



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Rôle du PAF et des phospholipases dans la dégranulation spécifique des polymorphonucléaires neutrophiles bovins

Giagoultsis, Théodora

*Award date:*  
1990

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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

1990



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

---

Rôle du PAF et des phospholipases  
dans la dégranulation spécifique  
des polymorphonucléaires  
neutrophiles bovins.

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

Théodora  
GIAGOULTSIS

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

Rôle du PAF et des phospholipases dans la dégranulation spécifique des polymorphonucléaires neutrophiles de bovins.

GIAGOULTSIS Théodora

### Résumé

Lors de la réaction inflammatoire, le leucocyte polymorphonucléaire (PMN) joue un rôle majeur; il produit différents médiateurs lipidiques comme le platelet-activating factor (PAF) et il participe à l'élimination des corps étrangers par la production de radicaux superoxydes et la dégranulation. De par son rôle fondamental, le PMN constitue un bon modèle pour l'étude de la régulation de la réaction inflammatoire.

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié la dégranulation spécifique des PMN neutrophiles de bovins. La mise au point d'un test de dégranulation a permis d'estimer l'importance des différentes voies d'activation et de leurs médiateurs lors de ce processus.

Suite à la mise au point d'un dosage du PAF par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse, nous n'avons pas pu montrer que le PAF était un médiateur de la dégranulation spécifique.

Par contre, l'étude au moyen de stimulateurs et d'inhibiteurs de la phospholipase A2, de la protéine kinase C et de la phospholipase D a révélé que ces enzymes intervenaient dans le processus de dégranulation spécifique. Cependant le rôle exact de chaque voie est difficile à déterminer étant donné la complexité et le nombre élevé d'enzymes qui caractérisent ce phénomène.

Mémoire de licence en sciences biologiques

Juin 1990

Promoteur : J. Remacle

## REMERCIEMENTS

*Au terme de ce mémoire, il me tient à coeur de remercier le Professeur J. Remacle de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir judicieusement conseillée.*

*Mes remerciements vont ensuite à G. Lenoir qui m'a guidée, conseillée et aidée tout au long de l'année.*

*Je remercie aussi,*

*E. Delaive et G. Lenoir pour les prélèvements de sang qu'ils ont réalisés.*

*Marc Dieu pour l'analyse au GC-MS de mes échantillons (et merci pour la spéléo!! qui fut mémorable pour chaque participant).*

*Un "merci" tout particulier à Isabelle Alexandre (EH!!) qui a tapé une partie du manuscrit et qui m'a beaucoup aidée lors des dernières finitions.*

*Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur gentillesse, leur serviabilité et leur bonne humeur quotidiennes.*

*Un grand merci à Andrée, Véronique, Pierre, Vincent, Manoëlle, Benoît, Isabelle K., Marc D., Nathalie pour leurs petits "coups de pouce".*

*Merci à mes parents pour tout.*

# INTRODUCTION

## CHAPITRE 1.....1

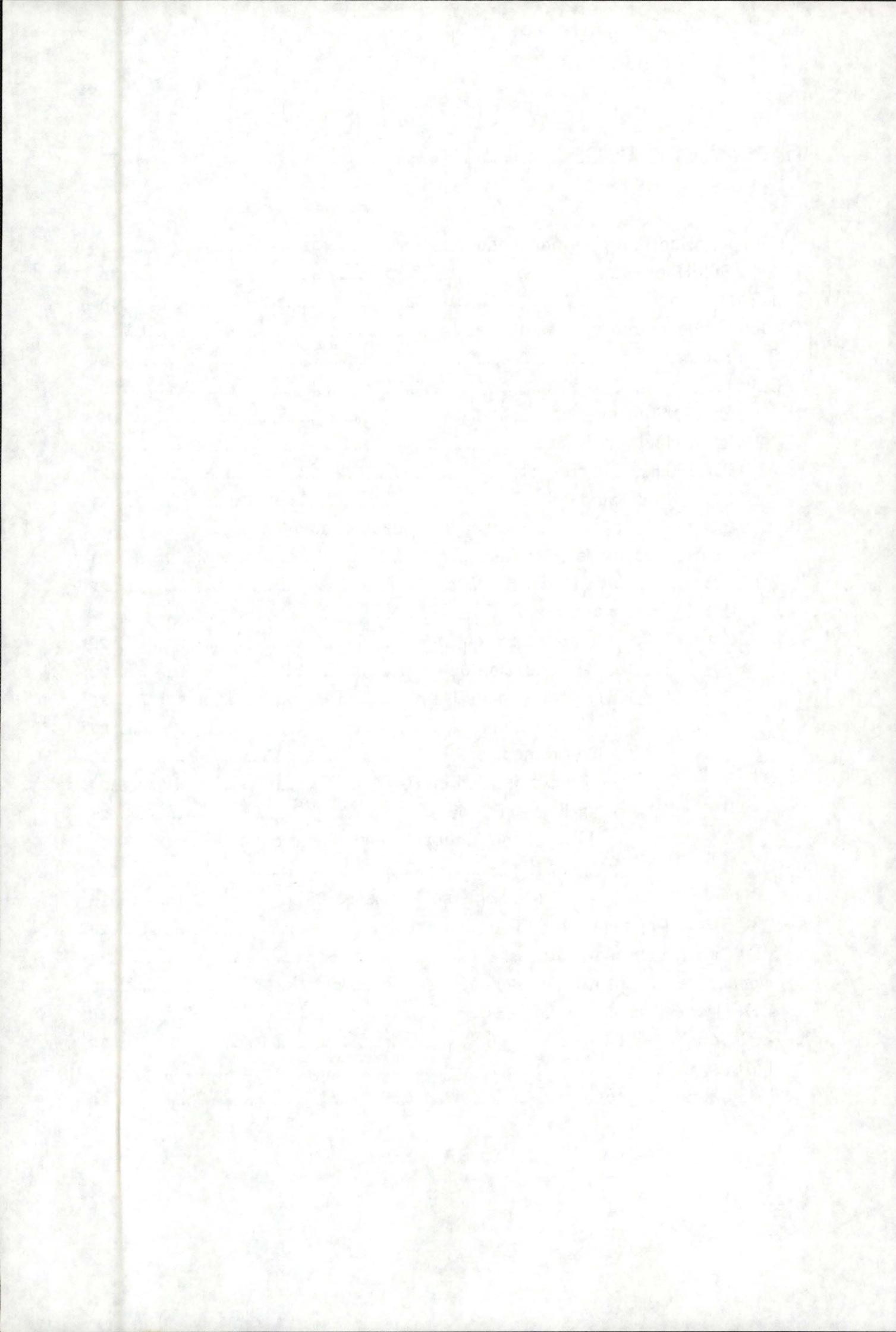
- 1) Le PMN dans la réaction inflammatoire.....1
  - 1.1) Le déclenchement de la réaction inflammatoire.....1
  - 1.2) L'amplification de la réaction inflammatoire.....3
  - 1.3) La stabilisation de la réaction inflammatoire.....4
  - 1.4) La phase de résolution.....4
- 2) Le PMN bovin. ....5
  - 2.1) Description du PMN de bovins.....5
  - 2.2) Fonctions du neutrophile.....6

## CHAPITRE 2.....8

- 1) Introduction. ....8
- 2) Action de la phospholipase A2 sur les phospholipides.....8
  - 2.1) Le platelet-activating factor (PAF).....9
    - 2.1.1) Structure du PAF. ....9
    - 2.1.2) Biosynthèse du PAF. ....10
    - 2.1.3) Catabolisme du PAF.....10
    - 2.1.4) Activités biologiques du PAF.....10
  - 2.2) La cascade de l'acide arachidonique.....11
- 3) Action de la phospholipase C sur les phospholipides.....12
  - 3.1) Métabolisme des phospholipides en général.....12
  - 3.2) Métabolisme du phosphatidylinositol.....12
- 4) Action de la phospholipase D sur les phospholipides.....14

## **POSITION DU PROBLEME**.....15

<b>MATERIEL ET METHODE.....</b>	<b>17</b>
1) Préparation des polymorphonucléaires de bovins.....	17
1.1) Solutions.....	17
1.2) Méthode.....	17
2) Dosage de la protéine fixant la Vit B12.....	18
2.1) Principe.....	18
2.2) Dosage.....	19
2.1.1) Solutions.....	19
2.1.2) Méthode.....	20
2.1.3) Calcul des résultats.....	21
2.1.4) Mise au point.....	21
3) Dosage du PAF par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.....	21
3.1) Dosage.....	22
3.1.1) Préparation du PAF.....	22
3.1.1.1) Production du PAF.....	22
3.1.1.2) Purification du PAF.....	22
3.1.1.3) Hydrolyse du PAF.....	23
1) solutions.....	23
2) méthode.....	23
3.1.1.4) Dérivatisation du PAF.....	24
3.1.1.5) Analyse au GC-MS.....	25
1) la chromatographie en phase gazeuse (GC).....	25
2) le spectromètre de masse (MS).....	25
3.1.2) Préparation du PAF deutéré.....	26
3.2) Calcul des résultats.....	28
4) Dosage de la lactate déshydrogénase.....	29
4.1) Principe.....	29
4.2) Solutions.....	29
4.3) Dosage.....	30
4.4) Calcul des résultats.....	30



<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	<b>31</b>
1) Rôle du PAF dans la dégranulation spécifique des PMN bovins. ....	<b>31</b>
1.1) Production de PAF par les PMN bovins stimulés avec l'ionophore du calcium.....	<b>32</b>
1.2) Efet de l'acide oléique sur la synthèse de PAF par les PMN bovins stimulés avec l'ionophore du Ca <sup>2+</sup> A23187. ....	<b>33</b>
1.3) Dégranulation spécifique des PMN bovins induite par l'ionophore du Ca <sup>2+</sup> A23187. Dépendance vis-à-vis du calcium.....	<b>34</b>
1.4) Effet de l'acide oléique sur la dégranulation spécifique induite par l'ionophore A23187.....	<b>36</b>
1.4.1) Effet de différentes concentrations en acide oléique sur le taux de dégranulation.....	<b>36</b>
1.4.2) Effet de l'acide oléique sur la dégranulation spécifique induite par différentes concentrations en ionophore A23187. ....	<b>36</b>
1.5) Effet de la carbénoxolone sur la dégranulation spécifique des PMN. ....	<b>38</b>
1.5.1) Effet de la carbénoxolone sur l'incorporation d'acide acétique <sup>3</sup> H dans le PAF par les PMN stimulés par l'ionophore du calcium A23187. ....	<b>39</b>
1.5.2) Dégranulation des PMN en présence de carbénoxolone et dépendance vis-à-vis du Ca <sup>2+</sup> .....	<b>40</b>
2) Rôle de la PKC dans la dégranulation spécifique des PMN bovins. ....	<b>43</b>
2.1) Effet du PMA. ....	<b>43</b>
2.2). Rôle de la PKC dans la dégranulation induite par l'ionophore A 23187. ....	<b>46</b>
3) Rôle des phospholipases dans la dégranulation spécifique des PMN bovins. ....	<b>50</b>

3.1) Rôle de la phospholipase A2. ....	50
3.1.1) Effet du pBPB. ....	50
3.1.2) Effet du NDGA.....	52
3.2) Rôle des phospholipases C et D dans la dégranulation spécifique des PMN bovins .....	55
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>58</b>

## Liste des abréviations

- Ac : anticorps
- Ag : antigène
- AGPI : acide gras polyinsature
- DAG : diacylglycérol
- FMLP : formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine
- GC : chromatographie gazeuse
- HETE : acide hydroxy éicosatétraénoïque
- HPETE : acide hydroperoxy éicosatétraénoïque
- H-7 : 1-(5-isoquinoline-sulfonyl)-2)-méthylpipérasine
- IP3 : inositol phosphate
- LDH : lactate déshydrogénase
- LT : leucotriène
- MS : spectrométrie de masse
- NDGA : acide nordihydroguaiacétique
- PA : acide phosphatidique
- PAF : platelet-activating factor
- pBPB : para-bromophénacyl bromide
- PG : prostaglandine
- PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
- PKC : protéine kinase C
- PLA2 : phospholipase A2
- PLC : phospholipase C
- PLD : phospholipase D
- PMA : phorbol 12-myristate 13 acétate
- PMN : polymorphonucléaire
- Vit B12 : Vitamine B12

## INTRODUCTION

### CHAPITRE 1.

#### 1) Le PMN dans la réaction inflammatoire.

Lorsqu'on se coupe , la plaie est le siège de toute une série de phénomènes très complexes. D'abord on saigne, ensuite le saignement s'arrête, la plaie gonfle, rougit, devient douloureuse; une croûte va se former, cachant parfois un peu de pus, et enfin après quelques jours, la croûte tombe, révélant une "peau neuve" qui s'est mise en place en-dessous.

Tous ces phénomènes constituent la réaction inflammatoire aiguë. Elle est la première ligne de défense contre toute agression extérieure. Elle fait intervenir des séries de réactions s'enchaînant en cascade, entraînant l'activation de différents types de cellules et de nombreux médiateurs (GUALDE, 1986; DODET, 1989; BLOTMAN *et al*, 1983).

Dans ce premier chapitre, nous allons décrire brièvement les phénomènes liés à la réaction inflammatoire, ce qui va nous permettre de nous familiariser avec le cadre dans lequel le PMN agit.

#### 1.1) Déclenchement de la réaction inflammatoire.

Le résultat immédiatement visible d'une lésion de la peau est un saignement qui, si la plaie n'est pas profonde, s'arrête très vite, du fait de la formation d'un caillot de sang : la cascade des facteurs de la coagulation provoque l'occlusion des brèches vasculaires.

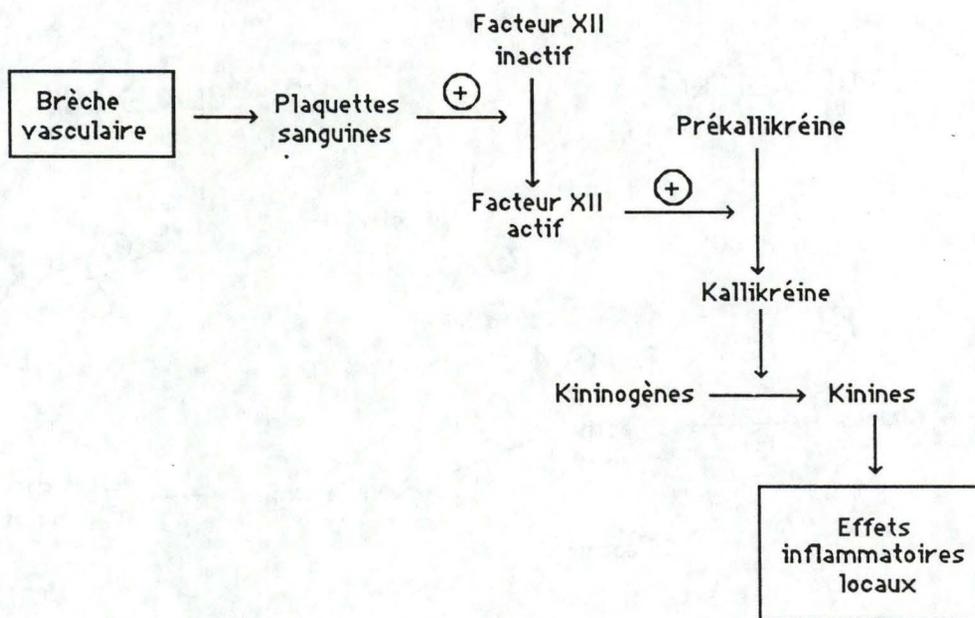


Figure 1 : Représentation schématique de l'activation des facteurs de la coagulation conduisant à l'activation du processus inflammatoire.

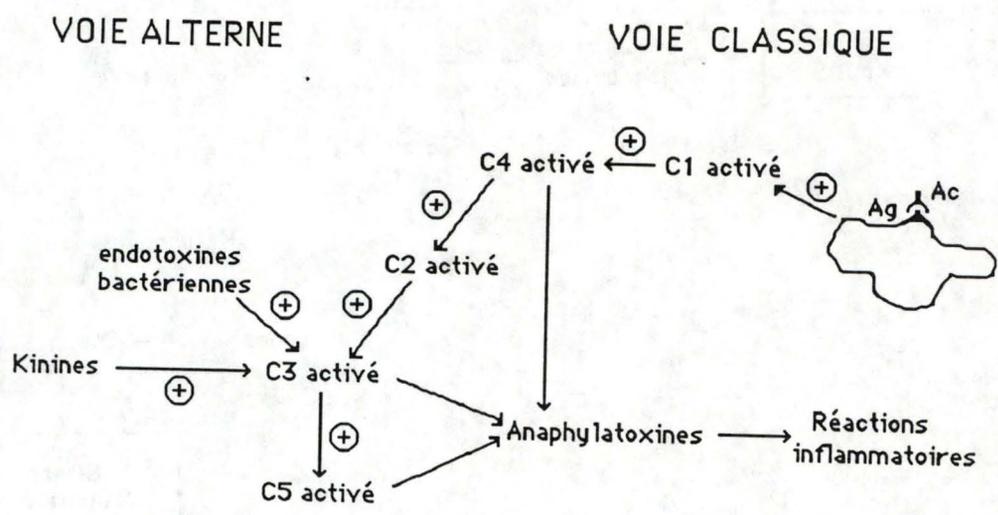


Figure 2 : Activation du complément par la voie classique et la voie alterne.  
 (Ag=antigène, Ac=anticorps).

Cependant son action ne s'arrête pas là; en effet, un des facteurs de la coagulation du sang, le facteur XII, active de manière rapide et explosive la cascade des kinines. Ce facteur transforme la prékallitréine qui est inactive en kallitréine qui va alors transformer les kininogènes en kinines. Ces molécules, dont la plus active est la bradykinine, provoquent une intense dilatation des vaisseaux sanguins et entraînent l'apparition des premiers signes de douleur (Figure 1).

Mais cela ne s'arrête pas là : le sang qui coule sous la plaie véhicule les composants du complément. La cascade du complément est mise en marche de deux manières :

- la première, dite voie classique, débute par l'activation du facteur C1 du complément, suite à la fixation des anticorps sur l'antigène.
- la seconde, dite voie alterne, est un moyen de défense immédiat, qui ne nécessite pas l'action du système immunitaire. Elle peut être activée directement, par toutes sortes de substances étrangères présentes dans la plaie cutanée car celle-ci est toujours souillée, mais aussi par le système des kinines (Figure 2).

Une fois le complément activé, il provoque la lyse de l'antigène et la production de C3a, C4a et C5a appelés anaphylatoxines. Ce sont de petits peptides très toxiques qui agissent sur la perméabilité des capillaires, provoquent la contraction des fibres musculaires lisses, et attirent par chimiotactisme les polynucléaires. Ils activent également les mastocytes qui libèrent alors des substances inflammatoires : médiateurs préformés présents dans leurs granules (histamine, sérotonine, bradykinine) puis les médiateurs néoformés (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes, platelet-activating factor).

Une des substances libérées par les mastocytes activés est l'histamine qui a des fonctions très diverses : elle entraîne une dilatation des vaisseaux sanguins, ce qui favorise le transit des cellules et des macromolécules contenues dans le plasma vers la blessure. Elle intervient donc dans l'amplification du processus inflammatoire et dans l'apparition d'un gonflement ou oedème.

### 1.2) L'amplification de la réaction inflammatoire.

Cependant, la réaction inflammatoire ne se borne pas à cela. En particulier, les mastocytes, ainsi que toutes les cellules qui sont arrivées sur le lieu de l'inflammation, relâchent dans le sang des substances telles que le C3b. Ces substances ont une activité chimiotactique sur les macrophages et les polymorphonucléaires qui vont alors exercer une activité bactéricide. Ils phagocytent et digèrent micro-organismes et corps étrangers. Ils libèrent des enzymes lysosomiales et des radicaux oxygénés extrêmement toxiques pour les micro-organismes, mais aussi pour les cellules avoisinantes.

De tous les globules blancs du sang, les neutrophiles sont les plus abondants. Ils migrent du sang vers la plaie où se trouvent les corps étrangers et les phagocytent pour les détruire grâce aux enzymes lysosomiales et aux radicaux libres qu'ils déversent dans les phagosomes. Lors de la phagocytose, les neutrophiles "régurgitent" une partie de leur contenu, libérant ainsi des enzymes et des radicaux chimiques qui sont bactéricides, mais entraînent également des lésions tissulaires.

Parallèlement à ces actions, les neutrophiles sécrètent de nombreux médiateurs : leucotriènes, prostaglandines, PAF, qui vont amplifier à leur tour la réaction inflammatoire.

Comme nous venons de le voir, le neutrophile joue un rôle essentiel lors de la réaction inflammatoire en "digérant" les corps étrangers qui se trouvent dans la plaie et en participant à l'amplification du processus.

### 1.3) La stabilisation de la réaction inflammatoire.

Quelques heures après le début de la réaction, l'organisme a mis en place (ou renforcé) une réponse immunitaire spécifique contre l'agresseur, qui s'ajoute aux défenses non spécifiques déployées par la réaction inflammatoire. Ces deux modes de défense vont conjuguer leurs forces et en général ils parviennent à éliminer l'agent pathogène et à "nettoyer" le foyer infectieux.

Les phénomènes inflammatoires se stabilisent. Des systèmes de régulation contrôlent et neutralisent les réactions.

Ces systèmes de régulation sont d'une très grande complexité et encore très imparfaitement connus. On peut cependant estimer qu'il doit exister un antagoniste par agoniste ou groupe d'agonistes et qu'aux systèmes d'activation s'opposent des moyens d'inactivation.

### 1.4) La phase de résolution.

Les cellules vasculaires et conjonctives détruites par le traumatisme initial ou au cours de la réaction inflammatoire vont être remplacées. Les processus de réparation se mettent en place dès la phase d'initiation ou, au plus tard, d'amplification. Ils sont contrôlés par de nombreux facteurs de croissance.

Cette phase de restauration est marquée par la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène. Elle débute au sein du foyer inflammatoire et comprend la restauration du tissu conjonctif et la restauration du parenchyme. Elle peut être parfaite, on parle alors de "régénération". Ceci n'est possible que si le tissu n'a pas été

trop détruit : les cellules spécifiques du tissu conjonctif et les cellules parenchymateuses survivantes colonisent le foyer et remplacent parfaitement les cellules détruites. Mais le plus souvent, la restauration est imparfaite ou incomplète. On dit alors qu'il s'agit d'une "réparation". Elle se fait à partir des fibroblastes, cellules non spécialisées du tissu conjonctif, et laisse une cicatrice fibreuse.

## 2) Le PMN bovin.

### 2.1) Description du PMN bovin.

Les neutrophiles bovins contiennent trois types de granules cytoplasmiques. Deux d'entre eux ressemblent aux granules azurophiles (ou primaires) et spécifiques (ou secondaires) des neutrophiles humains.

Le troisième type de granules semble être caractéristique des espèces ruminantes (sauf le cheval) et est de très grande taille.

Caractéristiques de ces granules :

#### 1) granules azurophiles :

ce sont des granules peroxydase positifs. Ils sont de petite taille et de forme ellipsoïdale ou ronde. Ils contiennent des hydrolases acides, des protéases neutres et des enzymes antimicrobiennes.

#### 2) granules spécifiques :

ils sont peroxydase négatifs, petits et très denses aux électrons (matrice sombre). Ils contiennent des métalloprotéases, de la lactoférine, de la protéine fixant la Vitamine B12.



Figure 3 : 1) Micrographie d'un neutrophile bovin, sur laquelle on peut distinguer les granules et les lobes du noyau.

2) Détail du cytoplasme contenant les trois types de granules :

-les granules azurophiles sont de forme éllipsoïdale ou ronde (suivant la section) et ont une matrice très sombre.

(coin supérieur gauche).

-les granules spécifiques sont ronds et ont une matrice moins sombre.

(indiqués par les flèches).

-le troisième type de granules est de grande taille et possède une matrice très claire.

### 3) troisième type de granules :

ce sont des granules peroxydase négatifs, de très grande taille et ronds. Ils ont une matrice pâle et uniforme. Ils constituent la majorité des granules chez les PMN bovins, alors que les deux autres types de granules sont minoritaires.

Ils ont une activité antibactérienne oxygène-dépendante très puissante, qui pourrait être due à la présence de protéines fortement cationiques.

#### Remarque :

Les PMN bovins ne contiennent pas de lysozyme.

La figure 3 est une micrographie sur laquelle on peut facilement distinguer les trois types de granules (GENNARO *et al*, 1983; BAGGIOLINI *et al*, 1985).

## 2.2) Fonctions du neutrophile.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, les polymorphonucléaires neutrophiles ont un rôle essentiel lors de la défense de l'organisme hôte en cas d'infection.

Les phagocytes (polymorphonucléaires, monocytes) sont attirés vers les foyers inflammatoires par chimiotactisme, c'est-à-dire grâce à un phénomène par lequel le phagocyte qui est sensible aux gradients de concentration de certaines substances (facteurs chimiotactiques) libérées à proximité d'un micro-organisme étranger, les détecte et migre vers leur source.

Une fois sur place ils identifient leurs proies, car celles-ci sont enrobées d'opsonines c'est-à-dire des protéines de l'organisme infecté, qui font partie des immunoglobulines et du système complémentaire : on pense qu'elles sont reconnues par des récepteurs spécifiques situés dans la membrane du phagocyte. Une fois identifié, le micro-organisme est englouti et il est emprisonné à l'intérieur du phagosome. La destruction du micro-organisme

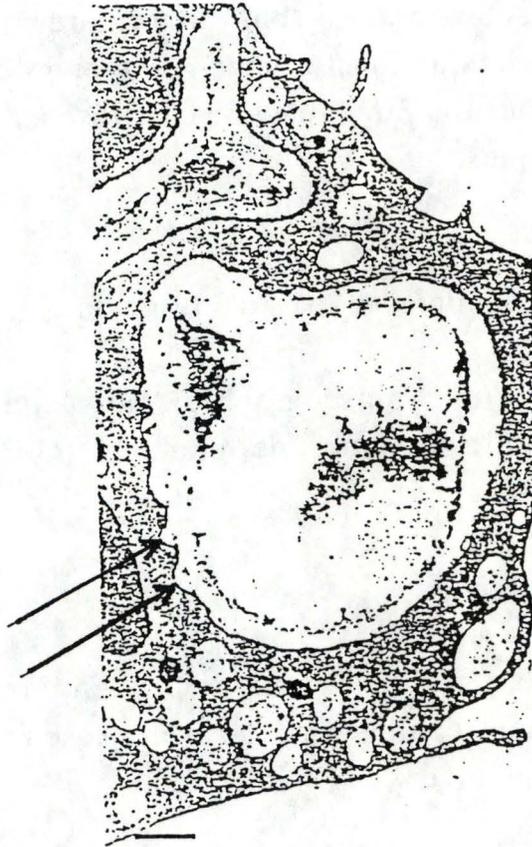


Figure 4 : Portion d'un neutrophile bovin phagocytant une particule de zymozan.  
Les ondulations qui bordent la vacuole représentent le site de fusion des granules avec le phagosome.

commence alors, grâce à la dégranulation et à l'hyperactivité oxydative.

- La dégranulation désigne la fusion du phagosome et des granules intra-cytoplasmiques du phagocyte. Ceux-ci contiennent des matériaux qui participent à la mise à mort de la bactérie et à sa lyse. Lors de la dégranulation, ces matériaux sont libérés dans la vacuole qui renferme le micro-organisme séquestré (figure 4).

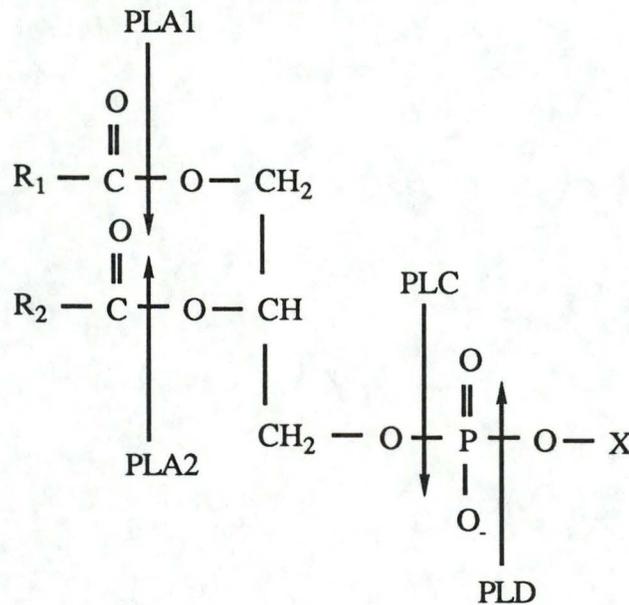
- L'hyperactivité oxydative désigne une voie métabolique qui produit un groupe d'agents bactéricides très puissants, grâce à la réduction partielle de l'oxygène.

