Mesure de la production de radicaux superoxydes.

III.2. Méthode de dosage :

III.2.1. Solutions.

III.2.2. Méthode.

III.2.3. Calcul de la production d' $O_2^{\cdot(-)}$.

IV. TEST DE CYTOTOXICITE.

RESULTATS :

I. MISE AU POINT DU DOSAGE DES RADICAUX SUPEROXYDES PAR LA CHEMOLUMINESCENCE.

I.1. Influence de la concentration en lucigénine.

I.2. Influence de la concentration en macrophages.

I.3. Calcul de la production de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$.

I.4. Effet de la superoxyde dismutase.

I.5. Effet de la catalase.

II. ACTIVATION DE LA PRODUCTION DE RADICAUX SUPEROXYDES DANS LE TEST DE CHEMOLUMINESCENCE.

II.1. Effet de OL_1 .

II.2. Effet de AL_3 .

II.3. Effet de R_{61} .

II.4. Effet de NaN_3 .

II.5. Effet de la Vitamine C.

II.6. Effet du Paraquat.

II.7. Effet de l'Indigocarmin.

II.8. Effet du para-diméthylaminobenzène.

II.9. Effet du Lampit.

III. ACTIVATION DE LA PRODUCTION DE RADICAUX SUPEROXYDES PAR LE SYSTEME XANTHINE-XANTHINE OXYDASE.

IV. DISCUSSION DES RESULTATS.

CONCLUSIONS ET APPLICATIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

INTRODUCTION

I. LES MECANISMES DE PHAGOCYTOSE DES MACROPHAGES.

I.1. La poussée d'activité respiratoire (P.A.R.).

C'est le chemiotactisme qui pousse les macrophages vers leur proie. Il se produit dès lors une phagocytose de la proie qui est stimulée par la présence de protéines de l'hôte fixées sur cette proie. Ces protéines sont appelées opsonines et sont membres de la famille des immunoglobulines et du système du complément. Elles sont reconnues par des récepteurs membranaires spécifiques que l'on retrouve entre autre chez les macrophages. Cette reconnaissance provoque la stimulation de deux mécanismes cellulaires: la dégranulation et l'initiation de la P.A.R. [1]

La dégranulation comprend les mécanismes d'endocytose, la fusion avec les lysosomes primaires et la formation du phagolysosome avec digestion du contenu grâce au matériel enzymatique des lysosomes.

La P.A.R. (ou explosion respiratoire) décrit un processus métabolique dont la fonction est de produire un groupe d'agents bactéricides hautement réactifs grâce à la formation de dérivés oxygénés.

Fridovitch (1975) et Babior montrèrent que la P.A.R. des macrophages incluait quatre phénomènes :

- une augmentation de l'oxygène consommé
- une augmentation de la voie de synthèse des hexoses monophosphates
- une augmentation des radicaux superoxydes produits
- une augmentation des peroxydes.

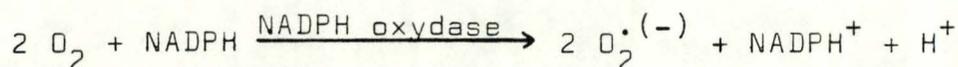
I.2. Induction de la P.A.R.

Plusieurs substances peuvent provoquer la P.A.R., [2] par exemple: les bactéries enrobées d'opsonines, le zymosan, le phorbol myristate acétate (P.M.A.), des peptides chimiotactiques, des lectines, l'acide arachidonique, etc ...

Cette induction se produit lors du simple contact de l'inducteur avec la surface du phagocyte. Le temps de latence est de 30 à 60 secondes.

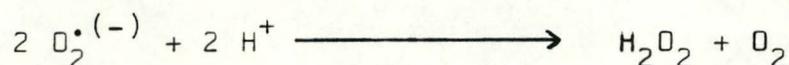
I.3. Interaction entre les 4 phénomènes de la P.A.R.

L'augmentation de l'oxygène s'explique en partie par la formation importante de radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet(-)}$), reconnus comme agents bactéricides [3] :

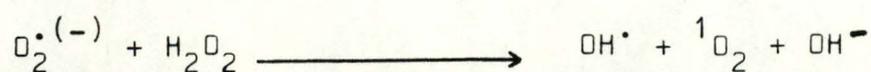


La NADPH oxydase est l'enzyme clé dans les réactions de réduction partielle de l' O_2 . Elle est localisée sur la membrane externe des macrophages [2] .

Par la suite, il peut se produire une dismutation spontanée d'une partie des $O_2^{\bullet(-)}$ en H_2O_2 :



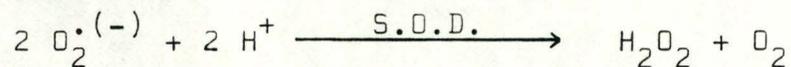
Babior et Curnutte démontrèrent que l' $O_2^{\bullet(-)}$ n'était pas le seul agent microbicide, mais que par réaction avec H_2O_2 , il pouvait former d'autres agents hautement réactifs, le radical hydroxyl (OH^{\bullet}) et l'oxygène singulet (1O_2); ce dernier est une forme réactionnelle de l'oxygène due à la position de spin des électrons périphériques.



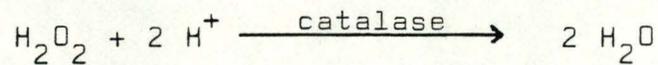
I.4. Mécanismes de défense contre les radicaux libres.

Il existe des mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques. Les principaux enzymes impliqués dans la défense contre les dérivés oxygénés sont :

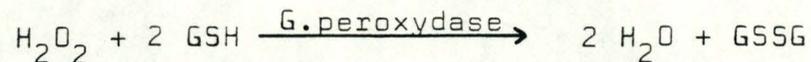
- la superoxyde dismutase (SOD), qui catalyse la transformation de $O_2^{\cdot(-)}$ en H_2O_2 (Fridovitch + Mc Cord, 1969) :



- la catalase, qui détruit H_2O_2 en H_2O (Roos, 1980) :



- la glutathion peroxydase, qui catalyse la détoxification des peroxydes :



GSSG représente le glutathion réduit. Il est régénéré par action de la glutathion réductase qui utilise le pouvoir réducteur du NADPH.

Les mécanismes de défense non enzymatiques sont principalement :

- les vitamines C et E
- les hydroquinones
- beaucoup d'anti-oxydants synthétiques
- etc ...

Ils agissent en trappant les radicaux ou par leur action anti-oxydante.

I.5. Effets délétères de la P.A.R.

I.5.1. Système H₂O₂ - Myéloperoxydase - Halide.

Le système bactérien le plus efficace décrit jusqu'à présent est le système H₂O₂ - Myéloperoxydase - Halide (Klebanoff, 1967) [1].

Plusieurs mécanismes ont été proposés :

- l'halogénéation de la surface étrangère pourrait permettre dans certains cas la destruction de la cible (Klebanoff, 1967).
- la décarboxylation des acides aminés amènerait la rupture de la paroi bactérienne et provoquerait ainsi sa lyse (Paul et coll., 1970).
- ce système pourrait aussi intervenir dans la formation de l'oxygène singulet, intermédiaire doté d'une très grande réactivité (Rosen et Klebanoff, 1977).

I.5.2. Peroxydation lipidique.

Les membranes cellulaires, riches en lipides insaturés, vont être une cible de choix pour les radicaux libres oxygénés [4].

OH[•] est capable d'initier la peroxydation lipidique par sa faculté d'oxyder des lipides insaturés pour former des hydroperoxydes.

Par contre, ¹O₂ peut réagir directement avec des acides gras polyinsaturés pour former des hydroperoxydes.

O₂⁽⁻⁾, lui, intervient en tant qu'intermédiaire dans la peroxydation lipidique en provoquant la formation d'OH[•] et ¹O₂.

1.5.3. Attaques des acides nucléiques.

OH^\bullet et $^1\text{O}_2$ sont capables de réagir avec les acides nucléiques.

Ils réagissent de la même façon que pour la peroxydation lipidique et peuvent de cette manière engendrer des erreurs dans le génome [5].

Il est évident, compte-tenu de l'efficacité des agents anti-bactériens et anti-tumoraux, que ces agents sont capables de provoquer la mort cellulaire ainsi que tissulaire.

Certains [5] ont d'ailleurs montré les effets délétères des dérivés oxygénés en cas d'accumulation ou d'agrégation des leucocytes sur des cellules endothéliales en culture.

II. LA CHEMOLUMINESCENCE.

La chemoluminescence (CL) représente une émission de lumière par certaines molécules. Elle peut être utilisée pour la détection de la production de radicaux $O_2^{(-)}$ et des autres dérivés oxygénés (H_2O_2 , OH^{\cdot} et 1O_2).

Allen et ses collaborateurs (1972) avaient montré que la stimulation de macrophages pouvait donner lieu à une émission de lumière.

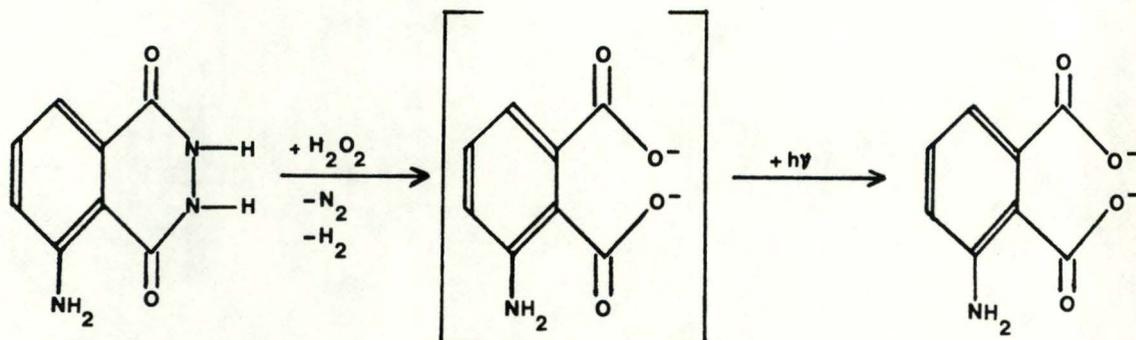
Les macrophages non stimulés émettent aussi de la lumière, mais en plus faible quantité. C'est ce que l'on appelle la luminescence naturelle ou bioluminescence.

Cependant cette émission naturelle peut être grandement augmentée grâce à des molécules amplificatrices. On parlera alors de luminescence induite ou chemoluminescence.

Ces molécules amplificatrices réagissent avec les agents oxygénés émis par les macrophages lors de la P.A.R.; elles sont excitées et lors de leur désexcitation, elles émettent un photon, qui peut être détecté par un photomètre.

On connaît principalement deux molécules amplificatrices :

- le luminol qui réagit principalement avec le H_2O_2 et probablement 1O_2 [6].

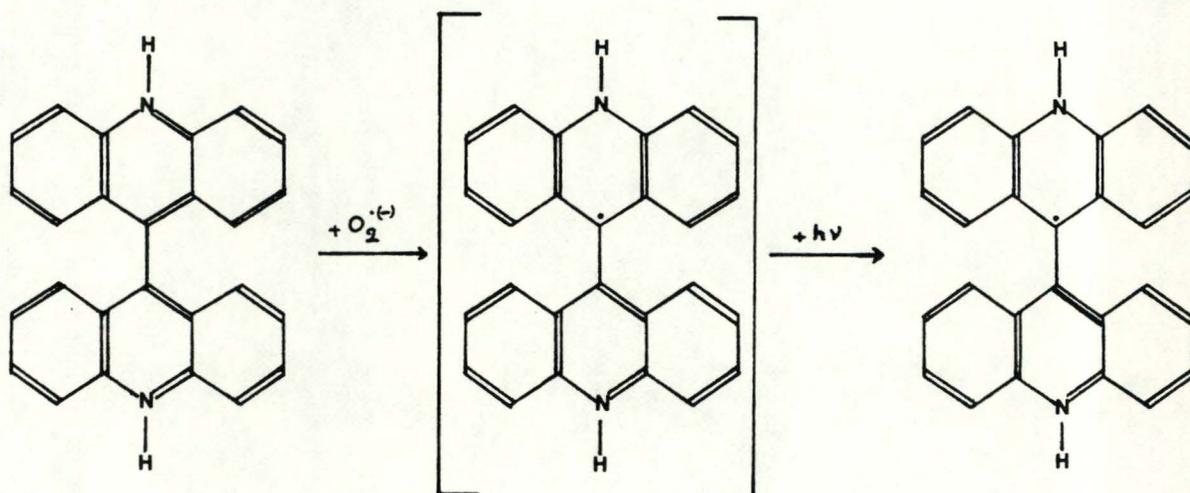


aminophthalate
(luminol)

ion
aminophthalate excité

ion
aminophthalate

- la lucigénine qui réagit principalement et probablement exclusivement avec le radical superoxyde $O_2^{(-)}$ [7].



10,10'-diméthyl-bis-
9,9'-biacridium nitrate
(lucigénine)

radical diméthyl
biacridium
nitrate excité

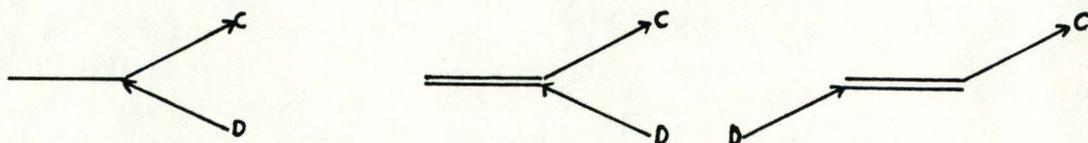
radical diméthyl
biacridium
nitrate stable

La possibilité de détection quantitative des photons émis permet une quantification de la production des radicaux superoxydes.

