

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Importance des radicaux libres et des hydroperoxydes dans la synthèse des leucotrienes

BERNIER, Anne

Award date:
1984

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.

1984



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

IMPORTANCE DES RADICAUX LIBRES
ET DES HYDROPEROXYDES
DANS LA SYNTHÈSE DES
LEUCOTRIÈNES.

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

BERNIER
Anne

Au terme de ce travail, je voudrais adresser mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. Remacle pour les conseils avisés qu'il m'a fournis et pour sa constante disponibilité.

Mes remerciements vont aussi à Messieurs Gérard Lenoir et Edouard Delaive pour l'aide efficace qu'ils m'ont apportée durant cette année.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux autres membres du département de biochimie cellulaire pour l'ambiance sympathique qu'ils y font régner.

T A B L E D E S M A T I E R E S
=====

	Page
I. Introduction	1
I.1. Historique	1
I.2. Biosynthèse des leucotriènes	2
I.3. Effets biologiques des leucotriènes	3
I.4. La 5-lipoxygénase	5
II. Matériel et méthodes	8
II.1. Purification des leucocytes	8
II.2. Incubation des cellules	9
II.2.1. Mise au point de la technique d'homogénéisation	10
II.2.2. Homogénéisation des leucocytes et incubation de l'homogénat	17
II.3. Extraction et purification des leucotriènes	19
II.4. Détection des leucotriènes : appareillage et principe	20
II.5. Dosage et calculs	22
II.6. Production de radicaux superoxydes dans le système xanthine-xanthine oxydase à pH 7 et 37 ° C	22
III. Résultats et discussions	25
III.1. Effets des radicaux superoxydes sur l'activité de la lipoxygénase	25
III.1.1. Effets des radicaux superoxydes produits par le système xanthine-xanthine oxydase sur l'activité de la lipoxygénase	25
III.1.2. Effets de la superoxyde dismutase sur l'activité de la lipoxygénase	29
A. Durant l'incubation	29
B. Durant l'homogénéisation	29
III.1.3. Discussion	31
III.2. Effets des hydroperoxydes sur l'activité de la lipoxygénase	34
III.2.1. Effets de l'hydroperoxyde de cumène sur l'activité de la lipoxygénase	34
III.2.2. Effets de l'H ₂ O ₂ sur l'activité de la lipoxygénase	35

III.2.3. Effets de la catalase sur l'activité de la lipoxygénase	35
III.2.4. Effets de la glutathion peroxydase sur l'activité de la lipoxygénase	38
III.2.5. Discussion	40
III.3.1. Effet simultané de la catalase et de la SOD sur l'activité de la lipoxygénase	46
III.3.2. Discussion	46
IV. Conclusions	49
V. Bibliographie	52

I. INTRODUCTION

I.1. HISTORIQUE

C'est en 1940 que Kellaway et Trethewie (1) décrivent une substance myotropique libérée par les poumons lors d'une réaction anaphylactique. Elle provoquait une lente contraction du jejunum de cobaye. On appela cette substance SRS-A (de l'anglais : slow reacting substance of anaphylaxis).

Dans les années 50, s'accumulent beaucoup d'informations montrant le rôle important des SRS-A dans les réactions d'hypersensibilité. On démontre que des préparations de SRS-A induisent une profonde et durable constriction des voies respiratoires et que cette substance est produite en quantité importante par les poumons d'animaux mis en présence d'allergènes ou par les poumons d'individus asthmatiques (2).

Au cours des années qui suivirent, on fit beaucoup d'efforts dans le domaine de la pharmacologie et de la chimie de la SRS-A ; la raison principale de ces travaux fut la recherche d'un médicament qui contrôlerait l'asthme, mais les progrès de cette recherche étaient freinés par le peu de renseignements que l'on possédait sur la structure de ces SRS-A, ceci du fait de leur relative instabilité et de leur purification difficile.

Enfin, on a montré il y a 6 ans, que le SRS-A était un mélange de trois substances de formule chimique inhabituelle : il s'agit de trois thioéthers constitués d'un acide gras relié par un atome de soufre à un ou plusieurs acides aminés (3). Samuelsson a étudié la

structure de ces trois substances et il les a appelées " leucotriènes " parce qu'elles sont synthétisées par les leucocytes et qu'elles possèdent trois doubles liaisons conjuguées.

I.2. BIOSYNTHESE DES LEUCOTRIENES

Les leucotriènes et les prostaglandines dérivent de l'acide arachidonique par deux voies enzymatiques différentes. L'acide arachidonique est présent dans les cellules sous forme estérifiée, dans les phospholipides membranaires. Une phospholipase, activée par le calcium, libère l'acide arachidonique et la double voie de réactions qui part de cet acide porte le nom de " cascade de l'acide arachidonique " : d'un côté, il y a synthèse des prostaglandines par la cyclooxygénase et de l'autre, la lipoxygénase donne les leucotriènes.

Trois lipoxygénases différentes sont principalement connues chez les mammifères (4) : les plaquettes possèdent la 12-lipoxygénase qui métabolise l'acide arachidonique pour produire l'acide 12-hydroperoxy-5, 8, 10-14-eicosatétraénoïque (12-HPETE), tandis que les leucocytes polymorphonucléaires contiennent les lipoxygénases 5 et 15 qui synthétisent respectivement les 5-HPETE et 15-HPETE. (Voir figure 1)

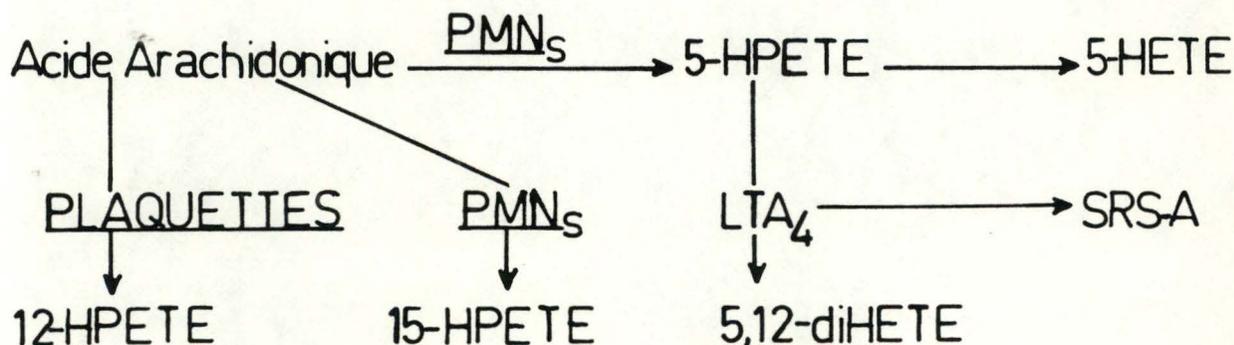


Figure 1 : Réactions et localisations de trois lipoxygénases différentes connues (d'après (4)).

Le leucotriène A4 qui provient de la transformation du 5-HPETE est un intermédiaire instable. Son groupement époxyde va subir une attaque nucléophile de l'eau pour donner des dihydroxyacides gras. Cette réaction est réalisée enzymatiquement par une hydrolase produisant le leucotriène B4, mais elle peut se faire non enzymatiquement et il se forme alors deux groupes de composés, à savoir deux 5,12-dihydroxyacides isomères du leucotriène B4 et deux 5,6-dihydroxyacides (5).

Le groupement époxyde du leucotriène A4 peut aussi être attaqué par le glutathion plutôt que par l'eau, il se formera alors le leucotriène C4. Celui-ci par élimination de l'acide glutamique (un des trois acides aminés composant le glutathion) va donner le leucotriène D4 qui, à son tour, peut perdre la glycine pour former le leucotriène E4 (voir fig 2).

Le mélange LTC4 + LTD4 + LTE4 forme les SRS-A.

I.3. EFFETS BIOLOGIQUES DES LEUCOTRIENES

Au cours des phénomènes allergiques, les leucotriènes interviennent ainsi que les prostaglandines et les médiateurs libérés par les granules des mastocytes pour contracter les muscles lisses des voies respiratoires et de l'intestin. Leur action de contraction des petits troncs bronchiques est 100 à 1000 fois plus forte que celle de l'histamine et des prostaglandines. Les leucotriènes dilatent les petits vaisseaux sanguins, augmentent leur perméabilité à l'eau et aux protéines plasmatiques, provoquent la sécrétion d'un mucus épais et poisseux et enfin, excitent les terminaisons nerveuses de la peau ; tous ces effets entraînent les démangeaisons et les douleurs caractéristiques des réactions allergiques.

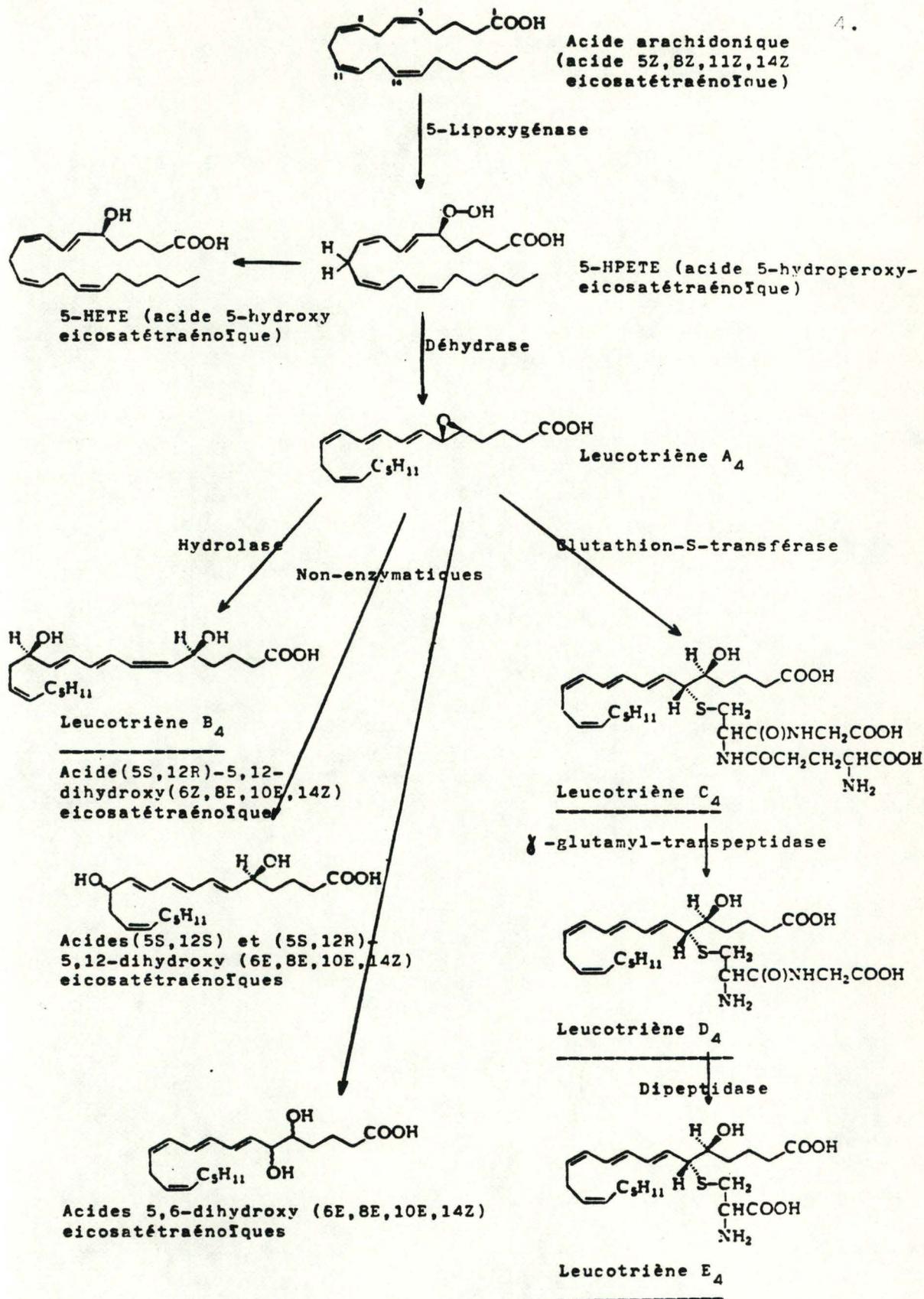


Figure 2 : Métabolisme de l'acide arachidonique dépendant de la 5-lipoxygénase (d'après (6)).

Le leucotriène B₄ en particulier joue un rôle important dans la réaction inflammatoire. On a démontré (7) qu'il :

- stimule l'aggrégation des leucocytes,
- stimule leur adhésion aux endothéliums vasculaires,
- est fortement chimiotactique vis-à-vis des polymorphonucléaires, monocytes et macrophages,
- induit la dégranulation des neutrophiles,
- altère l'homéostasie du Ca⁺⁺ dans les leucocytes polymorphonucléaires,
- libère les enzymes lysosomiaux,
- augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins.

Etant donné tous les effets néfastes liés à une surproduction de leucotriènes dans des phénomènes comme l'asthme et l'allergie, on comprend pourquoi les firmes pharmaceutiques sont intéressées par la mise au point des inhibiteurs de la lipoxigénase de manière à pouvoir les utiliser éventuellement comme médicaments.

I.4. LA 5-LIPOXYGENASE

Les inhibiteurs spécifiques de la 5-lipoxigénase sont aussi utiles comme outils dans la recherche des mécanismes de régulation de cette enzyme. En effet, bien qu'il y ait beaucoup d'articles décrivant les produits du métabolisme de la lipoxigénase, on sait très peu de choses sur les mécanismes de régulation de l'enzyme.

La localisation de cette enzyme n'est pas claire non plus. On la retrouve dans des fractions solubles après homogénéisation mais elle peut tout aussi bien être associée à des structures membranaires plus fines (4). Lorsque l'on centrifuge un homogénat de RBL-1 (rat basophilic leukemia cells) à 100000 g, elle se

trouve entre le culot et le surnageant. Tandis qu'à 10000 g, on la localise seulement dans le surnageant (8). D'autres auteurs comme Narumiya et al. (1981) la retrouvent dans un surnageant obtenu après centrifugation à 100000 g d'un homogénat de leucocytes (9). Nous reviendrons sur ces résultats contradictoires dans la suite de notre travail.

Les lipoxygénases catalysent l'oxygénation d'acides gras polyinsaturés en hydroperoxydes d'acides gras ayant trois doubles liaisons conjuguées (10). En ce qui nous concerne, la 5-lipoxygénase de leucocytes de bovins a l'acide arachidonique comme substrat. Elle a une activité qui dépend directement de la disponibilité de la cellule, en acide arachidonique. Or, la quantité d'acide arachidonique libre est normalement très faible dans la cellule et la lipoxygénase ne peut agir sur les esters de l'acide arachidonique. Son activité est donc initialement contrôlée par l'activité des différentes lipases qui libèrent l'acide arachidonique (7).

Comme les lipoxygénases utilisent de l'oxygène, on peut s'attendre à ce que celui-ci, sous une certaine forme, joue un rôle dans la régulation de ces enzymes. Certains auteurs pensent que ce rôle pourrait être joué par des superoxydes (9-11), ou par un autre oxygène radicalaire (7), ou encore par un oxygène moléculaire (12-10).