La mort de la proie est le résultat de l'action conjointe du contenu des granules et des agents oxydants libérés au cours de l'hyperactivité oxydative (BRAQUET et BRAQUET, 1983 ; BECKER, 1990 ; STYRT, 1989).

## CHAPITRE 2.

### 1) Introduction : Métabolisme des phospholipides chez les PMN bovins.

La dégradation des phospholipides membranaires est sous le contrôle de plusieurs phospholipases. Leur action est schématisée ci-dessous :



Ce mécanisme est général, quel que soit le phospholipide, à l'exception des phosphoinositides (voir action de la phospholipase C) (BLOTMAN, 1983).

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase C (PLC) et la phospholipase D (PLD).

### 2) Action de la phospholipase A2 sur les phospholipides.

Les phospholipases A2 sont des enzymes Ca<sup>++</sup>-dépendantes localisées dans le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Lorsqu'elles sont activées, elles hydrolysent le groupement 2-acyl des phospholipides membranaires libérant ainsi

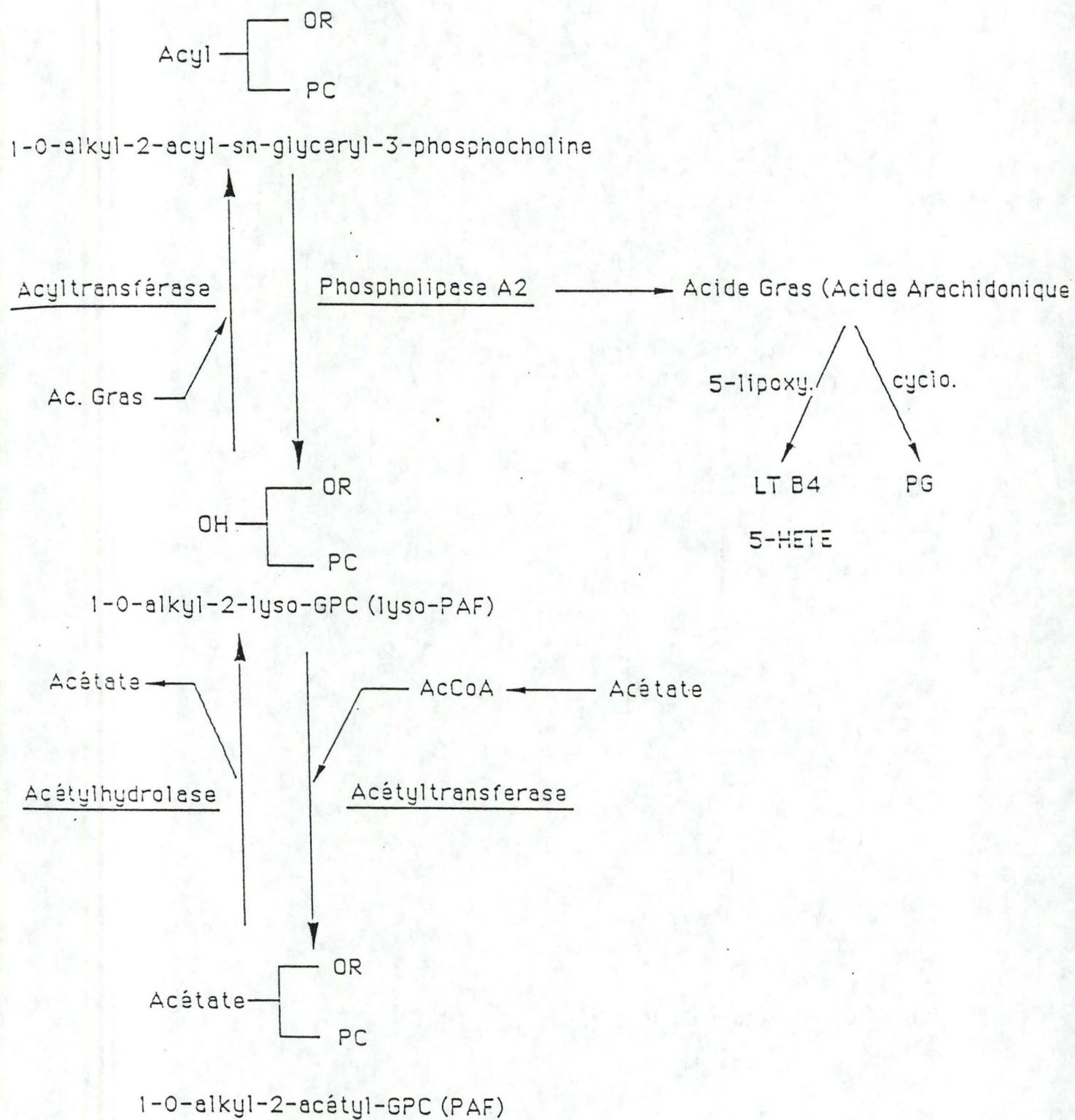


Figure 5 : Représentation schématique de la synthèse et du métabolisme du PAF.

(PC=phosphocholine, PG=prostaglandine, LTB4=leucotriène B4, R=(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub>).

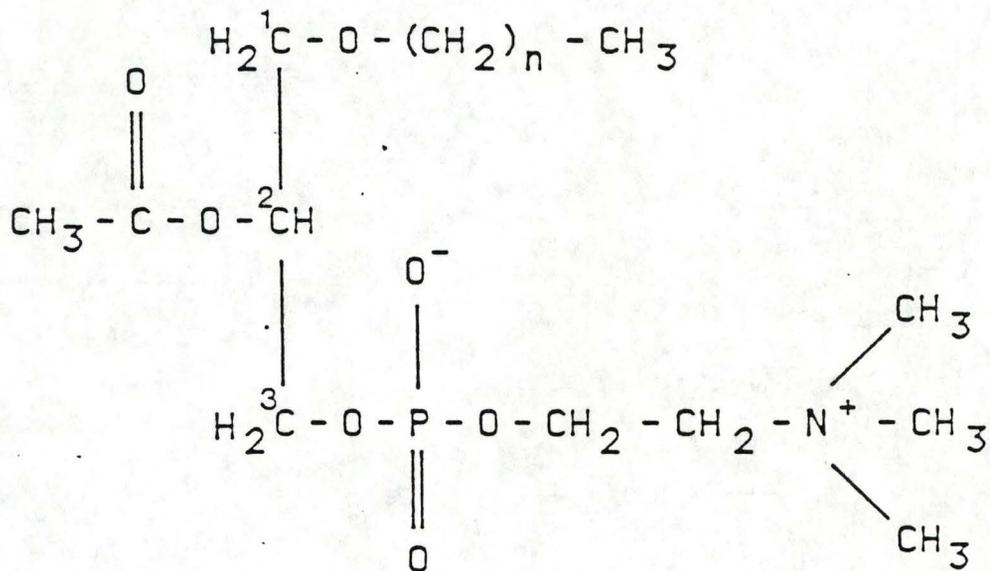


Figure 6 : Structure du PAF (n=15 ou 17).

de l'acide arachidonique et du 1-O-alkyl-2-lyso-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (figure 5).

L'acide arachidonique est l'acide gras préférentiellement libéré; pour expliquer ce fait, différents auteurs ont émis des hypothèses :

- La localisation spécifique de cet acide en position 2-acyl implique sa libération lors de l'action de la PLA2 (CRASTES DE PAULET, 1983).
- Il existerait des lipases spécifiques de l'arachidonate (VAN DEN BOSCH, 1980).
- CHILTON (1983) a démontré, pour sa part, que la réacylation du lyso-PAF se fait préférentiellement avec de l'acide arachidonique, ce qui contribue à enrichir l'alkyl acyl GPC en cet acide gras. Les métabolites de la PLA2 vont alors servir de substrats à la cascade de l'acide arachidonique et à la synthèse du PAF.

## 2.1) Le platelet-activating factor (PAF)

### 2.1.1) Structure du PAF.

Le platelet activating factor est un phospholipide aux actions très toxiques, de structure 1-O-alkyl-2-O-acétyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (figure 6).

Ce phospholipide se caractérise par le fait que l'acide gras en position *sn*-1 est lié au premier carbone du glycérol par une liaison ether et non par une liaison ester.

Il est produit par de nombreuses cellules inflammatoires et notamment les neutrophiles (BENVENISTE, 1985 ; O' FLAHERTY *et al.*, 1983).

### 2.1.2) Biosynthèse du PAF.

Comme nous l'avons déjà vu, la phospholipase A2 activée libère à partir des phospholipides membranaires du lyso-PAF. Ce composé va soit former du PAF par acétylation en position 2 sous l'action d'une acétyltransférase, soit reformer le phospholipide de départ en se réacylant sous l'action d'une acyltransférase (figure 5) (BENVENISTE, 1985).

### 2.1.3) Catabolisme du PAF.

Un contrôle strict du taux de PAF dans le sang et les autres tissus est nécessaire du fait de sa très grande réactivité. C'est pourquoi le PAF est rapidement catabolisé sous l'action d'une acétylhydrolase qui lui enlève son groupement acétyl. Il apparaît que le lyso-PAF ainsi libéré n'est pas détruit mais qu'il est réacylé par une acyltransférase (figure 5).

En résumé, nous pouvons dire que la biosynthèse et la dégradation se font suivant un cycle de déacylation-réacylation (O'FLAHERTY *et al.*, 1983 ; BENVENISTE, 1985).

### 2.1.4) Activité biologique du PAF.

Le PAF est un médiateur très puissant que l'on trouve impliqué dans différents processus :

- le PAF joue plusieurs rôles importants dans la réaction inflammatoire :
  - \* il stimule l'agrégation et la dégranulation des plaquettes
  - \* c'est un facteur d'activation du neutrophile chez lequel il induit le chimiotactisme, l'agrégation, la libération des enzymes lysosomiales et des anions superoxydes
  - \* il augmente la perméabilité vasculaire

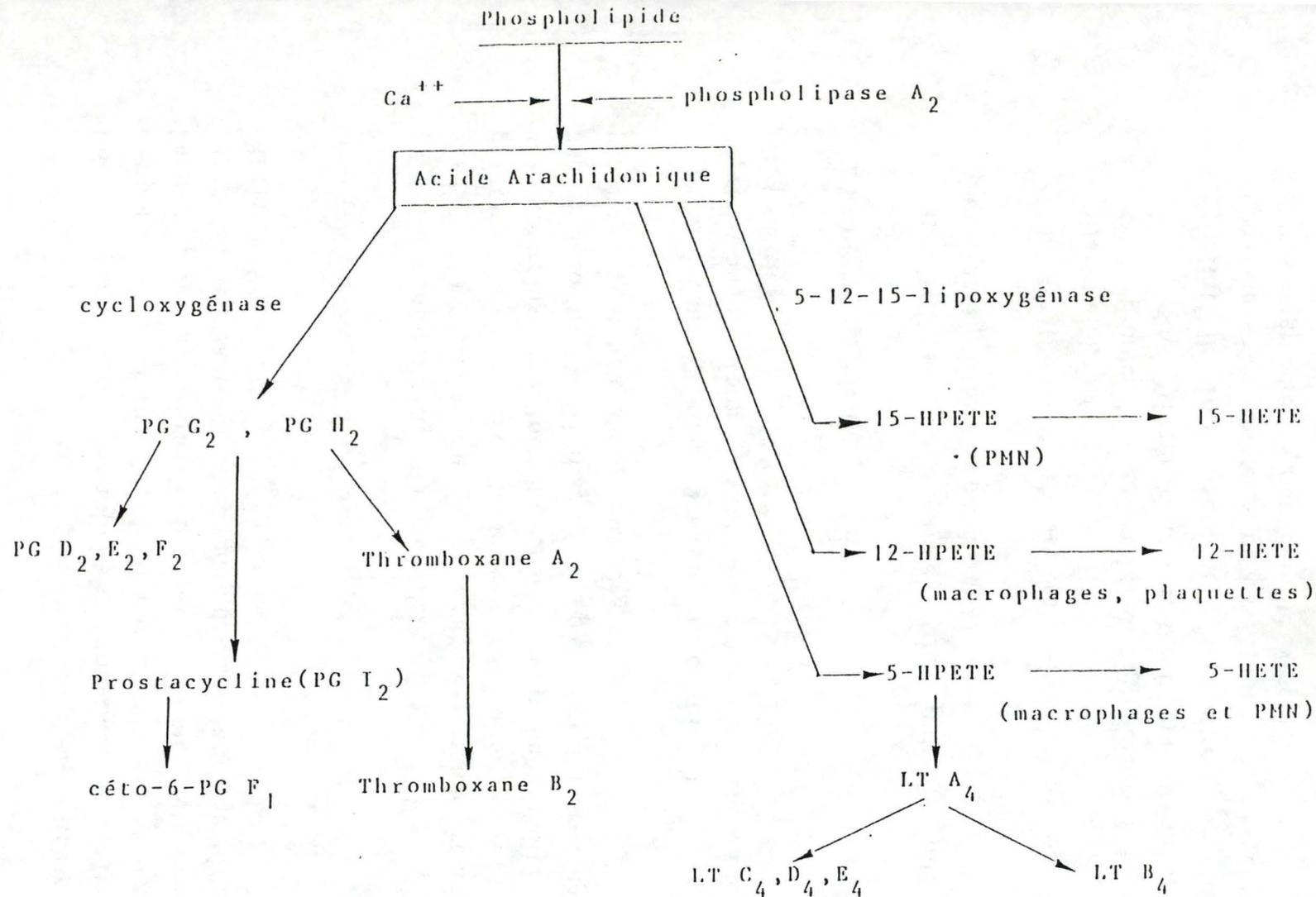


Figure 7 : Schéma général du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclooxygénase et les lipoxygénases (BLOTMAN *et al*, 1983). (PG=prostaglandine, HPETE=acide hydroperoxy éicosatétraénoïque, HETE=acide hydroxy éicosatétraénoïque).

- il intervient aussi dans l'asthme, car le PAF est l'agent bronchoconstricteur le plus puissant jamais décrit
- il provoque des arythmies cardiaques et un disfonctionnement du myocarde
- il provoque l'exsudation du plasma, l'hémoconcentration et l'hypotension (BENVENISTE, 1985; O'FLAHERTY *et al*, 1983).
- le PAF provoque l'ulcère gastrique (ROSAM *et al*, 1986).

## 2.2) La cascade de l'acide arachidonique.

La phospholipase A2 activée libère du lyso-PAF mais également de l'acide arachidonique (figure 5). Celui-ci va alors être métabolisé :

- en prostaglandines et thromboxanes par la voie de la cyclooxygénase,
- en leucotriènes et HETE's par la voie des 5, 12, 15 lipoxygénases (BLOTMAN *et al*, 1983).

Ce métabolisme est illustré à la figure 7, qui rend compte de la complexité et de la variété des médiateurs formés.

Cependant le rôle de la PLA2 ne semble pas limité à la libération d'acide gras polyinsaturés (AGPI) et ainsi au contrôle de la production d'icosanoïdes (PG et LT). Elle contrôle aussi la "fluidité" membranaire et le flux de calcium, par les modifications que son action apporte sur l'organisation du film lipidique membranaire (diminution des AGPI, apparition de lysophospholipides ionophores).

Par hydrolyse de la liaison 2-acyl des O-alkyl phospholipides, elles contrôlent la production de lyso-PAF. Elles participent

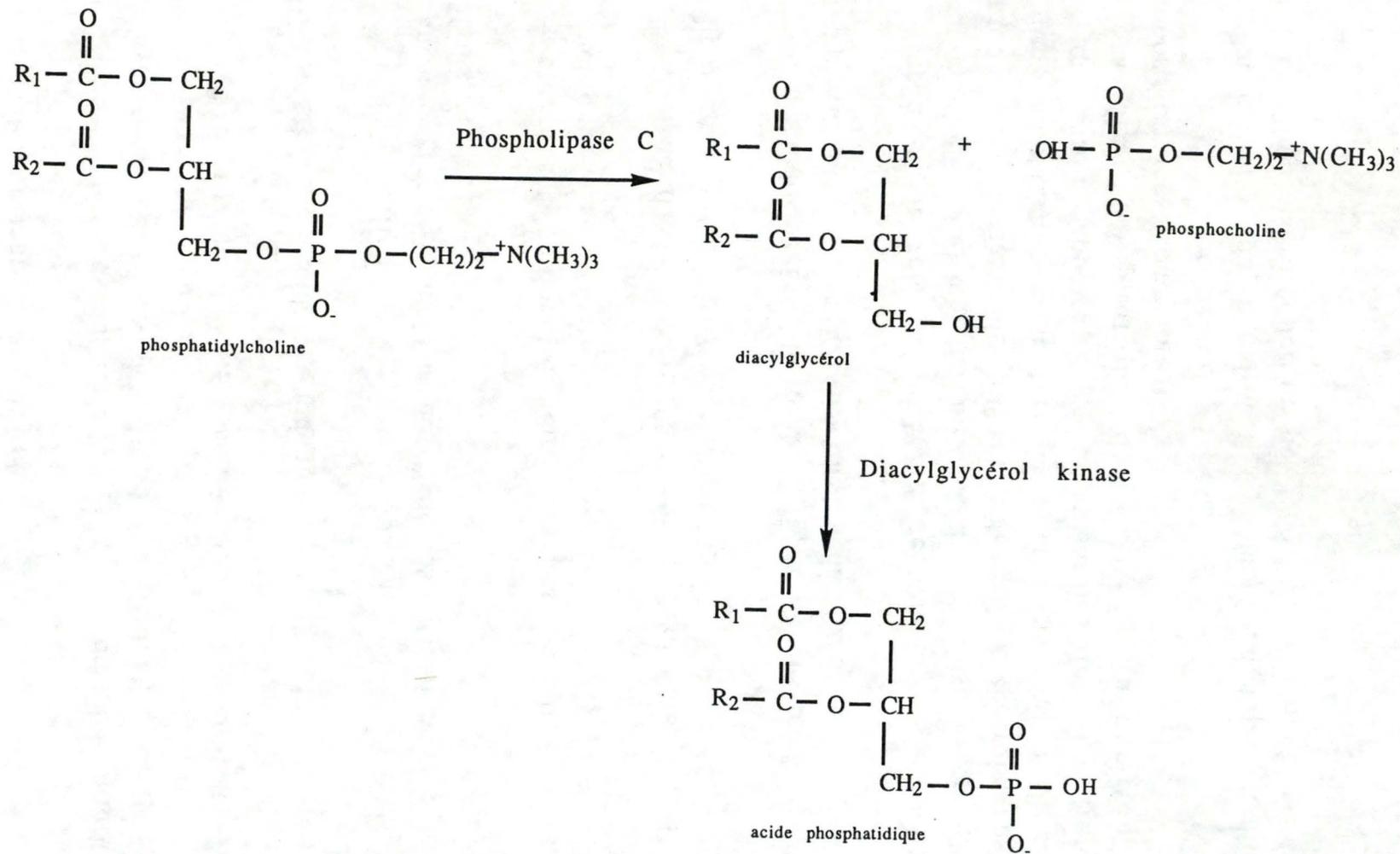


Figure 8 : Schématisation de l'action de la phospholipase C sur la phosphatidylcholine et de la diacylglycérol kinase sur le diacylglycérol.

également au contrôle du renouvellement des acides gras des phospholipides membranaires. Elles pourraient enfin jouer un rôle critique dans la protection de la cellule contre les dommages résultant des réactions de peroxydation affectant les AGPI des lipides membranaires. Les PLA2 membranaires pourraient participer à l'élimination sélective de ces acides gras "endommagés", les rendant ainsi accessibles aux enzymes "protecteurs", et contribuer, via le cycle déacylation-réacylation, au maintien de l'intégrité membranaire (CRASTES DE PAULET, 1983).

### 3) Action de la phospholipase C sur les phospholipides.

Une autre voie du métabolisme des phospholipides membranaires passe par les phospholipases C, qui sont de deux types :

- celles qui agissent sur les phospholipides en général
- celles qui sont spécifiques du phosphatidylinositol

#### 3.1) Métabolisme des phospholipides en général.

Lorsqu'un ligand spécifique se lie au récepteur d'une phospholipase C, cette liaison provoque son activation. La lipase va agir sur les phospholipides membranaires et les scinder en diacylglycérol (DAG) et en phosphocholine (dans le cas où le phospholipide précurseur était le phosphatidylcholine). Le diacylglycérol va alors être transformé en acide phosphatidique (PA) sous l'action d'une diacylglycérol kinase (CRASTES DE PAULET, 1983; KANOH *et al*, 1990). Les réactions sont représentées à la figure 8.

#### 3.2) Métabolisme du phosphatidylinositol.

L'occupation de certains récepteurs par leur ligand spécifique détermine l'activation d'une phospholipase C hautement spécifique

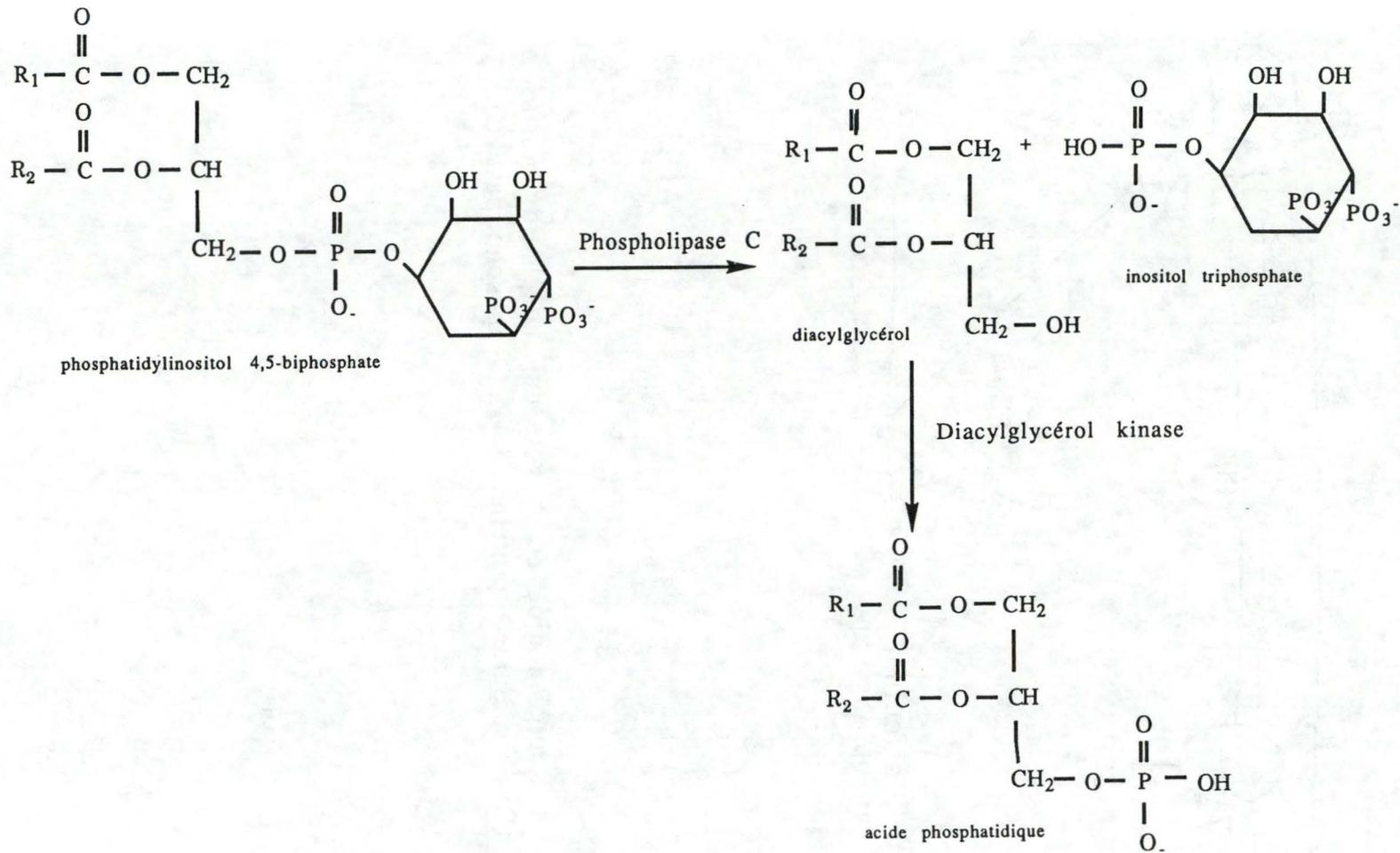


Figure 9 : Schématisation de l'action de la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate.

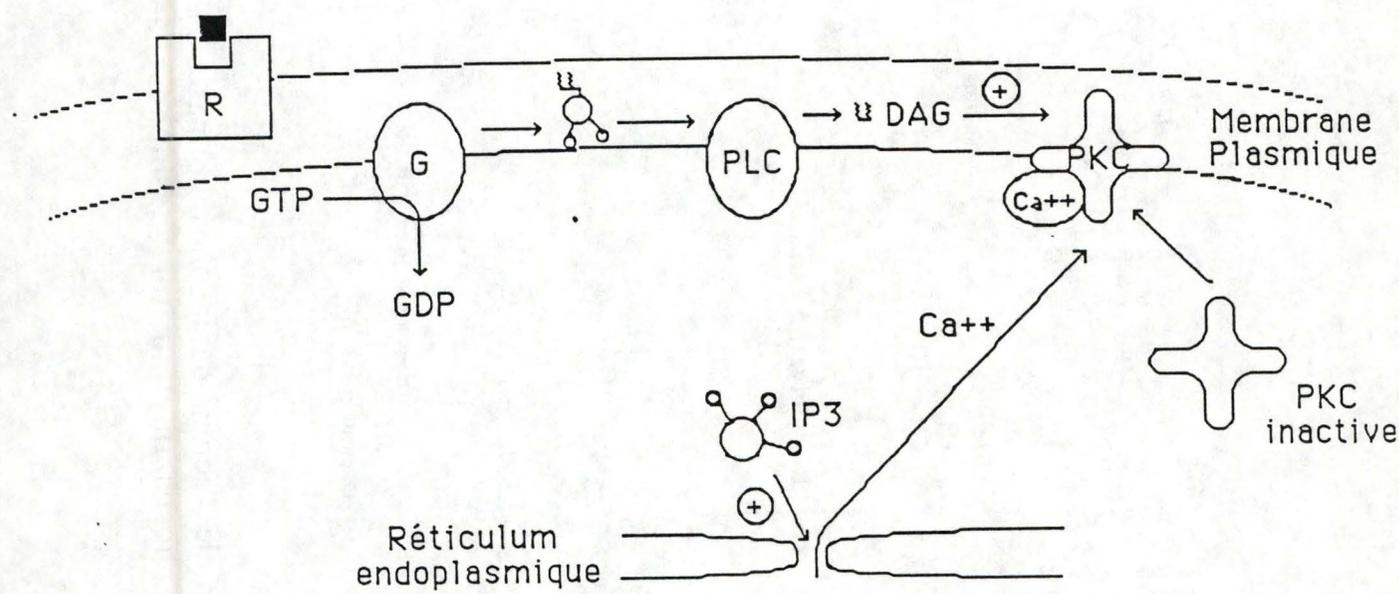


Figure 10 : Représentation de la voie du phosphatidylinositol (R=récepteur, G=protéine G, PLC=phospholipase C).

du phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>); il y a libération de diacylglycérol et d'inositol triphosphate. Ce diacylglycérol, sous l'action d'une diacylglycérol kinase, est converti en acide phosphatidique. Les réactions sont reprises à la figure 9.

Les métabolites des phospholipases C et de la diacylglycérol kinase sont des "messagers" qui vont avoir un rôle extrêmement important.

1) Les acides phosphatidiques, et en particulier ceux ayant un acide gras polyinsaturé en C<sub>2</sub>, se comportent comme un ionophore calcique. Il s'ensuit une entrée de calcium qui va déclencher l'activation des PLA<sub>2</sub> membranaires : il en résulterait la libération d'arachidonate, et de lysophospholipides (BLOTMAN *et al*, 1983).