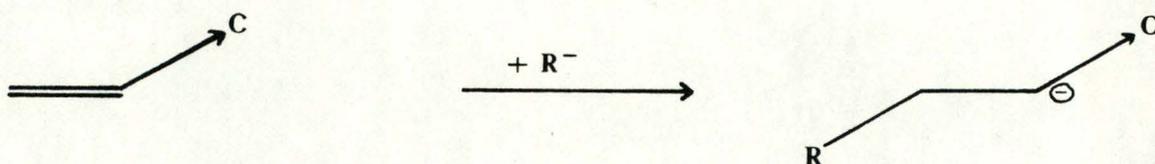
III. LA SUBSTITUTION CAPTO-DATIVE.

La substitution capto-dative signifie la présence simultanée sur une molécule d'un donneur (d) et d'un capteur (c) d'électrons.

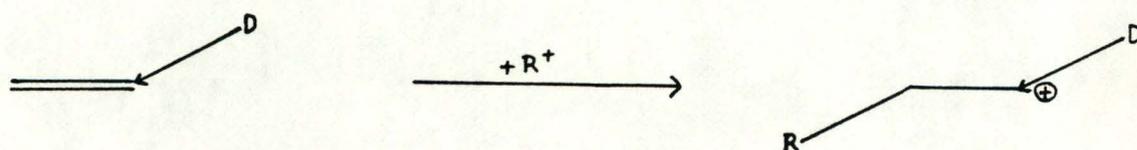
La réunion de ces deux groupements sur un même atome ou en position vinylique permet la stabilisation de la forme radicalaire de la molécule [8], [9].



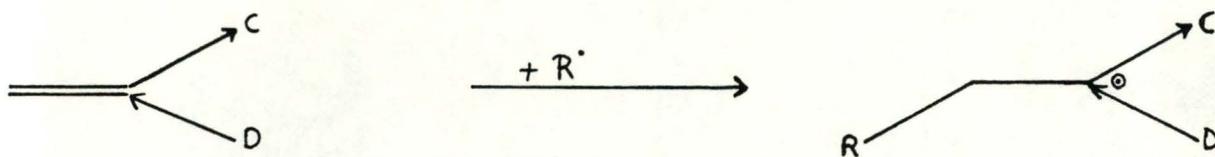
Les molécules capto-datives trappent donc aisément les radicaux. On les nomme radicophiles par analogie avec les molécules nucléophiles et électrophiles.



Une molécule qui possède un groupement capteur est rendue électrophile et elle stabilise bien l'addition d'un anion.



Par contre, la molécule qui possède un groupement donneur est rendue nucléophile et elle stabilise bien l'addition d'un cation.



Dès lors, une molécule qui possède à la fois un groupement capteur et donneur est dite radiphile car elle stabilise parfaitement l'addition d'un radical.

Il faut cependant ajouter que la notion de radiphilicité est basée principalement sur la propriété des systèmes π de former un radical thermodynamiquement stable grâce à une réaction homolytique, alors que celle de nucléophilicité et d'électrophilicité ont été définies en terme cinétique.

La stabilisation cinétique est continuellement créée par des effets stériques; par contre, la stabilisation thermodynamique résulte principalement d'effets de conjugaison et est formulée comme étant l'énergie de stabilisation radicalaire (R.S.E.).

IV. BUT DU TRAVAIL.

L'objectif principal de ce travail était de tester certaines molécules afin de vérifier leur capacité éventuelle d'augmenter la production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot(-)}$).

Pour permettre le dosage des radicaux libres, nous avons utilisé une technique extrêmement sensible, la chemoluminescence :

dans cette technique, les radicaux libres réagissent avec une molécule "amplificatrice" et provoquent l'émission de photons qui seront facilement détectables par un photomètre.

Le système utilisé pour produire ces radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ est composé de macrophages intrapéritonéaux murins activés afin d'obtenir une production importante des radicaux $O_2^{\cdot(-)}$.

Les molécules que nous avons testées ont comme caractéristique chimique d'être capto-datives. Elles offrent un intérêt tout particulier : en effet, certaines de ces molécules, grâce à la présence simultanée de groupements capteurs et donneurs, seraient capables de stabiliser la présence de radicaux libres et de ce fait, soit de capter les radicaux produits en les inactivant, soit, au contraire, de servir d'intermédiaires réactionnels et de favoriser ainsi la formation de radicaux.

C'est cette dernière propriété que nous avons recherché dans ce travail.

MATERIEL ET METHODES

I. PRELEVEMENTS DES MACROPHAGES.

Après avoir effectué une injection de thioglycollate (2,5 %) (Merck, Darmstadt) dans la cavité intrapéritonéale de souris quatre jours auparavant, on procède au sacrifice de l'animal. Il est préférable de la décapiter après l'avoir endormie pour éviter un afflux sanguin dans l'abdomen. La souris est alors placée sur une planche à dissection. On pratique une section de son abdomen suffisamment grande pour permettre l'introduction d'une pipette pasteur. La cavité intrapéritonéale est lavée grâce à un milieu de culture RPMI 1640 (Eurobio, Paris) contenant 20 % de sérum de veau foetal et la suspension est recueillie dans un tube préalablement refroidi dans un bac à glace afin d'éviter l'adhésion des cellules sur les parois. En effet, à 0° C., le métabolisme des cellules est au repos.

Il faut compter 2 à 3 ml de milieu par souris pour obtenir une concentration approximative de 1.10^6 cellules par millilitre.

Il est possible d'estimer la population de macrophages d'une manière plus correcte grâce à un hémocymètre qui permet de répertorier un nombre de cellules dans un volume connu.

II. TEST DE CHEMOLUMINESCENCE.

II.1. Solutions :

- lucigénine (Sigma, St-Louis) 10^{-3} M dans la solution de Hanks (et à l'abri de la lumière)
- PMA (Sigma) (phorbol myristate acétate) 1 M dans du DMSO (Merck) (diméthylsulfoxyde)
- solution salée de Hanks : (composition pour 1 litre d'eau distillée)

NaCl	8	g
glucose	1	g
KCl	0,4	g
NaHCO ₃	0,35	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,186	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,100	g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,100	g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,060	g
KH ₂ PO ₄	0,060	g

- molécules à tester: diluées à différentes concentrations qui s'échelonnent de 10^{-2} à 10^{-8} Molaire. Lorsque les molécules sont insolubles dans l'eau, elles sont dissoutes préalablement dans de l'éthanol. On les dilue encore 100 fois dans le tampon d'incubation afin de les utiliser dans le test.

II.2. Méthode :

Le dosage est réalisé à 37°C sur un photomètre (biocounter Lumac M2010, Schaesberg, Netherlands). On maintient une agitation constante tout au long de l'expérience grâce à un agitateur magnétique. Les macrophages sont maintenus à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation.

Les échantillons des molécules sont préchauffés à 37° quelques minutes auparavant. Nous avons indiqué à la fig.1 l'observation d'une expérience.

Au départ, nous incubons 0,4 ml de la suspension contenant des macrophages et 0,1 ml de lucigénine. La chemoluminescence est faible.

Nous rajoutons, cinq minutes plus tard, 1 ml de PMA afin d'activer les macrophages et nous observons alors une nette augmentation de la chemoluminescence qui atteint un maximum après quinze à vingt minutes. Cinq minutes après l'addition du PMA, nous ajoutons 0,1 ml de l'échantillon pour le test et 0,1 ml de la solution de Hanks pour le témoin. Et nous observons alors l'évolution de la courbe de chemoluminescence.

Pour obtenir un résultat plus précis, on peut calculer l'intégrale de la courbe d'activation.

Le pourcentage d'activation d'une molécule sera le rapport de l'aire de sa courbe d'activation sur l'aire de la courbe témoin.

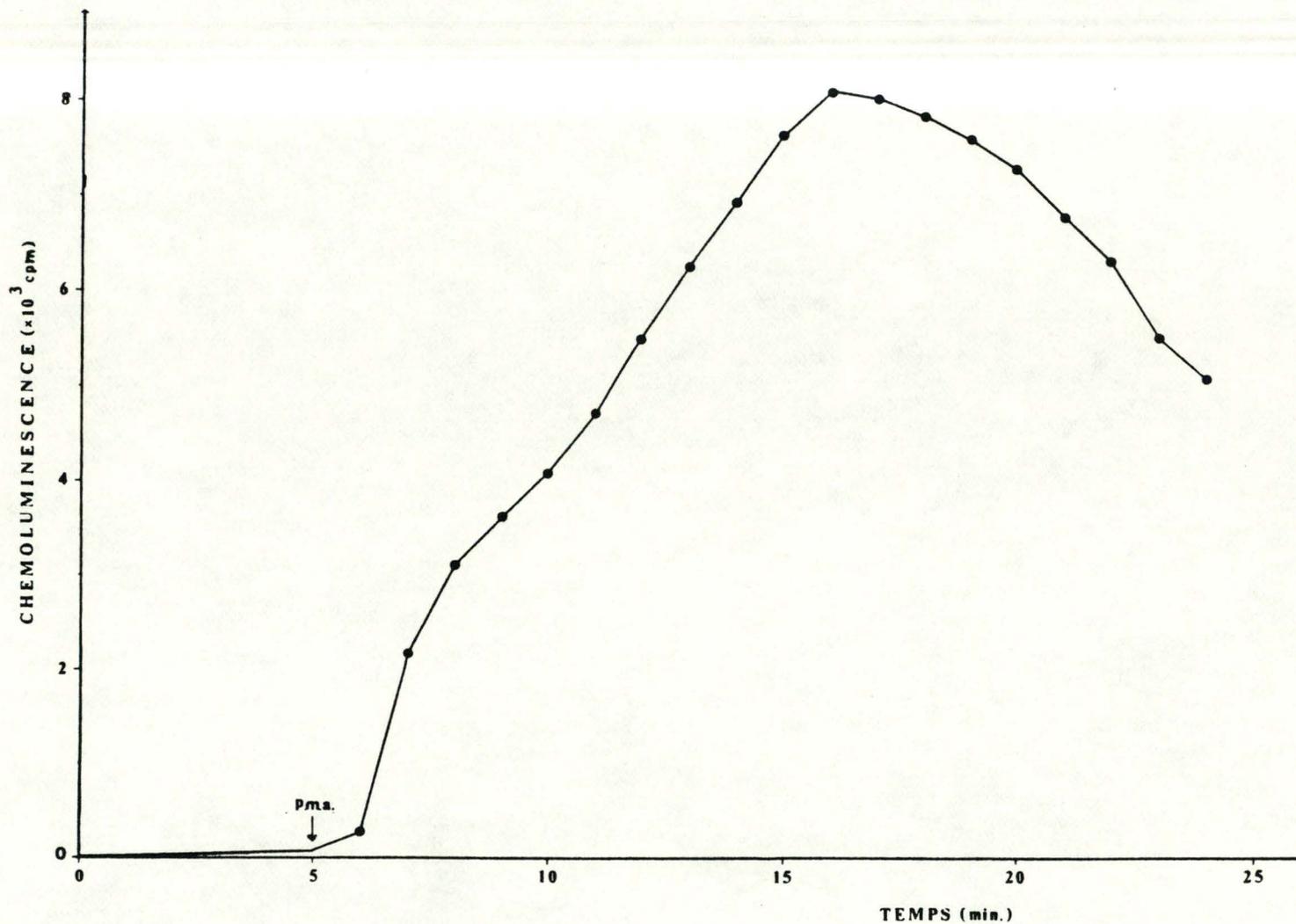
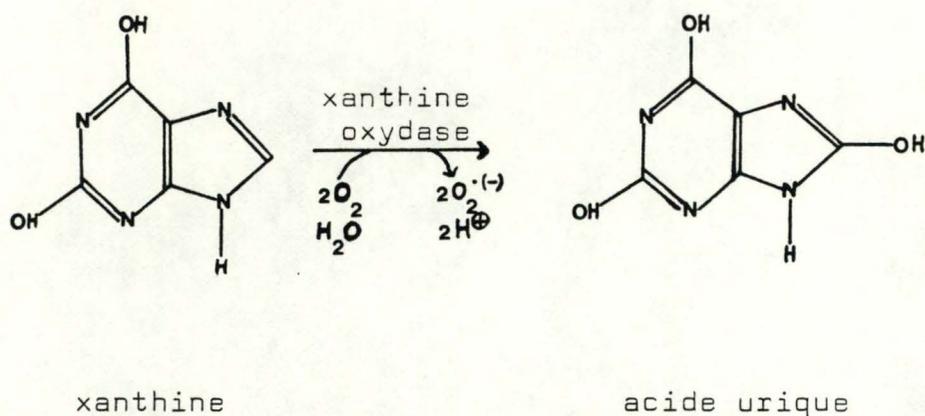


Figure 1: Evolution de la chemoluminescence au cours de l'activation des macrophages. La stimulation induite par le PMA est effectuée après cinq minutes d'incubation de la lucigénine et des macrophages. Les mesures sont prises chaque minute. La chemoluminescence en CPM représente le nombre de photons détectés par l'appareil par minute.

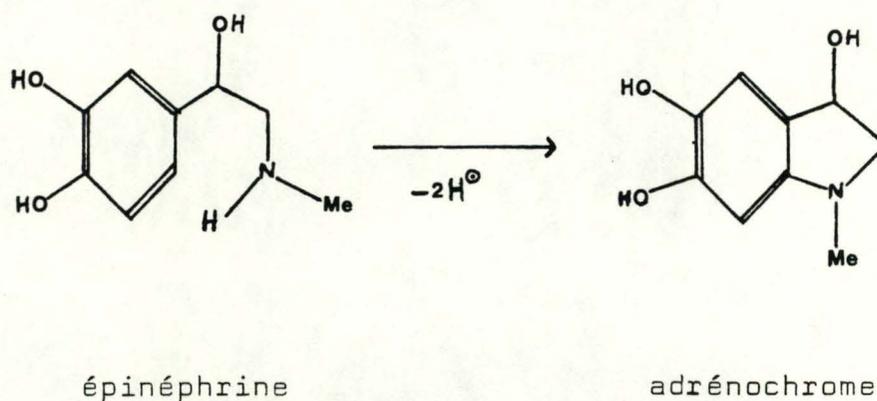
III. SYSTEME XANTHINE - XANTHINE OXYDASE.