Il en est de même pour les hydroperoxydes qui eux semblent jouer un rôle important dans la synthèse des leucotriènes (7).

Enfin, la régulation de la lipoxygénase est à considérer en comparaison avec celle de la cyclooxygénase. On remarque en effet que certains produits, comme

l'indométhacine (9), ont des actions antagonistes sur ces deux enzymes. De plus, leurs produits de réaction, les prostaglandines et les leucotriènes s'activent ou s'inhibent mutuellement (13). Mais la régulation de la cyclooxygénase est mieux connue et dans ce cas, les peroxydes et les superoxydes jouent des rôles importants comme stimulateurs ou inhibiteurs de l'activité enzymatique suivant les concentrations auxquelles ils sont présents (14). C'est pourquoi, étant donné les différences mais aussi les similitudes entre les deux enzymes, nous avons décidé d'étudier l'effet de ces molécules sur l'activité de la lipoxygénase.

II. MATERIEL ET METHODES

Nous avons réalisé l'étude de l'activité de la lipoxygénase par le dosage de la production de leucotriènes. Il fallait trouver des cellules productrices de leucotriènes. Nous avons le choix entre les RBL-1 (basophiles transformés de rat) et les leucocytes.

Les RBL-1 dont nous disposions produisaient peu de leucotriènes et chaque essai nécessitant l'utilisation de grandes quantités de cellules, les contraintes pratiques de cultures continuelles de ces cellules devenaient importantes ; c'est pour ces deux raisons que nous nous sommes tournés vers les leucocytes polymorphonucléaires de bovins.

II.1. PURIFICATION DES LEUCOCYTES

- Solutions : 1) N.P. NaCl 0,7 % tamponnée à pH 7 par 0,0132 M en phosphate.
- 2) N.N.P. NaCl 2,7 % tamponnée à pH 7 par 0,0132 M en phosphate.
- 3) E.N.P. EDTA 1,5 % dans la solution de NaCl 0,7 % et tamponnée à pH 7 par 0,0132 M en phosphate.
- Dans 6 bouteilles de 250 ml, mettre 10 ml de la solution E.N.P. et 100 ml de sang bovin.
- Centrifuger 20 min. à 2000 RPM et 20° C au rotor JA 14 (Beckman J-21 B).
- Décanter le surnageant contenant les plaquettes et la couche blanche de monocytes et lymphocytes.
- Réaliser un choc hypotonique pour lyser les globules rouges : 1°) Ajouter 100 ml d'H₂O distillée par bouteille et mélanger

durant 30 secondes.

2°) Rétablir l'osmoticité en ajoutant 50 ml de solution N.N.P. dans chaque bouteille.

- Centrifuger 20 min. à 1100 RPM et 20° C au rotor JA 14 (Beckman J-21 B).
- Décanner le surnageant.
- Resuspendre le culot et rincer chaque bouteille à l'aide de la solution N.P. Rassembler le tout dans une seule bouteille.
- Centrifuger 20 min. à 1100 RPM et 20° C au rotor JA 14 (Beckman J-21 B).
- Décanner le surnageant.
- Réaliser un second choc osmotique sur le culot en ajoutant 50 ml d'H₂O distillée puis, après 30 s., ajouter 25 ml de la solution N.N.P.
- Centrifuger 20 min. à 1100 RPM et 20° C au rotor JA 14 (Beckman J-21 B).
- Décanner le surnageant.
- Rincer le culot et le resuspendre dans 75 ml de la solution N.P.
- Centrifuger 20 min. à 1100 RPM et 20° C au rotor JA 14 (Beckman J-21 B).
- Décanner le surnageant.
- Resuspendre les leucocytes dans le tampon d'incubation.

II.2. INCUBATION DES CELLULES

Cette étape sert à activer la lipoxygénase afin qu'elle produise les leucotriènes nécessaires à la détection ultérieure de son activité.

La méthode de la lipoxycgénase avait été mise au point au laboratoire par G. Lenoir (15). Dans ce dosage, des cellules entières étaient incubées à 37° C durant 20 minutes en présence de CaCl_2 (2mM), d'acide arachidonique ($3,3 \cdot 10^{-5}$ M) et d'un ionophore du calcium, l'antibiotique A 23187 (8,3 $\mu\text{gr/ml}$) qui favorise l'entrée du Ca^{2+} dans les cellules et la stimulation des phospholipases et de la lipoxycgénase (11).

Le but de notre mémoire étant d'étudier l'effet direct des radicaux libres sur la lipoxycgénase, il nous fallait travailler sur un homogénat et non sur des cellules isolées. Nous avons de ce fait, dû modifier le protocole d'incubation.

II.2.1. Mise au point de la technique d'homogénéisation

Beaucoup de facteurs devaient être considérés dans cette démarche : - La quantité minimale suffisante de cellules par ml et par test.

- Le mode d'homogénéisation: il devait être assez drastique pour rompre la membrane des leucocytes et assez doux pour ne pas dénaturer l'enzyme très fragile.

- L'incubation : celle-ci devait-elle se faire sur tout l'homogénat ou seulement sur le surnageant après centrifugation ?

- Et enfin, la purification des échantillons avant leur passage sur colonne HPLC (Chromatographie sur HPLC, voir II.4).

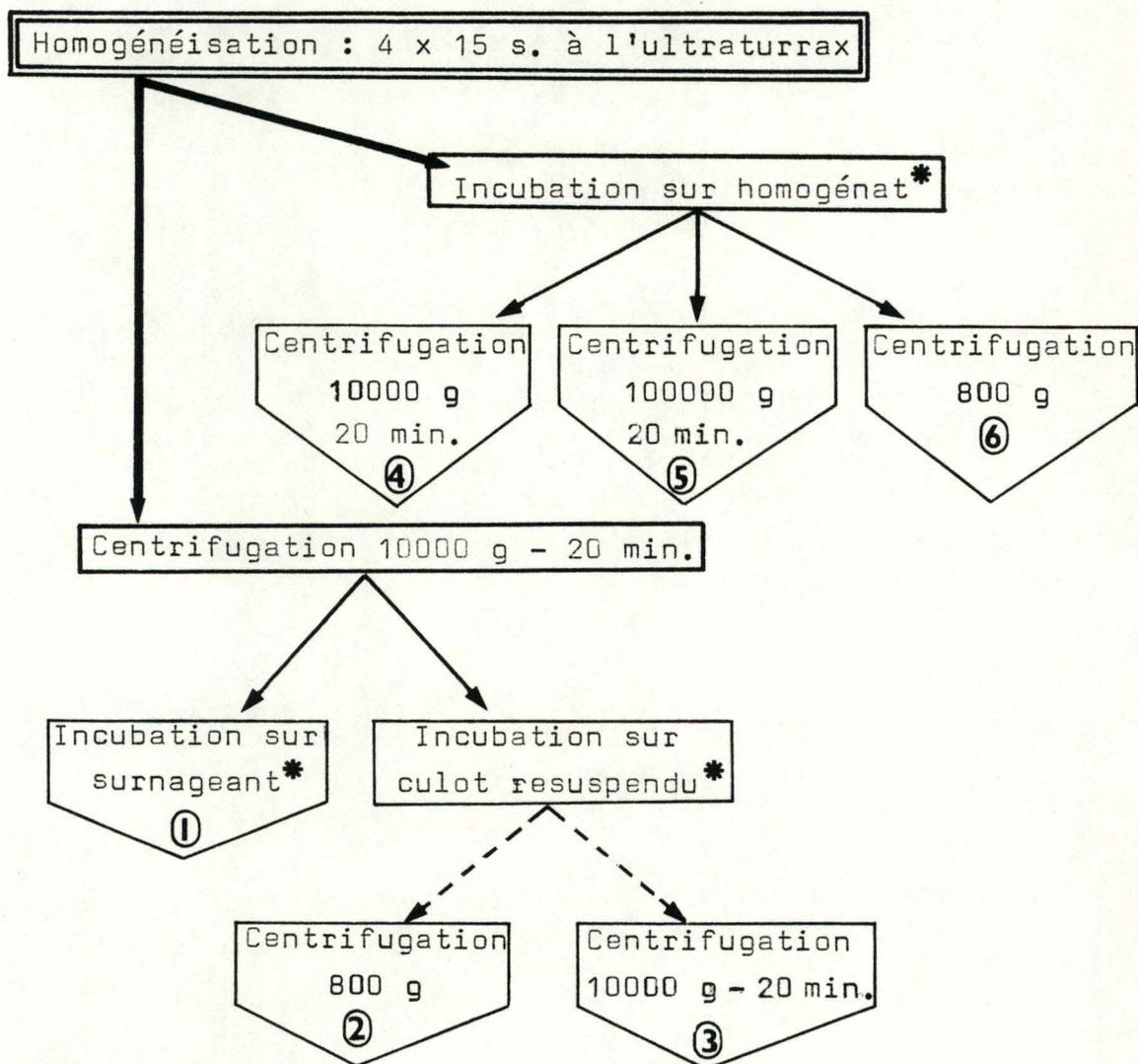
Dans la littérature, on parle très rarement d'homogénats, et ceux-ci sont le plus souvent réalisés à l'aide d'un " Tekmar Tissue Mizer ". Ne disposant pas de cet appareil, nous avons d'abord essayé les

ultra-sons que l'on mentionnait aussi dans certains articles. Mais, tandis que les faibles intensités ne cassaient pas les leucocytes, ou en trop petit nombre, les intensités plus grandes devaient dénaturer l'enzyme. En effet, nous ne détectons aucune activité de la lipoxygénase (méthode de dosage : voir II.4.). Nous avons alors testé l'ultraturax pendant différents temps variant de 15 secondes à 60 secondes, une à quatre fois de suite. C'est le test de 4 x 15 s. qui donna la plus grande production de leucotriènes B₄. Cette production était toutefois assez médiocre par rapport à celle obtenue en travaillant sur cellules entières.

Lors de nos premières expériences, nous avons réalisé une incubation sur l'homogénat complet. Après l'incubation, nous centrifugions à 10000 g pendant 20 minutes au rotor JA 20 (Beckman) (17), et l'extraction se faisait sur le surnageant ainsi obtenu. Dans chaque cas nous observions une perte importante du standard interne qui était ajouté en fin d'incubation (incubation : voir II.2.2.) c'est-à-dire avant la centrifugation dans ces cas-ci. Nous avons alors réalisé l'incubation sur le surnageant seul ; la récupération du standard interne était bonne, mais l'incubation du surnageant seul produisait moins de leucotriènes que l'homogénat complet.

Il fallait donc essayer d'incuber l'homogénat complet et tenter de réduire les pertes en standard interne et en leucotriènes. Nous avons réduit la vitesse et la durée de la centrifugation. La récupération du standard interne s'est en effet avérée meilleure dans ce cas mais les échantillons qui étaient moins purifiés ont fini par encrasser et boucher la colonne HPLC après quelques injections seulement.

Nous avons alors décidé d'étudier systématiquement l'influence des conditions de dosage et notamment les conditions de centrifugation sur l'activité de l'enzyme et la récupération du standard interne. Les diverses possibilités sont indiquées ci-dessous :



L'extraction se réalise sur les surnageants. La suite de l'expérience est la même pour tous les tests (Voir II.3 et II.4)

* : Ce signe représente le moment où l'on ajoute le standard interne.

Résultats observés	Récupération du standard interne	L.T. produits	Propreté de l'échantillon
1	100 %	15,1 %	+
2	49,2 %	1,4 %	-
3	21,3 %	1,3 %	+
4	23,7 %	16,4 %	+
5	20,0 %	0 %	+
6	50,2 %	28,0 %	-

Les pourcentages sont calculés par rapport aux résultats obtenus lors des expériences sur cellules entières.

Les signes + signifient que les échantillons n'obstruent pas la colonne HPLC.

Les signes - signifient que l'injection de ces échantillons a fini par obturer la colonne d'HPLC. Ce qui est évidemment à éviter.

Ce tableau montre clairement que les démarches 2 et 6 devaient être abandonnées pour éviter de nouveaux problèmes avec la colonne HPLC. Nous avons cependant essayé de purifier les échantillons de la démarche 6 en les faisant passer sur une résine amberlite après les avoir extraits à l'éther (voir II.3.), évaporés et repris dans de l'eau. La récupération n'était toujours pas satisfaisante. De plus, cette pratique demandait énormément de temps et consommait beaucoup trop de produits pour la préparation de la résine.

Par ailleurs, les tests 6 et 2, par rapport aux tests 4 et 3, semblent confirmer que les pertes en standard interne et en leucotriènes ont lieu au cours de la centrifugation qui suit l'incubation mais cette

étape est nécessaire pour obtenir un échantillon suffisamment propre. Il fallait donc abandonner les démarches 4 et 3 qui ne donnent pas une grande récupération. Il fallait également éliminer le test 5.

Il nous restait donc la technique 1 d'homogénéisation à l'ultraturrax : 4 x 15 s. et d'incubation du surnageant de 10000 g durant 20 minutes. Mais si la récupération était bonne, il fallait absolument améliorer la production des leucotriènes.

Nous avons commencé par déterminer la quantité minimale de cellules pour réaliser un test. Elle est de $250 \cdot 10^6$ de leucocytes par test avec $50 \cdot 10^6$ par ml de tampon d'incubation. Nous obtenons dans ce cas, des pics assez grands pour être enregistrés par le détecteur et dont la surface peut être déterminée par l'intégrateur. Des quantités supérieures de cellules seraient évidemment plus intéressantes mais comme nous obtenons généralement de $1 \cdot 10^9$ à $2 \cdot 10^9$ de leucocytes à partir de 600 ml de sang et que nous voudrions présenter au moins six points pour réaliser une courbe, il fallait se fixer $250 \cdot 10^6$ de cellules par test.

Il fallait aussi trouver une manière d'arrêter la réaction le plus vite possible à la fin de l'incubation. C'est l'acide nordihydroguaiarétique, un inhibiteur puissant de la lipoxigénase à la concentration de $2 \cdot 10^{-5}$ M (16) qui s'est avéré le plus intéressant. Nous avons aussi testé l'abaissement brusque de la température de 37°C à -13°C , mais la réaction n'était pas stoppée instantanément.

Ayant réalisé ces tests préliminaires, nous avons pu déterminer le meilleur temps d'incubation. Jusque là, nous procédions comme pour les cellules entières,

c'est-à-dire pendant 20 minutes à 37° C (15).

Pour l'incubation d'un système enzymatique libre, les conditions de travail diffèrent suivant l'auteur. Certains comme B.A. Jakschik incubent à 37° C durant 15 à 20 minutes (17-18-8). D'autres comme S. Narumiya le font pendant 2 minutes à 30° C (9). Enfin, J. Verhagen, lui, incube à 37° C durant 10 minutes (19).

Nous avons gardé la température de 37° C et nous avons réalisé l'incubation à différents temps. Nous en reproduisons les résultats à la figure 3.

Au temps zéro minute, on détecte un peu de leucotriènes. Il pourrait s'agir de leucotriènes B₄ se trouvant déjà avant l'homogénéisation, dans les leucocytes de l'individu dont provient le sang. Nous n'avons pas retrouvé de leucotriènes B₄ lors de la répétition de cette même expérience.

Les points de 30 secondes et 1 minute indiquent qu'il faut peut-être une période de latence (20) pour que la réaction s'enclenche vers les 2 minutes. La quantité de leucotriènes B₄ augmente alors lentement jusqu'à 20 minutes.

