



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### **Etude de la relation entre la production des leucotrienes et la production de radicaux superoxydes par les leucocytes polymorphonucléaires bovins et les macrophages murins**

Eric, Remy

*Award date:*  
1985

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

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

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

#### **Take down policy**

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



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

---

ETUDE DE LA RELATION ENTRE LA PRODUCTION  
DES LEUCOTRIENES ET LA PRODUCTION DE  
RADICAUX SUPEROXYDES PAR LES LEUCOCYTES  
POLYMORPHONUCLEAIRES BOVINS ET LES  
MACROPHAGES MURINS

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

REMY Eric  
1985

J'adresse mes plus vifs remerciements en premier lieu à Monsieur le Professeur J. REMACLE qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et qui m'a précieusement aidé tout au long de ce travail.

Je remercie également Monsieur Gérard LENOIR pour sa très grande disponibilité et son aide efficace.

Je voudrais, par la même occasion, exprimer toute ma reconnaissance à tous les autres membres du département de biochimie cellulaire pour leur sympathie et leur collaboration.

# T A B L E   D E S   M A T I E R E S

=====

|   |    |
|---|----|
| <u>INTRODUCTION</u>   | 1  |
| I. ACTIVATION DES CELLULES INFLAMMATOIRES                             | 2  |
| 1. La dégranulation   | 2  |
| 2. La poussée d'activité respiratoire (P.A.R.) ou "respiratory burst" | 2  |
| 3. La cascade de l'acide arachidonique                                | 2  |
| II. INITIATION DE L'ACTIVATION DES CELLULES INFLAMMATOIRES            | 3  |
| III. FORMATION DES RADICAUX LIBRES                                    | 4  |
| Biosynthèse   | 4  |
| IV. FORMATION DES LEUCOTRIENES  | 5  |
| IV.1. Structure et biosynthèse des leucotriènes                       | 5  |
| IV.2. Activité biologique des LT                                      | 7  |
| V. BUT DU TRAVAIL   | 9  |
| <br>  |    |
| <u>MATERIEL ET METHODES</u>   | 11 |
| I. SOLUTIONS  | 11 |
| II. PREPARATION DES CELLULES  | 12 |
| A. Macrophages péritonéaux de souris                                  | 12 |
| 1. Type de cellules récoltées dans la cavité intrapéritonéale         | 12 |
| 2. Prélèvement et préparation des macrophages (96 H PEC)              | 12 |
| B. Leucocytes polymorphonucléaires de bovin                           | 13 |
| - Purification et préparation des leucocytes                          | 13 |
| a) Solutions  |    |
| b) Méthode  |    |

|  |    |
|--|----|
| C. Identification des cellules récoltées dans la suspension finale               | 15 |
| . Macrophages péritonéaux de souris (96 h PEC)                                   | 15 |
| . Polymorphonucléaires neutrophiles isolés du sang de bovins.                    | 17 |
| III. DOSAGE DES $O_2 \cdot (-)$ : METHODE DE LA CHEMOLUMINESCENCE                | 19 |
| III.1. Principe général  | 19 |
| III.2. Dosage  | 20 |
| . Stimulation des macrophages par le zymosan opsonisé                            | 20 |
| . Stimulation des PMN de bovin par le zymosan opsonisé                           | 20 |
| . Stimulation des PMN de bovin par l'ionophore du calcium A23187                 | 21 |
| III.3. Calcul et présentation des données  | 21 |
| IV. DOSAGE DES LEUCOTRIENES  | 23 |
| A. Incubation des cellules   | 23 |
| 1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé                                  | 23 |
| 2. PMNL bovins stimulés par le zymosan opsonisé                                  | 23 |
| 3. PMNL bovins stimulés par ionophore du calcium                                 | 24 |
| B. Extraction et purification des leucotriènes                                   | 24 |
| 1. Préparation des colonnes  | 25 |
| 2. Extraction des leucotriènes   | 25 |
| C. Détection et dosage des leucotriènes : analyse par HPLC                       | 25 |
| 1. Leucotriènes produits par les PMN   | 25 |
| 2. Leucotriènes produits par les macrophages intrapéritonéaux                    | 25 |
| D. Calcul de l'activité  | 29 |
| V. SYSTEME XANTHINE-XANTHINE OXYDASE POUR LA PRODUCTION DES RADICAUX SUPEROXYDES | 29 |
| . Solutions  | 30 |
| . Dosage et calcul   | 30 |

|   |    |
|---|----|
| <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>  | 32 |
| I. MISE AU POINT DES DOSAGES  | 32 |
| I.1. Mise au point du dosage des radicaux superoxydes par chémoluminescence   | 32 |
| I.1.1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé   | 32 |
| I.1.1.1. Influence de la concentration en lucigénine  | 32 |
| I.1.1.2. Influence de la concentration en zymosan opsonisé  | 32 |
| I.1.1.3. Influence de la concentration en macrophages   | 34 |
| I.1.2. PMN stimulés par le zymosan opsonisé   | 36 |
| I.1.2.1. Influence de la concentration en zymosan opsonisé  | 36 |
| I.1.2.2. Influence de la concentration en PMN   | 36 |
| I.1.3. PMN stimulés par l'ionophore du calcium A23187   | 36 |
| I.1.3.1. Influence de la concentration en ionophore A23187  | 38 |
| I.1.3.2. Influence de la concentration en calcium   | 38 |
| I.1.3.3. Influence de la concentration en acide arachidonique   | 38 |
| I.1.3.4. Influence de la concentration en cellules  | 40 |
| I.2. Mise au point du dosage des leucotriènes   | 40 |
| II. EFFETS D'INHIBITEURS DE LA CYCLOXYGENASE ET DE LA LIPOXYGENASE SUR LA PRODUCTION D'O <sub>2</sub> <sup>•(-)</sup> | 42 |
| II.1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé  | 42 |
| II.1.1. Effet de l'acide nordihydroguaiarétique sur la production d'O <sub>2</sub> <sup>•(-)</sup>                    | 42 |
| II.1.2. Effet du BW755C sur la production d'O <sub>2</sub> <sup>•(-)</sup>  | 44 |
| II.1.3. Effet de l'indométhacine sur la production d'O <sub>2</sub> <sup>•(-)</sup>                                   | 46 |
| Discussion  | 46 |
| II.2. PMN stimulés par l'ionophore A23187   | 49 |