III.1. Mesure de la production de radicaux superoxydes.

En oxydant la xanthine en acide urique, la xanthine oxydase gènere la production de radicaux superoxydes.



La production de radicaux libres peut être mesurée par l'augmentation d'absorbance à 480 nm due à l'oxydation de l'épinéphrine en adrénochrome.



III.2. Méthode de dosage.

III.2.1. - Solutions :

- tampon de TRAP (Merck) (triéthanolaminohydrochloride) 20 mM à PH=9 contenant du sucrose 0,25 M et de l'EDTA (éthylène diaminotetraacétate) (Merck) 2 mM
- xanthine (Sigma) 0,1 M dans H₂O auquel on rajoute quelques gouttes de NaOH concentré jusqu'à dissolution
- xanthine oxydase (Sigma) concentrée (20 U/ml)
- épinéphrine (Sigma) 0,1 M dans Hcl 0,2 N fraîche
- molécules à tester: diverses concentrations entre 10⁻³M et 10⁻⁷M. Pour les molécules trop colorées, on doit les diluer beaucoup plus fort.

III.2.2. - Méthode :

Le dosage est réalisé sur un spectrophotomètre (Perkin Elmer 557, Tokyo, Japon). Il se fait à 25°C. On lit l'augmentation d'absorbance à 480 nm.

Dans la cuvette, on trouve: 1000 µl tampon à PH=9
 10 µl épinéphrine
 20 µl xanthine

On peut lire le blanc et mettre l'appareil à zéro.

On ajoute 1 ou 2 µl de xanthine oxydase suivant la pente que l'on veut obtenir. Cette pente représente l'augmentation d'absorbance due à la formation d'adrénochrome.

On place alors dans la cuvette 100 μ l de l'échantillon pour le test ou 100 μ l de tampon pour le témoin.

Le rapport des pentes entre le témoin et le test permet de calculer le pourcentage d'activation ou d'inhibition de la molécule.

Une légère correction doit être apportée pour tenir compte de l'effet de dilution.

III.2.3. - Calcul de la production $O_2^{(-)}$:

La formation d'adrénochrome permet d'évaluer la quantité d' $O_2^{(-)}$ formée d'après la formule :

$$\frac{\text{variation d'absorbance}}{\text{coefficient d'absorbance}} = \text{nmôles d'adrénochromes/min.ml.}$$

Comme il faut 2 $O_2^{(-)}$ pour former une molécule d'adrénochrome, il suffit de multiplier par 2 le nombre de nmôles pour obtenir la quantité d' $O_2^{(-)}$.

Nous avons obtenu dans notre test une formation de 60 nmôles d' $O_2^{(-)}$ /min.ml pour 1 μ l de xanthine oxydase.

IV. TEST DE CYTOTOXICITE.

Une grande boîte Falcon (75 cm²) à confluence est subdivisée par trypsinisation dans une boîte Multidish (25 X 4 cm²) de manière à obtenir une dilution de 4 fois des cellules.

Les cellules s'accrochent et s'étalent pendant une nuit à 37°C dans 1 ml de milieu (milieu minimum essentiel de Eagle, contenant les sels de Earle : Eurobio) contenant 10 % de sérum de veau foetal.

Le lendemain, le produit à tester est dilué dans le milieu de culture à des concentrations variables et ajouté dans la boîte de culture.

Chaque concentration est testée en triple.

Pendant une semaine, les cellules ont la possibilité de croître et de se diviser deux fois.

Après une semaine, elles sont rincées par 2 X 3 ml de PBS et raclées dans 2 ml de PBS-NaOH 0,5 N et les protéines sont dosées suivant la méthode de Folin [10].

RESULTATS

I. MISE AU POINT DU DOSAGE DES RADICAUX SUPEROXYDES PAR LA CHEMOLUMINESCENCE.

I.1. Influence de la concentration en lucigénine.

L'incubation des macrophages avec des concentrations croissantes de lucigénine est représentée à la fig.2.

Après stimulation des macrophages par le PMA, la production de radicaux $O_2^{(-)}$ atteint un plateau pour des concentrations en lucigénine proches de $2 \cdot 10^{-4} M$.

Au-dessus de ces concentrations, la lucigénine semble avoir un effet légèrement inhibiteur sur la production de radicaux, vraisemblablement dû à un effet quenchant.

Nous avons choisi pour la suite des expériences une concentration en lucigénine de $1,65 \cdot 10^{-4} M$.

I.2. Influence de la concentration en macrophages.

Si nous incubons la lucigénine avec des concentrations croissantes de macrophages, nous observons, après stimulation des macrophages par le PMA, une relation linéaire entre la concentration en macrophages et la production de radicaux superoxydes, comme nous le montre la figure 3.

Cette relation linéaire indique que, même pour une concentration de $2 \cdot 10^6 \phi/ml$, la lucigénine est encore en excès.

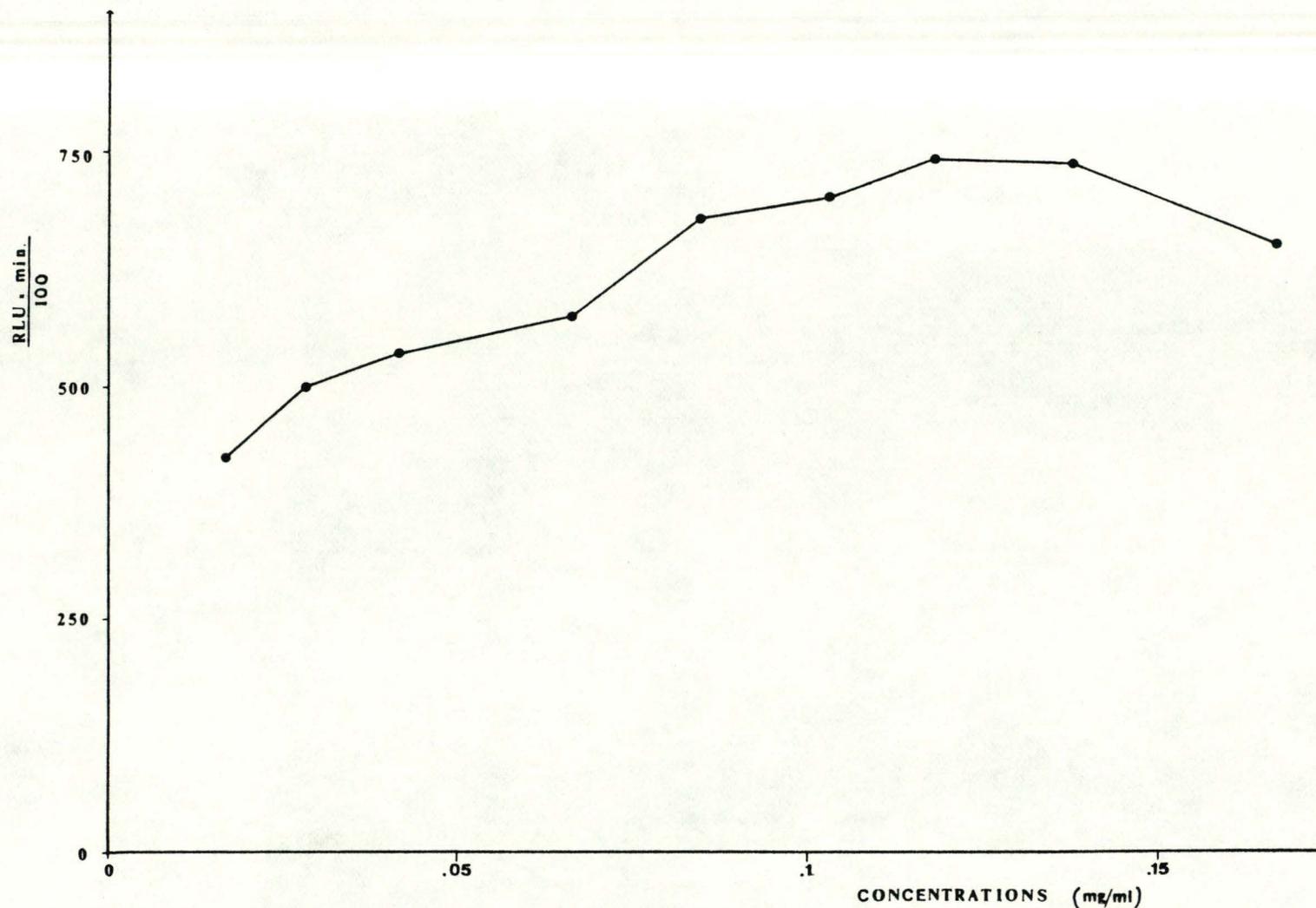


Figure 2: Influence de la concentration en lucigénine sur la production d' $O_2^{\cdot(-)}$.

RLU (relative light units) représente une moyenne du nombre de photons détectés par l'appareil pendant un intervalle de temps déterminé.

$\frac{RLU \times min.}{100}$ représente l'aire d'intégration située sous la courbe d'activation pendant quinze minutes après l'activation des macrophages par le PMA.

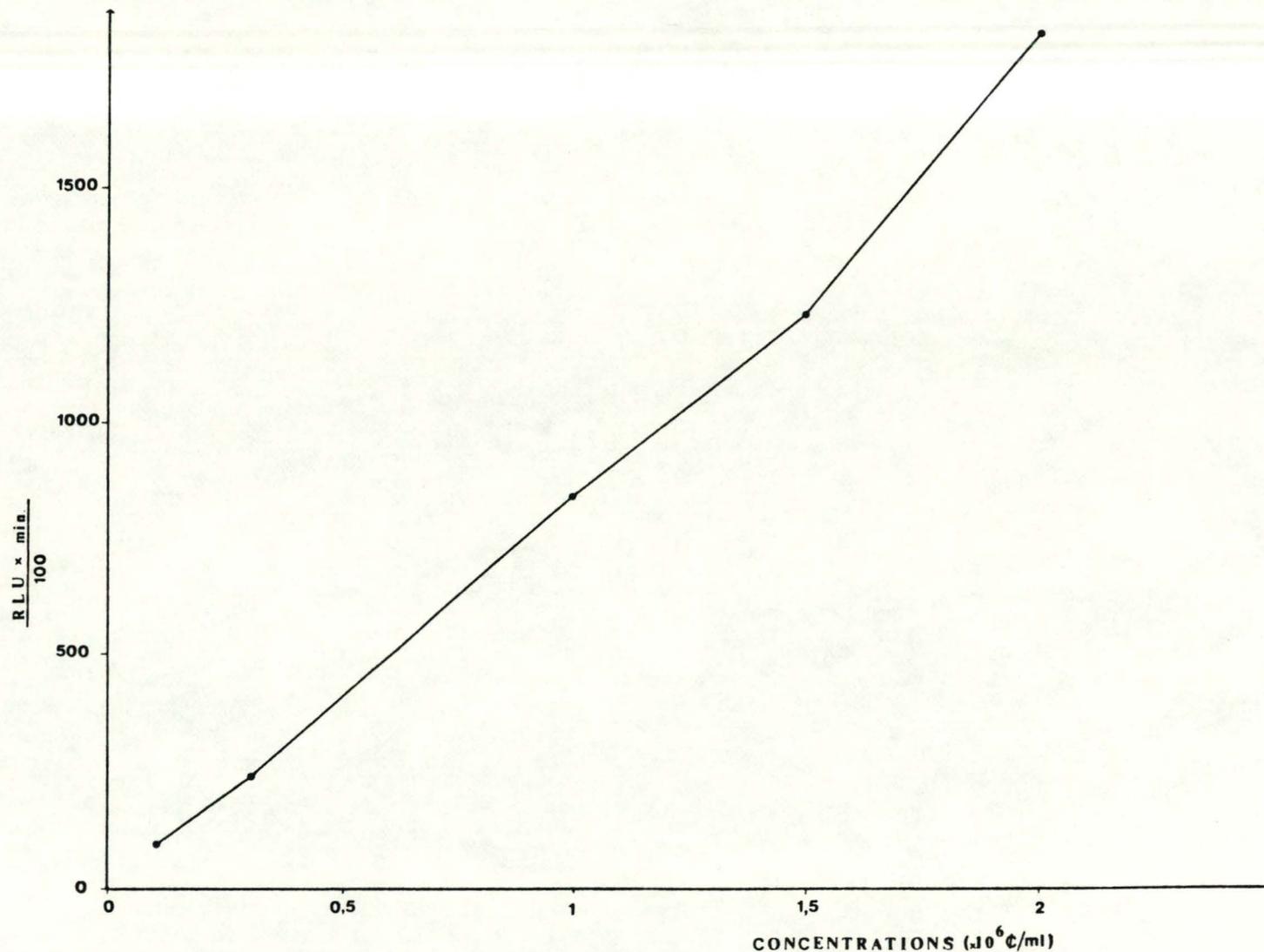


Figure 3: Influence de la concentration en macrophages intrapéritonéaux sur la production d' $O_2^{\cdot(-)}$.

RLU représente la moyenne du nombre de photons détectés par l'appareil pendant un intervalle de temps déterminé.

$\frac{RLU \times \text{min.}}{100}$ représente l'aire d'intégration située sous la courbe d'activation pendant quinze minutes après l'activation des macrophages par le PMA.