Après 30 minutes, d'autres phénomènes interviennent puisque la quantité de leucotriènes B₄ diminue.

Le dernier paramètre à tester dans cette mise au point était la concentration en acide arachidonique. La concentration employée jusqu'ici était celle utilisée avec les cellules entières c'est-à-dire de $33 \cdot 10^{-6}$ M final.

Nous avons testé des concentrations égales à la

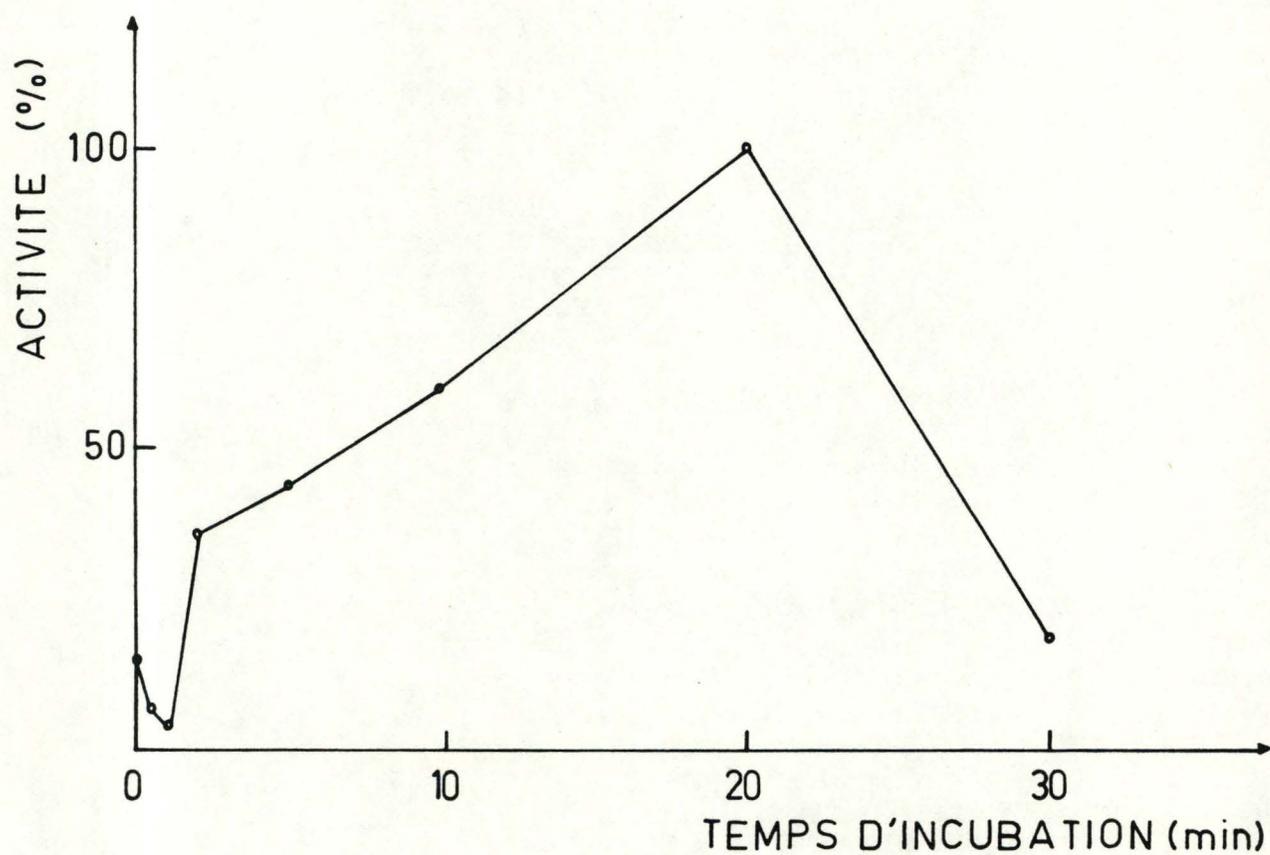


Figure 3 : Variation de l'activité de la lipoxygénase en fonction du temps d'incubation à 37 °C.

Les 100 % d'activité correspondent au contrôle. Celui-ci est incubé pendant 20 minutes (Voir II.5.).

moitié, au double de 33.10^{-6} M et égale à 0.

Les résultats présentés sur la figure 4 montrent que la concentration de $16,5.10^{-6}$ M donne une meilleure activité de la lipoxigénase.

Les modifications que nous avons apportées au dosage nous ont finalement permis d'obtenir des pics de leucotriènes B₄ correspondant à la moitié de ceux obtenus en travaillant sur des cellules entières.

Enfin, pour terminer, comme B.A. Jakschik (8) le propose, nous avons essayé d'améliorer l'extraction à l'éther (voir II.3.) en portant le pH à 3 au lieu de 7 au moment de l'extraction ; ce changement de pH n'a rien amélioré, au contraire.

Il aurait également été intéressant de réaliser une analyse des organites subcellulaires par centrifugation isopycniqne en gradient de saccharose afin de déterminer la localisation exacte de l'enzyme. Cette localisation est encore inconnue à l'heure actuelle.

Voici donc la technique que nous avons finalement utilisée dans la seconde partie de notre travail.

II.2.2. Homoqénéisation des leucocytes et incubation de l'homogénat.

- A. - Après la dernière centrifugation au Rotor JA 14 (Beckman), resuspendre les leucocytes dans le tampon d'incubation contenant 0,1 % de gélatine, 1 mM EDTA, 35 mM de tampon phosphate pH 7. Prendre un volume suffisant pour obtenir 50.10^6 leucocytes par ml.
- Prélever 5 ml pour chaque test et les mettre dans la glace.

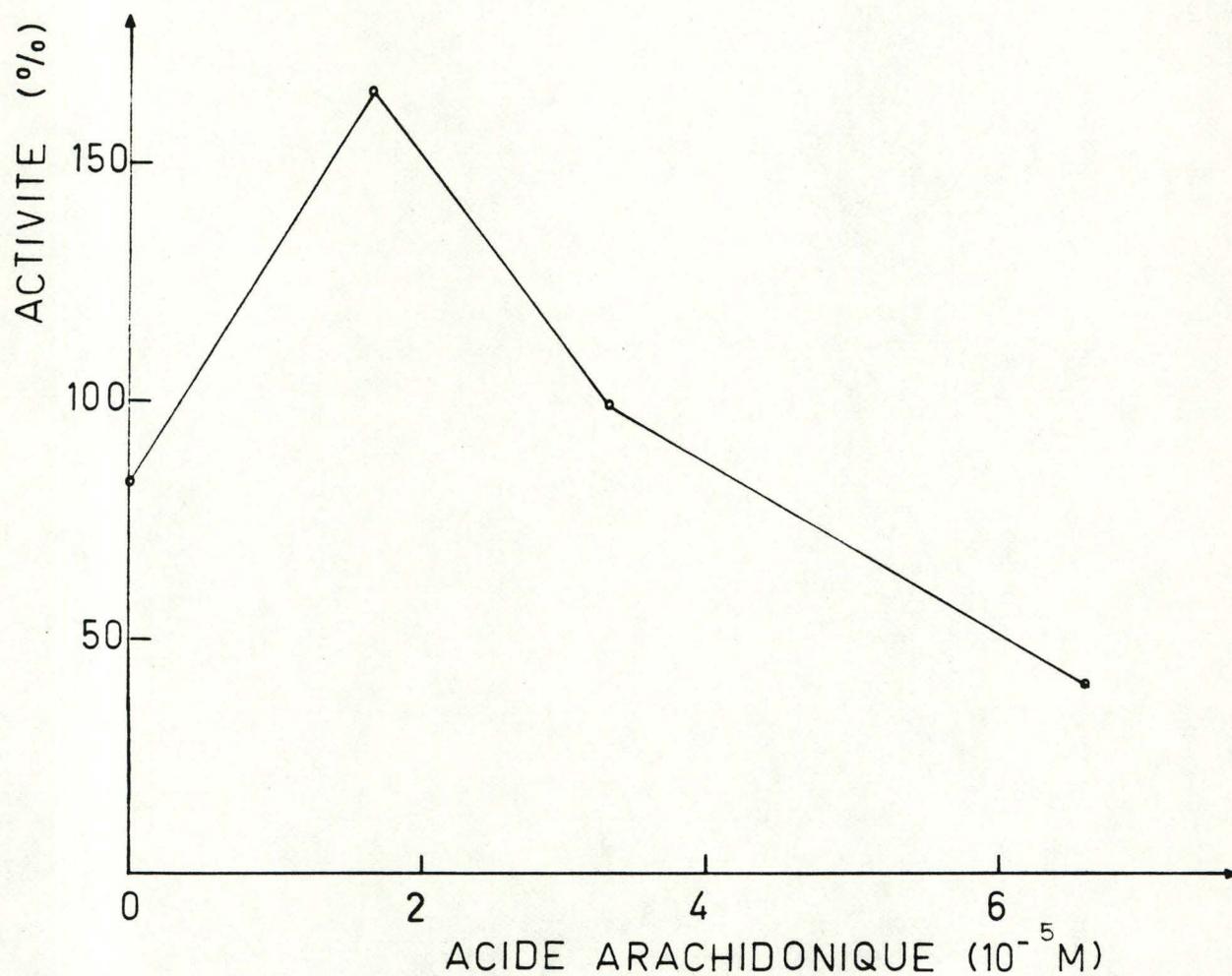


Figure 4 : Variation de l'activité de la lipoxygénase en fonction de la concentration en acide arachidonique exogène ajouté au milieu d'incubation.

Les 100 % d'activité correspondent à une concentration en acide arachidonique de $33 \cdot 10^{-6}$ M utilisée comme référence lors de l'incubation de cellules entières (15).

- Passer chaque test, un à la fois, à l'ultraturrax refroidi préalablement.
Effectuer 4 passages de 15 s.
 - Centrifuger à 0° C et 10000 g durant 20 min.
au rotor JA 20 (Beckman).
 - Reprendre le surnageant de chaque test (= 4,5 ml)
et maintenir à 4° C.
- B.
- Dans chaque test : ajouter du CaCl_2 2 mM final et
de l'acide arachidonique $1,65 \cdot 10^{-5}$ M final.
 - Mélanger et mettre incubé durant 20 min. à 37° C.
 - Après ce délai, ajouter de l'acide nordihydro-
guaiaretique $2 \cdot 10^{-5}$ M final, mélanger et remettre
le test dans la glace.
 - Ajouter alors la même quantité de standard interne
(la prostaglandine B2) dans chaque test ($66 \cdot 10^{-11}$ g).

II.3. EXTRACTION ET PURIFICATION DES LEUCOTRIENES

Les échantillons sont extraits par deux volumes d'éther diéthylique.

- 1°) Ajouter 4,5 ml d'éther dans le surnageant.
- 2°) Mélanger au vortex. Le leucotriène B4 qui est moins polaire que les leucotriènes de la SRS-A va migrer dans la phase-éther où il est soluble. A l'aide d'une pipette Pasteur, récupérer cette phase et la mettre dans un ballon pour évaporer.
- 3°) Répéter le 1° et le 2° points
- 4°) Evaporer le contenu du ballon (\pm 9 ml d'éther avec le leucotriène B4) à température ambiante. Le leucotriène B4 reste adsorbé sur le verre.
- 5°) Mettre 0,5 ml de méthanol 30 % dans le ballon, le LTB4 s'y solubilise.

6°) Centrifuger 5 min. à la Janetzki TH 12. L'échantillon est prêt à être injecté sur la colonne HPLC.

II.4. DETECTION DES LEUCOTRIENES : APPAREILLAGE ET PRINCIPE

La séparation des leucotriènes par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) s'effectue au moyen d'une colonne de type phase inverse, C 18, 5 μ , de 25 cm de longueur et 4,6 mm de diamètre intérieur. Nous utilisons une colonne vendue par Alltech sous la dénomination RSJL C 18 HL. La phase mobile employée est constituée de :

- Méthanol 67 %
- Acide acétique 0,1 %
- pH 6,2 (avec NH₄OH 10 N)

Elle doit également être filtrée avant de passer sur la colonne.

Suivant l'article de F.S Anderson (21), nous réalisons de temps à autre un lavage de la colonne avec une solution aqueuse d'EDTA à 2 %. Ceci permet d'augmenter la hauteur et la résolution des pics de leucotriènes.

Les leucotriènes sont détectés spectrophotométriquement à 278 nm au moyen d'un détecteur à longueur d'onde fixe (LKB 2238 Uvicord S II). Un enregistreur-intégrateur (Varian Y 270) fournit les chromatogrammes avec la surface des pics et leur temps de rétention.

L'appareil HPLC est un appareil Kontron HPLC System 600. Pratiquement, nous injectons 200 μ l par échantillon et l'élution est réalisée à 1 ml/min. Le dernier pic sort après environ 25 min.

On a démontré (15) que les deux 5,12-dihydroxyacides isomères du leucotriène B₄ précèdent celui-ci de quelques minutes. Le leucotriène B₄ quant à lui, sort

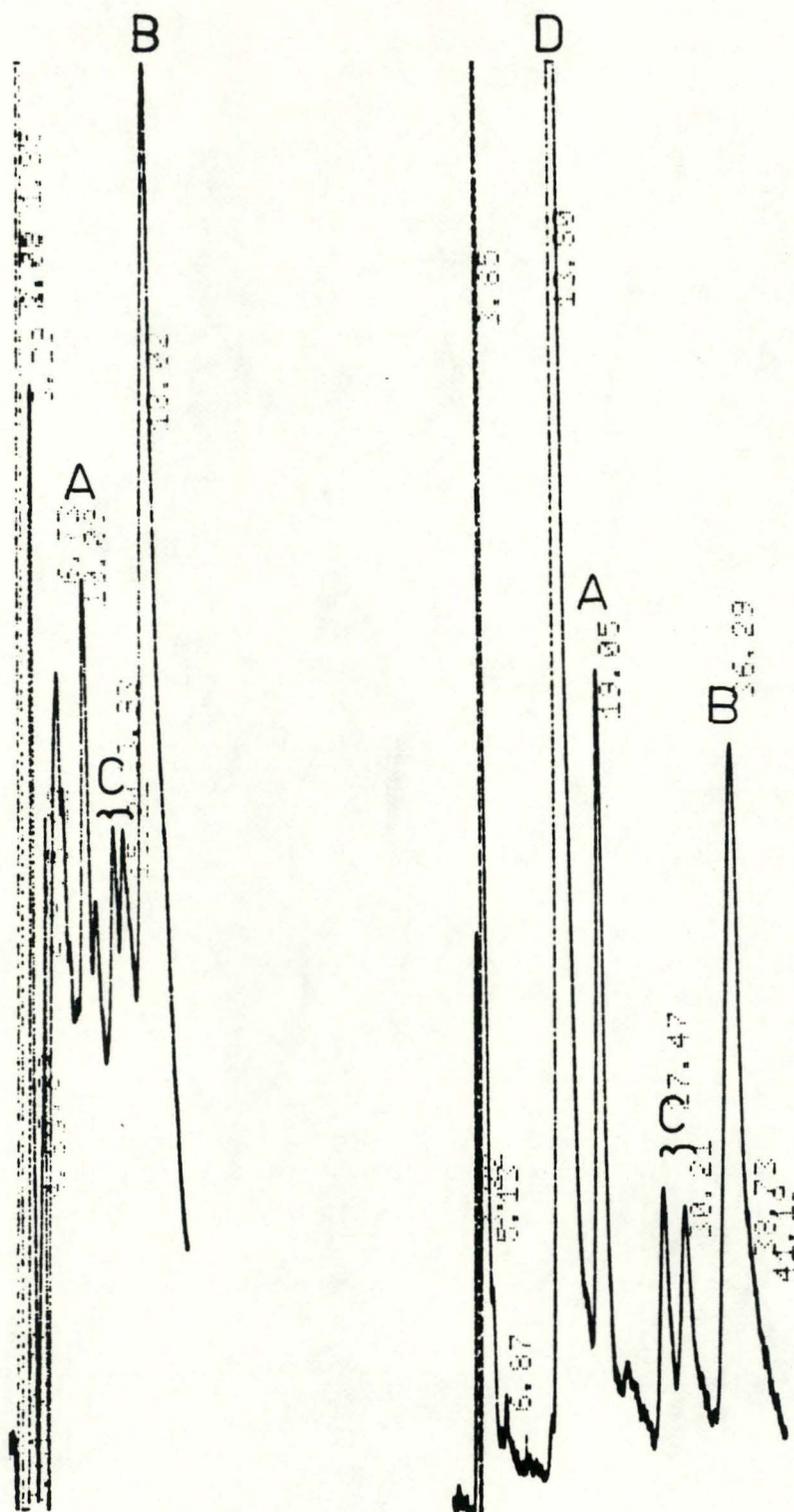


Figure 5 : Exemples de chromatogrammes obtenus après synthèse de leucotriènes.