2) Les diacylglycérols formés par action des phospholipases C sont riches en AGPI en position 2. De tels diglycérides activent une protéine-kinase Ca<sup>2+</sup>-phospholipido-dépendante. Un des effets de l'activation de cette protéine kinase pourrait être la phosphorylation de la lipomoduline, ce qui libérerait la PLA<sub>2</sub> du complexe (PLA<sub>2</sub>-lipomoduline-Ca<sup>2+</sup>), permettant ainsi l'accès du Ca<sup>2+</sup> au site catalytique de la PLA<sub>2</sub>, d'où l'activation de cette enzyme (CRASTES DE PAULET, 1983).

3) L'IP<sub>3</sub> agit principalement en provoquant la libération d'ions calcium à partir du réticulum endoplasmique (BERRIDGE, 1985).

Tous ces composés font partie de la voie de l'inositol phosphate qui est une des voies de la communication cellulaire (figure 10).

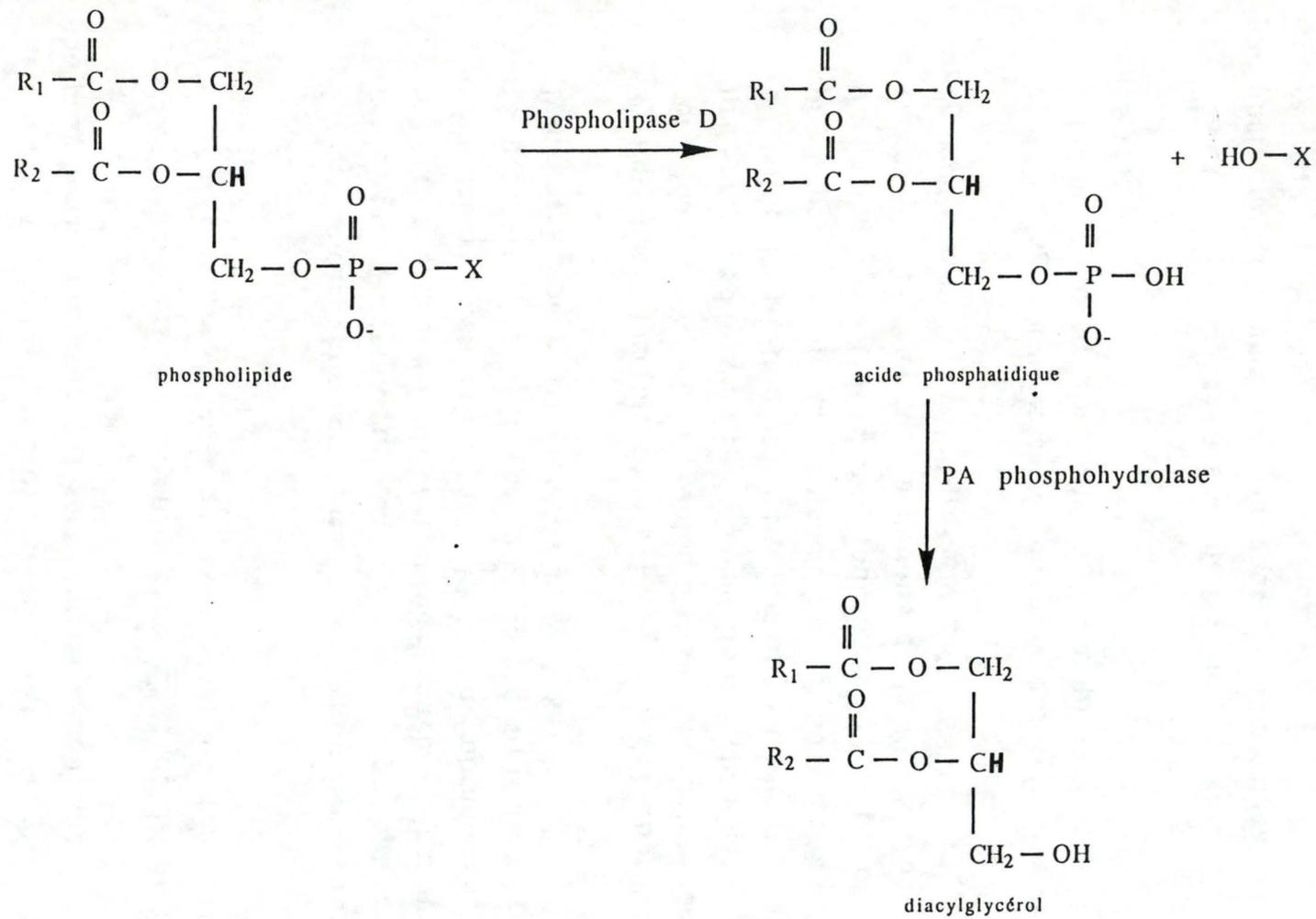


Figure 11 : Schématisation de l'action de la phospholipase D sur les phospholipides membranaires.

#### 4) Action de la phospholipase D sur les phospholipides.

La stimulation de la PLC entraîne la formation de diacylglycérols et l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium. Ces deux événements ont pour effet d'activer les protéines kinases, comme nous venons de le voir, mais ils peuvent aussi agir sur la phospholipase D (PLD) (BILLAH *et al*, 1989 b).

La PLD, lorsqu'elle est activée, agit sur les phospholipides membranaires et donne de l'acide phosphatidique. Ce composé peut être alors hydrolysé sous l'action d'une PA phosphohydrolase et donner ainsi un diacylglycérol (BILLAH *et al*, 1989 a). La figure 11 illustre ces réactions.

## POSITION DU PROBLEME ABORDE DANS CE TRAVAIL

La réaction inflammatoire est un phénomène très complexe faisant intervenir une multitude de médiateurs et de cellules. Le PMN neutrophile est une de ces cellules, dont le rôle est des plus importants. En effet, d'une part il participe activement à l'élimination des substances étrangères en les digérant grâce à deux processus : la production de radicaux superoxydes et la dégranulation. D'autre part, le PMN produit différents médiateurs lipidiques tels que le PAF, le LTB<sub>4</sub> et le 5-HETE qui vont alors amplifier la réaction inflammatoire.

Etant donné le rôle fondamental du PMN, celui-ci constitue un bon modèle pour l'étude des mécanismes responsables de la dégranulation survenant dans ces cellules lors de la réaction inflammatoire.

Une approche de ce problème consiste à étudier les mécanismes biochimiques contrôlant le déroulement des processus physiologiques caractéristiques de l'activation du PMN. Dans cette approche, la production des médiateurs lipidiques consécutive à la dégradation des phospholipides membranaires présente un intérêt central puisqu'elle est un des premiers événements liant la rencontre du PMN et des agents inflammatoires, au niveau de la membrane plasmique, et les réactions physiologiques du PMN.

La production de médiateurs dérivant de l'activité de la phospholipase A<sub>2</sub> fut étudiée, notamment dans ce laboratoire. Cette étude a permis de montrer que le PAF pouvait jouer un rôle de médiateur de la production de radicaux superoxydes par le PMN activé.

Il existe cependant d'autres médiateurs importants, dérivés des phospholipides par l'action des phospholipases C et D, comme les inositol phosphates et les diacylglycérols, qui peuvent contrôler l'activation du PMN. Les inositol phosphates (IP3) sont impliqués dans la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et les diacylglycérols seraient responsables de l'activation de la protéine kinase C phosphorylant des protéines impliquées dans les réponses physiologiques du PMN.

Les voies d'activation décrites à ce jour sont donc très diverses et l'on ne dispose pas encore d'un schéma liant les divers événements biochimiques observés lors de l'activation du PMN.

Dans ce travail, nous aborderons l'étude du processus de dégranulation spécifique du PMN bovin. Nous voudrions savoir si le PAF synthétisé lors de la stimulation du PMN est un des médiateurs de la dégranulation. Si ce n'est pas le cas, nous envisagerons le rôle éventuel de la protéine kinase C et des phospholipases.

Notre travail nécessitera la mise au point du dosage du PAF par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse et la mise au point du test de dégranulation. Les différentes voies impliquées dans la dégranulation seront étudiées au moyen des stimulateurs et des inhibiteurs dont nous disposons.

## MATERIEL ET METHODE

### 1) Préparation des polymorphonucléaires de bovins.

#### 1.1) Solutions.

A = solution de NaCl 0,7 % tamponnée à pH 6,8 par une solution phosphate 0,25 M.

B = solution de NaCl 2,7 % tamponnée à pH 6,8 par une solution phosphate 0,25 M.

C = solution d' EDTA 1,5 % préparée dans la solution A.

H = solution de Hanks non modifiée

composition : 136,90 mM NaCl; 0,50 mM glucose;  
4,20 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,49 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O;  
0,41 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.H<sub>2</sub>O  
tamponnée à pH 7,4.

Les sels, l'EDTA, le glucose sont fournis par Merck, Darmstadt, RFA. Le NaCl provient de chez Janssen Chimica, Beerse, Belgium.

#### 1.2) Méthode.

- récolter le sang dans une bouteille de 1 l contenant 100 ml de la solution C.
- répartir le sang dans 6 bouteilles de centrifugation de 250 ml.
- centrifuger pendant 20 minutes à 2 000 RPM dans le rotor JA 14 (Beckman, J-21B).
- aspirer le surnageant contenant les plaquettes, ainsi que la couche de lymphocytes et de monocytes qui recouvre le culot contenant les érythrocytes et les leucocytes polymorphonucléaires.

- les érythrocytes sont lysés par un premier choc osmotique :
  - ajouter 100 ml d'eau distillée à chaque bouteille, agiter 35 secondes
  - ajouter 50 ml de la solution B pour rétablir l'isotonicité
- centrifuger pendant 20 minutes à 1 000 RPM dans le rotor JA 14 (Beckman, J-21B).
- aspirer le surnageant contenant les érythrocytes lysés.
- resuspendre les culots contenant les neutrophiles dans 10 ml de la solution A.
- rassembler tous les culots dans une bouteille.
- centrifuger pendant 20 minutes à 1 000 RPM dans le rotor JA 14 (Beckman, J-21B).
- aspirer le surnageant et resuspendre le culot dans 10 ml de la solution A.
- les derniers érythrocytes sont lysés par un second choc hypotonique :
  - ajouter 50 ml d'eau distillée
  - ajouter 25 ml de la solution B pour rétablir l'isotonicité
- centrifuger 20 minutes à 1 000 RPM au rotor JA 14 Beckman, J21-B).
- le culot de PMN purifiés est resuspendu dans 10 ml de la solution de Hanks non modifiée.
- comptage à l'hémocytomètre (chambre de Neubauer) pour estimer la quantité de PMN purifiés (Diluer 100X).

## 2) Dosage de la protéine fixant la Vitamine B12. (Vit B12)

### 2.1) Principe.

La protéine fixant la Vit B12 est un excellent marqueur des granules spécifiques des PMN neutrophiles de bovins et lors de la dégranulation induite par divers stimulateurs solubles ou particulaires, 50 à 80 % du contenu cellulaire sont libérés dans le milieu d'incubation (GENNARO *et al*, 1983).

Pour le dosage, nous utilisons de la Vit B12 marquée au  $^{57}\text{Co}$ , qui va se lier à la protéine fixant la Vit B12. L'excès de Vit B12 radioactive non fixée est éliminée par l'addition d'une solution de charbon activé-albumine, suivie d'une centrifugation (ABSOLOM, 1986).

La quantité de Vit B12 présente dans le surnageant est donc proportionnelle à la quantité de protéine liant la Vit B12 et représente le taux de dégranulation des PMN.

Lors de ces dosages, nous ajoutons un inhibiteur de trypsine à raison de 50  $\mu\text{g/ml}$  (Trypsin inhibitor type 1 S from soybean, Sigma, St Louis, USA) au milieu d'incubation des PMN, pour empêcher toute dégradation protéolytique de la protéine fixant la Vit B12 (DEWALD *et al*, 1989).

## 2.2) Dosage.

### 2.2.1) Solutions.

- solution de  $^{57}\text{Co}$  Vit B12 10,5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 0,7  $\mu\text{g/ml}$  (Amersham, Buckinghamshire, UK).
- solution de charbon activé-albumine  
= solution de charbon activé 5% (Merck, Darmstadt, RFA) à laquelle on ajoute un volume égal d'une solution de sérum albumine bovine 1% (Sigma, St Louis, USA).
- solution de sérum albumine bovine (SAB) 0,5% (Sigma, St Louis, USA).
- solution de NaCl 0,15 M (Janssen Chimica, Beerse, Belgium).

### 2.2.2) Méthode.

La protéine fixant la Vit B12 est relarguée lors de la dégranulation spécifique dans le surnageant des neutrophiles; c'est ce dernier qui nous sert d'échantillon lors de notre dosage.

- mettre dans un tube à essai en plastique
  - 1,8 ml de la solution de NaCl 0,15 M
  - 80 µl du surnageant des PMN stimulés
  - 1 ml de la solution de  $^{57}\text{Co}$  Vit B12
- mélanger et laisser incuber 30 minutes
- ajouter 2 ml de la solution de charbon activé-albumine
- mélanger et laisser incuber 15 minutes
- centrifuger pendant 10 minutes à 3 300 RPM à la centrifugeuse de table (Hettich Universal).
- prélever 2 ml du surnageant
- lire la radioactivité au compteur gamma (LKB WALLAC, 1275 MINIGAMMA) pendant 15 secondes

Lors du dosage, nous avons réalisé chaque fois :

- deux contrôles :  
dans 2 tubes, remplacer la solution de charbon activé-albumine par une solution d 'albumine à 0,5%.  
Ces tubes permettent de connaître la radioactivité totale ajoutée.
- deux blancs :  
dans 2 tubes, remplacer l'échantillon par un volume égal de la solution de NaCl 0,15 M.  
Ces tubes constituent les blancs.

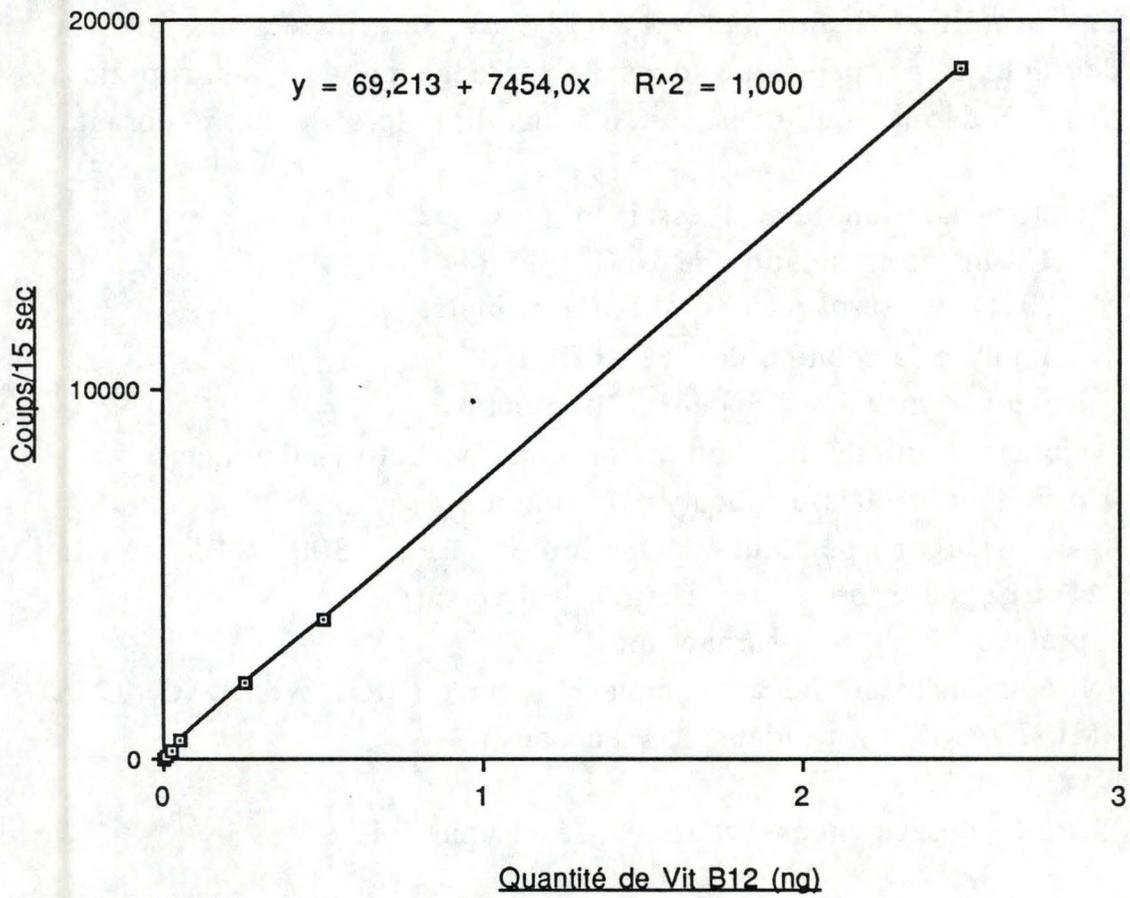


Figure 12 : Relation entre le nombre de coups/15 sec et la quantité de Vit B12.

### 2.2.3) Calcul des résultats.

La quantité de  $^{57}\text{Co}$  Vit B12 liée à la protéine fixant la Vit B12 pour  $10^7$  PMN est donnée par la relation suivante :

quantité de  $^{57}\text{Co}$  Vit B12 (ng/ $10^7$  PMN)

$= 31,25 \times$  nombre de coups de l'échantillon

moyenne des coups des tubes non traités avec la solution de charbon activé-albumine

La quantité de  $^{57}\text{Co}$  Vit B12 fixée doit être inférieure à 80% et supérieure à 10% de la radioactivité ajoutée, cette dernière étant donnée par les tubes où la solution de charbon activé-albumine a été remplacée par la solution d'albumine 0,5%.

### 2.2.4) Mise au point.

Comme le montre la figure 12, nous obtenons une relation linéaire entre le nombre de coups/15 sec et les différentes concentrations en  $^{57}\text{Co}$  Vit B12.

Pour nos dosages, nous avons travaillé avec une solution qui contenait 2,5 ng de  $^{57}\text{Co}$  Vit B12 par ml, soit 2,5 ng/test. L'addition de 80  $\mu\text{l}$  d'un lysat de  $10^7$  PMN (1 ml) entraîne la fixation d'un peu moins de 80% de la Vit B12 ajoutée.

### 3) Dosage du PAF par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

D'après la méthode décrite par RAMESHA *et al* (1986).

### 3.1) Dosage.

#### 3.1.1) Préparation du PAF.

##### 3.1.1.1) Production du PAF.

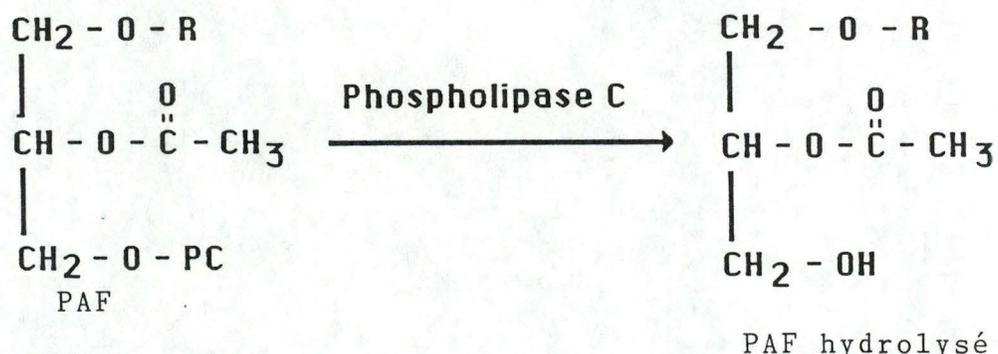
- stimuler de façon adéquate  $30 \times 10^6$  PMN bovins/ml
- arrêter la stimulation en ajoutant 3,75 ml d'une solution  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1; 2)
- ajouter 5 ng de PAF deutéré, celui-ci constitue le standard interne
- agiter pendant 20 minutes sur évapo-mix (Buchler instruments, Fort Lee, N. J., USA)
- centrifuger à 1 000 RPM pendant 10 minutes à la centrifugeuse de table pour sédimenter le matériel insoluble
- reprendre le surnageant dans des tubes coniques
- ajouter 1,25 ml de  $\text{CHCl}_3$  et vortexer 30 secondes
- ajouter 1,25 ml d'eau et vortexer 30 secondes
- centrifuger à 1 900 RPM pendant 5 minutes à la centrifugeuse de table pour obtenir une bonne séparation des phases
- récupérer la phase organique inférieure contenant le PAF

##### 3.1.1.2) Purification du PAF.

- conditionner les colonnes de silice (code RPN 1963 3 ml, Amersham, Buckinghamshire, UK) avec 5 ml de MeOH et ensuite avec 5 ml de  $\text{CHCl}_3$
- déposer l'échantillon et le laisser pénétrer lentement
- laver les colonnes avec 6 ml de  $\text{CHCl}_3$ , puis 6 ml de MeOH
- éluer avec 6 ml d'une solution  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$  (53; 26; 21)
- évaporer à sec sous un flux d'azote

### 3.1.1.3) Hydrolyse du PAF.

D'après la méthode décrite par BOSSANT *et al* (1987). Cette hydrolyse se fait suivant la réaction :



#### 1) solutions.

- tampon Tris-CaCl<sub>2</sub>, 50 mM/50 mM tamponnée à pH 8,0
- solution de phospholipase C (*Bacillus cereus*) contenant 0,3 mg par ml (Sigma, St Louis, USA)

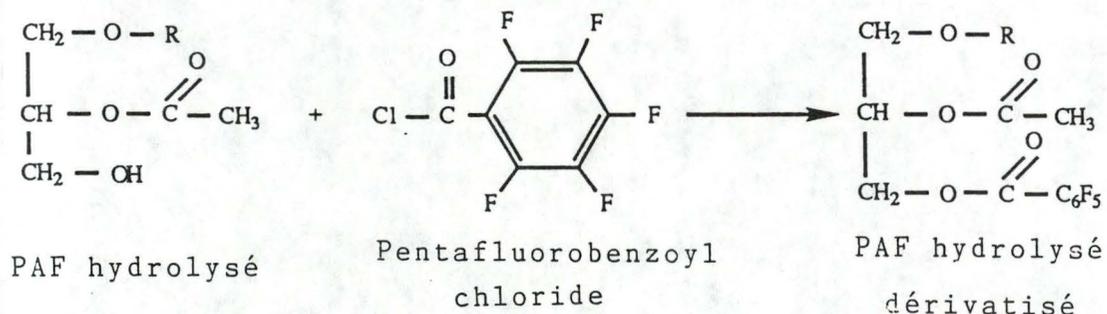
#### 2) méthode.

- ajouter 1 ml de la solution de phospholipase C à chaque tube contenant le PAF purifié
- incuber 1 heure à température ambiante avec agitation sur évapo-mix (Buchler instruments, Fort Lee, N.J., USA)
- prélever la phase organique inférieure contenant le PAF hydrolysé dans des tubes coniques
- évaporer à sec sous un flux d'azote

Le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>), le méthanol (MeOH) et le dichlorométhane sont fournis par Janssen Chimica, Beerse, Belgium.

### 3.1.1.4) Dérivatisation du PAF.

La dérivation du PAF se fait suivant la réaction :



Cette étape avant le passage au GC-MS a pour buts :

- de rendre le PAF plus apolaire pour permettre l'analyse par chromatographie gazeuse; en effet on remplace un groupement OH par un cycle benzénique avec 5 fluors, ce qui rend la molécule plus volatile.
- de permettre la détection de la molécule, car on travaille en ionisation chimique négative et cette dernière se fera facilement grâce aux atomes de fluor qui sont très électrophiles.

#### pour la dérivation

- ajouter à chaque tube contenant le PAF hydrolysé 50 µl de pentafluorobenzoyl chloride (Aldrich, Bruxelles, Belgium)
- chauffer à 120° C dans un bain de sable pendant 45 minutes
- évaporer à sec sous un flux d'azote
- ajouter au résidu sec 50 µl d'acétate d'éthyle (Analyticals, Farmitalia Carlo Erba, Milan, Italie)

### 3.1.1.5) Analyse au GC-MS.

#### 1) La chromatographie en phase gazeuse (GC).

Le chromatographe gazeux (Hewlett-Packard type 5890) comporte une colonne capillaire en silice fondue de 25 m de long et de diamètre intérieur de 0,32 mm. La phase stationnaire est constituée de 5% phényl/95% méthyl silicone et l'épaisseur du film est de 0,17  $\mu\text{m}$ . Le gaz vecteur est l'hélium. La température de l'injecteur est de 290° C. La température de la colonne est de 220° C pendant une minute et augmente ensuite jusqu'à 280° C à raison de 10° C par minute.

Le passage du chromatographe gazeux au spectromètre de masse se fait par une ligne de transfert direct.

#### 2) Le spectromètre de masse (MS).

Le spectromètre de masse (Hewlett-packard, type 5988A) permet de mesurer l'abondance des ions en fonction de leur rapport masse/charge.

Au laboratoire, pour la détection du PAF, nous utilisons le mode d'ionisation négative, celle-ci se déroule dans la chambre d'ionisation. En présence de gaz sous pression, les électrons émis par le filament chauffé voient leur énergie et leur vitesse diminuer. De tels électrons sont dits "thermalisés", ils peuvent être captés par le groupement pentafluorobenzoyl très électrophile du PAF dérivatisé et rendre ce dernier négatif, ce qui permettra sa détection.

Cette ionisation est qualifiée de douce car elle cause très peu de fragmentation, ce qui permet d'avoir un signal intense pour une seule masse.

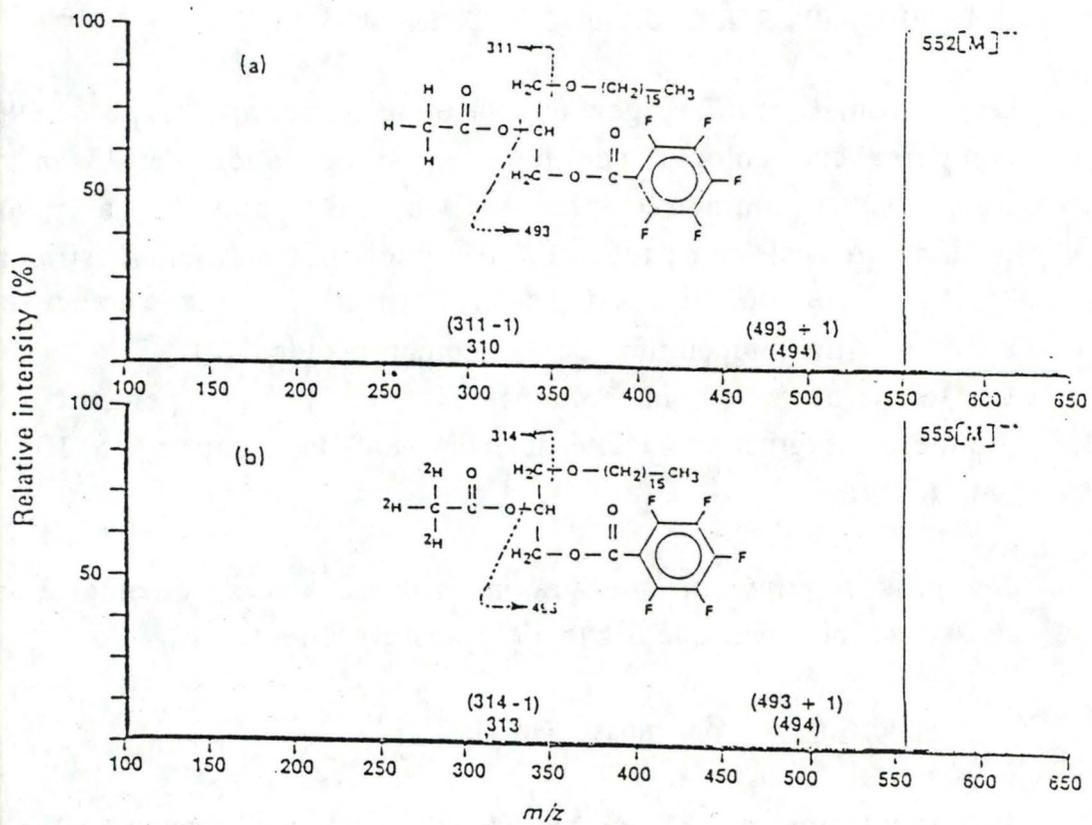


Figure 13 : Spectres de masse du PAF dérivatisé (a) et du D<sub>3</sub>PAF dérivatisé (b).

A la figure 13 sont représentés les spectres de masse du PAF dérivatisé et du D<sub>3</sub>PAF dérivatisé obtenus après analyse au GC-MS. On constate que ces molécules sont très peu fragmentées et qu'elles sont presque exclusivement représentées par l'ion 552 et l'ion 555 respectivement.