Nous avons choisi une concentration en macrophages intrapéritonéaux de 1.10^6 ϕ /ml, pour la suite des expériences, ce qui ne demande pas le sacrifice d'un trop grand nombre de souris, mais qui permet une mesure suffisamment fiable de la production de radicaux $O_2^{(-)}$.

1.3. Estimation de la production de radicaux $O_2^{(-)}$.

Nous avons testé la production de radicaux $O_2^{(-)}$ par la xanthine oxydase en présence de lucigénine.

Nous avons pris des concentrations en xanthine oxydase telles que pour une dilution de 2 fois de xanthine oxydase, nous ayons une diminution de moitié de la production de photons.

Nous sommes arrivés à la conclusion qu'une chemoluminescence de 20.000 cpm représente approximativement 0,025 nmôles d' $O_2^{(-)}$ /min.ml., sachant que 1 μ l de xanthine oxydase produit environ 60 nmôles/min.ml.

1.4. Effet de la superoxyde dismutase.

Nous avons testé diverses concentrations en superoxyde dismutase (SOD) sur la production de radicaux $O_2^{(-)}$.

La figure 4 nous montre que l'addition de concentrations croissantes en SOD, cinq minutes après la stimulation des macrophages par le PMA, provoque une inhibition proportionnelle à la dose de SOD ajoutée. Une unité de SOD représente 50 % d'inhibition des radicaux $O_2^{(-)}$.

Le calcul est facile et nous montre que la quantité de SOD est nettement supérieure à la quantité théoriquement suffisante pour une inhibition complète. La raison n'est pas encore connue pour l'instant.

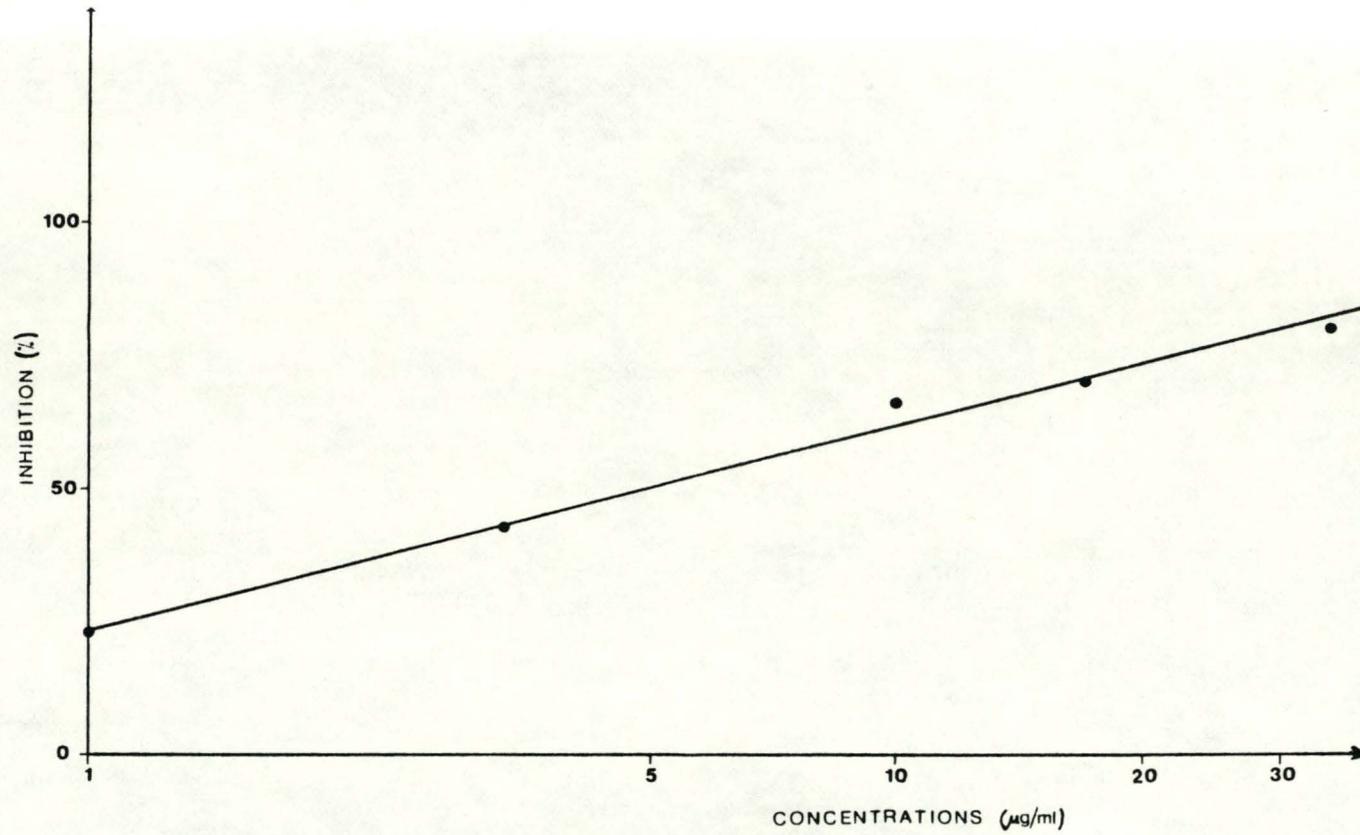


Figure 4: Effet de la concentration en superoxyde dismutase (SOD) sur la production d' $O_2^{\cdot(-)}$.
La SOD est ajoutée cinq minutes après la stimulation des macrophages par le PMA.
 $1 \mu\text{gr}$ de SOD représente 2,8 Unités.

I.5. Effet de la catalase.

Nous avons représenté à la fig.5 l'effet de diverses concentrations en catalase sur la production de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$.

L'addition de concentrations croissantes en catalase, cinq minutes après la stimulation des macrophages par le PMA, montre également une inhibition proportionnelle à la dose de catalase ajoutée.

Cependant, il faut remarquer ici qu'une Unité de catalase détruit 1 nmôle d' H_2O_2 . Nous obtenons ici une inhibition de 90 % pour 10 mgr de catalase ajoutée. Cela correspond à plus de 300.000 Unités.

Il faut invoquer un effet "quenchant" ainsi qu'un effet cytotoxique direct de la catalase aux fortes concentrations [1].

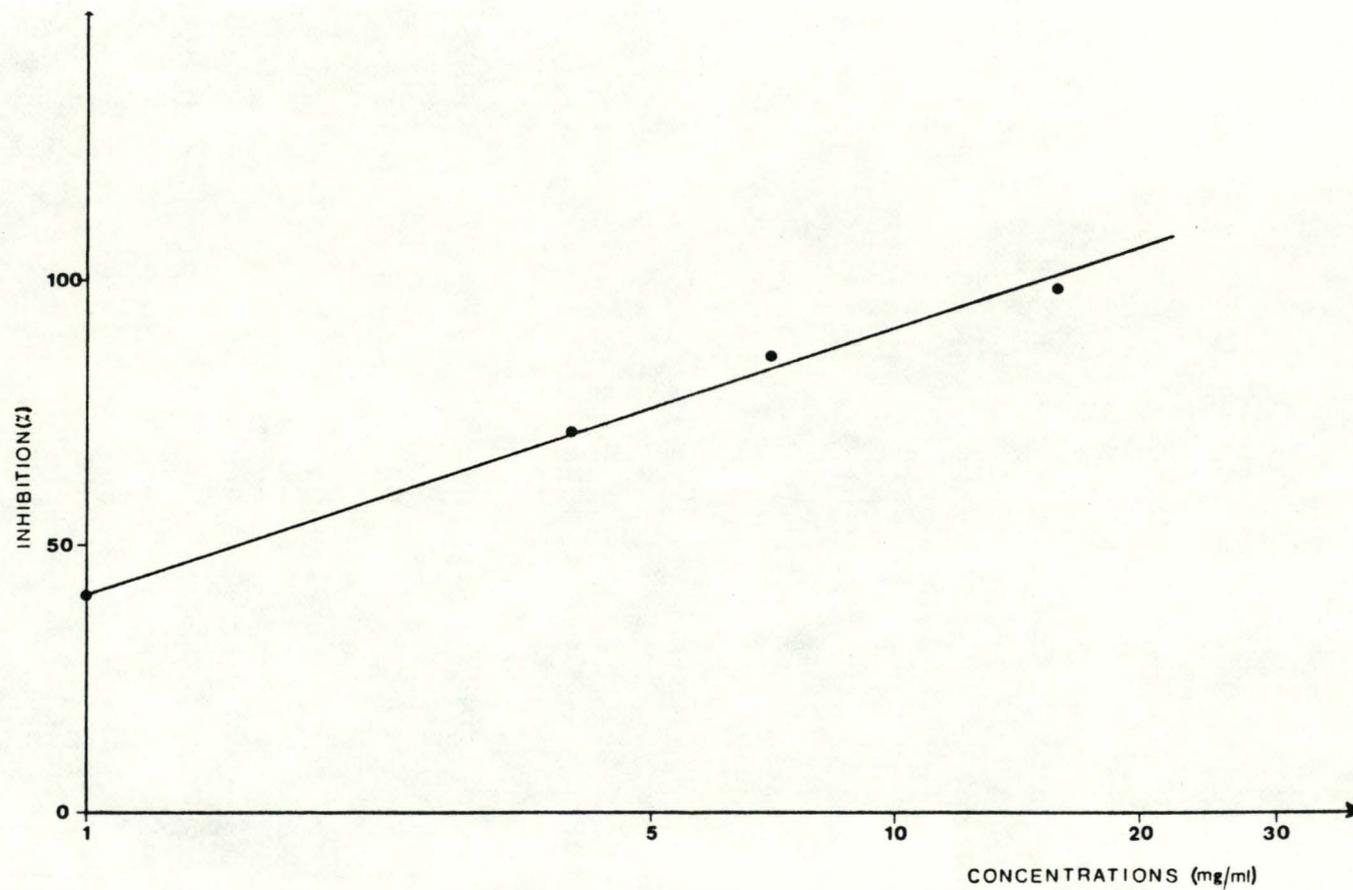


Figure 5: Effet de la concentration en catalase sur la production d' $O_2^{\cdot(-)}$.

La catalase est ajoutée cinq minutes après la stimulation des macrophages par le PMA.

1 mg. de catalase représente 33.900 Unités.

1 U. de catalase détruit 1 nmôle d' H_2O_2 /min.ml.

II. ACTIVATION DE LA PRODUCTION DE RADICAUX SUPEROXYDES DANS LE TEST DE CHEMOLUMINESCENCE.

Les molécules testées ont été ajoutées cinq minutes après la stimulation des macrophages par le PMA. Nous avons observé leur effet pendant quinze minutes.

Le % d'activation de la molécule représente le rapport de l'aire d'intégration de la courbe-test sur l'aire d'intégration de la courbe témoin.

Les résultats sont repris dans le tableau 1 dans la discussion. (cfr p.41)

II.1. Effet de la molécule OL₁.

Nous avons testé cette molécule à des concentrations croissantes à partir de 10^{-4} Molaire.

Il ressort de la figure 6 que la molécule testée montre une inhibition croissante pour des concentrations croissantes.

Cette molécule était intéressante car elle activait les radicaux $O_2^{(-)}$ dans un autre test de production d' $O_2^{(-)}$. [2]

II.2. Effet de AL₃.

Cette molécule était fort intéressante à tester, car elle représente un exemple typique de molécule capto-dative.

Nous avons testé cette molécule à des concentrations décroissantes à partir de 10^{-5} M.

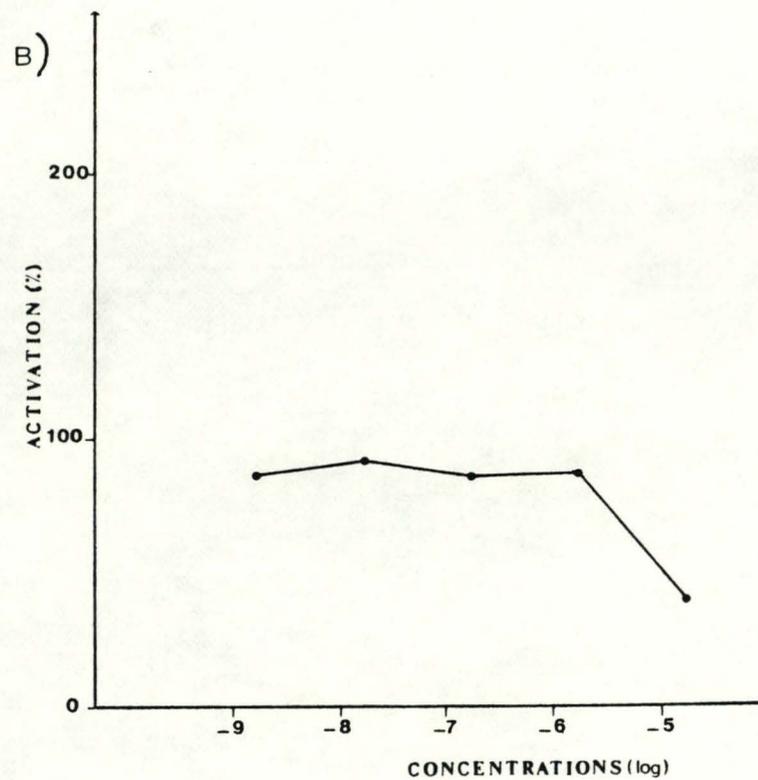
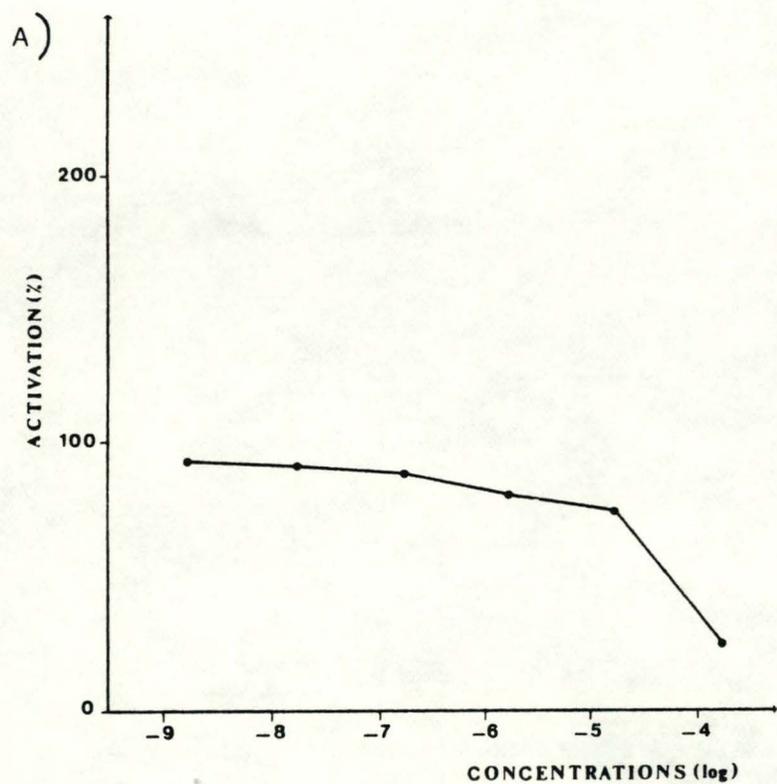


Figure 6: Evolution de la production de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ par la méthode de chemoluminescence après stimulation des macrophages par le PMA, en fonction de la molécule OL_1 (A) et AL_3 (B).