Celui de gauche correspond à un test fait sur cellules entières, celui de droite à un test sur homogénat.

Nous avons en A : le pic du standard interne (la PGB_2); en B : le pic du leucotriène B_4 ; en C : les pics des deux isomères du leucotriène B_4 (les 5,12-dihydroxyacides); en D : le pic de l'acide nordihydroguaiaretique que nous utilisons comme inhibiteur pour arrêter la réaction.

Ces deux chromatogrammes ont été faits à des mois d'intervalle. Ceci explique la diffé-

rence que l'on observe entre les deux chromatogrammes pour les temps de rétention qu'ils indiquent. Le chromatogramme de droite a été réalisé sur une colonne déjà très usagée alors qu'elle était neuve pour celui de gauche.

en dernier lieu, précédé des LTC₄, D₄, E₄ plus polaires que nous n'obtenons pas dans les conditions de travail présentées plus haut. La prostaglandine B₂ qui est utilisée comme standard interne sort en premier lieu (15).

II.5. DOSAGE ET CALCULS

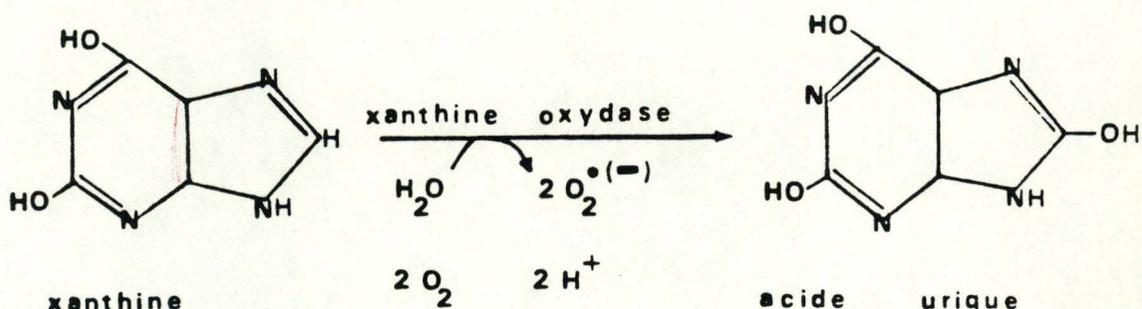
L'activité de la lipoxigénase est obtenue en faisant le rapport de la surface du pic du leucotriène B₄ sur la surface du pic de la prostaglandine B₂ d'un même chromatogramme.

Lors de chaque expérience, nous réalisons un contrôle ; c'est par rapport à celui-ci que nous pouvons connaître l'effet de divers produits testés sur d'autres échantillons réalisés le même jour. Le contrôle représente les 100 % d'activité de l'enzyme.

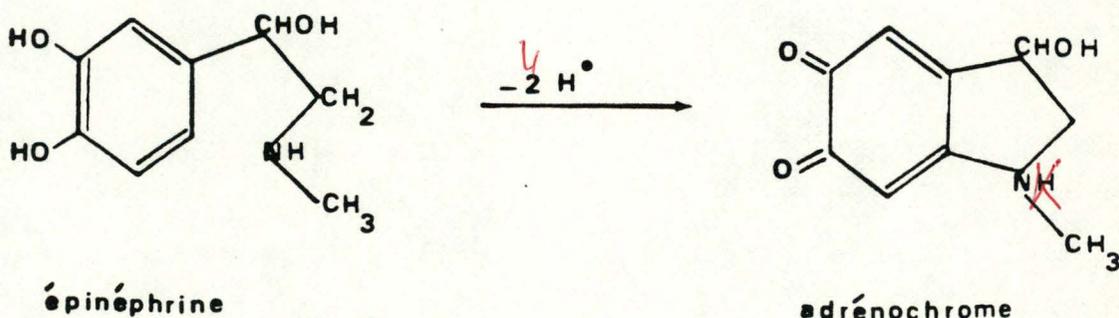
Le fait que les cellules ne proviennent jamais d'un même individu et que l'enzyme très fragile passe par beaucoup d'étapes expérimentales explique que les contrôles varient d'une expérience à une autre.

II.6. PRODUCTION DE RADICAUX SUPEROXYDES DANS LE SYSTEME XANTHINE-XANTHINE OXYDASE A pH 7 ET 37° C

La production des radicaux $O_2 \cdot (-)$ a été réalisée à l'aide du système xanthine-xanthine oxydase. En effet, la xanthine en présence de xanthine oxydase se transforme en acide urique en produisant des radicaux $O_2 \cdot (-)$.



Le dosage des radicaux $\text{O}_2^{\bullet(-)}$ se fait indirectement par la mesure de l'augmentation d'absorbance de l'adrénochrome. Cet adrénochrome provient de l'épinéphrine. Celle-ci ajoutée au système xanthine - xanthine oxydase subit une réaction d'oxydoréduction avec le radical $\text{O}_2^{\bullet(-)}$ pour donner l'adrénochrome qui absorbe à 480 nm.



Nous réalisons le dosage à l'aide d'un spectrophotomètre à deux faisceaux et à deux monochromateurs (Perkin-Elmer 557). La lecture est faite à 480 nm avec une lecture de référence à 575 nm.

Dans la cuvette nous mettons :

- 1 ml de tampon d'incubation (voir II.2.2.)
- 10 μl de xanthine 0,1 M
- 10 μl d'épinéphrine 0,1 M dans HCl 0,2 N
- 2 μl de xanthine-oxydase de concentrations différentes.

Les concentrations variables de xanthine-oxydase

nous permettent d'établir la droite étalon de la production d' $O_2 \cdot (-)$ en fonction de la quantité de xanthine oxydase. (voir fig 6)

Le coefficient d'absorbance de l'adrénochrome étant de $2,96 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, nous pouvons calculer la production d' $O_2 \cdot (-)$ obtenus par ml.

$$\text{nmoles d}'O_2 \cdot (-) / \text{min} / \text{ml} =$$

$$\frac{\text{variation d'absorbance/min} \times 2}{2,96}$$

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. EFFETS DES RADICAUX SUPEROXYDES ($O_2 \cdot (-)$) SUR L'ACTIVITE DE LA LIPOXYGENASE

Certains auteurs (9) pensent que l'oxygène sous sa forme peroxyde ou superoxyde interviendrait dans l'activation de la lipoxgénase (14).

Il pourrait s'agir de radicaux superoxydes car on sait que la phagocytose (22) ou l'ionophore du Ca A23187 (11) qui induisent la production d' $O_2 \cdot (-)$ déclenchent aussi la synthèse des leucotriènes. Ceci pourrait expliquer la faible activité de la lipoxgénase observée dans un système enzymatique libre.

C'est ce que nous allons tenter de mettre en évidence dans les expériences suivantes.

III.1.1. Effets des radicaux superoxydes produits par le système xanthine-xanthine oxydase sur l'activité de la lipoxgénase

Les radicaux superoxydes sont produits par le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase (voir II.6.) que nous mettons en présence de la lipoxgénase afin d'étudier l'effet des radicaux $O_2 \cdot (-)$ sur l'activité de la lipoxgénase.

Pour le test, nous avons dans chaque tube :

- 4,5 ml de surnageant obtenu après centrifugation de l'homogénat à 10000 g pendant 20 min.
- 45 μ l de xanthine 10^{-3} M final.

L'incubation se réalise à 37 ° C durant 20 min.

en présence de CaCl_2 2 mM final, d'acide arachidonique $1,6 \cdot 10^{-5}$ M final et de xanthine oxydase. La concentration en xanthine oxydase varie dans les différents tests. Le contrôle n'en contient pas et nous posons que l'activité de la lipoxigénase y est de 100 %. Les autres tests seront tous calculés par rapport au contrôle.

Sur la figure 6, nous observons une diminution rapide de l'activité de la lipoxigénase pour une production d' $\text{O}_2 \cdot (-)$ allant de 0 à $26 \cdot 10^{-12}$ M/min/ml.

Nous savons que la prostaglandine synthétase dans les mêmes zones de production d' $\text{O}_2 \cdot (-)$ subit une activation (14). Elle utilise de ce fait plus d'acide arachidonique. Celui-ci servant de substrat aux deux enzymes pourrait donc être moins disponible pour la lipoxigénase. L'inhibition que nous observons sur la figure 6 ne serait alors pas due à l'effet direct des $\text{O}_2 \cdot (-)$ sur la lipoxigénase.

Pour nous en assurer, nous avons recommencé l'expérience en présence d'un inhibiteur de la cyclo-oxygénase. Il s'agit de l'indométhacine à 10^{-5} M final (17) que nous ajouterons dorénavant dans le tampon d'incubation pour chaque expérience.

La figure 7 montre cependant encore une inhibition de l'activité de la lipoxigénase par les radicaux $\text{O}_2 \cdot (-)$. Cette inhibition est cependant plus lente et moins forte que celle observée sans indométhacine. Dans ces conditions, il faut une concentration en $\text{O}_2 \cdot (-)$ de plus de $5 \cdot 10^{-12}$ M/min/ml pour que l'inhibition de l'activité de la 5-lipoxigénase de leucocytes de bovins par les radicaux $\text{O}_2 \cdot (-)$ s'observe réellement. Aux plus petites concentrations, nous n'observons aucun effet.

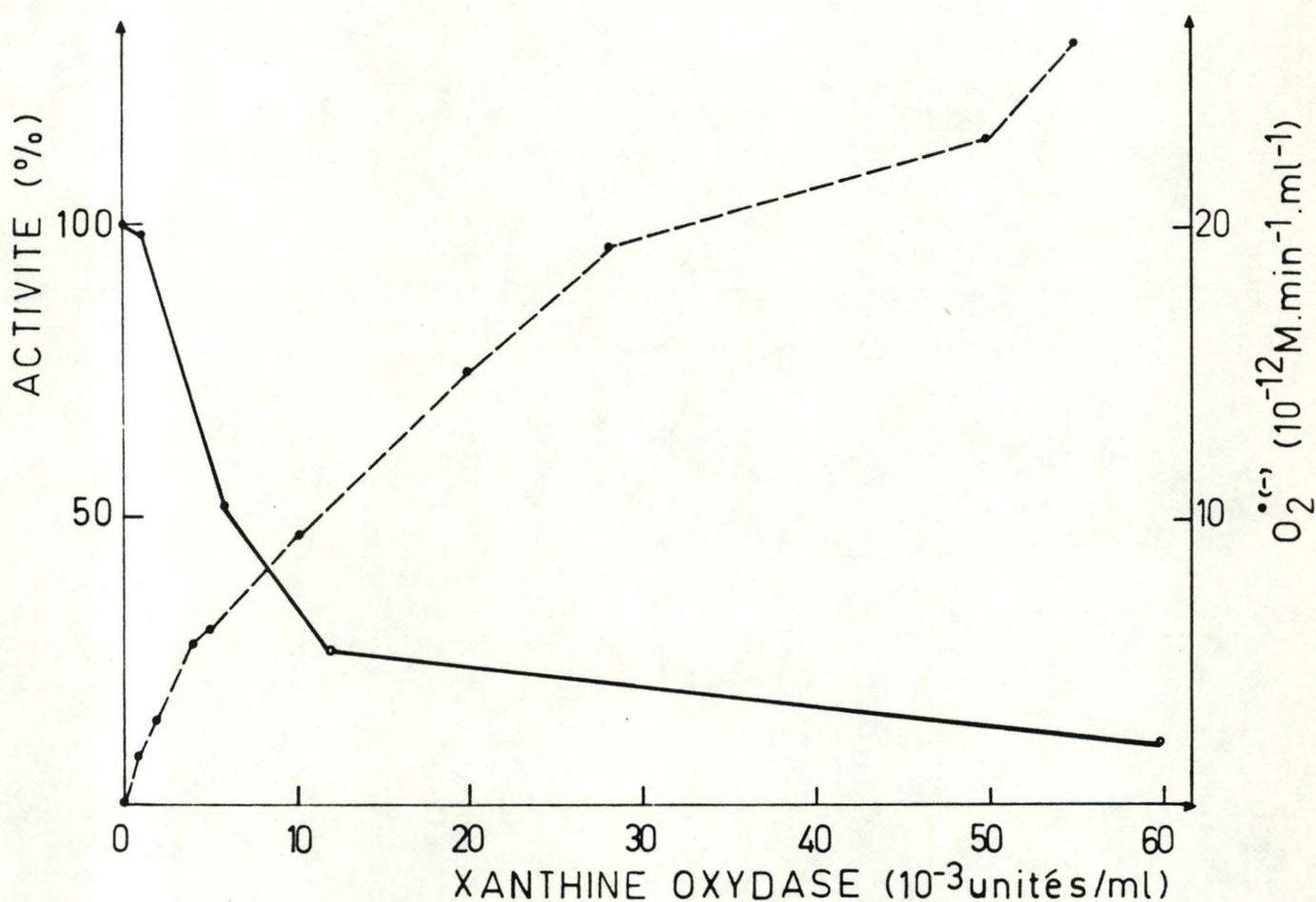


Figure 6 : Effet des radicaux $O_2^{\bullet(-)}$ sur l'activité de la lipoxgénase.
 Les radicaux $O_2^{\bullet(-)}$ sont produits par le système xanthine-xanthine oxydase (.-.-.-).
 L'activité de la lipoxgénase a été testée en présence de xanthine oxydase à des concentrations variables (o.____o).
 Nous n'ajoutons pas de xanthine oxydase au contrôle, son activité est posée égale à 100 % (Voir II.5.).