Les ions ainsi obtenus arrivent dans l'analyseur et sont soumis à l'action conjuguée d'un champ électrique continu et d'un champ électrique alternatif produits entre deux paires de barres (quadrupôle). Selon l'amplitude et la fréquence des tensions alternative et continue, seuls les ions d'un rapport masse/charge spécifique suivent une trajectoire stable et atteignent le détecteur.

Remarque :

L'ion 552 correspond au PAF dérivatisé, c'est-à-dire à la masse du PAF à laquelle il faut ajouter la masse du groupement pentafluorobenzoyl. Quant à l'ion 555, il correspond au D<sub>3</sub>PAF dérivatisé, c'est-à-dire le PAF dérivatisé + 3 car trois atomes de deutérium sont présents au lieu de trois atomes d'hydrogène.

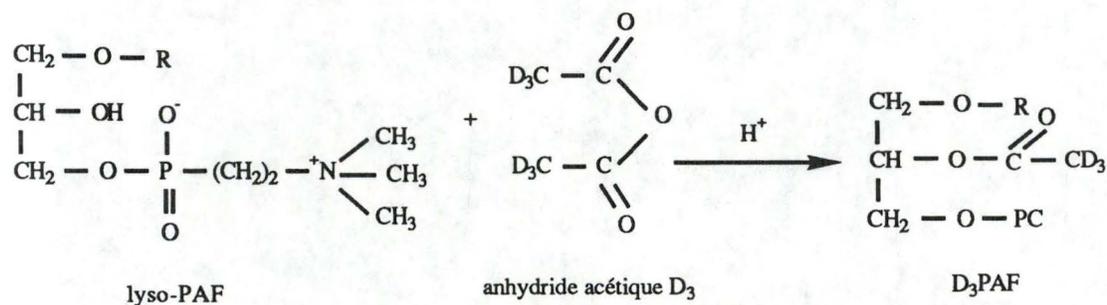
### 3.1.2) Préparation du PAF deutéré (D<sub>3</sub>PAF).

D'après la méthode décrite par KUMAR *et al* (1984).

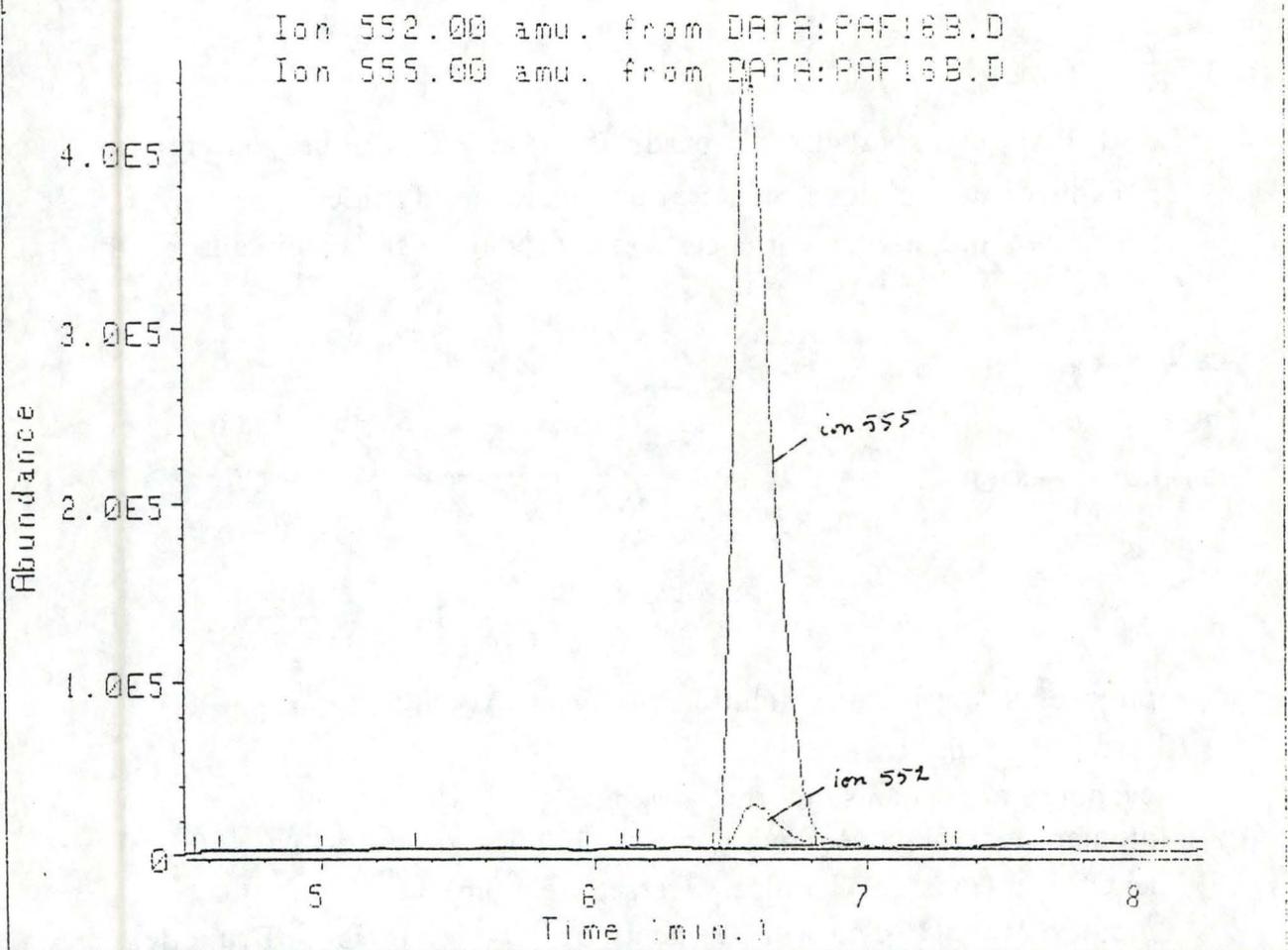
Le PAF deutéré sert de standard interne, et cela suppose qu'il a le même comportement que le PAF produit par les PMN lors des différents traitements tels que les extractions, les purifications sur colonne de silice, l'hydrolyse à la phospholipase C, la dérivatisation.

Le D<sub>3</sub>PAF est synthétisé à partir de lyso-PAF auquel on ajoute de l'anhydride acétique deutéré en présence d'acide.

La réaction qui a lieu entre ces deux produits est la suivante :



- prélever 100 µl d'une solution de lyso-PAF à 5 mg/ml (Sigma, St Louis, USA)
- évaporer à sec sous un flux d'azote
- ajouter au résidu sec qui contient 500 µg de lyso-PAF, 500 µl de CHCl<sub>3</sub> (Janssen Chimica, Beerse, Belgium)
- ajouter 100 µl d'anhydride acétique D<sub>3</sub> (Aldrich, Bruxelles, Belgium), mélanger pendant 30 secondes
- ajouter 50 µl d'acide perchlorique 12N (Merck, Darmstadt, RFA)
- mélanger pendant 10 secondes
- refroidir le tube dans de la glace
- ajouter au tube 1,8 ml d'eau froide, 1,95 ml de CHCl<sub>3</sub> et 2 ml de MeOH (Janssen Chimica, Beerse, Belgium)
- centrifuger pour obtenir une bonne séparation des phases pendant 5 minutes à 1 900 RPM à la centrifugeuse de table
- éliminer la phase aqueuse supérieure (eau+méthanol)
- laver la phase organique 3 fois avec 3,8 ml d'une solution MeOH/eau (10;9)
- purifier le D<sub>3</sub>PAF sur colonne de silice (cf. 3.1.1.2.)
- hydrolyser le D<sub>3</sub>PAF (cf. 3.1.1.3.)
- dérivatiser le D<sub>3</sub>PAF (cf. 3.1.1.4.)



Ion 552.00 amu. from DATA:PAF16B.D

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	4.579	BB	0.034	41251	4.548	4.628
2	6.591	BB	0.112	<u>2294101</u>	6.102	6.808
3	7.633	BB	0.029	11379	7.329	7.850

Ion 555.00 amu. from DATA:PAF16B.D

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	5.182	BB	0.142	107487	5.006	5.340
2	6.148	BB	0.050	14639	5.975	6.159
3	6.560	BB	0.129	<u>43722466</u>	6.439	7.287

Figure 14 : Chromatogrammes obtenus après injection de 2  $\mu$ l d'une solution contenant 100 ng de D3PAF/100  $\mu$ l et résultats d'intégration qui s'y rapportent. L'ion 552 correspond au PAF contaminant la préparation de D3PAF (ion 555).

### 3.2) Calcul des résultats.

Lors de chaque injection, nous avons obtenu deux chromatogrammes, un qui correspondait au PAF (ion 552) et l'autre au D<sub>3</sub>PAF (ion 555).

Le rapport masse /charge ainsi que le temps de rétention sont caractéristiques de chaque ion.

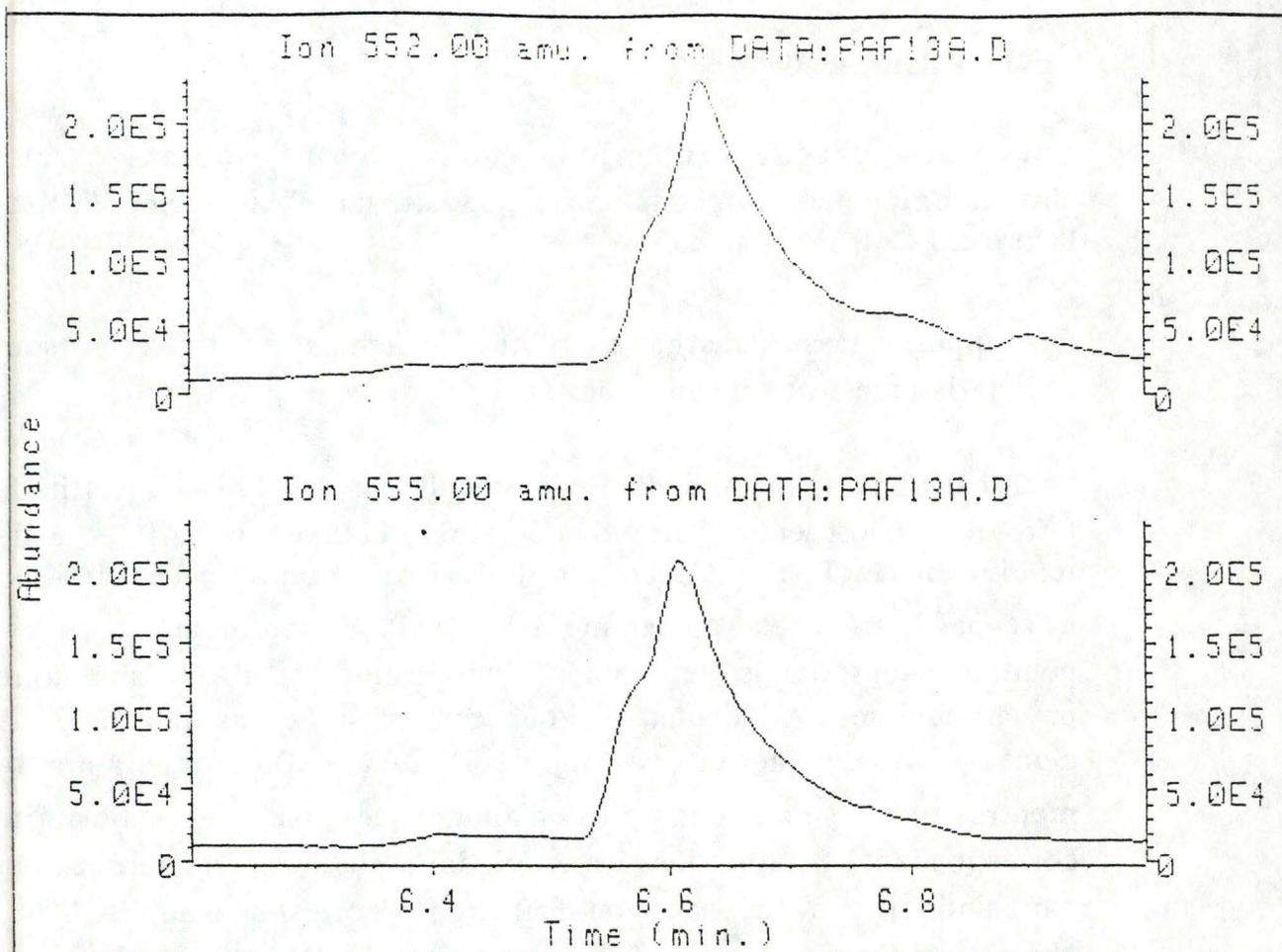
Pour calculer la quantité de PAF produit par les PMN il suffit de faire le rapport entre l'aire d'intégration relative au PAF et celle relative au D<sub>3</sub>PAF. Cependant le D<sub>3</sub>PAF ajouté à l'échantillon n'est pas pur et est contaminé par du PAF non deutéré. C'est pourquoi nous avons déterminé la proportion de PAF dans notre préparation de PAF deutéré. Pour cela, nous avons injecté 2 µl d'une solution contenant 100 ng de D<sub>3</sub>PAF/100µl. La figure 14 montre qu'il y a deux pics d'abondance, un pic majoritaire correspondant à l'ion 555 caractéristique du PAF deutéré et un pic minoritaire donné par l'ion 552 et qui correspond au PAF. Nous avons donc déterminé la proportion de PAF contaminant en faisant le rapport entre les aires d'intégration du PAF et du D<sub>3</sub>PAF.

$$\text{proportion de PAF contaminant} = \frac{2\ 294\ 101}{43\ 722\ 466} = 0,05$$

Nous avons introduit ce facteur de correction dans le calcul de la quantité de PAF produit par les PMN puisque la mesure se fait en présence de PAF deutéré comme standard interne :

Quantité de PAF

$$= \frac{\text{aire d'intégration PAF} - 0,05 \times \text{aire d'intégration D}_3\text{PAF}}{\text{aire d'intégration du D}_3\text{PAF}} \times Q$$



Ion 552.00 amu. from DATA:PAF13A.D

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	6.627	BB	0.084	<u>13586536</u>	6.484	6.867
2	6.900	BBA	0.049	332347	6.875	6.979

Ion 555.00 amu. from DATA:PAF13A.D

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	6.409	BB	0.038	99356	6.330	6.455
2	6.610	BB	0.085	<u>12228946</u>	6.517	6.875

Figure 15 : Exemple de chromatogrammes en phase gazeuse obtenus pour le dosage du PAF produit par des PMN stimulés ainsi que les résultats d'intégration qui correspondent aux masses 552 et 555. L'ion 552 correspondant au PAF et l'ion 555 au D<sub>3</sub>PAF.

que nous noterons  $\frac{\text{PAF} - 0,05 \times \text{D}_3\text{PAF}}{\text{D}_3\text{PAF}} \times \text{Q}$

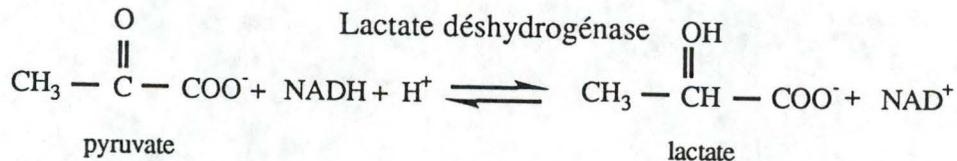
avec Q = quantité de PAF deutéré ajoutée à chaque échantillon = 5 ng.

#### 4) Dosage de la lactate déshydrogénase.

##### 4.1) Principe.

La lactate déshydrogénase (LDH) est un enzyme marqueur du cytoplasme des PMN. Sa présence dans le milieu d'incubation de PMN soumis à divers traitements est utilisée pour détecter une lyse éventuelle des cellules.

La lactate déshydrogénase en présence de pyruvate et de NADH donne du lactate et du NAD<sup>+</sup> suivant la réaction :



L'activité de la lactate déshydrogénase est donnée par la vitesse de disparition du NADH à 340 nm.

##### 4.2) Solutions.

- A= tampon phosphate de K 41 mM à pH 7,5  
= solution stock à conserver au frigo
- B= solution phosphate/pyruvate de Na 0,63mM à pH 7,5  
(Sigma, St Louis, USA)
- C= solution de β-NADH 11,3 mM (Sigma, St Louis, USA)

Les deux dernières solutions sont à préparer le jour du dosage.

#### 4.3) Dosage.

Le dosage se fait au spectrophotomètre (Perkin-Elmer 557, Tokyo, Japan) .

La mesure est réalisée à 25° C et la diminution d'absorbance est lue à 340 nm. Placer dans une cuvette :

- 3 ml de la solution B
- 50µl de la solution C
- 100 µl du surnageant de PMN

La pente obtenue représente la diminution d'absorbance due à la disparition du NADH.

#### 4.4) Calcul des résultats.

L'activité de la lactate déshydrogénase est donnée par la relation suivante :

$$\text{Activité U/l} = 5064 \times \text{variation DO/min}$$

Pour déterminer l'activité totale de la LDH, nous avons soniqué des PMN bovins, ce qui a pour effet de faire éclater les membranes et permettre ainsi la libération de toute la LDH.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1) Rôle du PAF dans la dégranulation spécifique des PMN bovins.

Le PAF est un des médiateurs lipidiques les plus importants de l'inflammation, et comme nous l'avons dit dans l'introduction (Introduction point 2.1.4. Activité biologique du PAF), ses actions sont très diversifiées.

Dans le cadre de notre travail, nous avons essayé de déterminer le rôle du PAF dans la dégranulation spécifique des PMN bovins suite à trois considérations :

- la stimulation des PMN bovins s'accompagne d'une production de PAF dont la majeure partie reste à l'intérieur de la cellule (LYNCH et HENSON, 1986). Ce PAF pourrait avoir un rôle de médiateur intracellulaire de l'activation du PMN.
- certains auteurs ont émis l'hypothèse que le PAF modifierait les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires, favorisant ainsi le processus de fusion des membranes et de dégranulation (HARRIS *et al.*, 1985 ).
- Eric Remy (1990) a montré au moyen d'un inhibiteur spécifique de la synthèse du PAF (l'acide oléique) que celui-ci est un médiateur de la production de radicaux  $O_2^{\cdot -}$ . A partir de ces observations, on peut supposer que le PAF pourrait avoir un rôle beaucoup plus général dans l'activation des neutrophiles bovins et notamment lors de la dégranulation spécifique, c'est donc l'hypothèse de départ de ce travail.

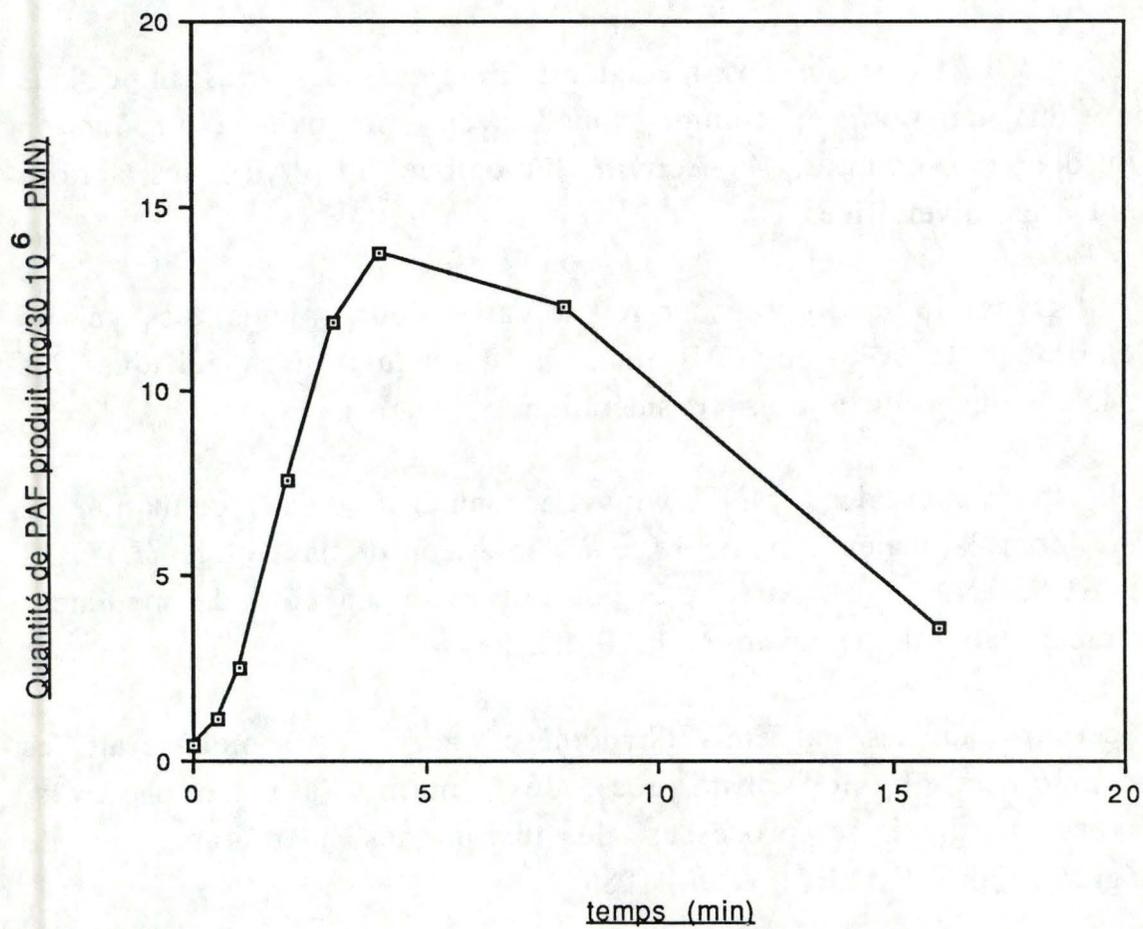


Figure 16 : Cinétique de la production de PAF chez des PMN bovins stimulés par l'ionophore du  $\text{Ca}^{2+}$  A23187  $3,3 \mu\text{M}$ .

### 1.1) Production de PAF par les PMN bovins stimulés avec l'ionophore du calcium.

#### Rôle de l'ionophore A23187.

L'ionophore du  $\text{Ca}^{++}$  A23187 forme un canal hydrophile dans la membrane plasmique hydrophobe, ce qui permet l'entrée rapide et massive du  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire dans le neutrophile bovin. Cette augmentation brutale de la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{++}$  a pour effet d'activer la phospholipase A2 (PLA2), cette dernière libère alors à partir des phospholipides membranaires :

- de l'acide arachidonique qui va donner ultérieurement les prostaglandines et les leucotriènes respectivement par la voie de la cyclooxygénase et de la 5-lipoxygénase.
- du lyso-PAF qui, sous l'action d'une acétyltransférase, va incorporer un groupement acétate et ainsi former du PAF (CRASTES DE PAULET, 1983).

Avant d'entreprendre l'étude du rôle du PAF dans la dégranulation spécifique des PMN bovins, nous avons déterminé la cinétique de production du PAF.

Nous avons incubé à  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $30.10^6$  PMN bovins/ml avec l'ionophore du  $\text{Ca}^{++}$  A23187 ( $3,3 \mu\text{M}$ ) et  $1,4 \text{ mM}$  de  $\text{CaCl}_2$  pendant 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 8 ; 16 minutes.

La figure 16 permet de suivre l'évolution de la synthèse de PAF au cours du temps. On constate que la production de PAF chez les PMN bovins stimulés avec l'ionophore du  $\text{Ca}^{++}$ , en présence de  $\text{Ca}^{++}$ , est très importante dès les premières minutes de l'incubation, elle atteint un maximum au bout de 4 minutes et ensuite elle décroît assez rapidement endéans les 20 minutes. Cette diminution rapide s'explique par le fait que le PAF est un médiateur lipidique très toxique. Après sa synthèse il est rapidement dégradé grâce à

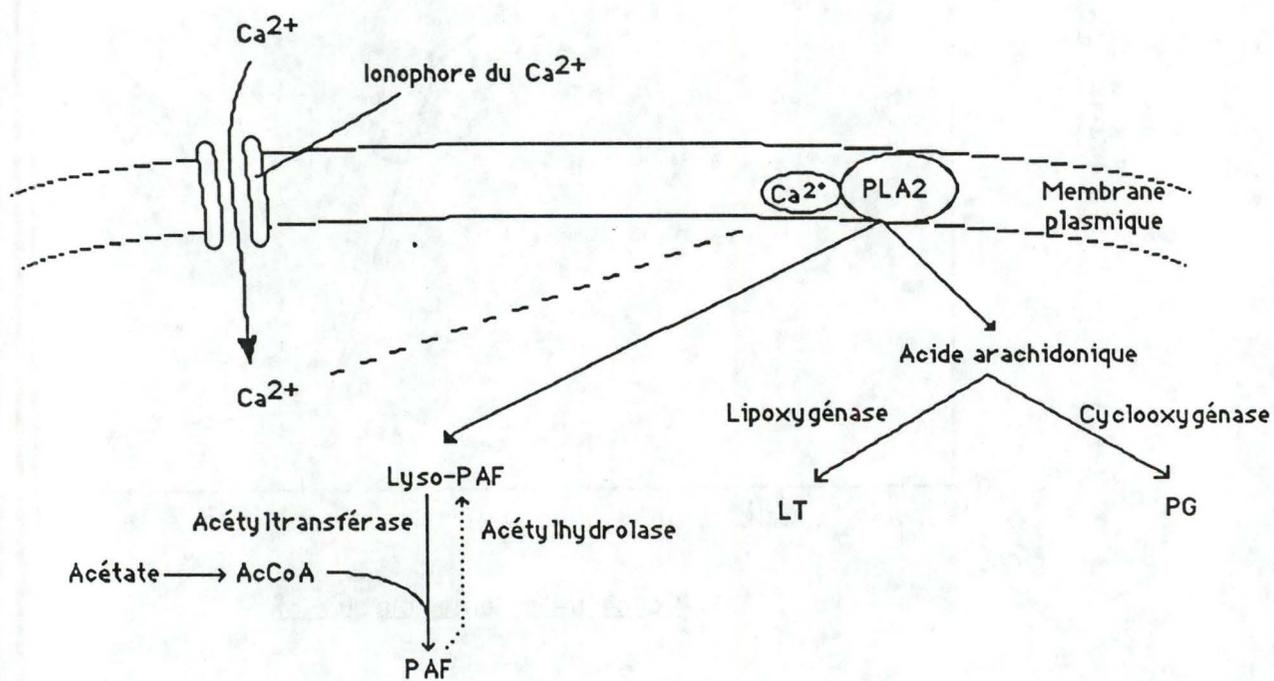


Figure 17 : Schématisation de l'activation de la PLA2 par l'ionophore A23187.

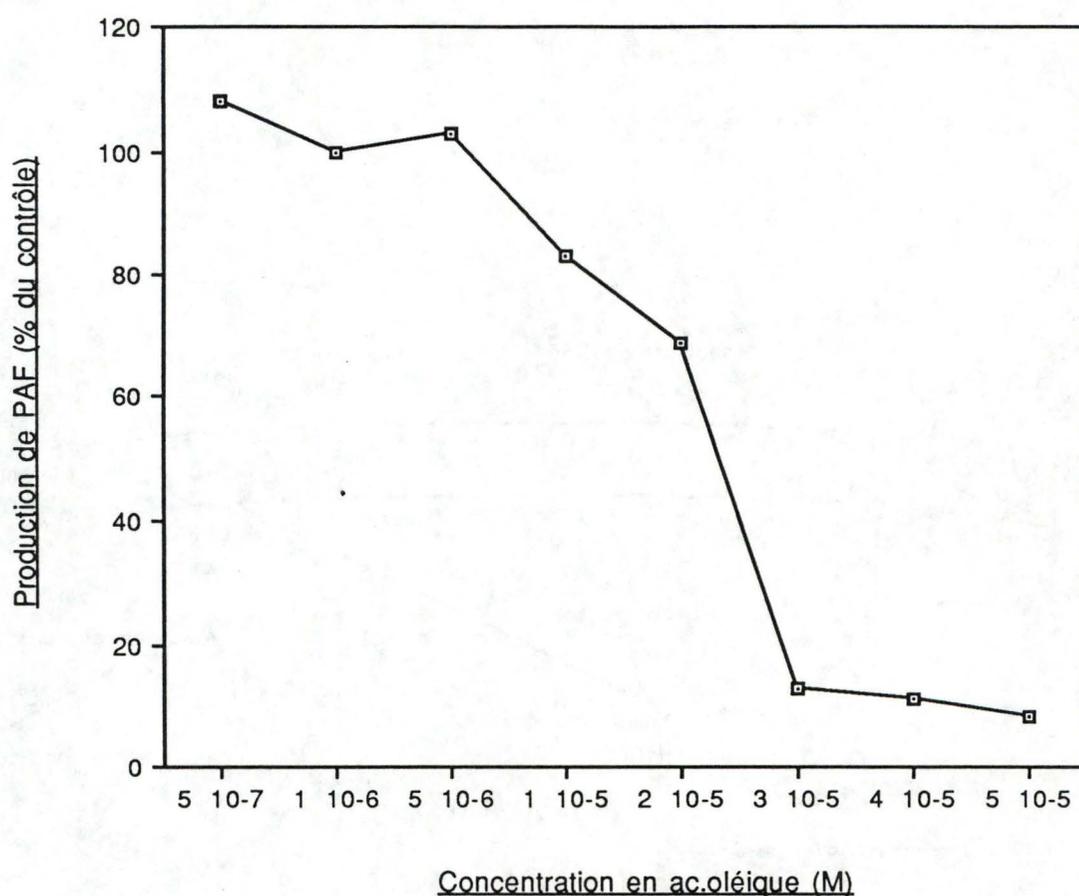


Figure 18 : Effet de l'acide oléique sur la synthèse de PAF par les PMN stimulés par l'ionophore du  $\text{Ca}^{2+}$  A23187  $3,3 \mu\text{M}$ .