La figure 7 nous donne l'évolution de la courbe d'activation de la production des radicaux $O_2^{(-)}$, en fonction des concentrations en Al_3 .

Les concentrations plus faibles ne donnent pas d'effet significatif, cependant à $10^{-5}M$, la molécule montre une forte inhibition de la production de radicaux $O_2^{(-)}$.

II.3. Effet de R_{61}

Nous avons testé cette molécule dans le test de chemoluminescence à des concentrations partant de $10^{-3}M$.

Cette molécule est similaire à la molécule précédente car elle répond aussi à la définition de molécule capto-dative

La fig.8 nous montre qu'elle provoque une activation de plus en plus importante de la production des $O_2^{(-)}$ pour des concentrations croissantes. A $10^{-3}M$, elle active de 146 %

II.4. Effet de NaN_3

Nous avons testé la molécule NaN_3 pour des concentrations entre 10^{-2} et $10^{-8}M$.

Cette molécule est connue comme inhibitrice de la respiration.

Il était intéressant d'étudier cette molécule, car en inhibant la respiration, elle était potentiellement capable de dévier l' O_2 destiné à la respiration vers la production de radicaux libres.

La fig.9 nous montre un effet nul ou peu significatif des faibles concentrations (10^{-7} à $10^{-4}M$). A $10^{-3}M$ cependant, elle donne un effet fortement inhibiteur de la production d' $O_2^{(-)}$.

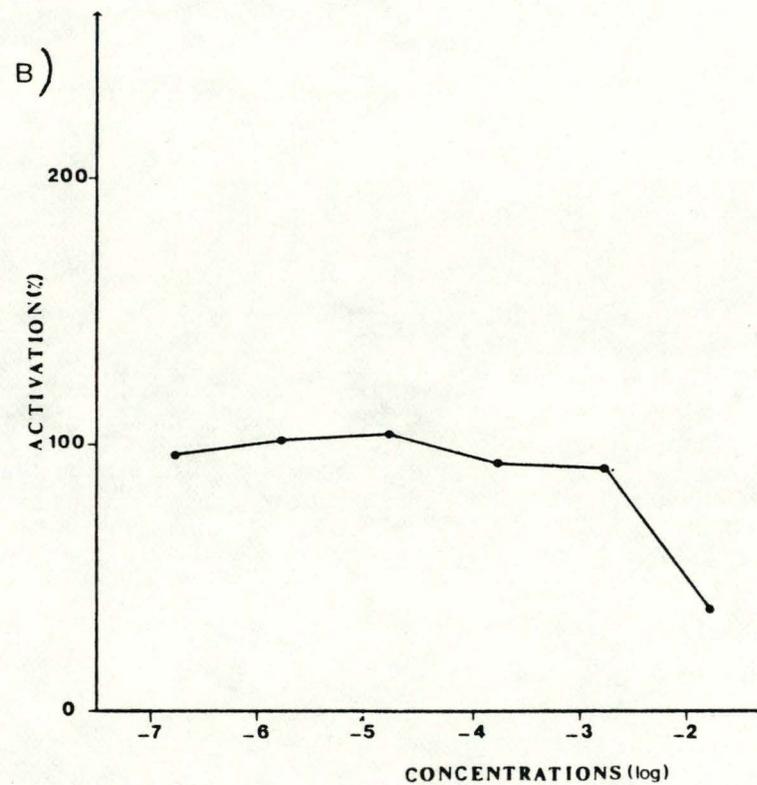
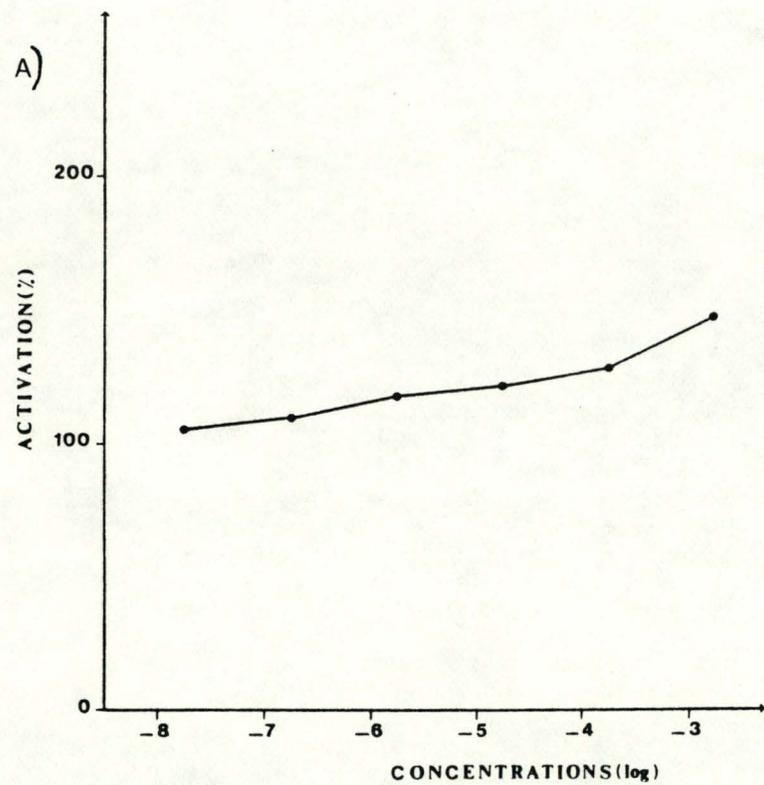
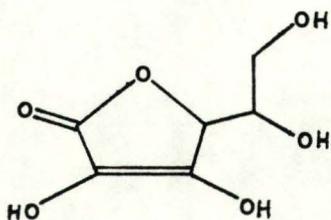


Figure 7: Evolution de la production de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ par la méthode de chemoluminescence après stimulation des macrophages par le PMA en fonction de la molécule R_{61} (A) et NaN_3 (B).

II.5. Effet de la Vitamine C.

La vitamine C est connue depuis longtemps comme un antioxydant.

Cependant certains pensent qu'elle pourrait, au lieu de s'oxyder complètement en acide déhydro-ascorbique et utiliser son pouvoir réducteur pour éliminer les $O_2^{(-)}$, former l'ascrobate free radical qui pourrait intervenir dans l'activation des radicaux libres $O_2^{(-)}$.



Il était donc très intéressant de tester cette molécule.

La figure 10 nous montre des effets antagonistes suivant la concentration que l'on prend.

A des concentrations extrêmement faibles, de l'ordre de 10^{-10} M, la molécule provoque une activation de la production d' $O_2^{(-)}$, qui atteint 140 %.

Par contre, pour des concentrations supérieures à 10^{-4} M, la molécule provoque une forte inhibition.

On a démontré [13] l'effet toxique de la vitamine C aux concentrations supérieures à 10^{-4} M dans des cultures de macrophages.

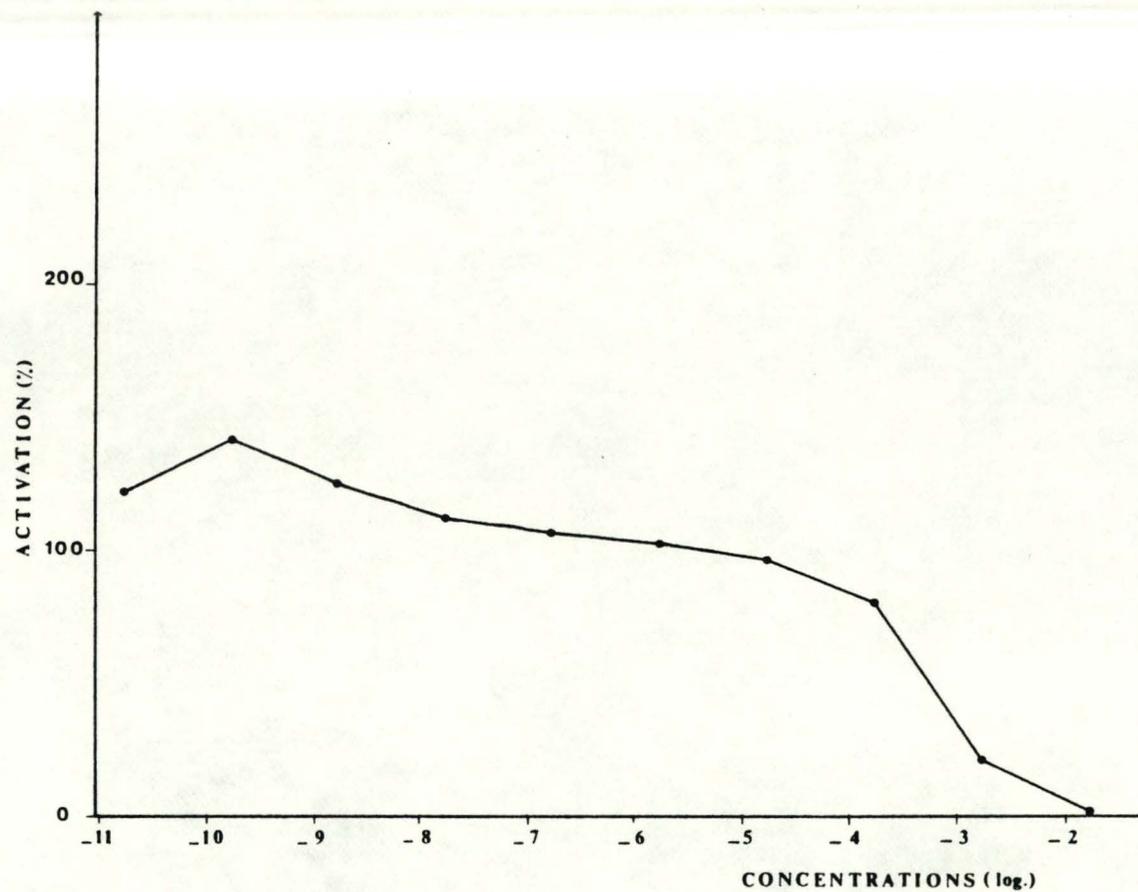
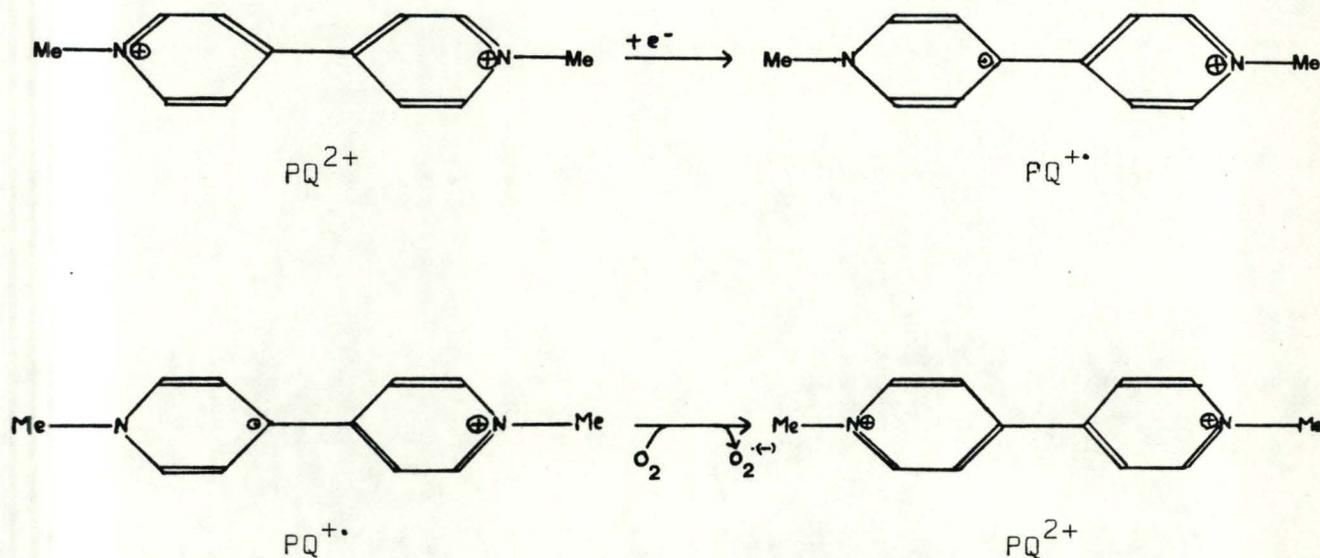


Figure 8: Evolution de la production de radicaux $O_2^{(-)}$ par la méthode de chemoluminescence après stimulation des macrophages par le PMA, en fonction de la vitamine C.