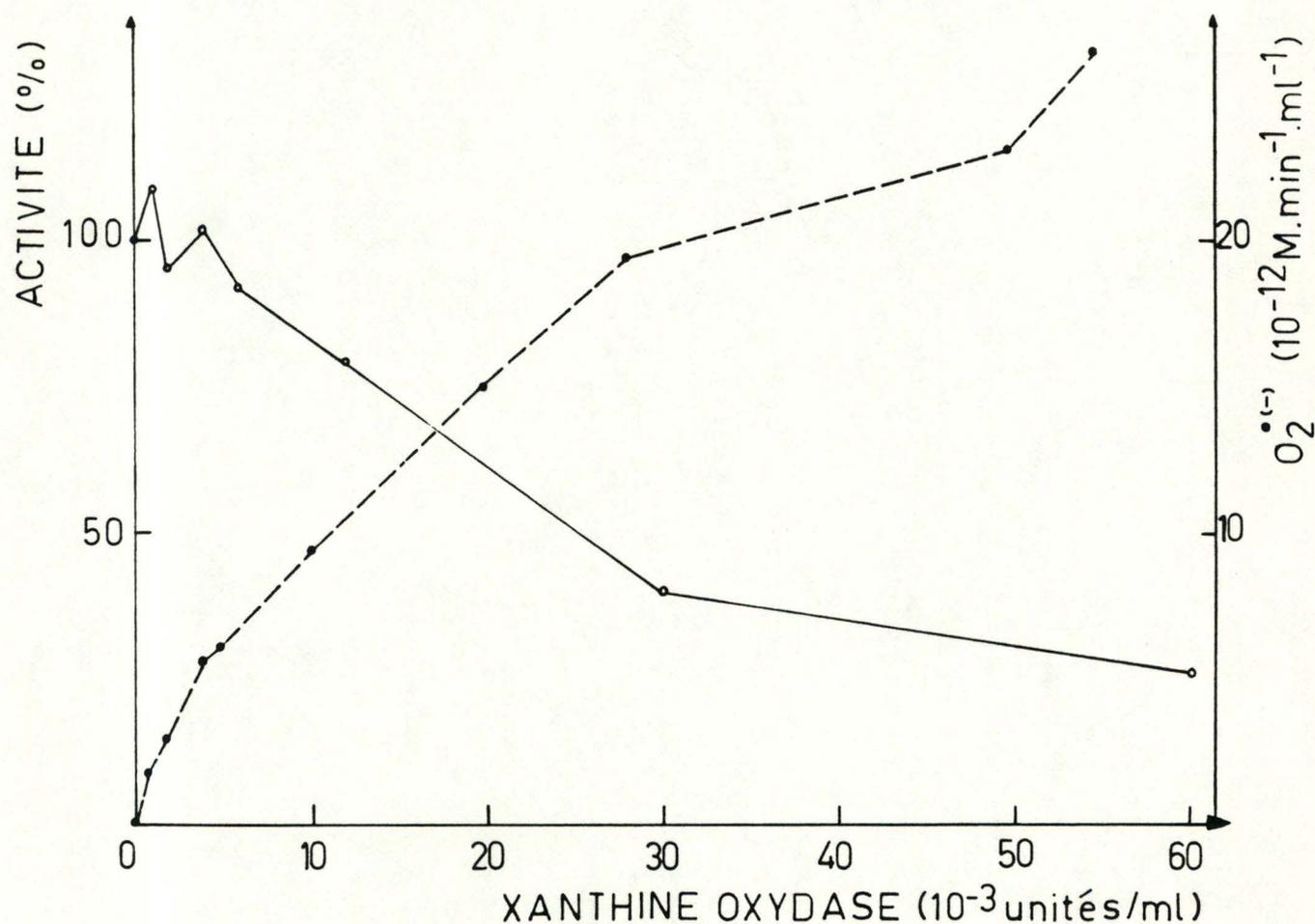
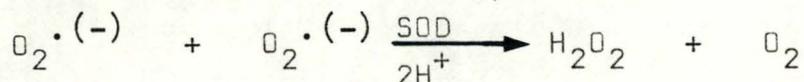


Figure 7 : Effet des radicaux $O_2^{\bullet(-)}$ sur l'activité de la lipoxigénase en présence d'indométhacine 10^{-5} M. Les radicaux $O_2^{\bullet(-)}$ sont produits par le système xanthine-xanthine oxydase (•_ _ _•). L'activité de la lipoxigénase a été testée en présence de xanthine oxydase à des concentrations variables (o_ _ _o). L'activité du contrôle est posée égale à 100 %, il ne contient pas de xanthine oxydase (voir II.5.).

III.1.2. Effets de la superoxyde dismutase (SOD) sur l'activité de la lipoxigénase

La SOD fait partie du système enzymatique de défense de l'organisme contre les radicaux superoxydes. Elle catalyse la réaction suivante :



Il en résulte une diminution de la concentration d' $\text{O}_2 \cdot (-)$ se trouvant dans le milieu cellulaire.

A. Durant l'incubation

Une unité d'activité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme inhibant à 50 % l'oxydation de l'épinéphrine en adrénochrome à 37° C et pH 7 dans les conditions de dosage (voir II.6.).

Pour cette expérience, nous avons dans chaque tube 4,5 ml de surnageant. On y ajoute le CaCl_2 2mM, l'acide arachidonique $1,6 \cdot 10^{-5}$ M et la SOD en concentration variable. On incube 20 min. à 37° C. Le contrôle ne contient pas de SOD et l'activité de la lipoxigénase y est considérée égale à 100 %.

A la figure 8 nous observons, pour des concentrations inférieures à $3 \cdot 10^{-3}$ unités de SOD/ml, une production de leucotriènes B4 assez variable mais située aux environs de 100 %. Ensuite, l'activité reste stationnaire jusqu'à $15 \cdot 10^{-3}$ unités de SOD par ml. Elle s'élève très légèrement aux plus fortes concentrations de SOD.

B. Durant l'homogénéisation

Dans cette expérience, nous avons voulu tester si la SOD ne pouvait pas jouer un rôle protecteur

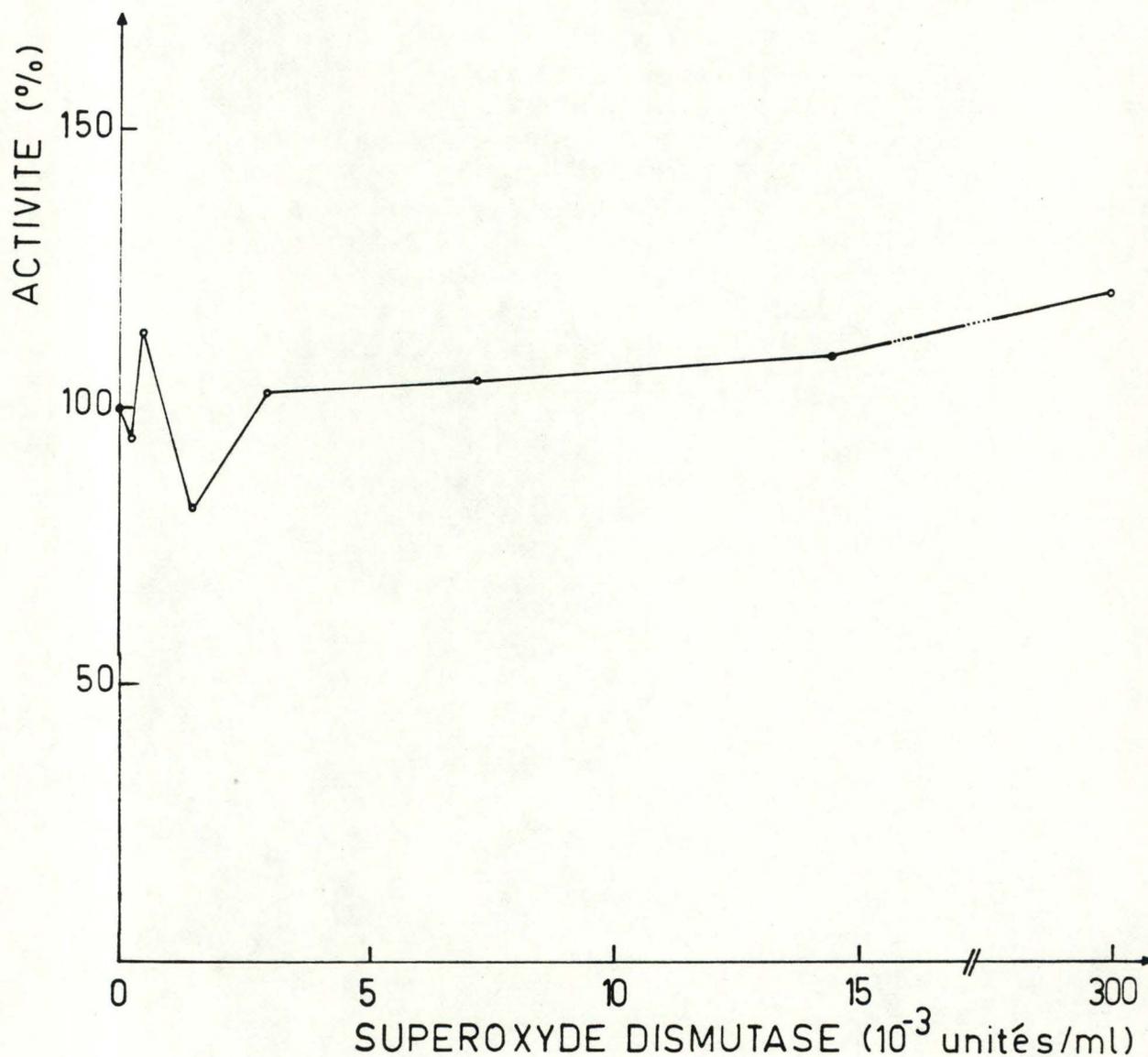


Figure 8 : Effet de la SOD sur l'activité de la lipoxygénase lors de l'incubation à 37 °C. Nous n'ajoutons pas de SOD au contrôle, son activité est posée égale à 100 % (Voir II.5.).

sur la lipoxygénase. En effet, il est possible que des $O_2 \cdot (-)$ soient produits par l'activité cellulaire et puissent alors inhiber l'enzyme bien avant que nous ne l'ayons incubée. Si c'est le cas, la SOD ajoutée au milieu cellulaire avant l'homogénéisation pourrait peut-être stabiliser l'enzyme.

Une unité de SOD dosée à 4° C équivaut à 1,14 unités à 37° C.

Pour le test, nous avons dans chaque tube, 5 ml de tampon d'incubation contenant $250 \cdot 10^6$ de leucocytes. Nous y ajoutons des concentrations variables en SOD avant l'étape d'homogénéisation à l'ultraturrax. Seul le contrôle ne contient pas de SOD. La suite de l'expérience se déroule normalement et l'incubation est la même pour tous les tubes (voir matériel et méthodes).

Sur la figure 9, nous observons d'abord une grande variabilité de la production de leucotriènes B4 pour des concentrations de SOD allant de 0 à $5 \cdot 10^{-3}$ unités/ml. Aux plus fortes concentrations en SOD, on revient à une activité de la lipoxygénase plus stable, aux environs de 100 %.

III.1.3. Discussion

Les lipoxygénases réalisent l'oxygénation d'acides gras polyinsaturés. On peut donc s'attendre à ce que l'oxygène, en plus de son rôle de substrat, joue sous une forme ou sous une autre, un rôle dans la régulation de ces enzymes.

Sur les figures 6 et 7, nous observons que les radicaux superoxydes ont un effet inhibiteur sur la 5-lipoxygénase de leucocytes de bovins.

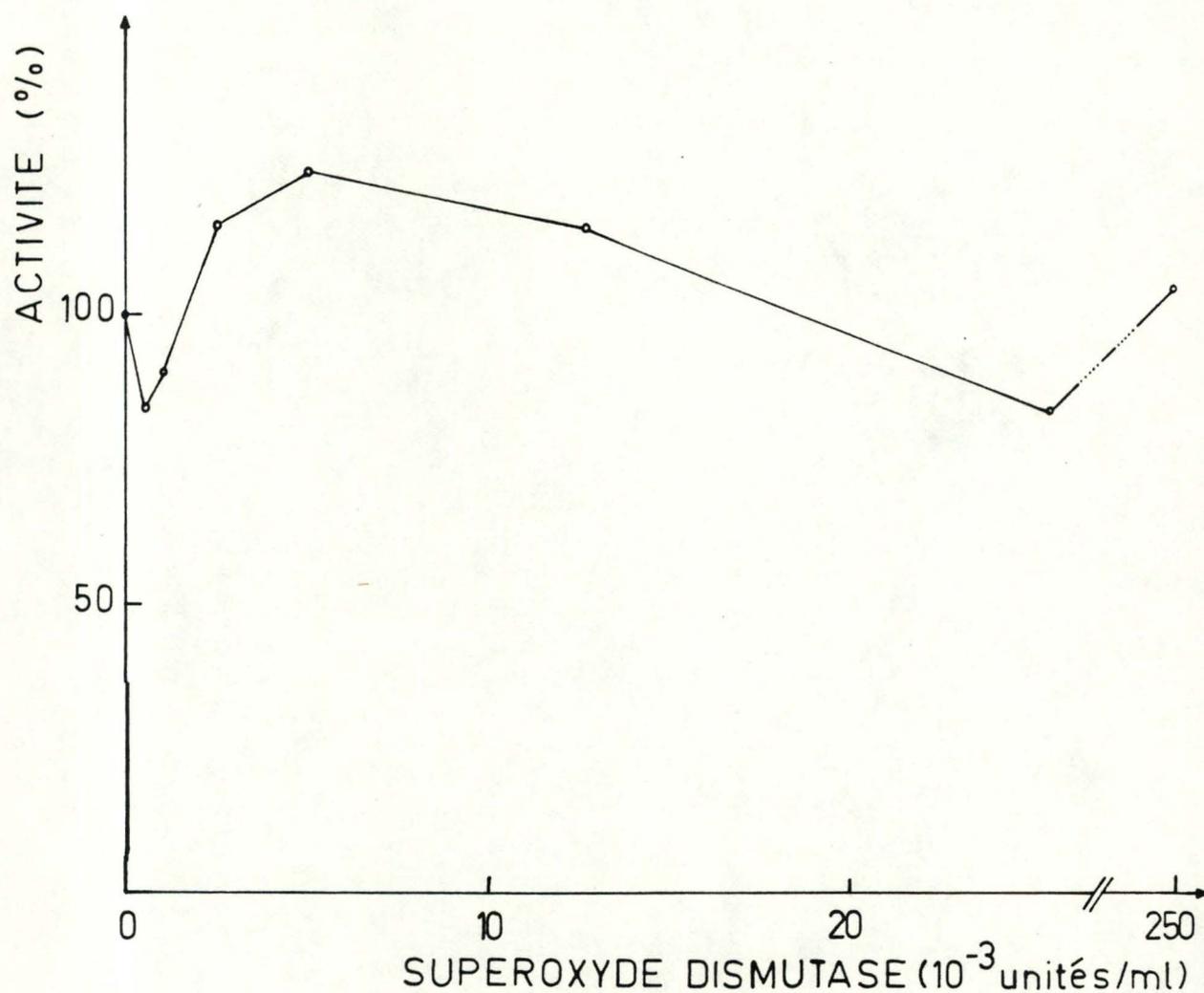


Figure 9 : Effet de la SOD sur l'activité de la lipoxygénase lors de l'homogénéisation dans la glace.