Les résultats sont exprimés en % du contrôle stimulé en absence d'acide oléique.

une acétylhydrolase qui donne du lyso-PAF et de l'acétylCoA (figure 17).

1.2) Effet de l'acide oléique sur la synthèse de PAF par les PMN bovins stimulés avec l'ionophore du  $\text{Ca}^{++}$  A23187.

Une fois la cinétique de production du PAF chez les PMN bovins stimulés par l'ionophore du  $\text{Ca}^{++}$  déterminée, nous avons essayé de moduler cette production.

Nous nous sommes basés sur les travaux effectués par REMY *et al.* (1989). Ceux-ci ont montré que l'addition d'acide oléique dans le milieu d'incubation des PMN bovins stimulés avec l'ionophore du  $\text{Ca}^{++}$  provoque une forte inhibition de la synthèse de PAF via une inhibition de l'acétyltransférase.

Nous avons donc testé à notre tour l'effet de l'acide oléique sur la synthèse du PAF, en mesurant cette dernière par GC-MS. Nous avons préincubé  $30 \cdot 10^6$  PMN bovins/ml pendant 5 minutes à  $37^\circ\text{C}$  avec de l'acide oléique entre  $5 \cdot 10^{-7}$  M et  $5 \cdot 10^{-5}$  M et nous les avons ensuite incubés 4 minutes à  $37^\circ\text{C}$  en présence de  $3,3 \mu\text{M}$  d'ionophore A23187.

Remarque :

le temps d'incubation optimal des neutrophiles bovins avec l'ionophore du  $\text{Ca}^{++}$  a été fixé à 4 minutes, temps auquel la production de PAF est maximale comme le montre la figure 16.

Nos résultats sont représentés à la figure 18. Nous constatons que l'inhibition due à la présence d'acide oléique dans le milieu d'incubation commence à se manifester à  $1 \cdot 10^{-5}$  M et qu'elle est pratiquement complète à  $5 \cdot 10^{-5}$  M.

L'intérêt de l'utilisation de l'acide oléique comme inhibiteur de la synthèse du PAF réside dans le fait que :

- il inhibe l'acétyltransférase, or cette enzyme est considérée comme étant l'enzyme clé dans le contrôle de la synthèse de PAF.
- que cette inhibition constitue un moyen d'investigation pour l'étude du rôle du PAF comme médiateur intracellulaire étant donné que la synthèse des autres dérivés de la PLA<sub>2</sub>, tels que les produits de la 5-lipoxygénase n'est pas affectée (REMY *et al*, 1989).

### 1.3) Dégranulation spécifique des PMN bovins induite par l'ionophore du Ca<sup>++</sup> A23187. Dépendance vis-à-vis du Ca<sup>++</sup>.

Maintenant que nous avons décrit la cinétique de production du PAF et que nous avons trouvé le moyen de moduler sa synthèse grâce à l'acide oléique, sans pour autant perturber la production des autres dérivés de la PLA<sub>2</sub>, nous allons pouvoir mettre en relation la synthèse du PAF et son rôle éventuel lors de la dégranulation spécifique des PMN bovins.

Dans un premier temps, nous allons déterminer si la stimulation avec l'ionophore du Ca<sup>++</sup> A23187 nécessite l'apport de Ca<sup>++</sup> exogène et ensuite nous allons voir s'il y a une corrélation entre la synthèse de PAF et la dégranulation spécifique chez les PMN bovins stimulés avec l'ionophore du Ca<sup>++</sup> A23187.

#### Dépendance vis-à-vis du Ca<sup>++</sup>.

Nous avons stimulé 10.10<sup>6</sup> PMN/ml avec l'ionophore du Ca<sup>++</sup> A23187 avec ou sans Ca<sup>++</sup> 1,4 mM pendant 0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 60 minutes à 37°C.

Nous avons réalisé 2 contrôles incubés sans ionophore :

10.10<sup>6</sup> PMN/ml incubés avec 1,4 mM de Ca<sup>++</sup>

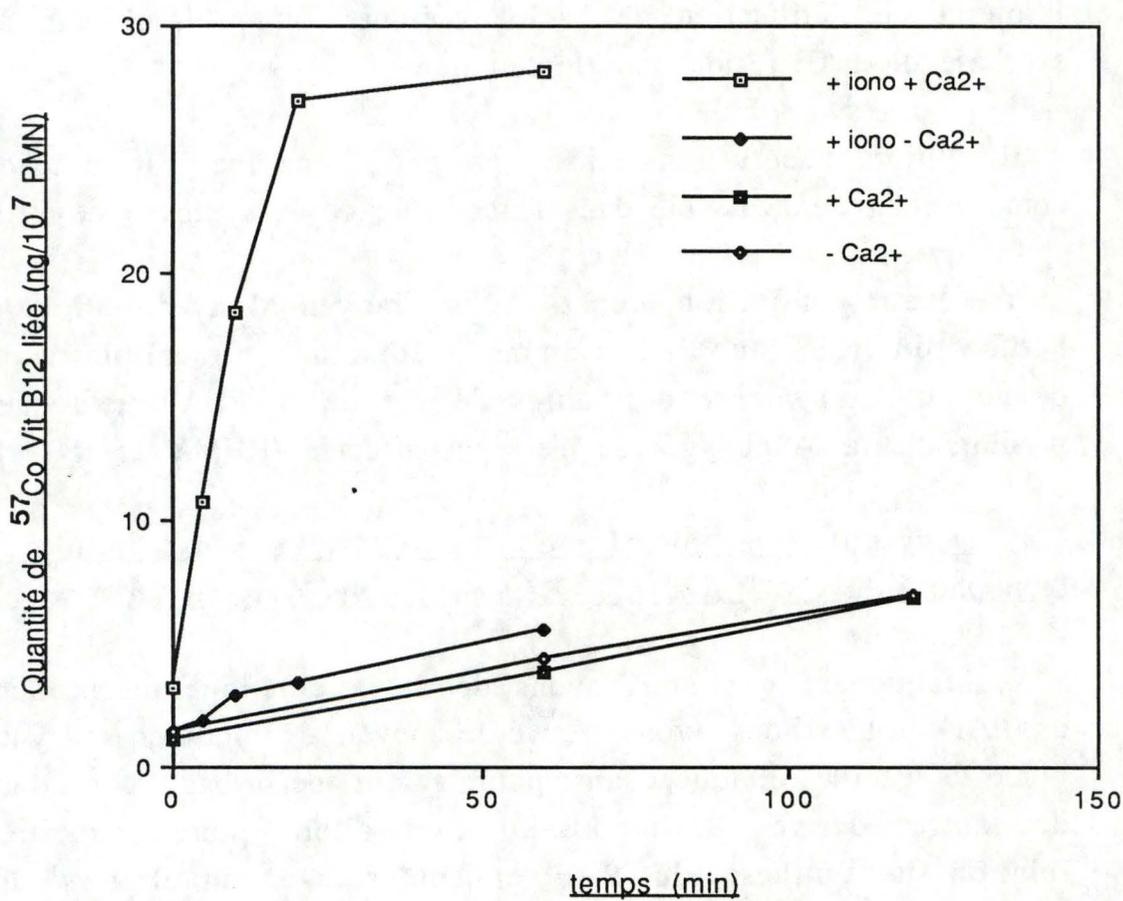


Figure 19 : Cinétique de la dégranulation spécifique des PMN en présence et en absence de CaCl<sub>2</sub> (1,4 mM), stimulés ou non par l'ionophore du Ca<sup>2+</sup> A23187 (3,3 μM).

10.10<sup>6</sup> PMN/ml incubés sans Ca<sup>++</sup>  
pendant 0, 60 et 120 minutes à 37°C.

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 19. Nous observons que les PMN stimulés avec l'ionophore A23187 en présence de Ca<sup>++</sup> exogène ont fortement dégranulé contrairement à ceux qui n'ont pas eu d'apport de Ca<sup>++</sup>.

Quant aux contrôles incubés en absence d'ionophore, on constate que leur taux de dégranulation reste très faible que ce soit en présence ou en absence de Ca<sup>++</sup>.

Nous avons donc confirmé que la dégranulation spécifique des PMN bovins induite par l'ionophore A23187 fait intervenir le mécanisme décrit précédemment, reposant sur la formation de "tunnels" permettant le passage des ions Ca<sup>++</sup> extracellulaires.

D'autre part, si l'on compare les cinétiques de production de PAF et de dégranulation, on constate qu'après 4 minutes, la quantité de PAF dans les PMN est maximale et la dégranulation n'atteint que le tiers de sa valeur maximale. Entre 4 et 20 minutes, la dégranulation se poursuit alors que la quantité de PAF dans les PMN diminue. Le rôle du PAF dans la dégranulation spécifique des PMN bovins ne semble donc pas reposer sur une modification des propriétés des membranes cellulaires car cet effet nécessiterait une production continue de l'agent perturbateur et le déclin de ce dernier devrait entraîner l'arrêt de la dégranulation. Nous n'excluons cependant pas que le PAF puisse jouer un rôle d'amorce de la dégranulation, c'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier l'effet des composés modulant la production de PAF sur la dégranulation spécifique.

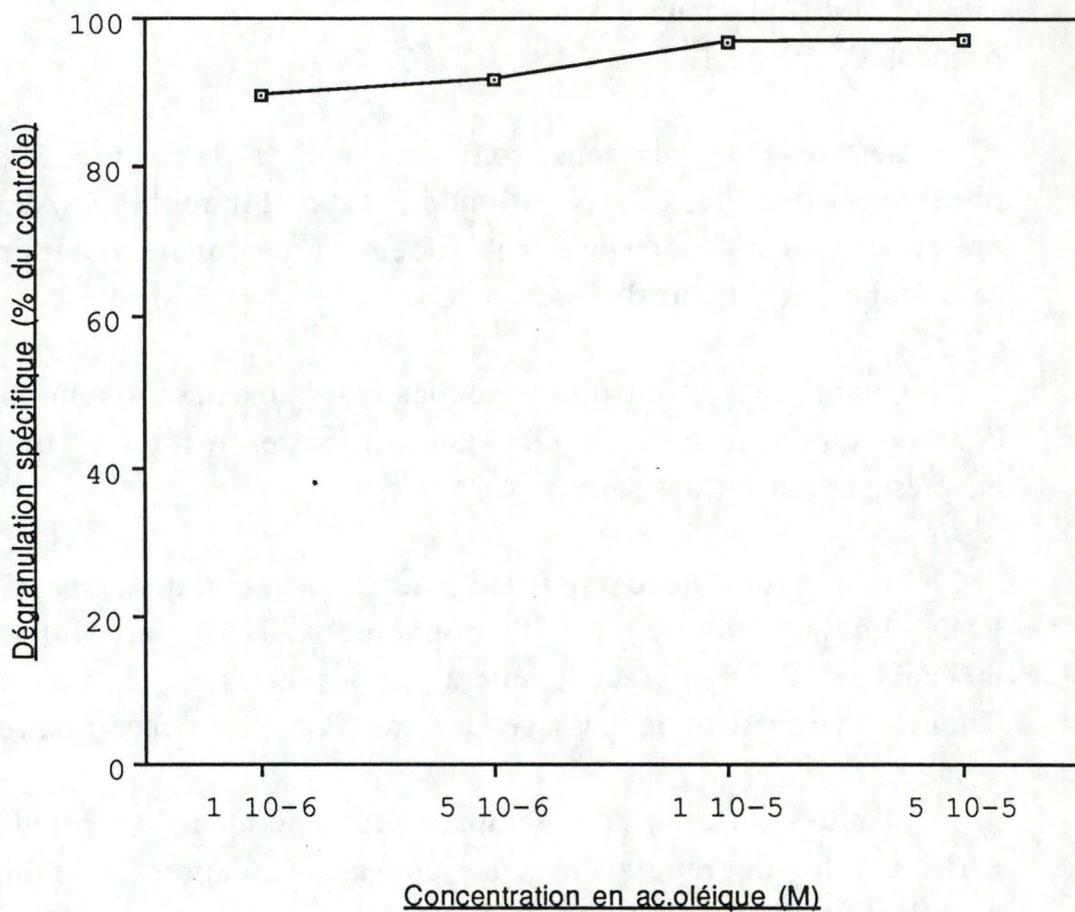


Figure 20 : Effet de l'acide oléique sur la dégranulation spécifique des PMN induite par l'ionophore.

#### 1.4) Effet de l'acide oléique sur la dégranulation spécifique induite par l'ionophore A23187.

##### 1.4.1) Effet de différentes concentrations en acide oléique sur le taux de dégranulation.

Nous avons montré à la figure 18 que l'acide oléique est un bon inhibiteur de la production de PAF par les PMN bovins stimulés avec l'ionophore A23187. Nous avons donc testé l'effet de cette inhibition sur le processus de dégranulation.

Les PMN ( $10 \cdot 10^6$ /ml) ont été préincubés 5 minutes en présence d'acide oléique ( $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$  et  $5 \cdot 10^{-5}$  M) et stimulés ensuite par l'ionophore A23187 ( $3,3 \mu\text{M}$ ) en présence de  $\text{CaCl}_2$  (1,4 mM) pendant 60 minutes.

La figure 20 montre que dans ces conditions, l'acide oléique n'inhibe pas la dégranulation spécifique, même à  $5 \cdot 10^{-5}$  M qui inhibait quasi totalement la synthèse de PAF à la figure 18.

##### 1.4.2) Effet de l'acide oléique sur la dégranulation spécifique induite par différentes concentrations en ionophore A23187.

Afin d'être tout à fait certains de l'incapacité de l'acide oléique à inhiber la dégranulation spécifique, nous avons voulu compléter cette étude en testant ce composé sur la dégranulation induite par des concentrations plus faibles en ionophore. On peut en effet penser qu'une stimulation sub-maximale de la dégranulation permettra de détecter plus facilement une participation du PAF dans ce processus.

Nous avons tout d'abord stimulé les PMN bovins par des dilutions croissantes de l'ionophore afin de déterminer la zone de concentrations donnant une stimulation sub-maximale de la dégranulation.

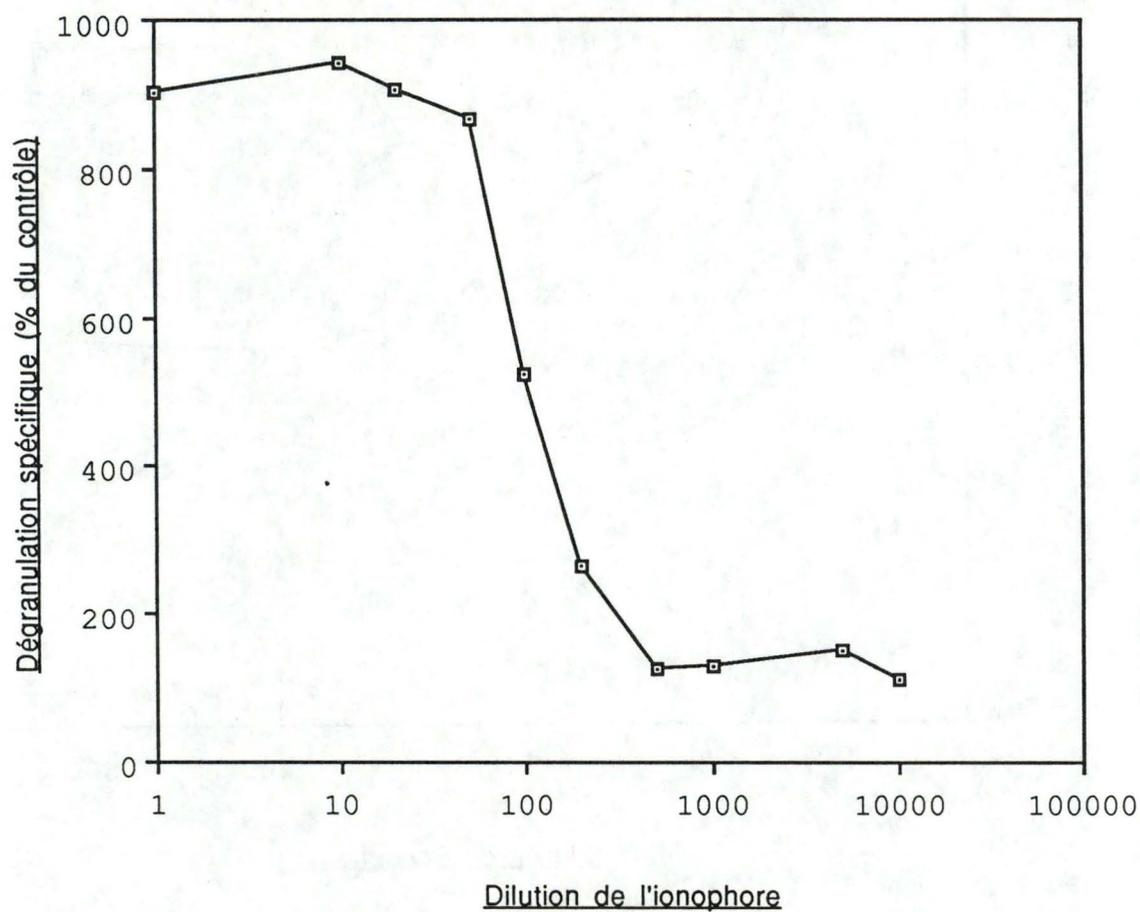


Figure 21 : Dégranulation spécifique des PMN stimulés par l'ionophore du  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 dilué à partir d'une solution  $3,3 \mu\text{M}$  utilisée dans les expériences précédentes.

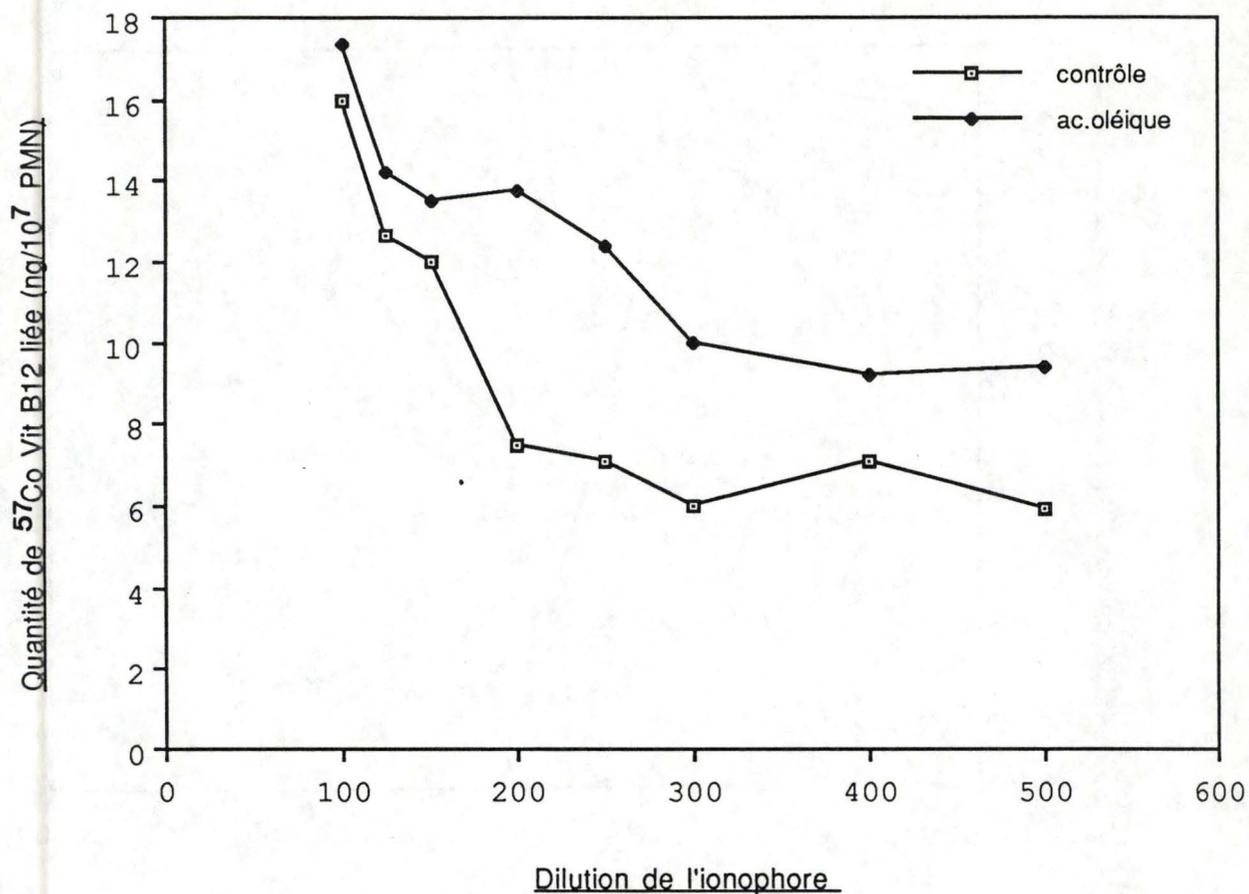


Figure 22 : Effet de l'acide oléique sur la dégranulation spécifique des PMN induite par des dilutions croissantes de la solution 3,3  $\mu\text{M}$  de l'ionophore A23187.

Les contrôles sont incubés en absence d'acide oléique.

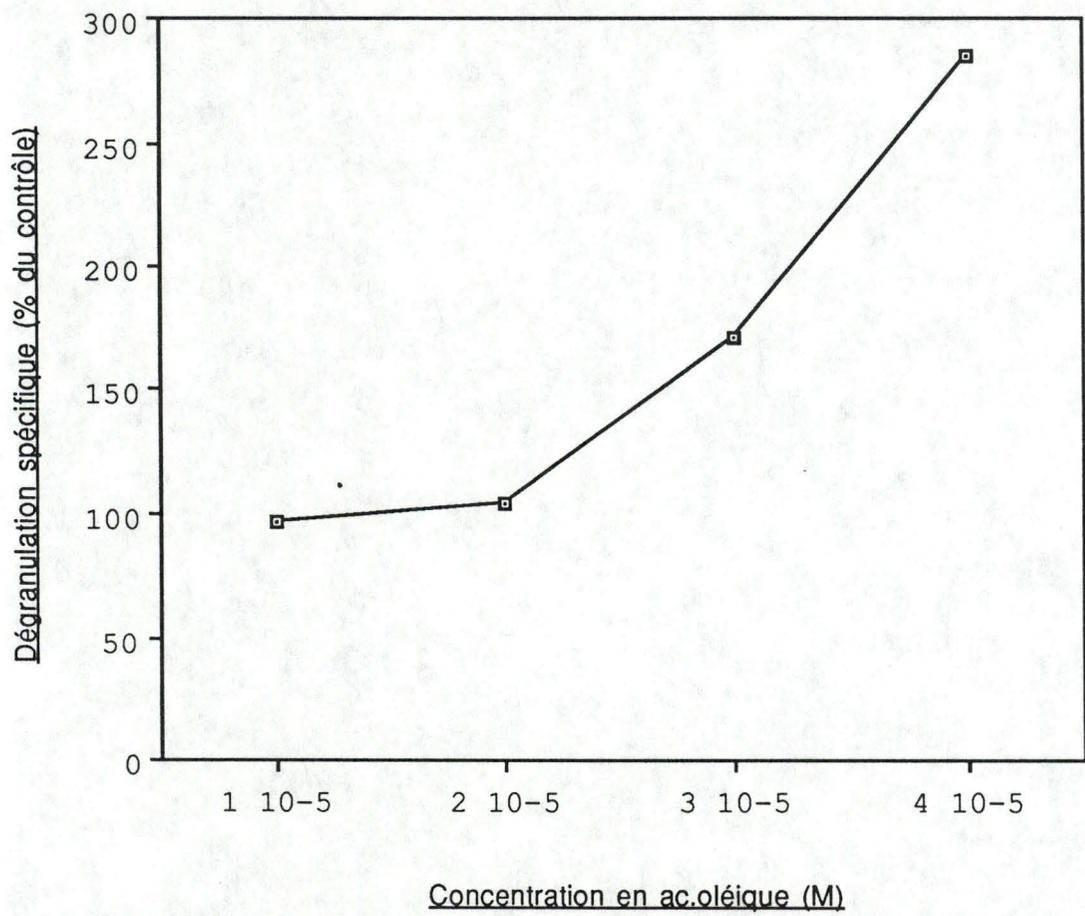


Figure 23 : Dégranulation spécifique des PMN obtenue en présence d'acide oléique seul.

Les PMN ( $10^7$ /ml) ont été incubés à  $37^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes en présence de  $\text{CaCl}_2$  1,4 mM et de différentes concentrations en ionophore.

La figure 21 montre que des taux de dégranulation intermédiaires sont obtenus pour des concentrations en ionophore variant de 33 nM à 3,3 nM.

Nous avons alors testé l'effet de l'acide oléique sur la dégranulation induite par ces faibles concentrations en ionophore.

Nous avons préincubé pendant 5 minutes à  $37^\circ\text{C}$   $10^7$  PMN/ml avec de l'acide oléique  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Ils ont été ensuite stimulés par les différentes concentrations en ionophore, en présence de  $\text{CaCl}_2$  1,4 mM. Des contrôles sans acide oléique ont été réalisés pour chaque concentration en ionophore.

La figure 22 montre que l'acide oléique n'inhibe pas la dégranulation induite par de faibles concentrations en ionophore. En effet, pour les plus faibles concentrations, une dégranulation plus importante est obtenue, par rapport aux contrôles.

Nous avons confirmé cet effet de l'acide oléique en incubant les PMN en présence de différentes concentrations en acide oléique, sans ionophore, pendant 30 minutes (figure 23).

Notons que le dosage de la LDH n'a révélé aucune lyse cellulaire causée par cet acide gras.

### **Conclusions.**

L'utilisation de l'acide oléique comme inhibiteur de la synthèse de PAF ne nous a pas permis de montrer que le PAF jouait un rôle de médiateur de la dégranulation spécifique induite par l'ionophore A23187. De plus, l'essai de ce composé sur la dégranulation induite par de faibles concentrations en ionophore a

révélé qu'il possédait lui-même un léger pouvoir dégranulateur.

Notons que d'autres travaux (MURAKAMI *et al*, 1986) ont montré que des acides gras pouvaient activer la protéine kinase C, qui est elle-même impliquée dans le phénomène de dégranulation, comme nous le verrons plus loin.

Pour terminer cette étude du rôle du PAF dans la dégranulation spécifique des PMN bovins, nous avons choisi de vérifier si un composé capable d'augmenter la production de PAF induite par l'ionophore A23187 aurait une influence sur le phénomène de dégranulation.

#### 1.5) Effet de la carbénoxolone sur la dégranulation spécifique des PMN.

La carbénoxolone est un médicament qui est employé pour le traitement de l'ulcère gastrique. Son mécanisme d'action n'est pas encore bien connu, mais il semble que cette molécule exerce un effet gastroprotecteur via la stimulation de la production des prostaglandines gastroprotectrices endogènes et en augmentant la production de mucus (PARKE, 1983).

De plus, des effets anti-inflammatoires ont été montrés pour des composés similaires, ce qui justifie que l'on s'intéresse à l'effet de cette molécule sur une cellule comme le leucocyte PMN qui est impliqué dans la réaction inflammatoire.