II.6. Effet du Paraquat (Méthyl Viologène). (PQ^{2+})

Le Paraquat est un herbicide puissant et une molécule toxique pour les cellules animales.

Il peut agir comme compétiteur avec la ferrédoxine (1er accepteur d'électrons du photosystème I) [14] et être réduit par l'addition d'un électron en un radical libre stable ($PQ^{+•}$). En présence d'oxygène, il se réoxyde en donnant son électron à l' O_2 pour former $O_2^{•(-)}$.



On a démontré que cette production de radicaux superoxydes engendrait des phénomènes de peroxydations lipidiques tant chez les cellules végétales qu'animales [15].

Cependant dans notre test d'activation des macrophages par le PMA, nous n'avons pas constaté d'effet sur la production de radicaux $O_2^{•(-)}$.

La figure 11 montre l'effet du Paraquat sur la production de radicaux $O_2^{•(-)}$.

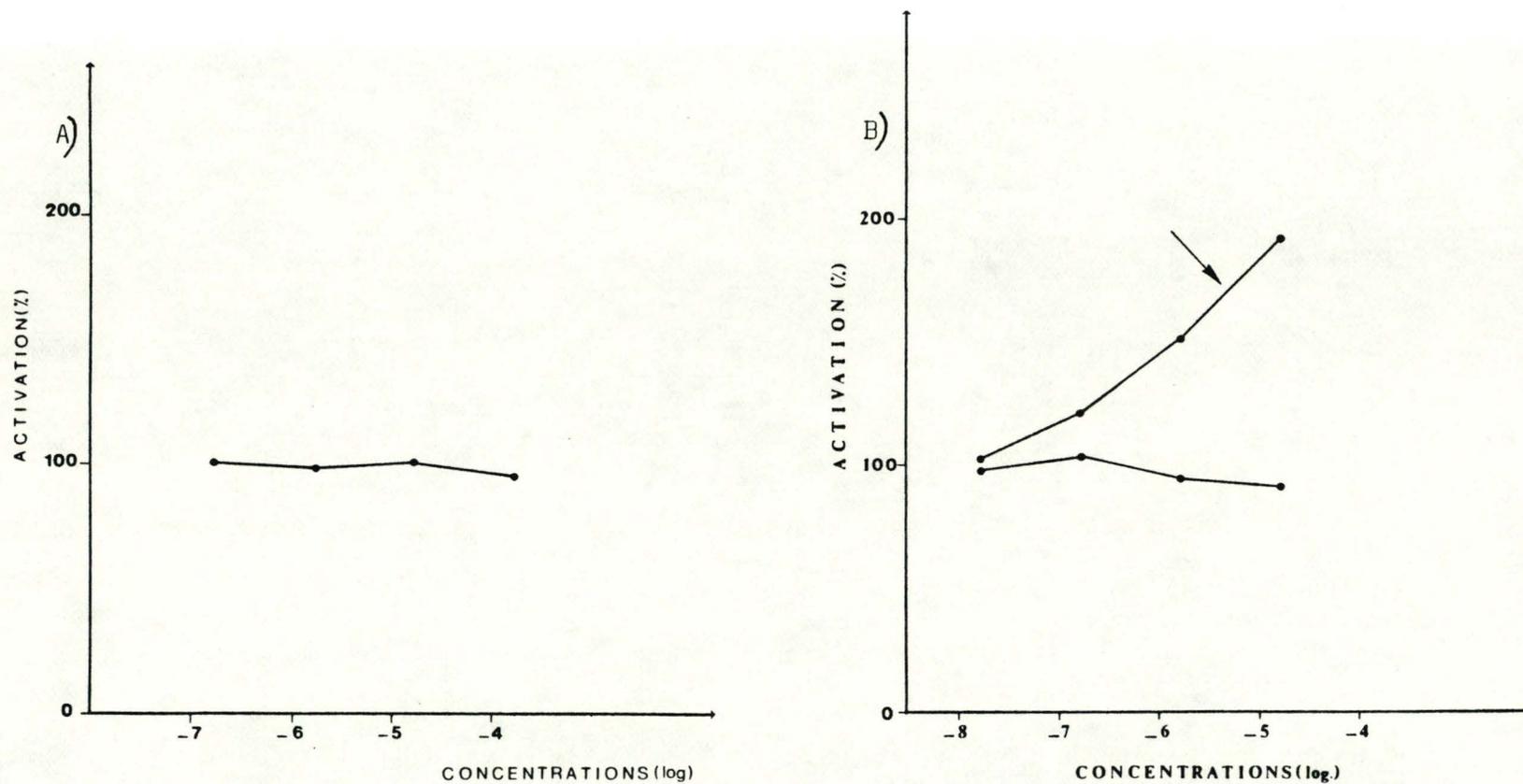
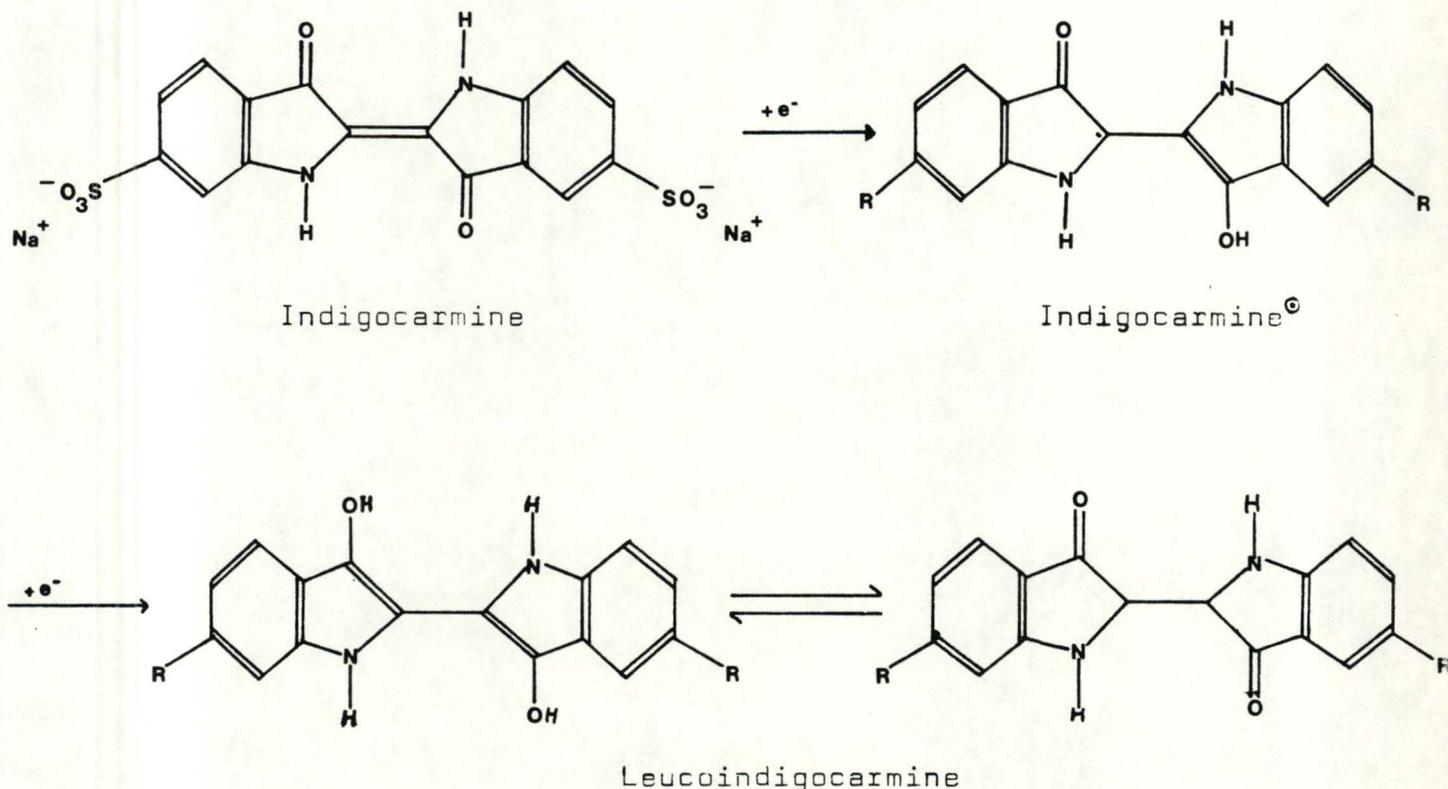


Figure 9: Evolution de la production de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ par la méthode de chemoluminescence après stimulation des macrophages par le PMA, en fonction du paraquat (A) et de l'indigocarmin (B). Pour le graphique B, la courbe fléchée représente l'effet de l'indigocarmin préalablement réduite par du $NaBH_4$, l'autre courbe représente l'effet de l'indigocarmin oxydée.

II.7. Effet de l'Indigo-carmine.

Cette molécule paraissait intéressante car elle peut subir deux réductions. En voici le schéma principal [16] :



La réduction peut se faire grâce à un réducteur tel que le NaBH_4 ou le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

La molécule réduite est alors réoxydée par l' O_2 atmosphérique et libère théoriquement des $\text{O}_2^{\cdot(-)}$. C'est ce que l'on constate au vu de la figure 12.

Alors que la forme oxydée n'a aucun effet, la forme réduite provoque une augmentation très nette de la chemoluminescence et donc de la production de radicaux $\text{O}_2^{\cdot(-)}$. Elle atteint 189 % à 10^{-5}M . Il faut ajouter que la réduction de la molécule est très brève.

De plus, si on pratique un contrôle sans macrophages avec la molécule réduite, on constate aussi une activation de la production de photons.

Cependant, le NaBH_4 seul, aux mêmes concentrations, ne donne pas le moindre effet avec ou sans macrophages.

Nous n'avons pas pu utiliser des concentrations plus fortes en Indigocarmine car la dose de réducteur utile devenait toxique pour les macrophages.

Dans une étude de cytotoxicité sur culture de fibroblastes, les résultats suivants nous permettent de conclure que la molécule oxydée n'est nullement toxique à des concentrations supérieures à 10^{-3}M pour les cellules. On peut même remarquer un léger effet activateur pour toutes ces concentrations.

Résultats : (absorbance des protéines par le dosage de Folin)

témoin	:	148,7	± 2,6
$5 \cdot 10^{-3}\text{M}$:	113,1	± 6,8
10^{-3}M	:	153,3	± 15,8
$5 \cdot 10^{-4}\text{M}$:	188,6	± 8,2
10^{-4}M	:	164,8	± 1,7
$5 \cdot 10^{-5}\text{M}$:	186,0	± 3,7
10^{-5}M	:	175,2	± 6,3
$5 \cdot 10^{-6}\text{M}$:	183,0	± 3,5

II.8. Effet du para-diméthylaminobenzène. (p-DMAB)

Nous avons testé cette molécule sur l'activation des macrophages par le PMA.

La figure 13 nous montre l'influence des diverses concentrations de p-diméthylaminobenzène sur l'activation de la production des radicaux $O_2^{(-)}$.

En fait, nous n'observons aucun effet significatif de la molécule sur la chemoluminescence.

II.9. Effet du Lampit.

Le Lampit ou Nifurtimox est une molécule qui est déjà connue pour produire des radicaux $O_2^{(-)}$ et utilisée dans la maladie de Chagas [17]. Il était donc très intéressant de voir son effet sur l'activation des macrophages in vitro.

La figure 14 nous montre l'activation obtenue avec quelques concentrations relativement proches.