Nous n'ajoutons pas de SOD au contrôle, son activité est égale à 100 % (Voir II.5.).

Nous constatons également, sur les figures 8 et 9, que la SOD, qui diminue la quantité d' $O_2^{(-)}$ dans le milieu, n'a pas d'effet significatif sur l'activité de la lipoxycgénase. En effet, vu les nombreux paramètres entrant en jeu dans l'initiation de la réaction (Ca^{++} , phospholipases, disponibilité en phospholipides et acide arachidonique (23)), les écarts trouvés par rapport au contrôle ne peuvent pas être pris en considération. Les répétitions de l'expérience avec la SOD nous ont chaque fois ramenés à la même conclusion. Ceci est d'autant plus vrai que les fortes concentrations en SOD qui devraient montrer un effet protecteur maximal donnent une activité proche de celle du contrôle.

Il ne semble donc pas, d'après nos résultats, que les ions superoxydes soient nécessaires à l'activité de l'enzyme. Si c'était le cas, nous aurions dû observer un effet activateur des ions $O_2^{(-)}$ sur l'activité de la lipoxycgénase et un effet inhibiteur de la superoxyde dismutase. En fait, les auteurs (7,9) qui ont proposé un effet possible des radicaux superoxydes sur la synthèse des leucotriènes se sont basés sur des effets très indirects (lors de l'emploi de l'ionophore du Ca A 23187, ou lors de la stimulation de la phagocytose) et leurs arguments nous paraissent très faibles.

Il nous semblait aussi intéressant d'opposer à cet effet inhibiteur de la lipoxycgénase par les radicaux superoxydes, l'effet activateur qu'ils ont aux mêmes concentrations sur la cyclooxygénase. Lors de l'expérience en présence d'indométhacine qui inhibe la cyclooxygénase, nous avons observé sur la figure 7, que l'inhibition était moins rapide que sur la figure 6 où nous n'avions pas utilisé d'indométhacine. On peut donc croire qu'une certaine quantité d'acide arachidonique commune aux deux enzymes a été détournée à l'avantage de la cyclooxygénase.

F.A. Kuehl (13), en effet, a étudié le problème de la disponibilité de l'acide arachidonique dans différentes cellules possédant les deux enzymes de la cascade de l'acide arachidonique. Si pour les RBL-1 (rat basophilic leukemia cells), il a trouvé qu'il s'agissait de deux ensembles de substrats différents, dans les polymorphonucléaires de rats par contre, il ne trouve qu'un seul ensemble de substrats, mais une activité assez basse en cyclooxygénase. Etant donné nos observations, il apparaît donc que les polymorphonucléaires de bovins se comportent comme ceux de rats en ce qui concerne la disponibilité de l'acide arachidonique.

III.2. EFFETS DES HYDROPEROXYDES SUR L'ACTIVITE DE LA LIPOXYGENASE

Les hydroperoxydes de l'acide arachidonique sont les premiers intermédiaires de l'activité des lipoxygénases. En général, les hydroperoxydes sont également des molécules réactionnelles qui ont un rôle inhibiteur sur les enzymes. Par exemple dans le cas de la cyclooxygénase, on avait pu démontrer à la fois un rôle activateur aux faibles concentrations et inhibiteur aux fortes concentrations (14).

Il nous a donc paru intéressant d'étudier directement l'effet de deux peroxydes sur l'activité de l'enzyme et l'action de deux enzymes détruisant les peroxydes : la catalase et la glutathion peroxydase.

III.2.1. Effets de l'hydroperoxyde de cumène sur l'activité de la lipoxygénase

Dans cette expérience, nous avons voulu tester l'effet d'un hydroperoxyde exogène, l'hydroperoxyde de cumène, sur l'activité de la lipoxygénase.

Lors de l'expérience, nous avons incubé dans chaque

tube 4,5 ml de surnageant pendant 20 minutes à 37 ° C en présence de CaCl_2 2 mM final, d'acide arachidonique $1,6 \cdot 10^{-5}$ M final et d'hydroperoxyde de cumène. Le contrôle ne contient pas d'hydroperoxyde de cumène.

La figure 10 montre une baisse progressive de l'activité de la lipoxygénase lorsque l'on augmente la concentration en hydroperoxyde de cumène dans le milieu, ces concentrations variant de 0 à $10 \mu\text{M}$.

III.2.2. Effets de l' H_2O_2 sur l'activité de la lipoxygénase

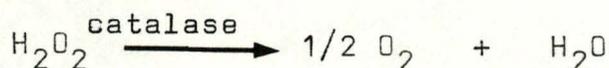
Nous avons cette fois testé l'effet d'un autre peroxyde. Il s'agit du peroxyde d'hydrogène.

Dans chaque test, nous disposons de 4,5 ml de surnageant. L'incubation se passe en présence de CaCl_2 2 mM final, d'acide arachidonique $1,6 \cdot 10^{-5}$ M final et d' H_2O_2 en concentrations variables, à 37 ° C durant 20 minutes. Nous n'ajoutons pas d' H_2O_2 dans le contrôle.

Sur la figure 11, nous observons une inhibition croissante de l'activité de la lipoxygénase en fonction de la concentration croissante en H_2O_2 .

III.2.3. Effets de la catalase sur l'activité de la lipoxygénase

La catalase est une enzyme de défense des organismes contre de trop grandes concentrations en peroxydes d'hydrogène.



Nous définissons une unité d'activité de catalase comme la quantité d'enzyme qui, à 37 ° C et pH 7, détruit, par minute, 90 % des 26,1 nmoles présentes

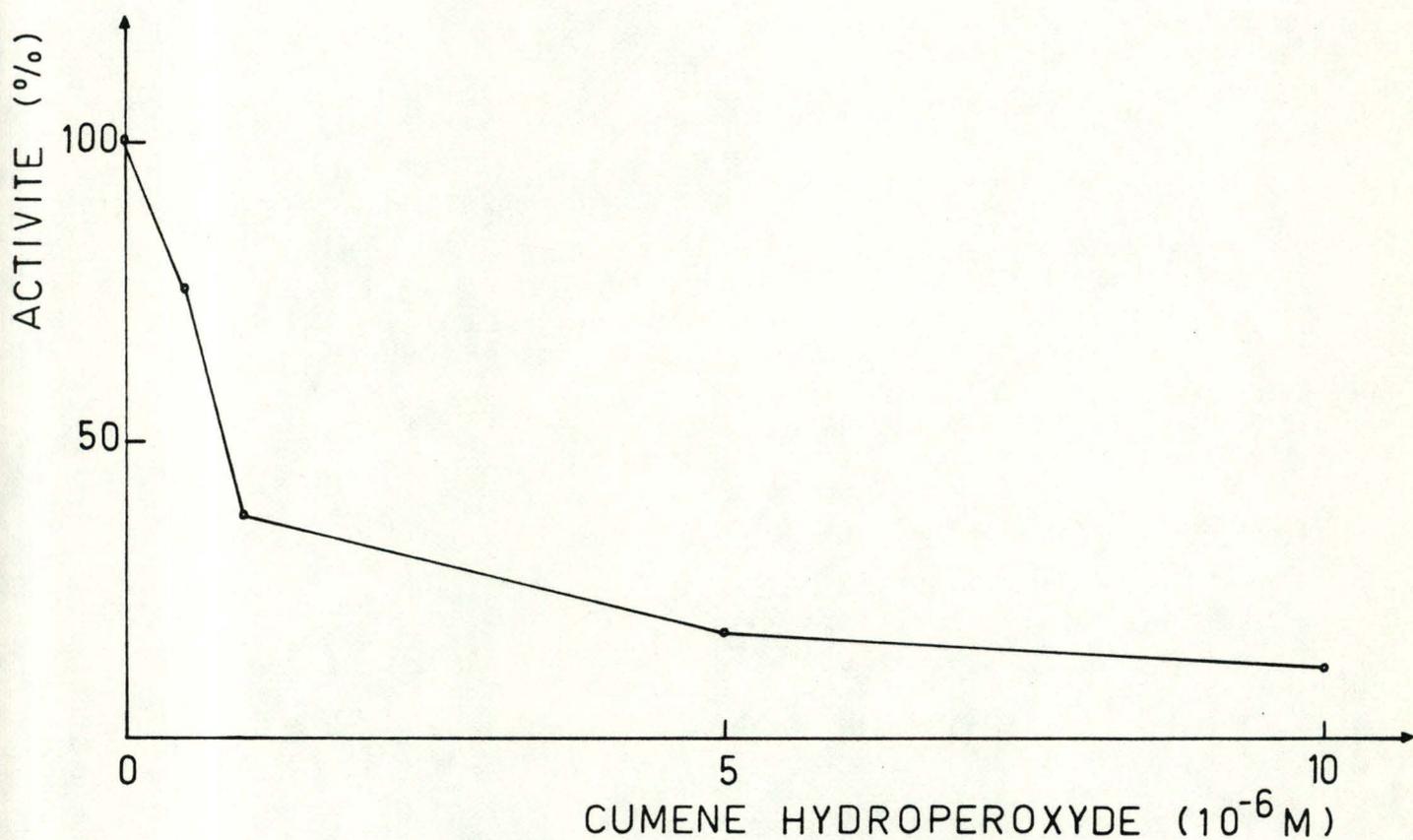


Figure 10 : Effet du cumène hydroperoxyde sur l'activité de la lipoxygénase.

Le contrôle ne contient pas de cumène hydroperoxyde, son activité est posée égale à 100 % (Voir II.5.).

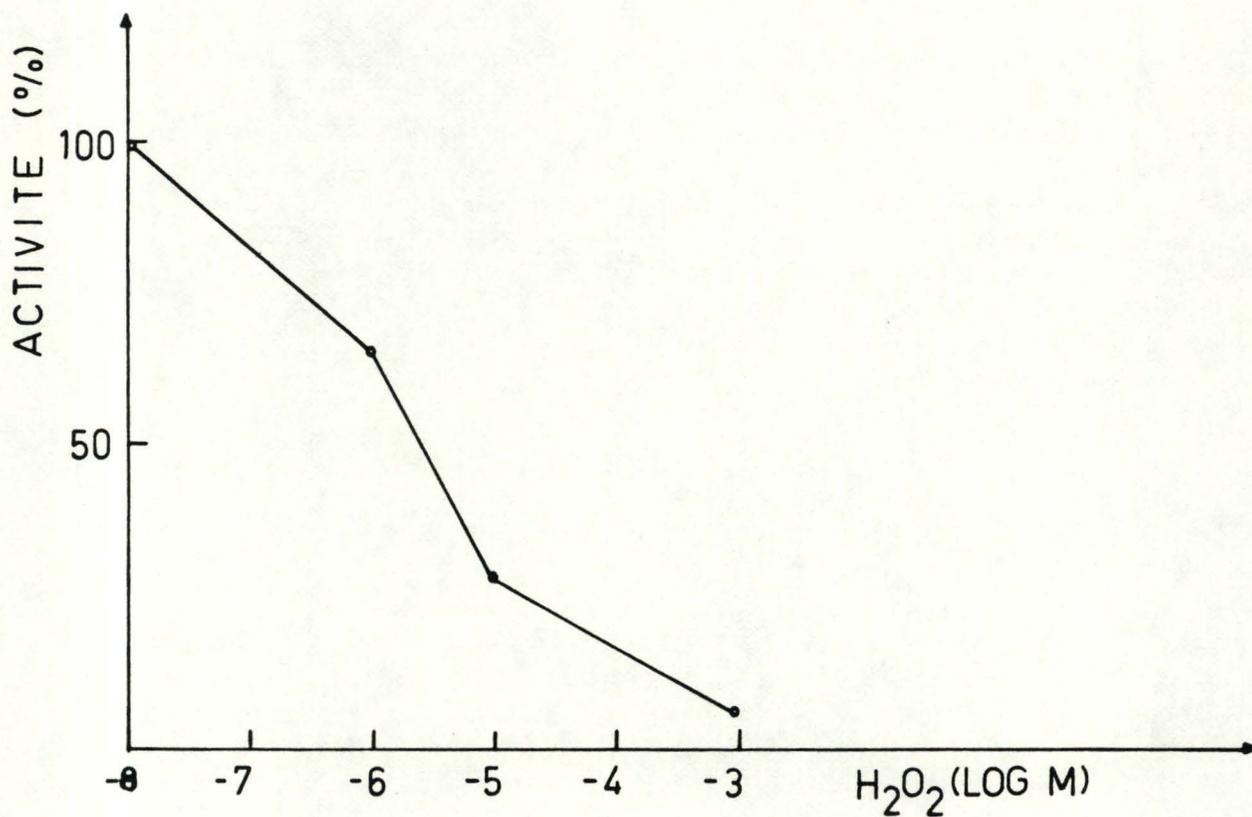


Figure 11 : Effet de H₂O₂ sur l'activité de la lipoxygénase.

Nous n'ajoutons pas d'H₂O₂ au contrôle, son activité est posée égale à 100 % (Voir II.5.).

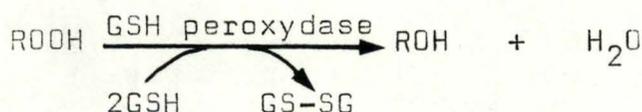
dans 5 ml du test.

Pour l'expérience, nous avons dans chaque tube 4,5 ml de surnageant CaCl_2 2 mM, la catalase de concentration variable et l'acide arachidonique $1,6 \cdot 10^{-5}$ M. L'incubation se fait à 37°C durant 20 minutes. Le contrôle n'est pas incubé en présence de catalase. Son activité est posée égale à 100 %.

Les résultats indiqués à la figure 12 montrent que 10^{-3} à une unité enzymatique de catalase par ml n'influence pas de manière significative l'activité de la lipoxigénase puisque nous observons une activité constante à toutes les concentrations testées.

III.2.4. Effets de la glutathion peroxydase sur l'activité de la lipoxigénase

La glutathion peroxydase est une enzyme qui réduit les hydroperoxydes en hydroxyles et diminue ainsi leur concentration. Elle fait également partie du système enzymatique de défense contre les peroxydations provoquées par les dérivés de l'oxygène.



Comme on le voit, l'enzyme a besoin de glutathion réduit pour être active. Cependant, le glutathion peut également réagir avec le LTA₄ en présence d'une glutathion-S-transférase pour donner le LTC₄ (voir I.2.). Cette réaction pourrait donc induire une diminution de la synthèse du LTB₄ que nous dosons. Aussi, pour mesurer l'effet de la glutathion peroxydase seulement sur la lipoxigénase, nous avons également ajouté du GSH au contrôle.