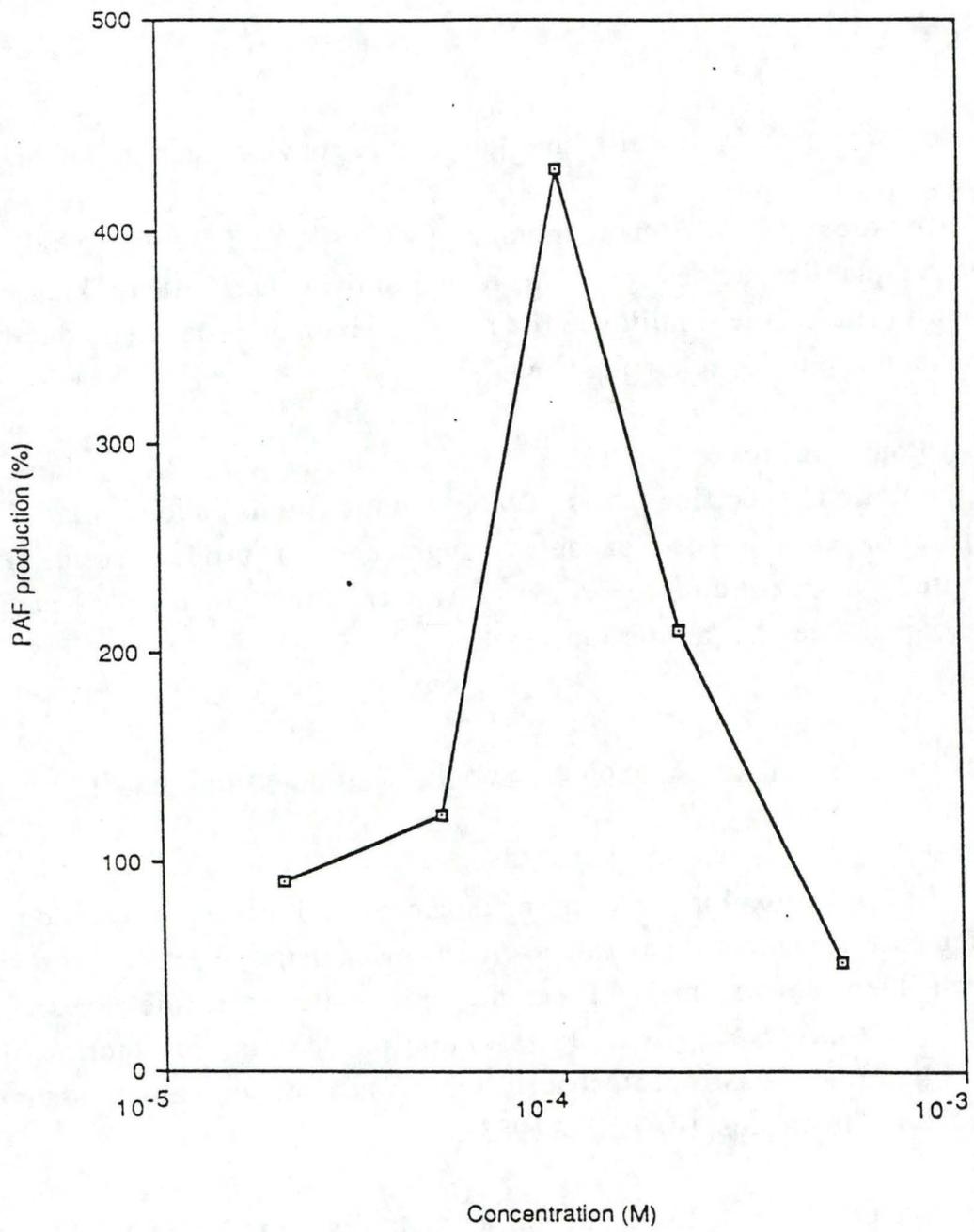
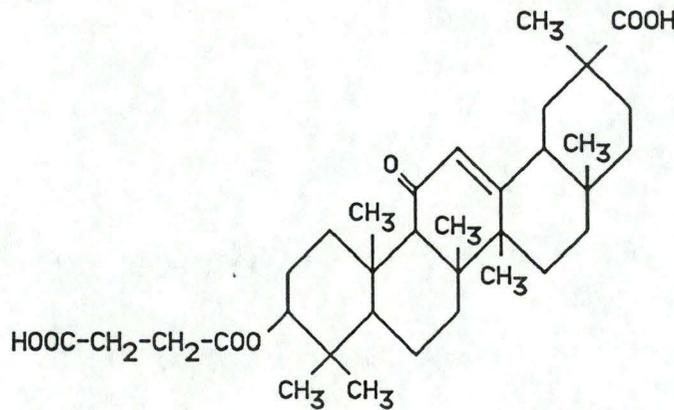


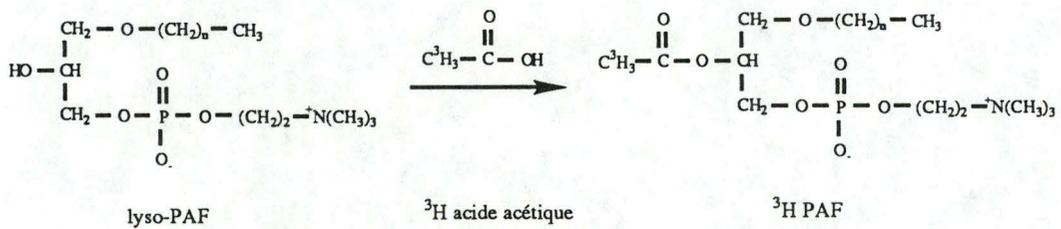
Figure 24 : Effet de la carbénolone sur la synthèse de PAF.  
Les résultats sont exprimés en % du contrôle incubé sans carbénolone.

Structure de la carbénoxolone :



1.5.1) Effet de la carbénoxolone sur l'incorporation d'acide acétique <sup>3</sup>H dans le PAF par les PMN stimulés par l'ionophore du calcium A23187.

La production de PAF est mesurée par la quantité d'acide acétique <sup>3</sup>H incorporée. Cette incorporation se fait suivant la réaction :



La carbénoxolone a été testée pour des concentrations variant de  $10^{-5}$  M à  $10^{-3}$  M. Les résultats sont montrés à la figure 24. On constate que la carbénoxolone stimule fortement la synthèse de PAF à  $10^{-4}$  M.

Bien que nous ne connaissions pas le mécanisme par lequel la carbénoxolone stimule la production de PAF induite par l'ionophore, il nous parut intéressant de vérifier si cette molécule pouvait influencer le phénomène de dégranulation et tenter de lier à nouveau ce phénomène à la production de PAF.

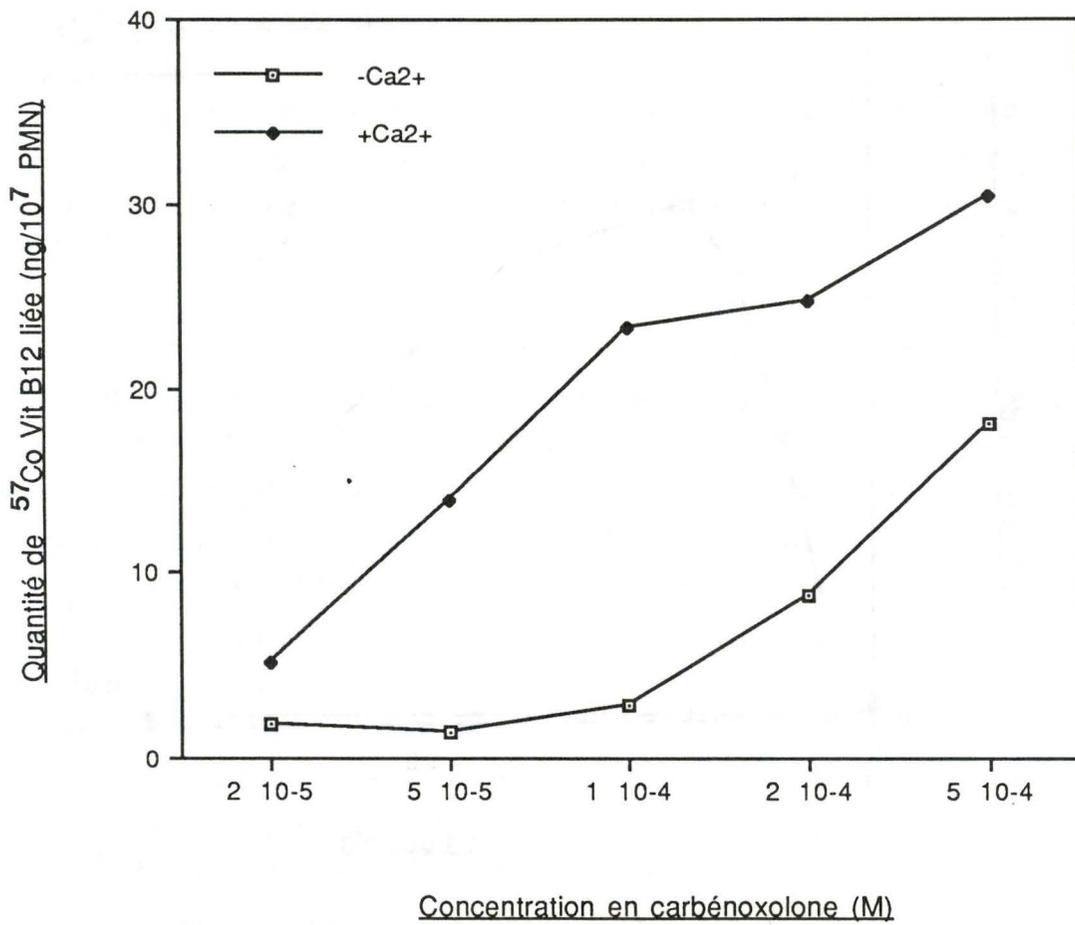


Figure 25 : Effet de la carbénoxolone en présence et en absence de CaCl<sub>2</sub> (1,4 mM) sur la dégranulation spécifique des PMN.

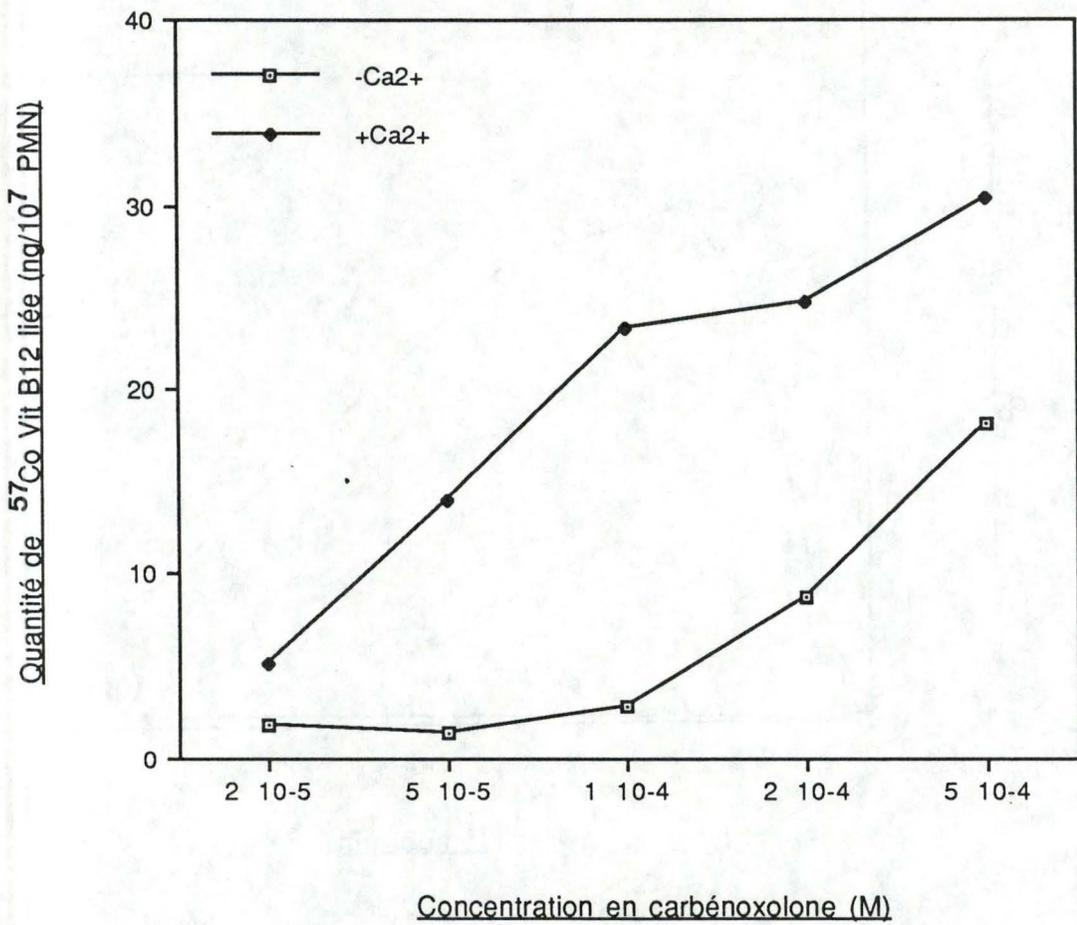


Figure 25 : Effet de la carbénolone en présence et en absence de CaCl<sub>2</sub> (1,4 mM) sur la dégranulation spécifique des PMN.

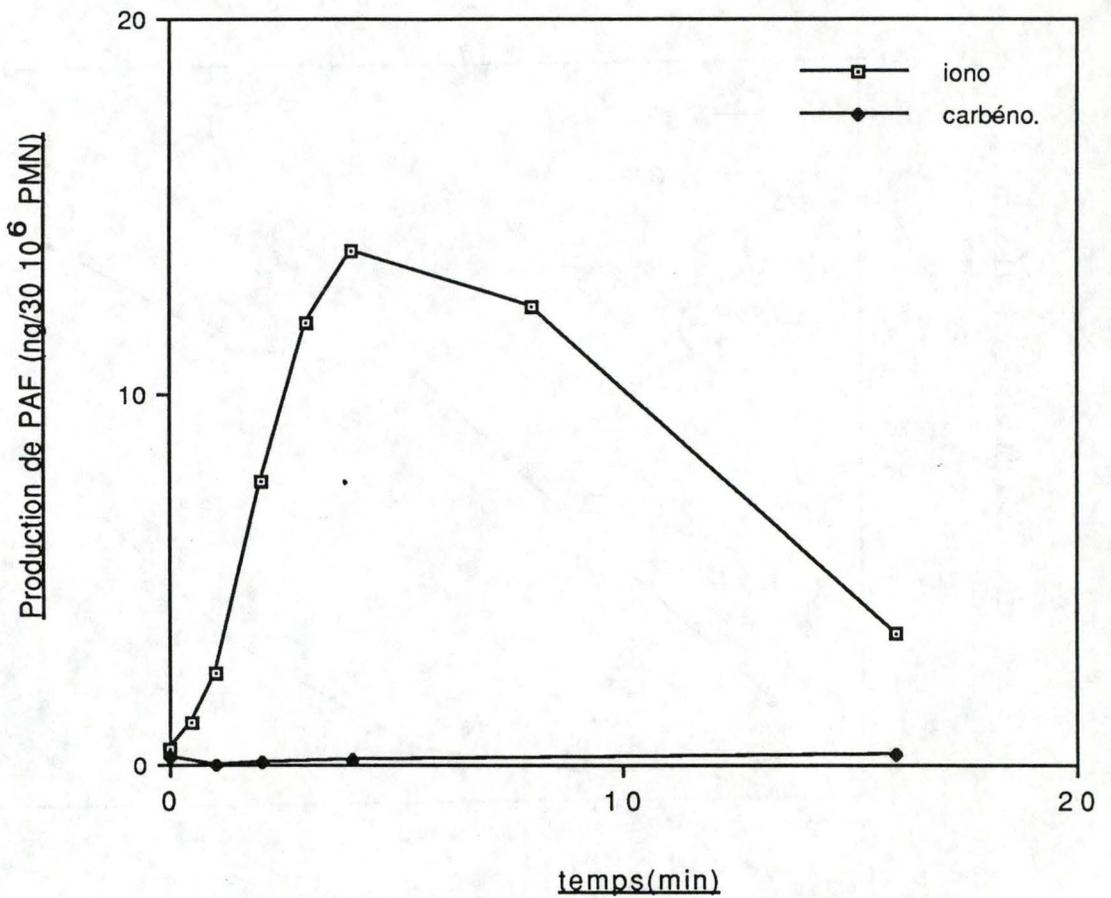


Figure 26 : Cinétique de la production de PAF par des PMN stimulés par l'ionophore du  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 ( $3,3 \mu\text{M}$ ) et par la carbénolone ( $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ).

### 1.5.2) Dégranulation des PMN en présence de carbénoxolone et dépendance vis-à-vis du $\text{Ca}^{++}$ .

Nous avons incubé les PMN ( $10^7/\text{ml}$ ) à  $37^\circ\text{C}$  pendant 45 minutes en présence de différentes concentrations en carbénoxolone, de  $2 \cdot 10^{-5}$  M à  $5 \cdot 10^{-4}$  M, en absence et en présence de  $\text{CaCl}_2$  (1,4 mM).

La figure 25 montre que la carbénoxolone possède la propriété d'induire la dégranulation spécifique des PMN : elle est apparente à partir de  $2 \cdot 10^{-5}$  M en présence de  $\text{CaCl}_2$  et à partir de  $1 \cdot 10^{-4}$  M en absence de  $\text{CaCl}_2$ . Etant donné que les taux de dégranulation en deçà de  $1 \cdot 10^{-4}$  M en absence et en présence de  $\text{CaCl}_2$  sont très différents, on peut dire que la dégranulation induite par des concentrations en carbénoxolone inférieures à  $1 \cdot 10^{-4}$  M est calcium-dépendante.

Par ailleurs, le dosage de la LDH a montré que la carbénoxolone aux plus fortes concentrations testées ( $1 \cdot 10^{-4}$  M à  $5 \cdot 10^{-4}$  M) en présence de  $\text{CaCl}_2$  causait une libération de quelques pourcents seulement de l'activité totale de cette enzyme. Nous pouvons donc affirmer que la libération de la protéine liant la vitamine B12 (marqueur des granules spécifiques des PMN) n'est pas le résultat d'une lyse cellulaire mais qu'elle est bien spécifique d'une dégranulation.

Comme nous observons une nouvelle fois l'importance du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans le phénomène de dégranulation, nous avons voulu vérifier si la carbénoxolone ne pouvait pas elle-même induire la synthèse de PAF, agissant ainsi comme un ionophore calcique. La figure 26 compare les productions de PAF induites par l'ionophore A23187 et par la carbénoxolone  $1 \cdot 10^{-4}$  M. On constate que la carbénoxolone seule n'induit pas la synthèse de PAF. Nous concluons donc que la stimulation de la synthèse de PAF tritié induite par la carbénoxolone en présence d'ionophore A23187 présentée à la figure 24 n'a pas de conséquence sur le phénomène

de dégranulation. On peut imaginer que cette synthèse de PAF soit plutôt une conséquence par exemple d'une perturbation des membranes cellulaires facilitant l'activité de la PLA2 et donc la production de PAF. La perturbation ainsi introduite serait à l'origine de l'effet dégranulateur de la carbénoxolone seule et serait amplifiée par le calcium extracellulaire, indépendamment de l'activité de la PLA2 et du PAF.

### Conclusions.

Nous n'avons pas pu montrer au moyen d'un inhibiteur de la synthèse de PAF et d'un composé stimulant sa synthèse que le PAF était médiateur de la dégranulation spécifique des PMN bovins.

Il semble donc que le rôle de médiateur intracellulaire de l'activation des PMN attribué au PAF et démontré dans le cas de la production de radicaux superoxydes ne soit pas généralisable et nous ne pouvons dans le cadre de ce travail confirmer l'hypothèse d'autres auteurs proposant le PAF comme médiateur de la dégranulation.

Nous avons par ailleurs montré l'importance du  $Ca^{++}$  extracellulaire dans la dégranulation induite par l'ionophore A23187 et la carbénoxolone.

Si nous voulons comprendre les mécanismes de la dégranulation de ces cellules, nous devons donc examiner l'implication d'autres voies métaboliques d'activation; nous avons examiné dans la suite de ce travail, le rôle possible de la protéine kinase C et des phospholipases.

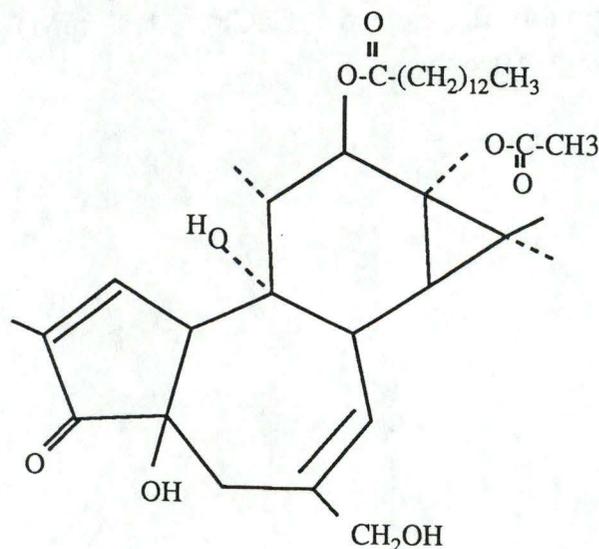
## 2) Rôle de la protéine kinase C dans la dégranulation spécifique des PMN bovins.

Au premier chapitre, nous avons montré que le PAF n'est pas impliqué dans la dégranulation spécifique des PMN bovins induite par l'ionophore A23187. Nous nous sommes alors intéressés à la voie de la protéine kinase C (PKC). Certains auteurs ont montré que cette voie est impliquée dans la dégranulation induite par le zymosan chez les monocytes humains (KELLY *et al.*, 1987), par l'ionophore du  $\text{Ca}^{++}$  A23187, le formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) et le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) chez les PMN humains (WILSON *et al.*, 1987).

Cette enzyme qui reçoit un intérêt croissant semble donc jouer un rôle important dans le contrôle de l'activation des cellules inflammatoires. De plus, son activité étant dépendante de la dégradation des phospholipides par les phospholipases, comme nous le verrons plus loin, elle présente un intérêt central dans le cadre de ce travail.

### 2.1) Effet du PMA.

Le PMA est un ester de phorbol analogue du diacylglycérol (DAG), l'activateur naturel de la PKC (NISHIZUKA, 1989).



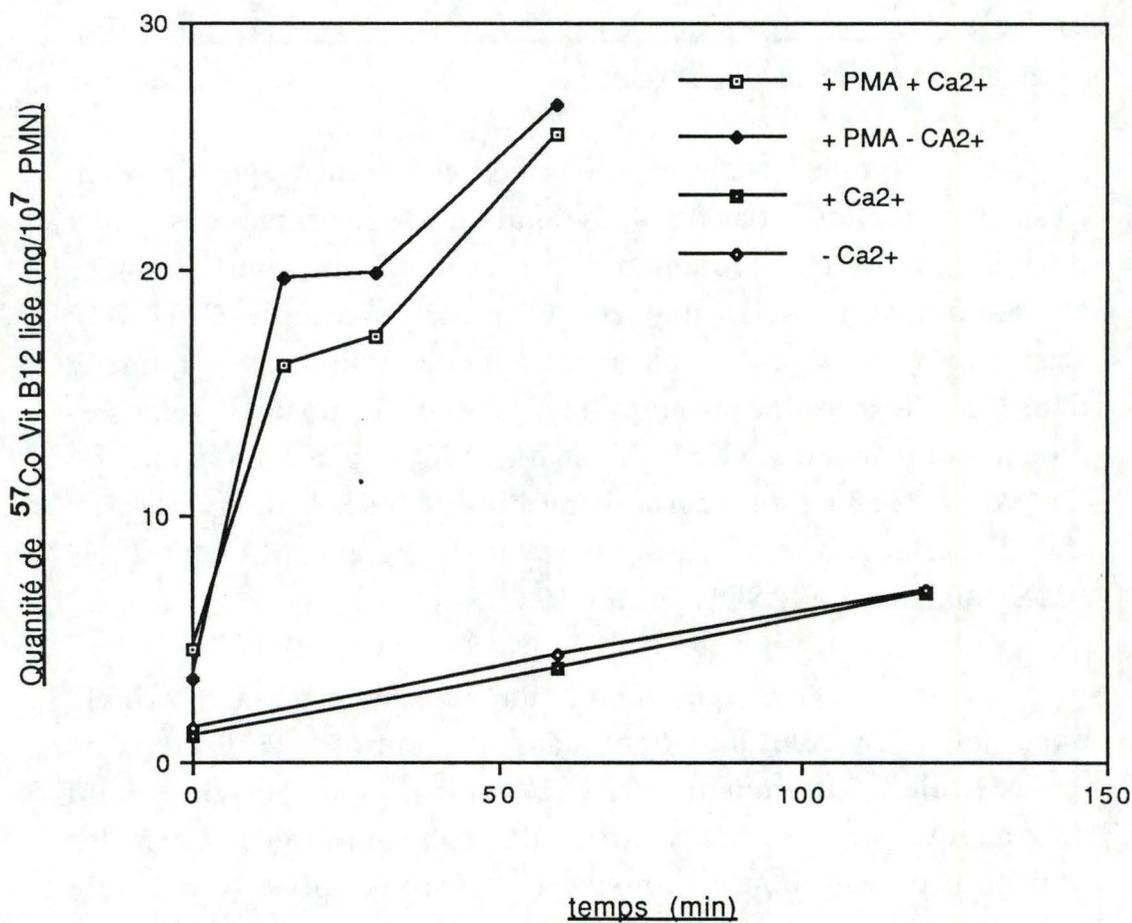


Figure 27 : Cinétique de la dégranulation spécifique des PMN en présence et en absence de  $\text{CaCl}_2$  (1,4 mM), stimulés par le PMA  $2 \cdot 10^{-8}$  M.

L'hypothèse de départ est que le PMA active la PKC, ce qui provoque la phosphorylation de toute une série de protéines nécessaires à l'activation des différentes fonctions du PMN et notamment de la dégranulation (KELLY *et al*, 1987).

Nous avons incubé à 37°C pendant 0, 5, 10, 20 et 60 minutes,  $10^7$  PMN/ml avec du PMA  $2.10^{-8}$  M en présence et en absence de  $\text{CaCl}_2$  1,4 mM. Une série de tubes contenant  $10^7$  PMN/ml est incubée sans PMA en présence ou non de  $\text{CaCl}_2$  1,4 mM à 37°C pendant 0, 60 et 120 minutes.

La figure 27 reprend les résultats obtenus lors de ces différents tests. Nous observons que :

- lorsqu'on stimule les neutrophiles bovins avec du PMA  $2.10^{-8}$  M, ceux-ci dégranulent dès les premières minutes. Le taux de dégranulation est comparable à celui obtenu précédemment avec l'ionophore A23187.

- l'action du PMA est indépendante de l'ion  $\text{Ca}^{++}$ . En effet nous constatons qu'il n'y a pas de différence notable entre la dégranulation spécifique qui a eu lieu avec ou sans  $\text{Ca}^{++}$ .

Ce fait est souvent noté dans la littérature. En effet il semble que l'activation des neutrophiles se fait selon deux voies : une voie nécessitant une augmentation de la concentration cytosolique en calcium et une voie médiée par les diacylglycérols mais ne nécessitant qu'un taux basal de calcium.

L'activation de la deuxième voie semble être suffisante pour la dégranulation spécifique, ce qui est bien en accord avec nos résultats qui montrent que la dégranulation spécifique induite par le PMA ne nécessite pas de  $Ca^{++}$  exogène.

La libération du contenu des granules spécifiques et azurophiles ne peut se faire que lorsque les deux voies sont impliquées, car la libération du contenu des granules azurophiles est médiée par la voie  $Ca^{++}$  dépendante (NACCACHE *et al.*, 1985).

- Le taux de dégranulation spontanée est faible que ce soit avec ou sans  $Ca^{++}$ .

A partir de ces observations, nous concluons que le PMA provoque la dégranulation spécifique suite à l'activation directe de la PKC.

Ces résultats avaient déjà été décrits chez les PMN humains stimulés avec l'ionophore du  $Ca^{++}$  A23187 qui provoque la sécrétion du contenu des granules spécifiques et azurophiles, le fMLP qui provoque aussi la dégranulation des deux types de granules et le PMA qui provoque la dégranulation spécifique, mais qui n'a aucun effet sur les granules azurophiles. Les auteurs ont conclu que la sécrétion du contenu des granules azurophiles est indépendante de la PKC, alors que la dégranulation spécifique est dépendante de la PKC (WILSON *et al.*, 1987).