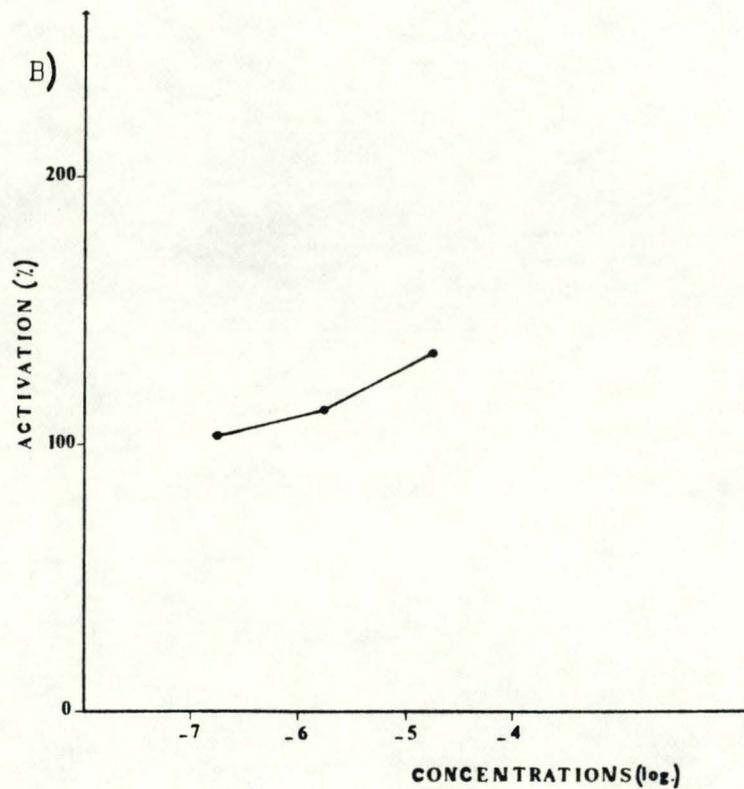
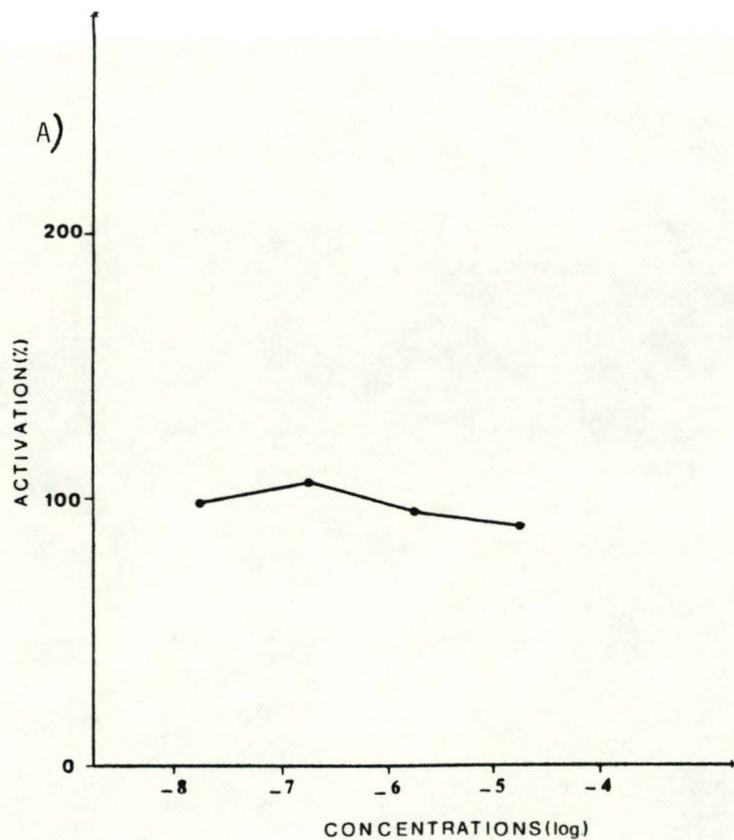


Figure 10: La courbe fléchée représente la molécule réduite, l'autre la molécule oxydée du para-diméthylaminobenzène (A) et du lampit (B).

III. ACTIVATION DE LA PRODUCTION DE RADICAUX SUPEROXYDES
PAR LE SYSTEME XANTHINE - XANTHINE OXYDASE.

Ce système enzymatique nous a paru intéressant afin de mieux comprendre certains effets observés parmi les molécules testées dans le test de la chemoluminescence.

Ici, par exemple, les inhibitions ne peuvent plus être expliquées par une cytotoxicité cellulaire.

Nous avons donc testé ces molécules en fonction de concentrations croissantes pour observer leur effet sur la production d' $O_2^{\cdot(-)}$ par la xanthine oxydase. Les résultats sont repris au tableau 2 dans la discussion. (cfr. p.42)

Certaines molécules n'ayant donné aucun résultat activateur sur les macrophages se sont révélées inefficaces dans ce test aussi. C'est le cas pour OL_1 et AL_3 . De plus, ces molécules montrent un léger effet inhibiteur; c'est aussi le cas pour NaN_3 et l'indigo-carmin oxydé qui ne montrent aucun effet significatif sur la production de radicaux superoxydes.

Par contre, pour le Paraquat et le para-diméthyl-aminobenzène, on observe une activation de la production des radicaux $O_2^{\cdot(-)}$, au contraire du test sur les macrophages.

Le Paraquat active fortement la production de radicaux aux fortes concentrations.

Le p-DMAB, lui, active cette production, mais pour des concentrations décroissantes. Pour $10^{-7}M$, il active de 134 %.

D'autres molécules, qui avaient donné des résultats positifs dans le premier test, se sont révélées sans aucune efficacité sur la production d' $O_2^{\cdot(-)}$. Il s'agit de la molécule R_{61} et de la vitamine C.

La vitamine C, même si elle reproduit son effet inhibiteur aux fortes concentrations, ne provoque plus l'activation des radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ aux très faibles concentrations.

La molécule R_{61} , elle, inhibe alors qu'elle activait de 146 % dans le premier test.

Enfin, l'Indigocarmin réduite et le lampit sont les deux seules molécules qui ont reproduit leurs effets activateurs sur la production d' $O_2^{\cdot(-)}$.

Il faut ajouter que d'autres molécules ont été testées sur ce système xanthine-xanthine oxydase, toutes répondant aux critères de molécules capto-datives. Aucune de ces molécules n'a donné de résultats activateurs. Les résultats sont repris dans le tableau 2.

IV. DISCUSSION DES RESULTATS.

Les résultats du test de chemoluminescence sur les macrophages se trouvent repris dans le tableau 1; ceux du test sur la xanthine-xanthine oxydase dans le tableau 2.

Avant de commencer la discussion proprement dite, il faut attirer l'attention sur la différence de complexité des deux méthodes.

Le premier test utilise des macrophages stimulés par le P.M.A. comme producteur de radicaux libres. Cela implique la mise en oeuvre d'une série de réactions et de facteurs sur lesquels la molécule introduite peut interférer.

Le deuxième test est une simple réaction catalysée par une enzyme, la xanthine oxydase, différente de la NADPH oxydase des macrophages, tant du point de vue de son mode d'action que de sa spécificité.

Ces différences sont importantes pour la discussion des résultats.

Examinons maintenant les effets de ces molécules sur ces deux tests :

Le paraquat est connu comme herbicide puissant; cette action herbicide serait due à sa capacité d'amplifier la production de radicaux libres. L'activation dans le test xanthine-xanthine oxydase en donne une confirmation. Cependant, le fait qu'il n'influence nullement la production de radicaux $O_2^{(-)}$ dans le système des macrophages semble contradictoire.

Il en va de même pour le p-DMAB, qui ne donne de résultats positifs que dans le test sur la xanthine oxydase.

TABLEAU 1

	CONCENTRATIONS (molaire)									
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
OL ₁			24	75	81	89	92	94		
AL ₃				40	87	86	93	87		
R ₆₁		146	129	122	118	110	105			
NaN ₃	38	90	93	103	103	97	104			
VIT. C	4	23	80	96	104	107	112	125	144	122
PARAQUAT			94	103	98	100	104			
INDIGO CARMINE				92	96	104	99			
I.C. + NaBH ₄				189	155	122	105			
p.DMAB				88	95	107	98			
LAMPIT				135	112	104				

Pourcentage d'activation des molécules testées sur la production de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ par des macrophages intrapéritonéaux activés par le PMA dans le test de chemoluminescence. Les % représentent le rapport de l'aire d'intégration de la courbe test sur l'aire d'intégration de la courbe témoin.

Tous les résultats sont exprimés en %.

TABLEAU 2

	CONCENTRATIONS (molaire)				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
OL ₁		67	78	83	78
AL ₃		82	76	75	85
R ₆₁	65	72	73	92	88
NaN ₃	99	100	97	107	104
VIT. C	2	55	83	95	104
PARAQUAT	163	147	135	128	115
INDIGO CARMINE			93	96	97
I.C. + NaBH ₄			133	224	137
p.DMAB	5	24	104	123	134
LAMPIT	145	115	103		
AL ₈		72	87	92	95
HC ₄	37	76	97	108	97
HC ₆	95	98	97	102	98
HC ₈	77	86	90	93	87
HC ₁₃	54	76	83	86	93
HC ₁₄	34	65	75	84	94
HC ₁₅		75	82	85	87

Pourcentage d'activation des molécules testées sur la production de radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ par la xanthine oxydase dans le test xanthine-xanthine oxydase.

Les % représentent le rapport de la pente test sur la pente témoin en tenant compte de l'effet de dilution provoquée par l'addition de la molécule.

Tous les résultats sont exprimés en %.

La différence de résultats entre ces deux tests pourrait suggérer que ces deux molécules manquent de spécificité à l'égard de la NADPH oxydase. Par exemple, elles pourraient être incapables de s'approcher du site actif de l'enzyme et donc d'exercer une quelconque action.

La molécule R_{61} et la vitamine C montrent des résultats opposés aux paraquat et p.DMAB, en ce sens qu'elles activent la production de radicaux $O_2^{(-)}$ en présence de macrophages, mais qu'elles ne produisent pas d'effet sur la xanthine oxydase.

On pourrait suggérer ici la même explication, c.a.d. un manque de spécificité à l'égard de la xanthine oxydase.

Pour le cas de NaN_3 , on pensait que le fait d'inhiber la respiration pouvait permettre une augmentation des radicaux $O_2^{(-)}$. Cette molécule n'a donné aucun effet significatif.

L'Indigocarmine oxydée ne produit aucun effet. Cependant, si on la réduit préalablement avec du $NaBH_4$ à des concentrations non toxiques pour les macrophages, on constate une nette activation de la production des radicaux $O_2^{(-)}$ sur les macrophages ainsi que sur la xanthine oxydase. Ce qui correspond parfaitement aux théories énoncées sur la molécule [16].

Cependant, le fait qu'un témoin sans macrophage avec la molécule réduite reproduise les mêmes effets suggère que cette molécule agit directement sur l' O_2 en lui cédant son électron et provoque ainsi la nette stimulation observée dans les deux tests. Elle n'agirait donc pas sur l'enzyme responsable de la production d' $O_2^{(-)}$, mais une forme plus stable de l'Indigocarmine réduite serait peut-être intéressante à tester !

L'expérience à l'indigocarminé donne également une voie d'explication des effets contradictoires que l'on observe sur une même molécule entre les deux tests et entre les molécules pour un même test. En effet, toutes ces molécules (excepté NaN_3) ont été choisies du fait de leur caractère capto-datif. Or, certaines activent la production alors que d'autres l'inhibent ou n'ont pas d'effet.

Lorsque l'on observe la structure du paraquat ou de l'indigocarminé, on s'aperçoit que ces deux molécules se réduisent facilement en une forme radicalaire en captant un électron. Cette forme radicalaire est stabilisée fortement par un ou plusieurs groupements donneurs et capteurs en accord avec la théorie développée par Viehe et ses collaborateurs [8], [9]. Cette forme radicalaire stabilisée peut alors se réoxyder en donnant un électron à l'oxygène, ce qui produit le radical superoxyde.

La formation du radical superoxyde provient donc de molécules ayant un pouvoir réducteur univalent capable de réduire l' O_2 en $\text{O}_2^{\cdot(-)}$. L'effet inhibiteur s'expliquerait plutôt soit par la fixation du radical $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ sur la molécule capto-dative, soit par la réduction ultérieure de $\text{O}_2^{\cdot(-)}$.

On voit donc que l'action du capto-datif sur l'oxygène peut soit se situer sur O_2 et dans ce cas c'est le radical $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ qui est produit, soit se situer sur $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ et dans ce cas le radical est stabilisé ou est réduit.

L'action diffère probablement suivant le pouvoir réducteur et la capacité de stabilisation du radical capto-datif par rapport au radical superoxyde.

Une mesure des potentiels redox de ces molécules serait très intéressante.

CONCLUSIONS ET APPLICATIONS

Bien que nous n'ayons dépisté aucune molécule "miracle", nous avons pu mettre en évidence des effets intéressants de certaines molécules sur l'activation des radicaux et nous avons pu mettre au point une technique qui est promise à un avenir certain.

Malgré sa découverte, il y a une dizaine d'années, elle n'est encore que peu utilisée à l'heure actuelle; mais déjà elle ouvre de nouvelles perspectives tant dans le domaine biochimique que médical.

Outre sa sensibilité extrêmement grande pour les dosages de radicaux libres dans le cas d'études anti-parasitaires [12] et [18], ainsi que dans l'étude du vieillissement [19] et [20] ou pour le dosage de molécules telles que la NADPH ou l'ATP [21], elle s'est révélée intéressante dans l'estimation de la fonction phagocytaire des polymorphonucléaires du sang humain au cours d'une maladie [22]. Il serait possible, en effet, par dosage de la fonction phagocytaire des polymorphonucléaires de suivre l'évolution d'une maladie et de connaître la phase dans laquelle elle se trouve.

Cette méthode simple et rapide n'implique plus, comme auparavant, la séparation des polymorphonucléaires du sang et de plus elle permet d'utiliser une fraction minime du sang (0,1 ml), ce qui n'était pas le cas dans les autres méthodes.

Pour mieux évaluer l'intérêt de cette technique, nous avons réalisé une expérience préliminaire en comparant le sang d'un patient et le sang d'un individu normal.