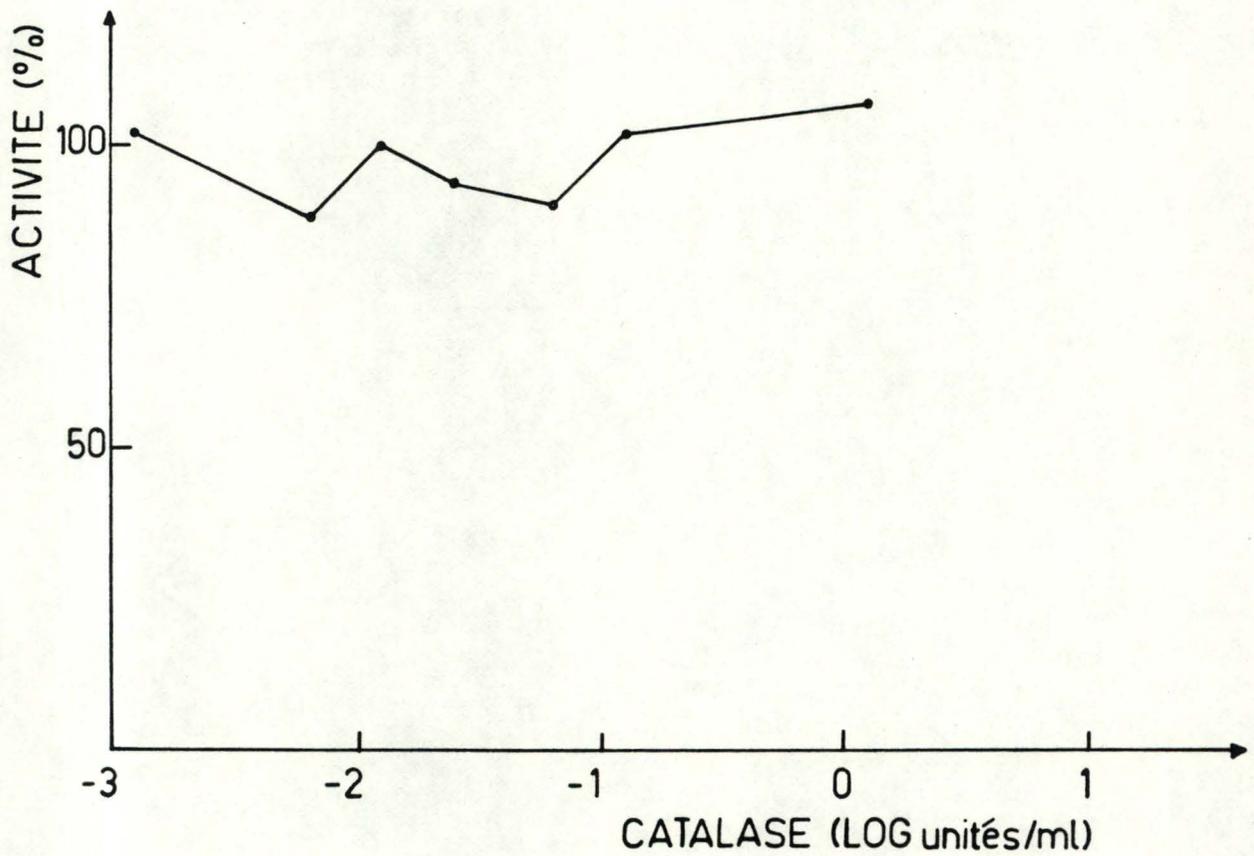


Figure 12 : Effet de la catalase sur l'activité de la lipoxygénase.

L'activité du contrôle auquel nous n'ajoutons pas de catalase est posée égale à 100 % (Voir II.5.).

Une unité d'activité de glutathion peroxydase est définie, à 37° C et pH 7, comme la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser l'oxydation par H_2O_2 d'une micromole de glutathion réduit en glutathion oxydé par minute.

Son optimum d'activité étant observé à pH 8,8, nous l'avons préparée dans un tampon KH_2PO_4 60 mM à pH 8,5, contenant du dithiothreitol 1 mM.

Pour le test, nous avons dans chaque tube : 4,5 ml de surnageant. Nous les incubons 20 min. à 37° C en présence de $CaCl_2$ 2mM, d'acide arachidonique $1,6 \cdot 10^{-5}$ M, de glutathion réduit $4 \cdot 10^{-4}$ M et de glutathion peroxydase en concentrations variables. Seul le contrôle ne contient pas de glutathion peroxydase.

La figure 13 nous montre une inhibition progressive de la lipoxigénase en présence de glutathion peroxydase pour des concentrations allant de 10^{-4} à 1 unité par ml.

III.2.5. Discussion

Plusieurs travaux dans la littérature montrent par des approches différentes que les hydroperoxydes sont nécessaires à la synthèse des leucotriènes ou sont des activateurs des lipoxigénases.

W.E.M. Lands (20) et W.L. Smith (24,25) constatent que la lipoxigénase de soja en présence d'hydroperoxydes est capable de s'auto-inactiver par une réaction qui fait intervenir le substrat, l'enzyme et les hydroperoxydes. Cette inhibition varie suivant l'acide gras polyinsaturé considéré et suivant la quantité d'hydroperoxydes présents dans le milieu. Ainsi, dans l'article de R.W. Egan (26), on apprend que s'il faut

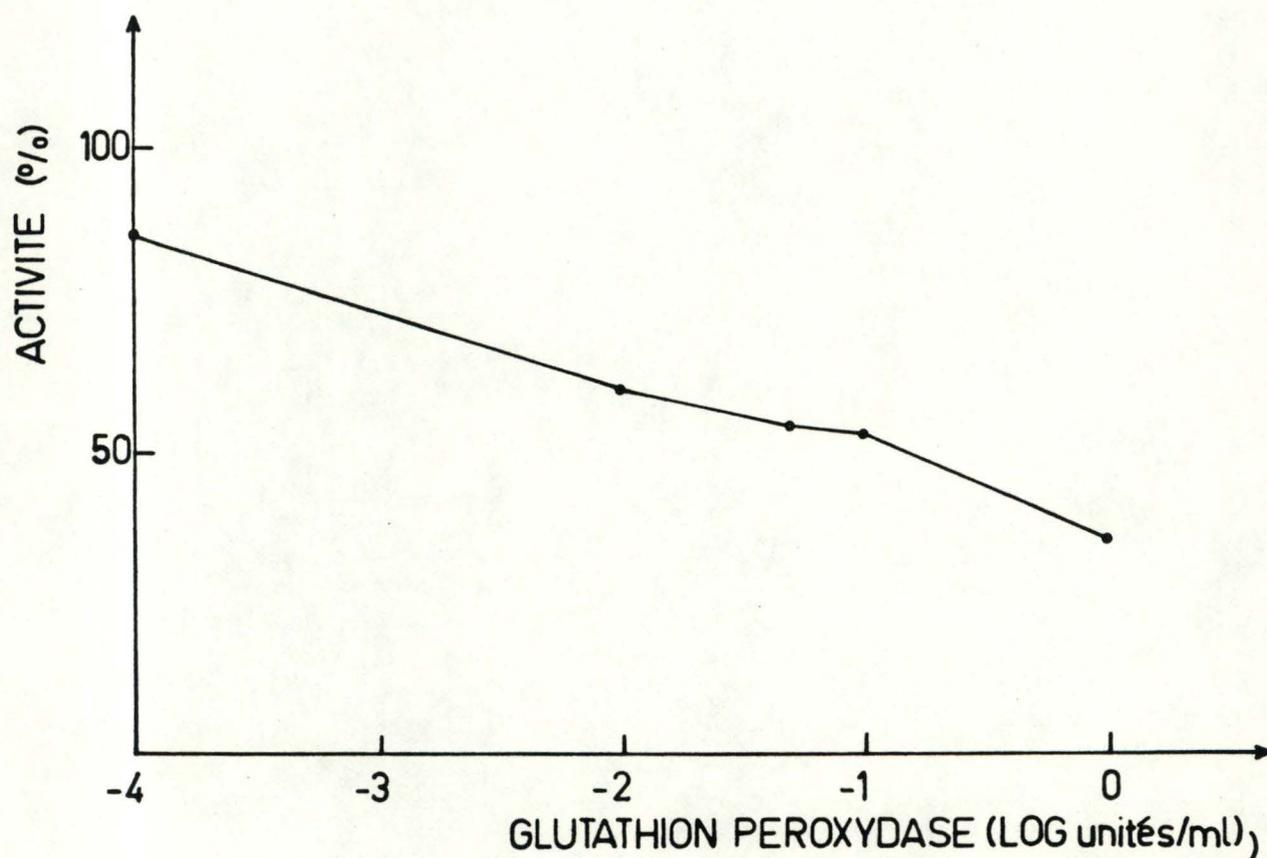


Figure 13 : Effet de la glutathion peroxydase sur l'activité de la lipoxygénase.
Tous les tests, ainsi que le contrôle, ont été incubés en présence de glutathion réduit $4 \cdot 10^{-4}$ M.
L'activité du contrôle, qui n'a pas été incubé en présence de glutathion peroxydase, est posée égale à 100 % (Voir II.5.).

des petites quantités d'hydroperoxydes pour activer la 5-lipoxygénase des RBL-1, par contre, de grandes quantités d'hydroperoxydes (100 à 200 μ M) pourraient diminuer la biosynthèse des leucotriènes.

D'autres auteurs, comme P. Borgeat (7) et J. Maclouf (27) ont constaté en travaillant respectivement sur la 5-lipoxygénase de polymorphonucléaires de lapins et d'humains, que le 12-HPETE synthétisé par la 12-lipoxygénase des plaquettes a un effet activateur. Par contre, le 15-HETE et le 12-HETE inhibent la 5-lipoxygénase. La 15-lipoxygénase étant localisée dans les leucocytes et la 12-lipoxygénase dans les plaquettes, on s'aperçoit que la régulation de la 5-lipoxygénase est très subtile et difficile à définir.

Un autre argument démontrant le rôle des hydroperoxydes dans la synthèse des leucotriènes vient des articles de J.L. Haining (28), W.L. Smith (25) et J. Maclouf (27) qui montrent que la phase de latence caractéristique des lipoxygénases peut être raccourcie et même supprimée par l'addition d'hydroperoxydes.

On peut donc supposer, comme le font notamment M. Hamberg et W.E.M. Lands, que les hydroperoxydes pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la biosynthèse des leucotriènes : soit pour enclencher la réaction (10), soit pour maintenir l'activité de l'enzyme au cours de la réaction (20).

D'autres auteurs ont étudié l'effet des peroxydes ne provenant plus cette fois-ci du métabolisme des lipoxygénases, mais de l'activité de la cyclooxygénase (29). A partir des résultats observés lors de l'emploi d'inhibiteurs de la cyclooxygénase, ils déduisent que des endoperoxydes synthétisés par la cyclooxygénase

auraient un effet activateur sur la 12-lipoxygénase de plaquettes qui, nous l'avons vu plus haut, synthétise le 12-HPETE qui est un activateur de la 5-lipoxygénase.

Un dernier argument en faveur de l'intervention des hydroperoxydes dans l'activation de la 5-lipoxygénase vient du fait que la glutathion peroxydase en présence de glutathion réduit inhibe l'enzyme (26-20).

Cependant, si d'après les données de la littérature il est évident que les peroxydes et probablement les radicaux libres sont impliqués dans la synthèse des leucotriènes vu le type de molécules intermédiaires (hydroperoxydes, époxydes), cette notion d'impliqué n'est cependant pas toujours explicitée. De plus, tous ces travaux ont été réalisés sur des lipoxygénases différentes : soit de soja, soit d'animaux ou de cellules différentes.

En ce qui concerne la 5-lipoxygénase de leucocytes de bovins, nous observons sur les figures 10 et 11 une inhibition très nette par les hydroperoxydes ; cette inhibition paraît un peu plus accentuée dans le cas du cumène hydroperoxyde que dans le cas de H_2O_2 . En effet, une concentration en cumène hydroperoxyde de 10^{-6} M donne une inhibition de 63 % alors que la même concentration en H_2O_2 ne donne que 33 % d'inhibition. Or les molécules H_2O_2 peuvent produire des radicaux OH^\bullet par la réaction d'Haber et Weiss :



Bien que d'un faible rendement (14), cette réaction produit des OH^\bullet qui devraient également avoir un effet sur la synthèse des leucotriènes. Ceci fera l'objet d'un autre travail.

Ayant constaté l'effet inhibiteur des hydroperoxydes sur la 5-lipoxygénase de leucocytes de bovins, nous pouvions nous attendre à trouver un effet protecteur de la catalase et de la glutathion peroxydase, bien que ces deux enzymes peuvent ne pas avoir nécessairement le même effet sur la lipoxygénase. Ainsi, W. E. M. Lands (20) mentionne l'effet activateur des hydroperoxydes et inhibiteur de la glutathion peroxydase mais il constate cependant que la catalase ne protège pas complètement la lipoxygénase de soja.

Sur la figure 12, nous constatons que la catalase n'a pas d'effet sur l'activité de la lipoxygénase. Ceci doit être dû au fait que les hydroperoxydes d'hydrogène n'ont aucun effet activateur sur la biosynthèse des leucotriènes (voir figure 11). Il est donc normal que la catalase, qui réduit la quantité d' H_2O_2 présents dans le milieu, n'ait pas d'effet inhibiteur sur la lipoxygénase.

Il n'en est pas de même pour la glutathion peroxydase. Si l'on regarde la figure 13, on observe une inhibition croissante de l'activité de la 5-lipoxygénase pour des concentrations croissantes en glutathion peroxydase.

Comme nous l'avons vu dans la littérature, les peroxydes qui jouent un rôle dans la synthèse des leucotriènes sont le plus souvent des produits de réaction de la lipoxygénase elle-même et non des H_2O_2 ou d'autres hydroperoxydes étrangers à la double cascade de l'acide arachidonique. La glutathion peroxydase est une enzyme capable de réagir avec ces hydroperoxydes et de les transformer en hydroxyles. Certains hydroperoxydes (12-HPETE) ont un effet activateur (7,27,20,26) et certains hydroxyles (15-HETE, 12-HETE) ont un effet inhibiteur (7,27) sur la régulation de la

5-lipoxygénase. L'inhibition de la synthèse des leucotriènes que nous observons lors de l'incubation en présence de glutathion peroxydase et de glutathion réduit s'accorde donc avec les données de la littérature. Cependant, cette inhibition est assez faible. Ceci pourrait s'expliquer par le fait suivant : les hydroperoxydes seraient surtout utiles à l'activation de l'enzyme, ce qui raccourcirait la phase de latence. Or cette phase de latence dure tout au plus à peu près 2 minutes (voir figure 3) et notre incubation se poursuit durant 20 minutes. La réaction a donc le temps de s'enclencher malgré tout. La faible inhibition observée pourrait être due à l'absence d'hydroperoxydes qui sont neutralisés par la glutathion peroxydase et qui dans les conditions normales maintiennent plus haut l'activité de la lipoxygénase durant toute la réaction. Pour observer l'effet d'activation des hydroperoxydes au début de la réaction et donc l'inhibition presque totale par la glutathion peroxydase, il aurait fallu réaliser l'incubation pendant des temps courts. Dans nos expériences, il faut des concentrations en glutathion peroxydase de l'ordre de 1 unité par ml pour atteindre 65 % d'inhibition. R.W.Egan (26) observe des inhibitions à des concentrations inférieures. Nous n'avons pas d'explication actuellement sur ces différences de sensibilité de l'enzyme à la présence de glutathion peroxydase.

Enfin, il est à signaler que l'action des hydroperoxydes sur la cyclooxygénase est mieux connue (14). A faible concentration, ils activent la cyclooxygénase. Par contre, à forte concentration ils ont un effet inhibiteur.

III.3.1. Effet simultané de la catalase et de la SOD sur l'activité de la lipoxigénase

H_2O_2 comme $O_2 \cdot (-)$ sont des molécules toxiques pour l'enzyme. De plus, lorsqu'elles sont mises en présence l'une de l'autre, elles peuvent former des radicaux hydroxyles qui sont très réactionnels.