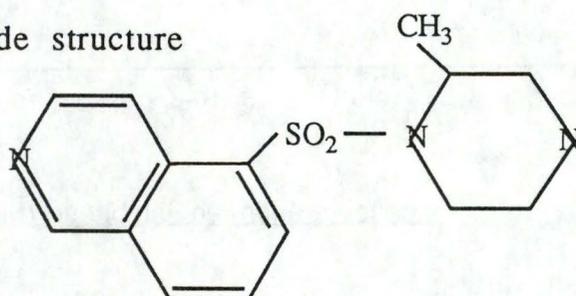
Cette différence entre les deux types de granules quant à leur sensibilité au PMA n'est pas encore très claire, elle pourrait être due à des différences au niveau de la membrane et/ou à des besoins différents pour l'assemblage des microtubules (GOLDSTEIN *et al.*, 1975).

## 2.2) Rôle de la PKC dans la dégranulation induite par l'ionophore A23187.

Au point précédent, nous avons montré que le PMA pouvait induire la dégranulation spécifique des PMN bovins, ce que nous attribuons à l'activation de la protéine kinase C. La question qui se pose est de savoir quelle est l'importance de cette enzyme dans la dégranulation induite par l'ionophore A23187 que nous avons utilisé au début de ce travail.

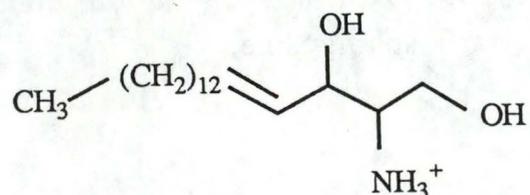
Notre approche consistera à tester l'effet de deux inhibiteurs de la PKC sur la dégranulation induite par l'ionophore A23187 : le 1-(5-isoquinoline-sulfonyl)-2-méthylpipérazine (H-7) et la sphingosine.

Le H-7 de structure



inhibe les phosphorylations induites par la PKC chez les PMN de lapin stimulés par les esters de phorbol (BERKOW *et al*, 1987).

La sphingosine quant à elle est une molécule cationique amphipatique dont voici la structure :



Son mode d'action n'est pas encore bien connu. Il semble cependant que l'inhibition exercée par la sphingosine est de type compétitif ; elle agirait sur les mêmes sites de la

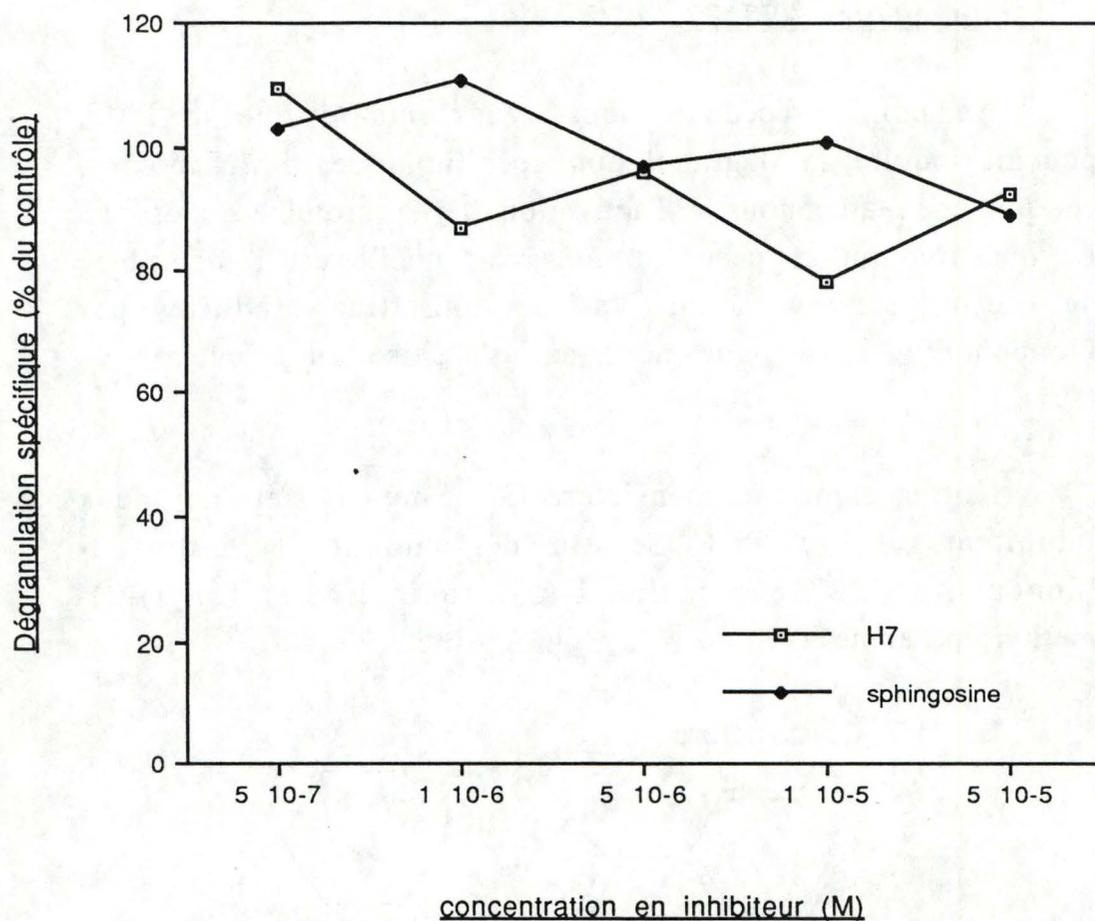


Figure 28 : Effet du H-7 et de la sphingosine sur la dégranulation spécifique des PMN induite par l'ionophore du Ca<sup>2+</sup> A23187 3,3 μM. Les résultats sont exprimés en % du contrôle incubé sans H-7 ou sans sphingosine.

PKC que les diacylglycérols (DAG) chez les PMN humains (WILSON *et al.*, 1987).

RANDO (1988) cite un autre mode d'action probable de la sphingosine : celle-ci agirait en interférant au niveau des interactions entre les lipides de la membrane chargés négativement et le  $\text{Ca}^{++}$ .

Suite à son mode d'action, cette molécule doit sans doute inhiber d'autres enzymes  $\text{Ca}^{++}$ -dépendantes, ce qui rend son usage délicat pour l'interprétation des effets physiologiques.

#### Effet de la sphingosine et du H-7 sur la dégranulation spécifique induite par l'ionophore du $\text{Ca}^{++}$ A23187.

Nous avons préincubé à  $37^{\circ}\text{C}$ , pendant 5 minutes,  $10^7$  PMN/ml avec différentes concentrations en H-7 ou en sphingosine, de  $5.10^{-5}$  M à  $5.10^{-7}$  M. On ajoute ensuite le  $\text{CaCl}_2$  (1,4 mM) et l'ionophore A23187 (3,3 mM) pour une incubation de 30 minutes. Les contrôles sont réalisés en absence d'inhibiteur.

Les résultats présentés à la figure 28 montrent que dans ces conditions le H-7 et la sphingosine n'inhibent pas la dégranulation spécifique des PMN bovins. Afin de pouvoir mettre en évidence plus facilement un éventuel effet inhibiteur, nous avons décidé de tester un des composés sur la dégranulation induite par de plus faibles concentrations en ionophore.

Nous avons préincubé à  $37^{\circ}\text{C}$ , pendant 5 minutes,  $10^7$  PMN/ml avec le composé H-7 à  $5.10^{-5}$  M. Les PMN ont ensuite été stimulés par l'ionophore A23187 à différentes concentrations (33 nM à 5,5 nM), en présence de  $\text{CaCl}_2$  1,4 mM. Les cellules contrôles n'ont pas reçu le H-7.

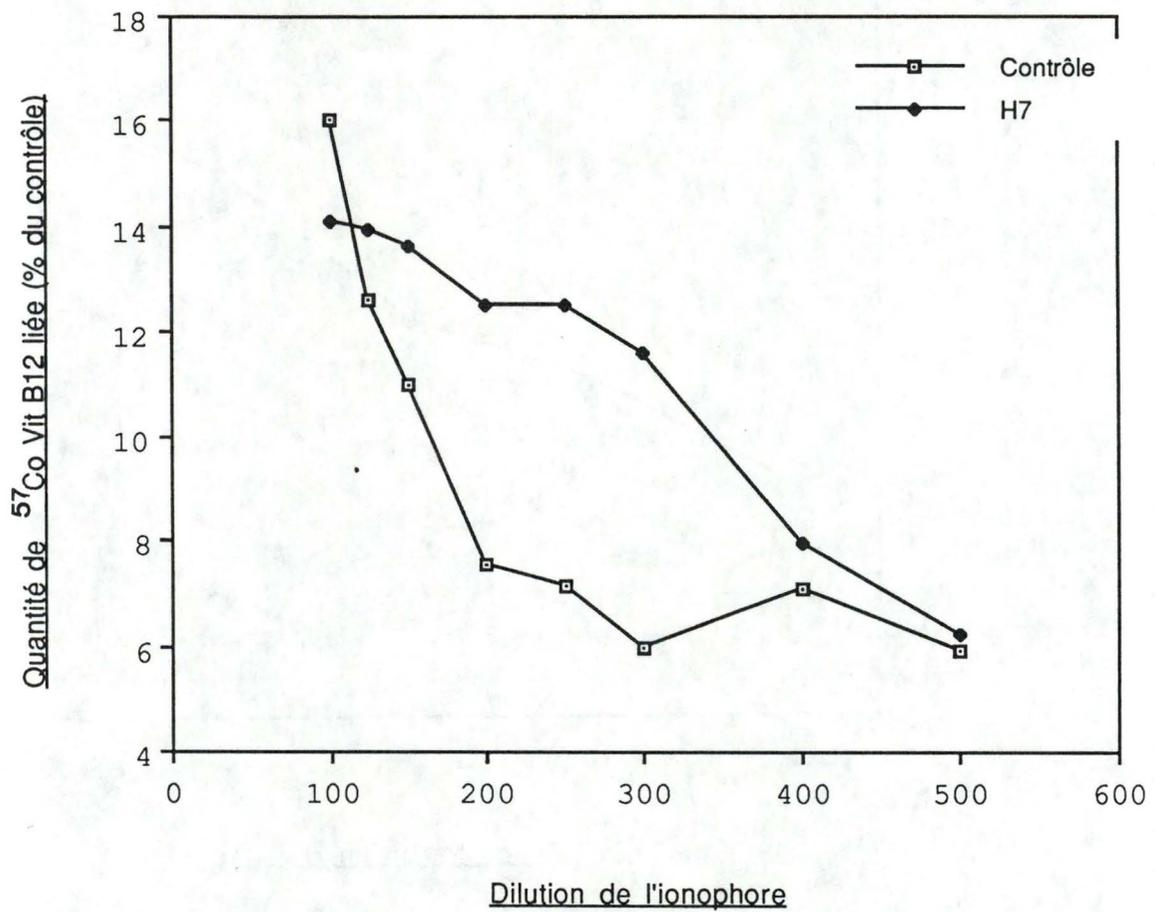


Figure 29 : Effet du H-7 sur la dégranulation spécifique des PMN induite par de faibles concentrations en ionophore du  $\text{Ca}^{2+}$  A23187.  
Les contrôles sont incubés en absence de H-7.

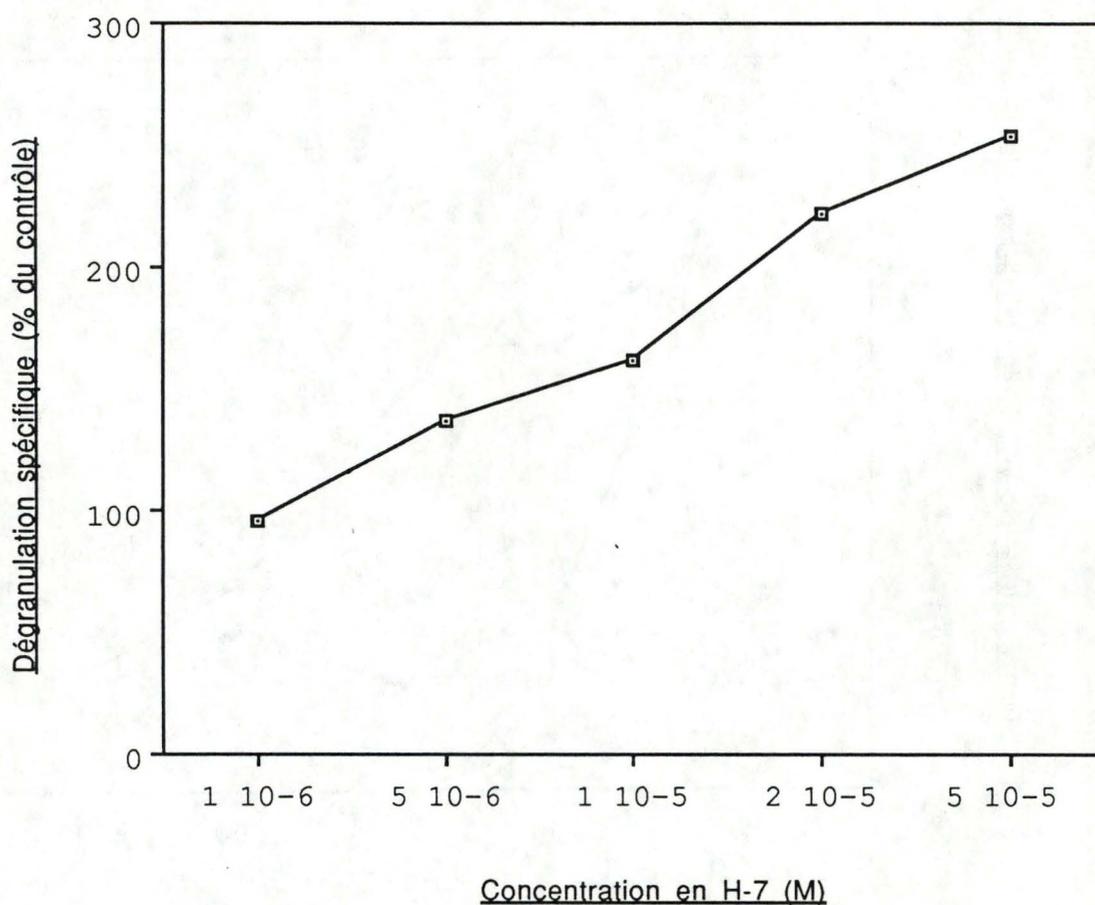


Figure 30 : Effet du H-7 sur la dégranulation spécifique des PMN non stimulés.  
Les résultats sont exprimés en % du contrôle incubé sans H-7.

Les résultats de la figure 29 montrent qu'on n'obtient pas non plus d'inhibition dans ces conditions moins drastiques. Au contraire, une plus forte dégranulation semble apparaître, aux concentrations intermédiaires en ionophore. Nous avons confirmé cet effet dégranulateur du H-7 en l'ajoutant seul à différentes concentrations pendant 35 minutes (figure 30). Le dosage de LDH dans les surnageants de PMN n'a révélé aucune lyse cellulaire.

### Conclusions.

Alors que nous pouvions nous attendre à un effet inhibiteur de la dégranulation par la sphingosine et le H-7, nous avons observé qu'ils avaient un effet stimulateur de la dégranulation.

Avant de discuter ces résultats, il faut souligner le manque de spécificité des inhibiteurs actuels de la protéine kinase C pouvant conduire à des effets imprévus quand ils sont utilisés sur des systèmes cellulaires complets.

Ainsi FIORE *et al* (1990) font remarquer que la sphingosine, outre son activité inhibitrice de la PKC, est capable d'inhiber ou d'activer, suivant l'isoenzyme considéré, l'enzyme diacylglycérol kinase (DAG kinase) de thymus de porc contrôlant le niveau cellulaire de DAG en le convertissant en acide phosphatidique. Ces auteurs suggèrent que certains effets de la sphingosine précédemment attribués à l'inhibition de la PKC peuvent résulter d'une activation ou d'une inhibition de la DAG kinase, suivant le type d'isoenzyme présent dans le type cellulaire considéré.

L'absence d'effet inhibiteur de la sphingosine sur la dégranulation spécifique des PMN bovins, bien qu'en opposition avec un effet inhibiteur dans le cas des PMN humains (WILSON *et al*, 1987), n'est donc pas une preuve

absolue d'une non-participation de la PKC dans la dégranulation induite par l'ionophore A23187.

En ce qui concerne le H-7, notons que BERKOW *et al* (1987) ont observé une inhibition par ce composé de la production de radicaux superoxydes par des PMN de lapin stimulés avec l'ionophore A23187 mais pas d'inhibition de la dégranulation. Plus récemment, DEWALD *et al* (1989) ont montré qu'un autre inhibiteur de la PKC, la staurosporine, pouvait inhiber la production de radicaux superoxydes par les PMN humains stimulés avec le fMLP mais était un mauvais inhibiteur de la dégranulation spécifique. De plus, ils ont observé un effet activateur de la dégranulation par la staurosporine seule, comme nous l'observons pour le H-7. Ils ont conclu que différentes voies sont impliquées dans l'activation du PMN et que la phosphorylation de protéines par la PKC serait nécessaire pour la production de radicaux superoxydes mais pas pour la dégranulation.

Pour notre part, nous suggérons que même s'il y a eu inhibition de la PKC, celle-ci n'est pas suffisante pour inhiber la dégranulation. Nous avons vu en effet qu'il existe sans doute deux voies d'activation, l'une dépendante de la PKC et l'autre médiée par le  $Ca^{2+}$ . Il se pourrait donc que l'inhibition de la PKC n'exclue absolument pas l'activation de la seconde voie utilisant d'autres voies métaboliques que la PKC. Cette explication permet de réconcilier plusieurs résultats de la littérature et l'opposition apparente entre les résultats obtenus dans ce chapitre.

Nous retiendrons aussi que le PMA connu comme un activateur puissant de la PKC induit une importante réponse de dégranulation et nous utiliserons encore cet activateur dans la suite de ce travail qui concerne plus particulièrement les phospholipases.

### 3) Rôle des phospholipases dans la dégranulation spécifique des PMN bovins.

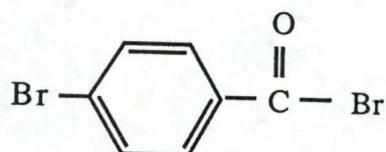
Nous avons aussi examiné l'implication éventuelle des premières enzymes contrôlant la production des médiateurs lipidiques. Comme auparavant, nous voudrions savoir s'il est possible d'influencer le processus de dégranulation au moyen d'inhibiteurs de ces cibles particulières et connaître l'importance relative des différentes voies impliquées.

#### 3.1) Rôle de la phospholipase A2.

##### 3.1.1) Effet du pBPB.

L'importance de l'activité de la PLA2 dans l'activation des cellules inflammatoires a suscité par le passé un grand intérêt puisqu'elle est à l'origine de la production de PAF, d'acide arachidonique libre et de ses métabolites via les voies de la cyclooxygénase et de la lipoxycgénase.

Le pBPB (para-bromophénacyl bromide) de structure



inhibe la mobilisation de l'acide arachidonique dans les cellules et l'activité des phospholipases A2  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes isolées. Du fait de ces propriétés, il a été utilisé comme inhibiteur de la PLA2 des cellules inflammatoires.

Il faut cependant noter que cette molécule est très peu active sur les PLA2 membranaires, ce qui peut s'expliquer par un manque d'accessibilité du site actif de l'enzyme, dû à un effet stérique ou à la présence de calcium (KYGER *et al*, 1984).

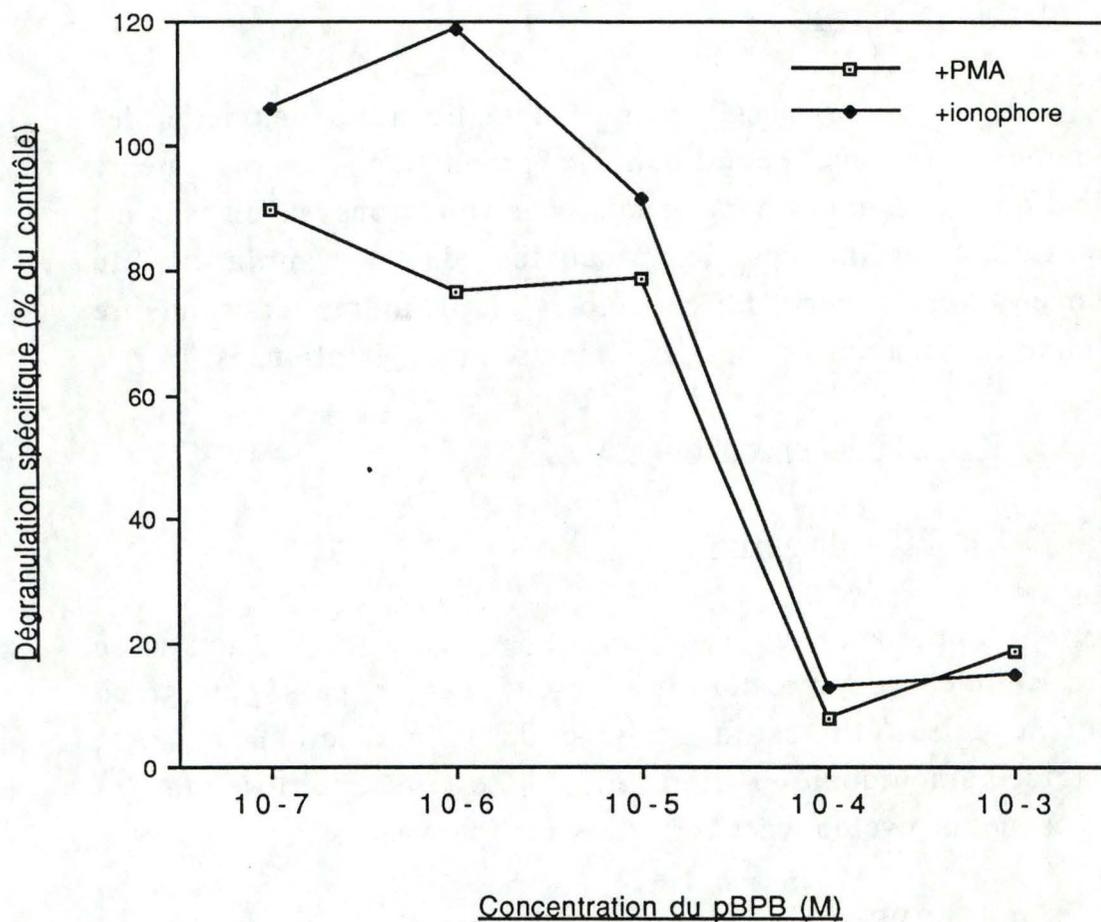


Figure 31 : Effet du pBPB sur la dégranulation spécifique des PMN induite le PMA  $2 \cdot 10^{-8}$  M et l'ionophore du  $\text{Ca}^{2+}$  A23187  $3,3 \mu\text{M}$ .

Les résultats sont exprimés en % du contrôle incubé sans pBPB.

Le pBPB inhibe la PLA2 en alkylant l'histidine 58 de son site actif de façon irréversible (CRASTES DE PAULET, 1983; DUQUE *et al*, 1986).

D'après DUQUE *et al* (1986) le pBPB  $1.10^{-5}$  M inhibe totalement la dégranulation des PMN de rat.

Nous avons testé le pBPB aux mêmes concentrations sur les PMN bovins :

nous avons préincubé  $10^7$  PMN bovins/ml avec du pBPB  $1.10^{-3}$  M,  $1.10^{-4}$  M,  $1.10^{-5}$  M,  $1.10^{-6}$  M,  $1.10^{-7}$  M pendant 10 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ . Les cellules sont activées en présence de  $\text{CaCl}_2$  1,4 mM par l'ionophore A23187 3,3 mM ou le PMA  $2.10^{-3}$  M.

Les résultats sont représentés à la figure 31. Nous observons que le pBPB à  $1.10^{-4}$  et  $1.10^{-3}$  M inhibe presque totalement la dégranulation spécifique des PMN bovins, qu'elle soit induite par l'ionophore ou le PMA.

C'est la première fois dans ce travail que nous obtenons une inhibition quasi totale de la dégranulation, mais notre conclusion sera limitée aux remarques suivantes :

1) Il est étonnant qu'on obtienne des taux d'inhibition identiques lorsque les PMN sont stimulés par l'ionophore et le PMA. Dans le premier cas, la dépendance totale de la dégranulation vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire que nous avons montrée précédemment, et l'activation de la PLA2 qui y est associée pouvaient permettre de révéler au moyen du pBPB une dépendance de la dégranulation vis-à-vis de la PLA2. Par contre, la stimulation par le PMA ne dépendant pas du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, le PMA était utilisé ici comme un contrôle, suivant l'hypothèse que le PMA active la

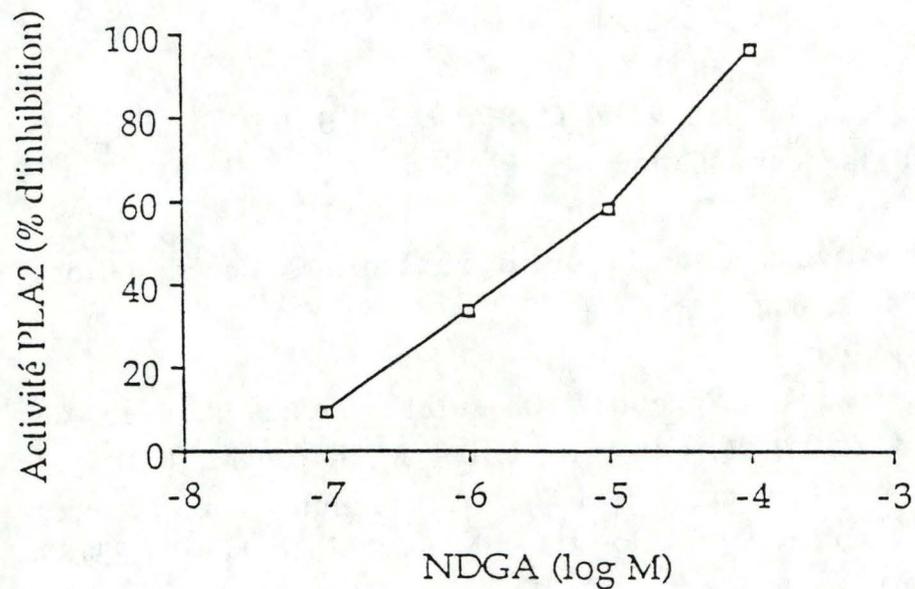


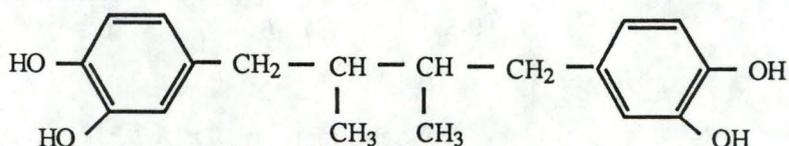
Figure 32 : Effet du NDGA sur l'activité de la phospholipase A2 des neutrophiles bovins stimulés avec l'ionophore A23187. La quantité d'acide arachidonique radioactif perdu par les phosphatidylcholines lors de la stimulation des cellules avec l'ionophore, est posée à 0 % d'inhibition pour les contrôles ne contenant pas de NDGA.

dégranulation par une voie indépendante de la PLA2, à savoir l'activation de la PKC.

2) KYGER et FRANSON (1984) ont montré que le pBPB pouvait inhiber d'autres enzymes que la PLA2 en alkylant les résidus histidine, méthionine et cystéine. Le manque de spécificité de ce composé joint à l'observation précédente nous fait douter que l'inhibition par le pBPB de la dégranulation induite par l'ionophore soit le résultat de la seule inhibition de la PLA2. Nous avons donc été amené à utiliser un autre composé inhibant la PLA2.

### 3.1.2) Effet du NDGA.

Le NDGA (acide nordihydroguaiacétique) de structure



(4,4'-(2,3-diméthyl-1,4-butanediyl)-bis(1,2 benzendiol 1)) a été utilisé au laboratoire par Eric Remy. Il a montré que ce composé entre  $1.10^{-7}$  M et  $1.10^{-4}$  M inhibe l'activité PLA2 des PMN bovins stimulés à l'ionophore A23187 ainsi que la production de PAF qui en résulte (figure 32).