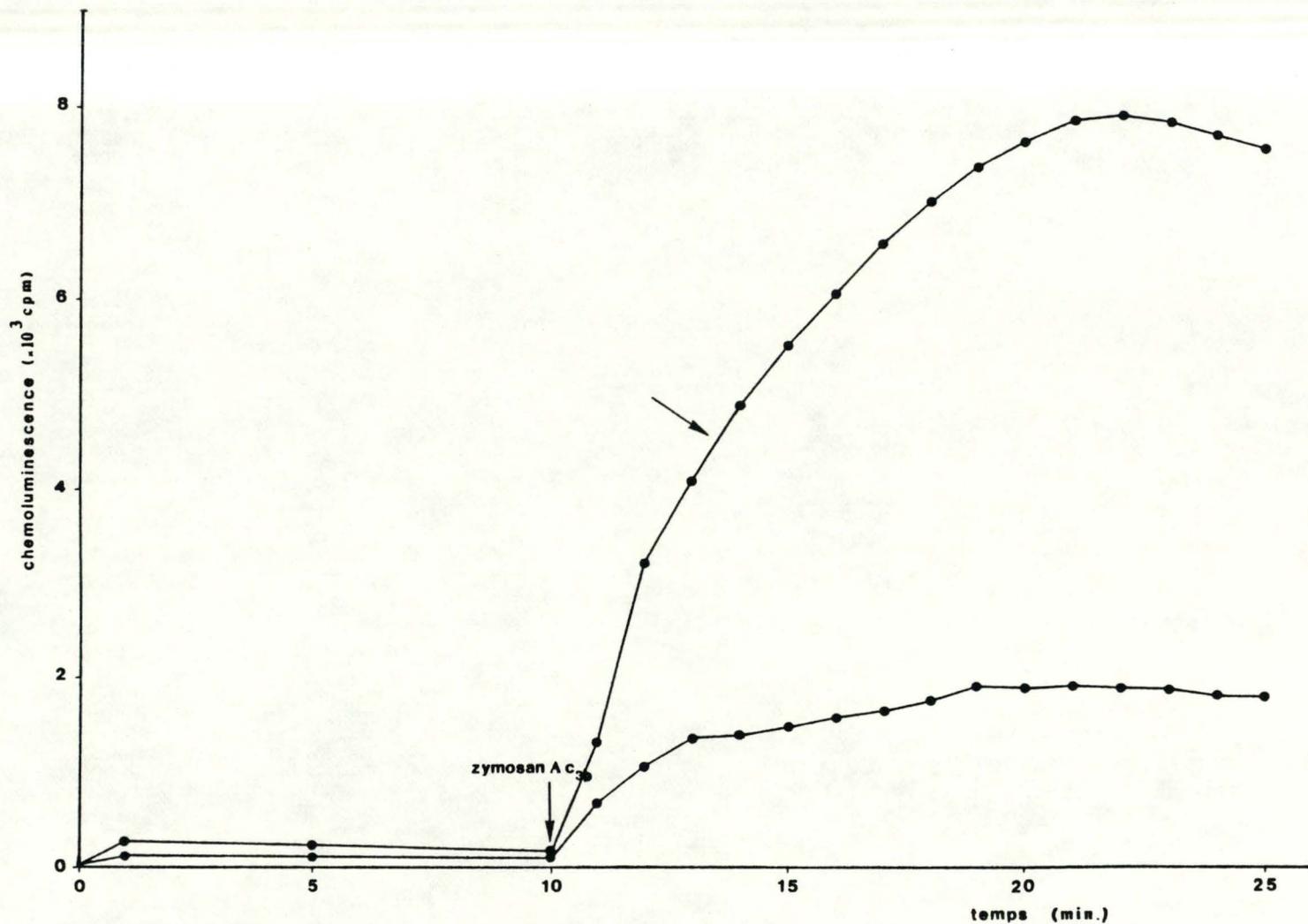


Figure 11: Evolution de la courbe d'activation des polymorphonucléaires du sang au cours du temps. La courbe fléchée représente l'activité phagocytaire de polymorphonucléaires du patient stimulés par le Zymosan Ac_3b , l'autre courbe représente l'activité phagocytaire de polymorphonucléaires de l'individu normal stimulés par le Zymosan Ac_3b .

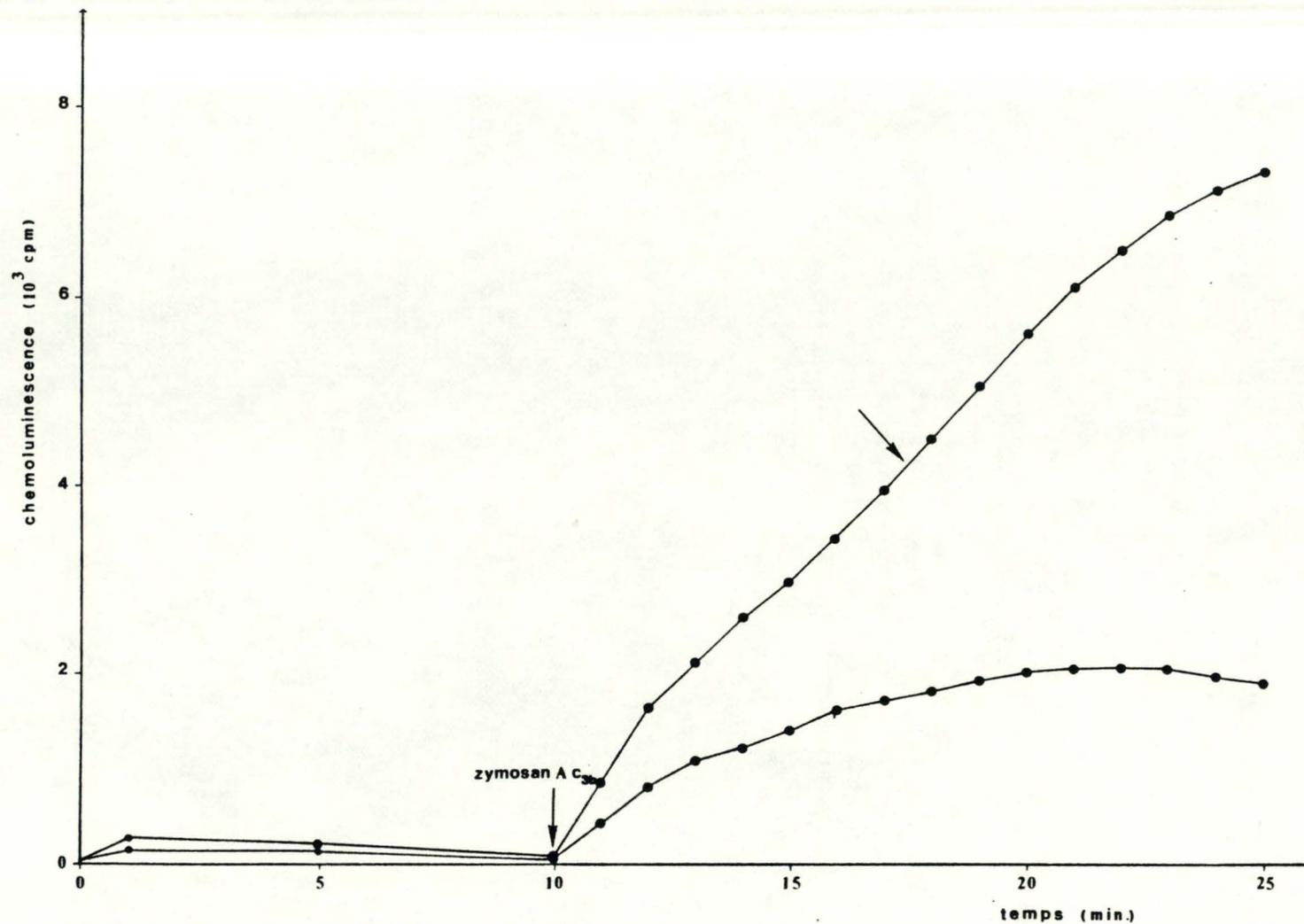


Figure 12: Evolution de la courbe d'activation des polymorphonucléaires du sang au cours du temps, trois jours après l'expérience de la figure 11.

La courbe fléchée représente l'activité phagocytaire de polymorphonucléaires du patient stimulés par le Zymosan Ac₃b, l'autre courbe représente l'activité phagocytaire de polymorphonucléaires de l'individu normal stimulés par le Zymosan Ac₃b.

Le patient montrait un traumatisme crânien compliqué d'une infection pulmonaire. Il recevait une dose élevée de corticoïdes. Ce patient présentait également un nombre légèrement plus élevé de globules blancs que la normale.

L'expérience s'est pratiquée en deux étapes :

Dans la première, nous avons prélevé le sang du patient et le sang d'un individu normal. Nous avons étudié la fonction phagocytaire des polymorphonucléaires des deux sangs.

Dans la deuxième étape, nous avons recommencé la même expérience, trois jours plus tard.

Il faut préciser que le patient, lors du dernier examen médical, ne présentait plus de fièvre et donnait une radio pulmonaire améliorée.

Pour ce qui relève de l'expérience en elle-même, la méthode en est très simple [22].

On incube 0,1 ml de sang dans 0,4 ml de milieu d'Eagle contenant de l'héparine (10 U/ml) pendant vingt minutes à 37°C. Ce spécimen est alors placé dans l'appareil de mesure, maintenu à 37°C, et constamment agité. On y ajoute alors 10 μ l de luminol (Sigma) ($2,4 \cdot 10^{-4}$ M). On attend vingt minutes pour que la chemoluminescence se stabilise et on prend la valeur inscrite sur l'appareil avant d'ajouter 10 μ l de Zymosan Ac₃b (Sigma) (50 mg/ml) pour permettre l'activation de la fonction phagocytaire des polymorphonucléaires et de cette manière activer la production de dérivés oxygénés. On lit pendant quinze minutes le pic de chemoluminescence.

Les figures 15 et 16 reprennent les deux expériences pratiquées sur le sang du patient à trois jours d'intervalle.

D'abord, nous pouvons remarquer une sensibilité exacerbée des polymorphonucléaires chez le patient par rapport aux polymorphonucléaires de l'individu normal. L'activation est supérieure à 300 %.

Nous constatons, d'autre part, une diminution de l'activation de cette fonction phagocytaire des polymorphonucléaires chez le patient entre les deux expériences.

Par contre, les deux courbes témoins sont restées relativement identiques.

Même si cette expérience n'était que préliminaire, elle est très encourageante: en effet, elle indique qu'il serait possible de suivre l'évolution d'une maladie en mesurant régulièrement la capacité d'activation de la fonction phagocytaire des polymorphonucléaires du sang.

Il serait donc intéressant de confirmer cette idée en engageant une étude approfondie dans cette voie et de pouvoir mettre ainsi au point un test très utile dans le suivi de divers traumatismes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 BABIOR B.M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes.
Medical Progress Vol.298, n°12, p.659 à 668 - (1978) Part I.
- 2 BRAQUET P. et BRAQUET M.: Phagocytose et stimulation des processus d'oxydation cellulaire des macrophages. Dans biochimie de l'inflammation par Blotman F., Crastes de Paulet A. et Simon L. chez Masson - p. 67 à 92 - (1983).
- 3 BABIOR B.M., KIPNESS R.S., CURNUTTE J.F.: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent.
The journal of clinical investigation Vol.52, p.741 à 744 - (1973).
- 4 BARBER A.A. & BERNHEIM F.: Adv. Gerontol. Res. 2 : p. 355 à 403 - (1967).
- 5 SOCKS T., MALDOW C.F., CRADDOCK P.R. & JACOB H.S.:
J. Clin. Invest. 61, p. 1161 à 1167 - (1978).
- 6 ALLEN R.C. et LOOSE L.D.: phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages.
Bioch. and Biophys. research communications, Vol.69, n°1, p. 245 à 252 - (1976).
- 7 ALLEN R.C.: Lucigenin chemiluminescence. In: De Luca M.A. & Mc Elroy W.D. (eds): Bioluminescence and chemiluminescence. Basic chemistry and analytical applications.
Academic press, New-York, p. 63-73 - (1981).

- 8 STELLA L., JANOUSEK Z., MERENYI R. et VIEHE H.G. :
Stabilization of radicals by "captive" substitution C-C addition to radicalophilic olefins
Angewandte chemie 17, 9, p. 691 - 692 - (1978).
- 9 STELLA L., JANOUSEK Z., MERENYI R. & VIEHE H.G. :
Captive substituent effects in syntheses with radicals and radicalophiles.
Angewandte chemie 18, 12, p. 917 à 932 - (1979).
- 10 LOWRY O., ROSEBROUGH H., FAER and RENDALL R. :
Biol. chem., 193, p. 265 à 275 - (1951).
- 11 MULLER-PEDDINGHAUS: In vitro determination of phagocyte activity by luminol - and lucigenin - amplified chemoluminescence. In Press.
- 12 REMACLE P.: Trypanosomes et radicaux libres ,
Mémoire de licence, FUN (1983).
- 13 LENOIR G.: Etude comparative de la toxicité et de l'activité de molécules radicalophiles, Mémoire de licence, FUN - (1981).
- 14 DODGE A.D.: The mode of action of the bipyridylum herbicides Paraquat and diquat. Endeavour, 30, p. 130 à 135 - (1971).
- 15 SMITH L.L., ROSE M.S. & WATT I.: The pathology and biochemistry of Paraquat. Dans: Oxygen free radicals and Tissue damage.
Ciba foundation symposium 65 (new series), p. 330 à 334.
- 16 NAARMANN H., BEAUJEAN M., MERENYI R. et VIEHE H.G. :
Dimerisation and oligomerisation by dehydrogenation as a general synthetic principle.
Part. I. Polymer Bulletin 2, p.363 à 372 (1980).

- 17 DOCAMPO R. and STOPPANI A.O.M.: Generation of superoxyde anion and hydrogen peroxide induced by rifurtimox in *Trypanosoma cruzi*.
Archives of Biochemistry and Biophysics 197, 1, p. 317 à 321 - (1979).
- 18 CHAVERIAT A.: Toxicité des radicaux superoxydes sur *T. brucei* et sur *T. Cruzi*, mémoire de licence, FUN - (1982).
- 19 CORBISIER Ph.: Essais de purification de mitochondries de fibroblastes WI- 38 et effet de la micro-injection de mitochondries sur la dégénérescence cellulaire.
- 20 LIPPMAN R.D.: Chemiluminescent measurement of free radicals and antioxydant molecular - protection inside living rat-mitochondria.
Exp. Geront. Vol.15, p. 339 à 351 - Pergamon Press Ltd - (1980).
- 21 REMACLE J., RAES M. & HOUBION A.: Sensitive assay for NADP^+ -NADPH using the bioluminescence method.
- 22 TONO-OKA T., UENO N., MATSUMOTO T., OHKAVA M. and MATSUMOTO S.: Chemiluminescence of whole blood.
Clinical immunology and immunopathology 26, p. 66 à 75 - (1983) Part 1 et 2.