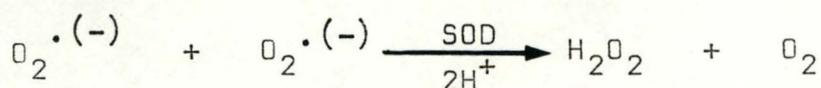
Afin d'être certains que ces molécules sont éliminées au cours du dosage de la lipoxigénase, nous avons incubé l'enzyme simultanément en présence de catalase et de SOD.

Pour chaque test, nous avons dans chaque tube 4,5 ml de surnageant, du $CaCl_2$ 2 mM final, de la catalase et de la superoxyde dismutase en concentrations variables et de l'acide arachidonique $1,6 \cdot 10^{-5}$ M final. L'incubation se réalise à 37 ° C durant 20 minutes. Nous n'ajoutons pas de catalase ni de superoxyde dismutase dans le contrôle dont l'activité en lipoxigénase est posée égale à 100 %. Dans les différents tubes, la catalase a la même activité que celle de la SOD.

Les résultats présentés à la figure 14 montrent que lorsque les deux enzymes sont présents, l'activité de la lipoxigénase se maintient à une valeur similaire à celle du contrôle.

III.3.2. Discussion

Nous avons vu, à la figure 8, que la superoxyde dismutase qui catalyse la réaction suivante :



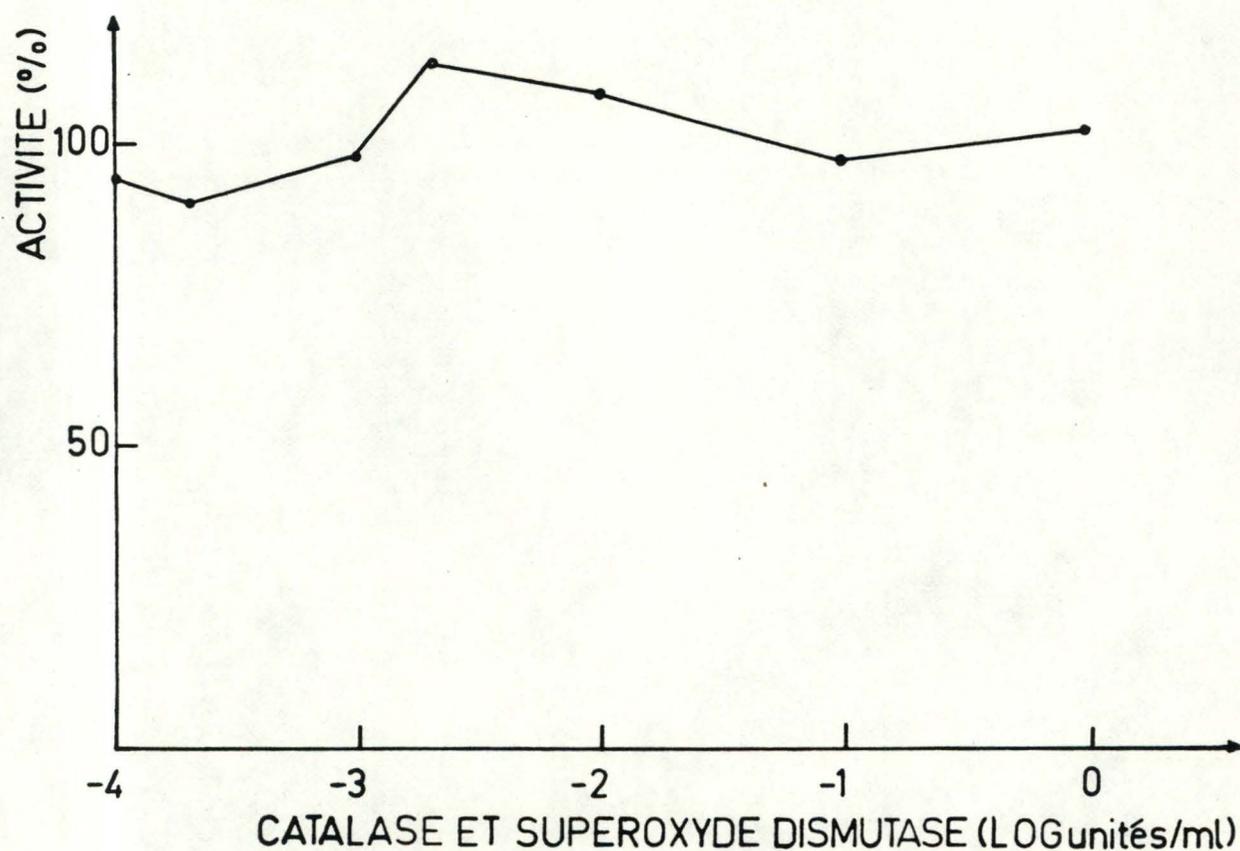


Figure 14 : Effet de la catalase et de la SOD sur l'activité de la lipoxygénase.
Nous n'ajoutons pas de catalase ni de SOD au contrôle dont l'activité est posée égale à 100 % (Voir II.5.).

n'avait pas d'effet sur la lipoxigénase. Pourtant, elle élimine les radicaux $O_2 \cdot (-)$ qui inhibent l'enzyme (figure 7). Cependant, on remarque également que la SOD produit des peroxydes d'hydrogène. Les H_2O_2 , nous l'avons observé sur la figure 11, ont une action inhibitrice lorsqu'ils sont en trop grande quantité dans le milieu d'incubation. Est-ce dû à ces deux effets antagonistes (diminution d' $O_2 \cdot (-)$ mais augmentation d' H_2O_2) que nous n'avons observé que de faibles modifications de l'activité de la lipoxigénase en présence de quantités croissantes de SOD ou bien les $O_2 \cdot (-)$ n'ont-ils pas d'effet activateur sur la lipoxigénase ?

Pour le savoir, nous avons testé simultanément la catalase et la SOD. La catalase élimine les H_2O_2 de la manière suivante :



Nous espérons ainsi ne plus avoir ni d' $O_2 \cdot (-)$, ni d' H_2O_2 dans le milieu d'incubation.

La figure 14 nous montre, par la stabilité de l'activité de l'enzyme, que les $O_2 \cdot (-)$ et H_2O_2 n'interviennent pas normalement dans la synthèse des leucotriènes.

IV. CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle des radicaux libres et des hydroperoxydes dans la synthèse des leucotriènes.

Nous avons mis en évidence que les radicaux superoxydes n'interviennent pas dans la synthèse des leucotriènes. Certains hydroperoxydes probablement dérivés de l'acide arachidonique auraient un effet activateur à faible concentration comme le suggère l'inactivation en présence de la glutathion peroxydase.

Pour clôturer ce travail, nous aimerions comparer nos résultats à ceux obtenus lors d'une recherche parallèle qui traitait de l'action des mêmes molécules sur la cyclooxygénase (14).

Ces deux enzymes, la cyclooxygénase et la lipoxygénase, synthétisent respectivement les prostaglandines et les leucotriènes. Ces icosanoïdes ont certaines actions identiques et d'autres opposées. Ils jouent aussi le rôle d'inhibiteurs ou d'activateurs dans la régulation des deux enzymes (13). Il était donc raisonnable de s'attendre à de nombreuses similitudes dans leur mode de régulation. D'autant que ces deux familles de produits dérivent d'un même précurseur : l'acide arachidonique.

Il semble cependant que les superoxydes jouent un rôle important dans le cas de la régulation de la cyclooxygénase (14), alors qu'il n'en est de même pour la lipoxygénase. Ils activent la synthèse des prostaglandines à faibles concentrations mais pas la synthèse des leucotriènes. Les deux enzymes sont par contre inhibés aux plus grandes concentrations (14).

Le rôle des hydroperoxydes semble par contre pareil pour les deux enzymes, mais avec une spécificité beaucoup plus importante pour la lipoxigénase. A faible concentration, ils ont en général un effet activateur et aux plus fortes concentrations, ils inhibent la cyclo-oxygénase et la lipoxigénase. La sensibilité aux hydroperoxydes est cependant nettement moins grande pour la lipoxigénase. Donc, les hydroperoxydes ne seraient pas aussi essentiels à la synthèse des leucotriènes alors qu'ils le sont pour la synthèse des prostaglandines. De plus, il semble que la spécificité des effets activateurs des hydroperoxydes soit beaucoup plus restreinte dans le cas de la régulation de la lipoxigénase puisque ni le peroxyde d'hydrogène, ni le cumène hydroperoxyde ne parviennent à activer l'enzyme et que la catalase n'a pas provoqué d'inhibition de la synthèse des leucotriènes.

Pour pouvoir compléter cette comparaison, il aurait été utile d'étudier le rôle des hydroxydes ainsi que des radicaux hydroxyles sur la lipoxigénase. Ils sont connus pour avoir un effet néfaste sur la cyclooxygénase (14).

Enfin, il faut aussi souligner comme plusieurs articles (7,10,13,16,20,23,24,25,27,29) le font que les différents facteurs considérés dans ce travail et d'autres encore n'agissent pas isolément mais forment un entrelacs d'interactions entre eux qui rend la régulation de ces enzymes très difficile à cerner.

Nous espérons malgré tout que ces quelques constatations pourront aider à faire progresser la compréhension de la régulation complexe de toute cette machinerie enzymatique impliquée dans les réactions inflammatoires et allergiques.

Comme nous l'avons dit plus haut, il serait bon de poursuivre ce travail en étudiant l'effet des radicaux

hydroxyles sur l'activité de la lipoxygénase. De plus, vu les résultats obtenus sur cellules entières par A. Houben et G. Lenoir au laboratoire, il serait aussi intéressant de tester l'effet direct d'antioxydants sur l'enzyme. Sur cellules entières et animaux, ils inhibent les processus qui nécessitent la production des leucotriènes. Ceci pourrait être une voie d'approche pour élucider les mécanismes de la régulation de la 5-lipoxygénase.

V. BIBLIOGRAPHIE

- 1- KELLAWAY C. H. and TRETHERWIE E. R.
Quart. J. Exp. Physiol., 30, 121. (1940)
- 2- BROCKLEHURST W. E.
Ciba Symposium on Histamine, Churchill, London.
p. 175. (1956)
- 3- SAMUELSSON B., BORGEAT P., HAMMARSTROM S., MURPHY R. C.
Prostaglandins, 17, 785. (1979)
- 4- VANDERHOEK J. Y. and al.
Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte
product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid.
J. Biol. Chem., 255, 10064-10066. (1980)
- 5- SERHAN C. N. and al.
J. Biol. Chem., 257, 4746. (1982)
- 6- SAMUELSSON B.
The L.T. : Highly biologically active substances
involved in allergy and inflammation.
Angewandte Chemie, 21, 902-910. (1982)
- 7- BORGEAT P., FRUTEAU DE LACLOS B., MACLOUF J.
New concepts in the modulation of leukotriene synthesis.
Biochem. Pharmacol., Vol. 32, n°3, p.381-387. (1983)
- 8- JAKSCHIK B. A., SUN F. F. and al.
Calcium stimulation of a novel lipooxygenase.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 103-110. (1980)
- 9- NARUMIYA S., SALMON J. A., COTTEE F. H.
Arachidonic Acid 15-lipooxygenase from rabbit
peritoneal polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem., 256, 9583. (1981)

- 10- HAMBERG M.
Studies on the formation and degradation of unsaturated fatty acid hydroperoxides.
Prostaglandins Leukotrienes and Medecine, 13, 27-33. (1984).
- 11- SCHELL-FREDERICK E.
Stimulation of the oxydative metabolism of polymorphonuclear leukocytes by the calcium ionophore A 23187. FEBS Lett., 48, 37-40. (1974).
- 12- BROM J. and al.
Subcellular localization of enzymes involved in leukotriene formation within human polymorphonuclear granulocytes.
Subcellular localization of enzymes, 51(3), 571-585. (1984).
- 13- KUEHL F. A., Jr., DOUGHERTY H. W., HAM E. A.
Biochem. Pharmacol., 33(1), 1-5. (1984).
- 14- SMETS G.
Effet de divers radicaux et hydroperoxydes sur la prostaglandine synthétase.
F.N.D.P. Namur (1983).
- 15- LENOIR G.
Dosage des leucotriènes par HPLC et effet de quelques molécules radicophiles sur la production du LTB₄ par des leucocytes.
Rapport de recherche (1983).
- 16- SALARI H., BRAQUET P., BORGEAT P.
Comparative effects of indomethacin, acetylenic acids, 15-HETE, nordihydroguaiaretic acid and BW755C on the metabolism of arachidonic acid in human leukocytes and platelets.
Prostaglandins, Leukotrienes and Medecine, 13, 53-60. (1984).

- 17- JAKSCHIK B. A., and LEE L. H.
Enzymatic assembly of slow reacting substance.
Nature, 287, 51-52. (1980).
- 18- JAKSCHIK B. A., HARPER T., MURPHY R.C.
The 5-lipoxygenase and leukotriene forming enzymes.
Methods in Enzymology, 86, 30-37. (1982).
- 19- VERHANGEN J., WALSTRA P. and al.
Separation and quantitation of leukotrienes by
reversed-phase high-performance liquid chromatography.
Prostaglandins, Leukotrienes and Medecine, 13,
15-20. (1984).
- 20- LANDS W. E. M.
Biological consequences of fatty acid oxygenase
reaction mechanisms.
Prostaglandins, Leukotrienes and Medecine, 13,
35-46. (1984).
- 21- ANDERSON F. S. and al.
Ethylenediaminetetraacetic acid in liquid chroma-
tography of L.T.
Analytical Chemistry, 55, 1837-1839. (1983).
- 22- CLAESSION H-E. and al.
Serum coated zymosan stimulates the synthesis of
leukotriene B₄ in human polymorphonuclear leukocytes.
Inhibition by cyclic AMP.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 99, 1230-1237. (1981).
- 23- MARONE G. and al.
Control mechanisms of histamine release from human
basophils in vitro : the role of phospholipase A₂
and of lipoxygenase metabolites.
Int. Archs Allergy Appl. Immun., 66 (suppl.1),
144-148. (1981).

- 24- SMITH W. L. and LANDS W. E. M.
The self-catalysed destruction of lipoxygenase.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 41 (4), 846-851. (1970).
- 25- SMITH W. L. and LANDS W. E. M.
Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean
lipoxygenase.
J. Biol. Chem., 247 (4), 1038-1047. (1972).
- 26- EGAN R. W. and al.
Specific inhibition and oxidative regulation
of 5-lipoxygenase.
Advances in prostaglandin, thromboxane and
leukotriene research, 11, 151-157. (1983).
- 27- MACLOUF J. and al.
Stimulation of leukotriene biosynthesis in human
blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-
icosatetraenoic acid.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 6042-6046. (1982).
- 28- HAINING J.L. and AXELROD B.
Induction period in the lipoxidase-catalysed oxidation
of linoleic acid and its abolition by substrate
peroxide.
J. Biol. Chem., 232, 193-202. (1958).
- 29- HAMBERG M. and HAMBERG G.
On the mechanism of the oxygenation of arachidonic
acid by human platelet lipoxygenase.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 95 (3), 1090-1097.
(1980).