Nous avons préincubé  $10^7$  PMN bovins/ml 10 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  avec différentes concentrations en NDGA de  $1.10^{-7}$  à  $1.10^{-4}$  M. Les cellules sont stimulées en présence de  $\text{CaCl}_2$  1,4 mM par l'ionophore A23187 3,3 mM ou le PMA  $2.10^{-8}$  M.

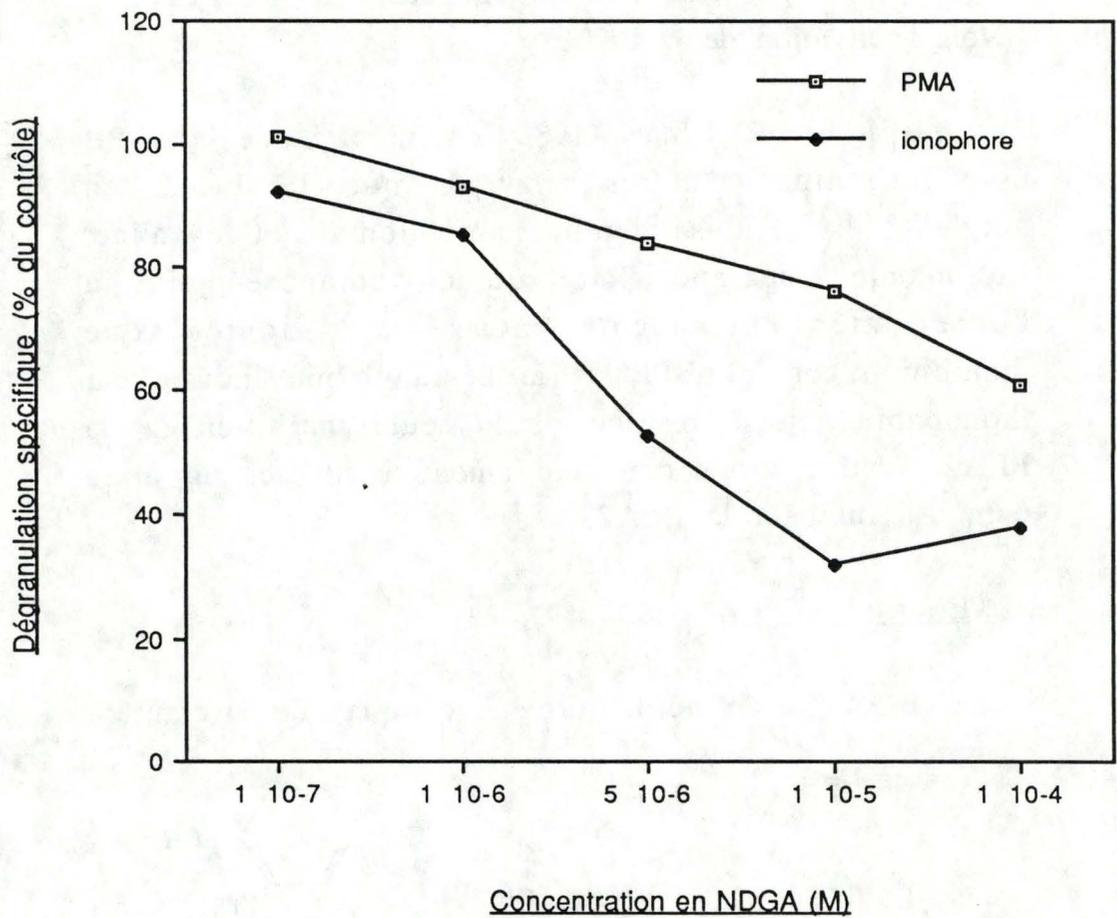


Figure 33 : Effet du NDGA sur la dégranulation spécifique des PMN bovins stimulés par l'ionophore 3,3  $\mu\text{M}$  et le PMA  $2 \cdot 10^{-8}\text{M}$ .

Les résultats sont exprimés en % du contrôle incubé sans NDGA.

Les résultats sont présentés à la figure 33.

Nous observons :

- une inhibition de la dégranulation induite par l'ionophore dans une zone de concentrations inhibant la PLA2. L'inhibition n'atteint cependant que 70% à  $1.10^{-4}$  M, concentration inhibant complètement la PLA2;
- une inhibition de la dégranulation induite par le PMA, moins importante puisqu'elle n'excède pas 40% à  $1.10^{-4}$  M.

### Conclusions.

1) Contrairement au pBPB, le NDGA inhibe de façon différente la dégranulation induite par l'ionophore et le PMA, la première étant plus fortement influencée. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'une activation de la PLA2 par les ions  $Ca^{++}$  et prouverait donc la participation de la PLA2 dans le processus de dégranulation.

2) Le fait que l'inhibition par le NDGA de la dégranulation induite par l'ionophore n'est pas totale peut signifier que d'autres mécanismes activés par l'entrée de  $Ca^{++}$  dans le PMN sont en jeu pour déclencher la dégranulation.

3) Le NDGA inhibant partiellement la dégranulation induite par le PMA, on peut conclure, soit à un effet non spécifique partiel du NDGA qui accompagnerait son effet inhibiteur de la PLA2, soit à un effet activateur indirect de la PLA2 par le PMA, qui serait contrecarré par le NDGA. Cette deuxième possibilité peut cependant être écartée par un résultat d'E. REMY (1990) montrant que le PMA n'a pas à lui seul la capacité d'activer la PLA2.

Suite à ces considérations, nous pouvons conclure à l'existence de deux voies différentes conduisant à la dégranulation spécifique des PMN bovins, l'une dépendante du  $\text{Ca}^{++}$  et dépendante partiellement de la PLA<sub>2</sub>, l'autre activable par le PMA, et ne dépendant pas du  $\text{Ca}^{++}$  et de la PLA<sub>2</sub>.

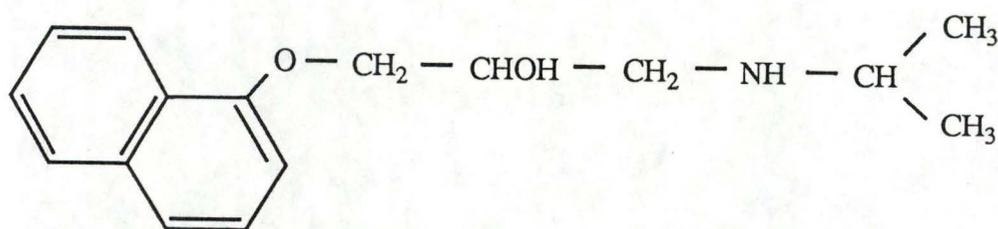
L'analogie fonctionnelle du PMA et des diacylglycérols soutient l'hypothèse que l'hydrolyse des phospholipides par des phospholipases conduisant à la production de diacylglycérols est à l'origine de l'activation de la PKC qui médierait un des deux processus de dégranulation. Pour terminer cette étude, nous nous tournerons donc vers le rôle de ces phospholipases.

### 3.2) Rôle des phospholipases C et D dans la dégranulation spécifique des PMN bovins.

Trois voies différentes peuvent conduire à la production de diacylglycérols :

- voie de la PLC agissant sur le phosphatidylinositol.
- voie de la PLC agissant sur la phosphatidylcholine.
- voie de la PLD agissant sur la phosphatidylcholine.

En ce qui concerne la voie de la phospholipase D, BILLAH *et al.* ont montré que cette voie était responsable de la production de la majorité du DAG lors de l'activation des neutrophiles humains par le fMLP (BILLAH *et al.*, 1989 a) ou des granulocytes HL-60 par l'ionophore A23187 et le PMA (BILLAH *et al.*, 1989 a). Ce dernier résultat indique donc un effet inattendu du PMA. De plus, ils ont montré que le propranolol, de structure :



pouvait inhiber , entre  $5.10^{-5}$  à  $2.10^{-4}$  M, la production de DAG par les neutrophiles stimulés avec le fMLP, via l'inhibition de la phosphohydrolase responsable de la conversion PA/DAG, sans effet sur la PLC agissant sur les phosphoinositides. Comme nous savons par les résultats d'E. Remy (1990) que la stimulation des PMN bovins par l'ionophore A23187 s'accompagne d'une production de DAG, nous avons pensé que nous disposions d'un moyen pour estimer l'importance de cette voie et de la protéine kinase C dans le processus de dégranulation.

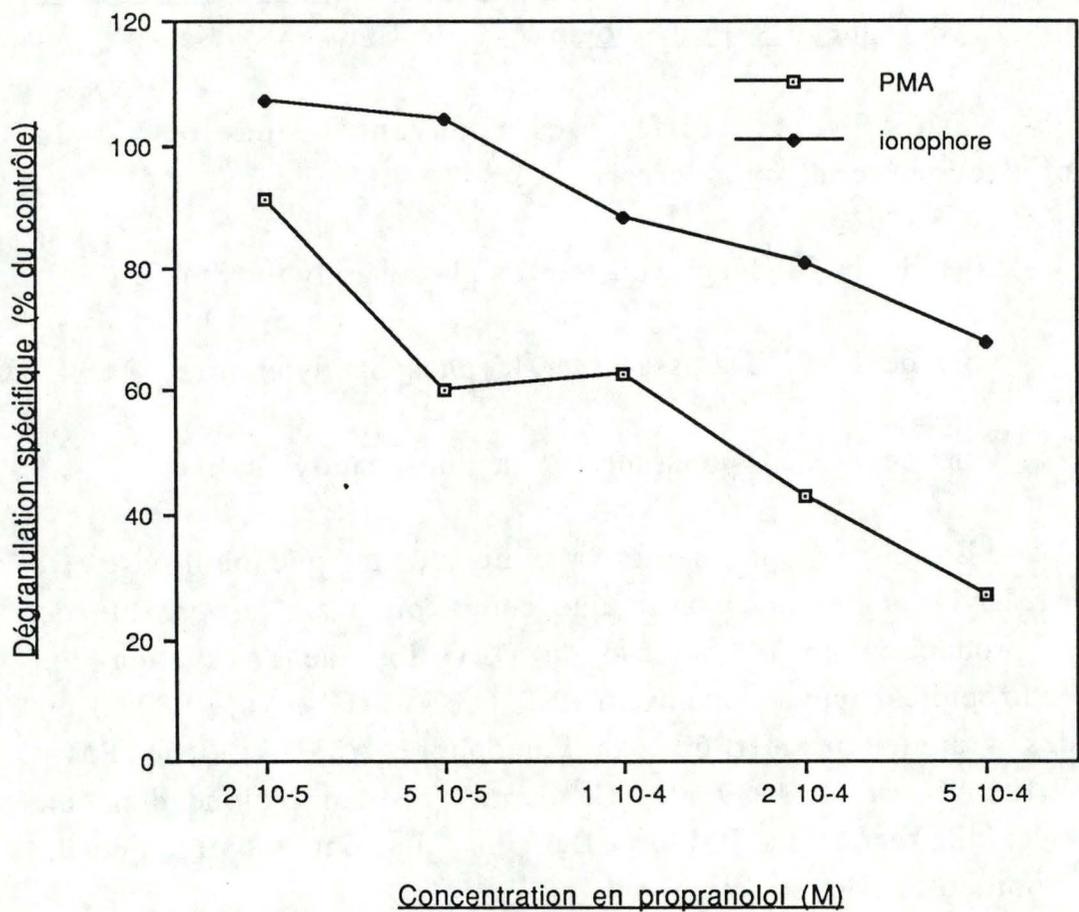


Figure 34 : Effet du propranolol sur la dégranulation spécifique des PMN bovins stimulés par l'ionophore 3,3  $\mu\text{M}$  et par le PMA  $2 \cdot 10^{-8}\text{M}$ .  
 Les résultats sont exprimés en % du contrôle incubé sans propranolol.

Comme le PMA dans les expériences de BILLAH *et al.* (1989 a) induit aussi la production de DAG, nous testerons également le propranolol sur la dégranulation induite par le PMA.

Nous avons préincubé 10 minutes à 37°C  $10^7$  PMN bovins/ml avec du propranolol à différentes concentrations, de  $2.10^{-5}$  à  $5.10^{-4}$  M. Les cellules sont stimulées en présence de  $\text{CaCl}_2$  1,4 mM par l'ionophore A23187 3,3  $\mu\text{M}$  ou le PMA  $2.10^{-8}$  M.

Les résultats sont présentés à la figure 34. Nous observons que le propranolol inhibe la dégranulation induite par l'ionophore et le PMA. Dans le premier cas, l'inhibition n'excède pas 30% à  $5.10^{-4}$  M, tandis que la dégranulation induite par le PMA est inhibée à 75% à la même concentration.

### Conclusions.

1) La dégranulation induite par le PMA étant inhibée par le propranolol, nous concluons que le PMA généralement utilisé comme activateur de la PKC a d'autres effets qui doivent être pris en considération. Suivant les résultats de BILLAH *et al.* (1989 a) il peut induire la production de DAG. Si l'inhibition de la dégranulation par le propranolol résulte bien de l'inhibition de la production de DAG par les PMN bovins, il faut conclure que les DAG peuvent induire la dégranulation par un autre mécanisme que l'activation de la PKC (DEWALD *et al.*, 1989).

Notons que NIEVA *et al.* (1989) ont montré que la formation de DAG par la PLC pouvait induire dans certaines conditions la fusion des liposomes. Leur étude est une approche du rôle du DAG comme déstabilisateur membranaire dans les cellules sécrétrices.

2) La dégranulation induite par l'ionophore A23187 est inhibée par le propranolol mais dans une moindre mesure que celle induite par le PMA. Comme dans le cas du NDGA, nous observons une inhibition différentielle suivant le type d'activateur. De plus, l'importance de l'inhibition est inversée dans le cas de ces deux inhibiteurs (figures 33 et 34). Ces résultats appuient donc l'idée que deux voies différentes peuvent être impliquées dans la dégranulation induite par l'ionophore et le PMA. La première mettrait en jeu plus particulièrement la phospholipase A2, la seconde ferait intervenir la production de DAG par la phospholipase D.

Remarque :

Le PMA, l'ionophore du  $\text{Ca}^{2+}$  A23187, la carbénoxolone, l'acide oléique et la sphingosine sont fournis par Sigma, St Louis, USA.

Le pBPB et le propranolol viennent de chez Janssen Chimica, Beerse, Belgium.

Le NDGA est fourni par Aldrich-Chimie, Steinheim, RFA.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous n'avons pas pu montrer que le PAF était un médiateur de la dégranulation spécifique des PMN bovins stimulés par l'ionophore A23187 bien qu'il soit, dans les mêmes conditions, un médiateur de la production des radicaux superoxydes.

Si la dégradation des phospholipides par la phospholipase A2, qui permet la formation du PAF, est à l'origine du processus de dégranulation, elle doit l'être suite à la production d'autres médiateurs dérivés de l'acide arachidonique ou lysophospholipides. Cependant, l'inhibition de la PLA2 par le NDGA n'entraîne pas une inhibition complète de la dégranulation induite par l'ionophore, ce qui laisse penser que d'autres mécanismes sont aussi en jeu.

Le fait que la dégranulation spécifique est fortement stimulée par le PMA, connu comme activateur de la PKC, nous a conduit à essayer de connaître le rôle de cette enzyme dans la dégranulation induite par l'ionophore. Cette étude fut gênée par le manque de spécificité des inhibiteurs actuels de la PKC, sans doute responsable de l'effet stimulateur de la dégranulation observé avec le H-7. Une étude de la phosphorylation des protéines en présence et en absence de ces inhibiteurs de PKC permettrait de savoir s'ils empêchent réellement l'activation de la PKC dans le cas des PMN bovins, sans inhiber le processus de dégranulation.

Suite aux résultats de BILLAH *et al* (1989 a) montrant que la majorité des diacylglycérols produits lors de l'activation des PMN humains résulte de l'action de la phospholipase D et que cette production peut être inhibée par le propranolol, nous avons testé ce composé sur les PMN bovins stimulés par l'ionophore et le PMA pour essayer

d'apprécier d'une autre façon l'importance des DAG et de la PKC dans le processus de dégranulation. Nous avons observé que la dégranulation induite par l'ionophore est faiblement influencée par le propranolol alors que celle induite par le PMA est plus fortement inhibée. En accord avec les résultats de cet auteur, nous concluons que le PMA possède d'autres effets que l'activation de la PKC. Le dosage de la production de DAG stimulée par le PMA, en présence et en absence de propranolol, permettrait de confirmer que le PMA active les PMN bovins partiellement via la production de DAG.

Le faible effet inhibiteur observé en présence de propranolol lors de l'activation avec l'ionophore pourrait signifier à nouveau que la phospholipase A2 présente une importance plus grande dans le cas de ce stimulateur particulier.

L'existence de deux voies d'activation, l'une dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et l'autre indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  se confirme dans ce travail.

La voie dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  agirait notamment via la phospholipase A2 qui est une enzyme  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante. Celle-ci une fois activée produit différents médiateurs qui pourraient alors provoquer la dégranulation spécifique. Cependant, il faut noter qu'en ce qui concerne le PAF, nous n'avons pas pu montrer qu'il était un médiateur de la dégranulation spécifique.

La voie indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  quant à elle agirait via la protéine kinase C qui est activée par les diacylglycérols, produits de dégradation des phospholipides membranaires par les phospholipases C et D.

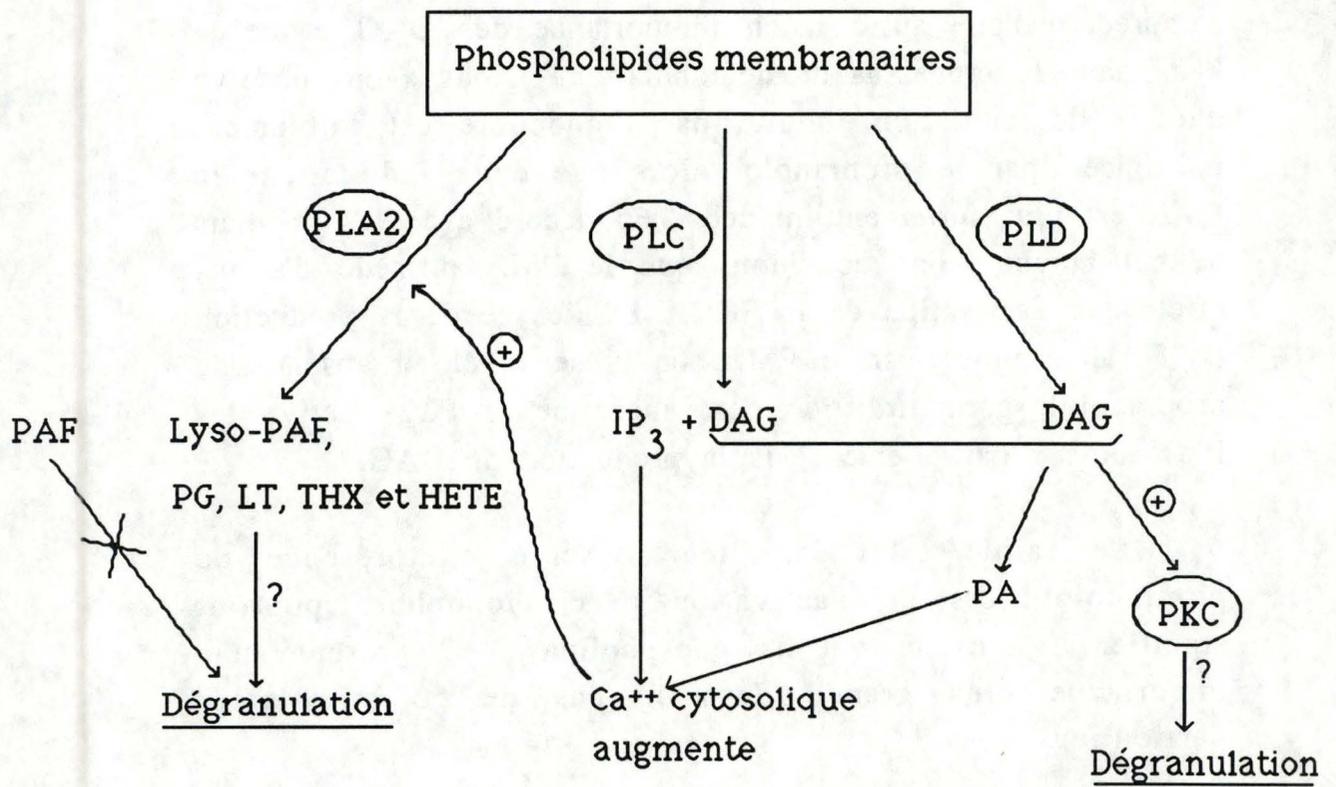


Figure 35 : Schéma reprenant les deux voies d'activation de la dégranulation spécifique des PMN bovins

Dans les voies des phospholipases C et D, il y a également formation d'IP3 et d'acide phosphatidique qui contribuent à l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. L'IP3 mobilise le  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du réticulum et l'acide phosphatidique agit comme un ionophore calcique. Cette augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire active alors les enzymes  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes telles que la phospholipase A2 (figure 35).

## BIBLIOGRAPHIE

ABSOLOM D.R., (1986)

In : Immunochemical Techniques Part J. (Phagocytosis and cell-mediated cytotoxicity).

Meth. Enzymol., ed by G.Di Sabato, J. Everse, 132, 167.

BAGGIOLINI M., HORISBERGER U., GENNARO R., DEWALD B., (1985)

Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants.

Lab. Invest., 52, 151-158.

BECKER E.L., (1990)

The short and happy life of neutrophil activation.

J. Leuk. Biol., 47, 378-389.

BENVENISTE J., (1985)

Paf-acether (Platelet-activating factor).

Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.,13, 11-18.

BERKOW R.L., DODSON R.W., KRAFT A.S., (1987)

The effect of protein kinase C inhibitor, H-7, on human neutrophil oxidative burst and degranulation.

J. Biol. Chem., 41, 441-446.

BERRIDGE M., (1985)

Les molécules de la communication dans la cellule.

Pour la science, 98, 134-146.

BILLAH M.M., ECKEL S., MULLMANN T.J., EGAN R.W., SIEGEL M.I., (1989 a)

Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils.

J. Biol. Chem., 264, 17069-17077.

BILLAH M.M., PAI J-K., MULLMANN T.J., EGAN R.W., SIEGEL M.I., (1989 b)

Regulation of phospholipase D in HL-60 granulocytes.

J. Biol. Chem., 264, 9069-9076.

BLOTMAN F. POUBELLE P., CHAINTREUIL J., DAMON M., (1983)

Icosanoïdes, inflammation articulaire et polyarthrite rhumatoïde.

In : Biochimie de l'inflammation, ed by Blotman F., Crastes de paulet A., Simon L., Masson, Paris, 134-173.

BOSSANT M.J., FARINOTTI R., MENCIA-HUERTA J.M., BENVENISTE J., MAHUZIER G., (1987)

Characterization and quantification of paf-acether (platelet-activating factor) as a heptafluorobutyrate derivative of 1-O-alkyl-2-*sn*-glycerol by capillary column gas chromatography with electron-capture detection. J. Chromatogr. Biomed Appl., 423, 23-31.

BRAQUET P., BRAQUET M., (1983)

Phagocytose et stimulation des processus d'oxydation cellulaire des macrophages.

In : Biochimie de l'inflammation, ed by Blotman F., Crastes de Paulet A., Simon L., Masson, Paris, 67-92.

CHILTON F.H., O'FLAHERTY J., ELLIS J.M., SWENDSEN C.L., WYKLE R.L., (1983)

Selective acylation of lyso platelet-activating factor by arachidonate in human neutrophils.

J. Biol. Chem., 258, 7268-7271.

CRASTES DE PAULET A., (1983)

Les grandes voies métaboliques de l'acide arachidonique.

In : Biochimie de l'inflammation, ed by Blotman F., Crastes de Paulet A., Simon L., Masson, Paris, 1-43.

DEWALD B., THELEN M., WYMAN M.P., BAGGIOLINI M., (1989)

Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces exocytosis in human neutrophils.

Biochem. J., 264, 879-884.

DODET B., (1989)

Stratégies anti-inflammatoires : l'inflation.

Biofutur, 82, 25-37.

DUQUE R.E., FANTONE J.C., KRAMER C., MARASCO W.A., PHAN S.H., (1986)  
Inhibition of neutrophil activation by p-Bromophenacyl Bromide and its effects on phospholipase A2.  
Br. J. Pharmac., 88, 463-472.

FIORE S., NICOLAOU K.C., CAUFIELD T., KATAOKA H., SERHAN C.N., (1990)  
Evaluation of synthetic sphingosine, lysosphingolipids and glycosphingolipids as inhibitors of functional responses of human neutrophils.  
Biochem. J., 266, 25-31.

GENNARO R., DEWALD B., HORISBERGER U., GUBLER H.U., BAGGIOLINI M., (1983)  
A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils.  
J. Cell biol., 96, 1651-1661.

GOLDSTEIN I.M., HOFFSTEIN S.T., WEISSMANN G., (1975)  
Mechanisms of lysosomal enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes.  
J. Cell biol., 66, 647-652.

GUALDE N., (1986)  
La réaction inflammatoire.  
La recherche, 17, 623-635.

HARRIS R.A., CLAY K., MURPHY R., HENSON P., (1985)  
Effects of PAF and related lipids on membrane physical properties.  
Fed. Proc. (Faseb J.), 44, 858 (Abs 2614).

KANO H., YAMADA K., SAKANE F., (1990)  
Diacylglycerol kinase : a key modulator of signal transduction ?  
Trends Biochem. Sci., 15, 47-50.

KELLY B.A., CARCHMAN R.A., (1987)  
The relationship between lysosomal enzyme release and protein phosphorylation in human monocytes stimulated by phorbol esters and opsonized zymosan.  
J. Biol. Chem., 262, 17404-17411.

KUMAR R., WEINTRAUB S.T., McMANUS L.M., PINCKARD R.N., HANAHAN D.J., (1984)

A facile route to semi-synthesis of acetyl glycerylether phosphoethanolamine and its choline analogue.

J. Lipid Res., 25, 198-208.

KYGER E.M., FRANSON R.C., (1984)

Nonspecific inhibition of enzymes by p-Bromophenacyl Bromide.

Inhibition of human platelet phospholipase C and modification of sulfhydryl groups.

Biochem. Biophys. Acta, 794, 96-103.

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

The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor.

J. Immunol., 137, 2653-2661.

MURAKAMI K., CHAN S.Y., ROUTTENBERG A., (1986)

Protein kinase C activation by *cis*-fatty acid in the absence of  $Ca^{2+}$  and phospholipids.

J. Biol. Chem., 261, 15424-15429.

NACCACHE P.H., MOLSKI T.F.P., BORGEAT P., SHA'AFI R.I., (1985)

Intracellular calcium redistribution and its relationship to fMet-Leu-Phe, leukotriene B<sub>4</sub>, and phorbol ester induced rabbit neutrophil degranulation.

J. Cell. Physiol., 122, 273-280.

NIEVA J-L., GONI F.M., ALONSO A., (1989)

Liposome fusion catalytically induced by phospholipase C.

Biochemistry, 28, 7364-7367.

NISHIZUKA Y., (1989)

The family of protein kinase C signal transduction.

JAMA, 162, 1826-1833.

O'FLAHERTY J.T., WYKLE R.L., (1983)

Biology and biochemistry of platelet - activating factor.

Clin. Rev. Allergy, 1, 353-367.

PARKE D.V., (1983)

The biochemical pharmacology of carbenoxolone,  
*Acta Gastro Enterologica Belgica*, 46, 437-447.

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

Measurement of sub-picogram quantities of platelet activating factor (AGEPC) by gas chromatography/negative ionization mass spectrometry.  
*Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 13, 107-111.

RANDO R.R., (1988),

Regulation of protein kinase C activity by lipids.  
*FASEB J.*, 2, 2348-2355.

REMY E., (1990)

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

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

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

ROSAM A-C., WALLACE J.L., WHITTLE B.J.R., (1986)

Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach.  
*Nature*, 319, 54-58.

STYRT B., (1989)

Species variation in neutrophil biochemistry and function.  
*J. Leuk. Biol.*, 46, 63-74.

VAN DEN BOSCH H., (1980)

Intracellular phospholipases A.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 604, 191-246.

WILSON E., RICE W.G., KINKADE J.M., Jr., MERRILL A.H., Jr., ARNOLD R.R.,  
LAMBETH J.D., (1987)

Protein kinase C inhibition by sphingoid long-chain bases : effects on  
secretion in human neutrophils.

Arch. Biochem.Biophys., 259, 204-214.