|   |    |
|---|----|
| III. EFFETS DES INHIBITEURS DE LA LIPOXYGENASE SUR LA PRODUCTION DE LEUCOTRIENES  | 49 |
| III.1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé   | 51 |
| . Effet du NDGA sur la production de LTC <sub>4</sub>   | 51 |
| III.2. PMN stimulés par l'ionophore du calcium  | 51 |
| III.2.1. Effet du NDGA sur la production de LTB <sub>4</sub>  | 51 |
| III.2.2. Effet du BW755C sur la production de LTB <sub>4</sub>  | 55 |
| IV. EFFETS DES METABOLITES DE LA 5-LIPOXYGENASE SUR LA PRODUCTION DES O <sub>2</sub> <sup>•</sup> (-) PAR LES MACROPHAGES | 55 |
| Discussion  | 57 |
| V. ETUDE CINETIQUE DE LA PRODUCTION DES LT ET DES RADICAUX O <sub>2</sub> <sup>•</sup> (-)                                | 59 |
| V.1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé   | 59 |
| . Cinétique de production du LTC <sub>4</sub>   |    |
| . Cinétique de production des radicaux O <sub>2</sub> <sup>•</sup> (-)  |    |
| V.2. PMN stimulés par l'ionophore du calcium A23187   | 62 |
| . Cinétique de production du LTB <sub>4</sub>   |    |
| . Cinétique de production des radicaux O <sub>2</sub> <sup>•</sup> (-)  |    |
| V.3. PMN stimulés par le zymosan opsonisé   | 62 |
| . Cinétique de production du LTB <sub>4</sub>   |    |
| . Cinétique de production des radicaux O <sub>2</sub> <sup>•</sup> (-)  |    |
| V.4. Discussion   | 65 |
| . Comparaison entre les différentes cellules et entre les différents agents d'activation                                  | 65 |
| - chémoluminescence   |    |
| - production des leucotriènes   |    |
| . Comparaison entre production des LT et production des radicaux  | 66 |
| <u>CONCLUSION</u>   | 69 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE</u>  | 71 |

=====  
INTRODUCTION  
=====

L'étude de l'inflammation au niveau cellulaire a sans doute commencé avec Metchnikoff qui mit en évidence, à l'institut Pasteur en 1887, le pouvoir des globules blancs de se diriger vers certaines bactéries et de les ingérer. Depuis lors, un nombre incalculable de travaux nous ont apporté une moisson d'informations aussi bien sur l'activation et le rôle des diverses cellules impliquées dans les processus inflammatoires, que dans le nombre de plus en plus étendu de molécules qui sont synthétisées par ces mêmes cellules en réponse à un agent étranger. Dans cette introduction, nous allons décrire brièvement les principales caractéristiques de l'activation des cellules, puis passer en revue la production des molécules qui vont nous intéresser, à savoir les radicaux libres et les leucotriènes. En ce qui concerne les autres aspects de l'inflammation, il serait trop long de les décrire tous ici et nous préférons nous référer à des revues générales (WILLOUGHLBY, 1978; WEISSMAN, 1980).



## I. ACTIVATION DES CELLULES INFLAMMATOIRES

Les phagocytes sont attirés vers leur proie par chimotactisme; une fois en contact avec elle, ils l'ingèrent par phagocytose. Cette phagocytose initie alors chez ces cellules trois phénomènes (BRAQUET et BRAQUET, 1983; WEISSMAN, 1980) :

### 1) La dégranulation :

Processus de fusion qui unit le phagosome et les lysosomes. Ceux-ci contiennent des hydrolases qui participent à la destruction de la particule étrangère (bactérie par exemple). Lors de la dégranulation, les hydrolases sont libérées dans la vacuole qui renferme la bactérie séquestrée; une partie s'échappe à l'extérieur dans l'espace extracellulaire.

### 2) La poussée d'activité respiratoire (P.A.R.) ou "respiratory burst" :

Cette poussée d'activité respiratoire du phagocyte se caractérise par 4 processus physiologiques :

- une augmentation de la consommation d' $O_2$
- une augmentation du cycle des pentoses phosphates : oxydation du glucose à partir du glucose-6-phosphate avec réduction du  $NADP^+$  en NADPH
- une production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )
- une production de radicaux superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )

### 3) La cascade de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est libéré de la membrane plasmique sous l'action d'une phospholipase. Cet acide gras polyinsaturé libre va alors servir de substrat à 2 voies enzymatiques différentes : l'une produit les prostaglandines via la cycloxygénase, l'autre produit les leucotriènes (LT) via la lipoxygénase.

Expérimentalement, les macrophages et les neutrophiles peuvent être activés de différentes façons, soit par des stimuli particuliers, tels le zymosan opsonisé, les immun complexes,... soit par des stimuli solubles, tels que le phorbol myristate acétate (PMA), l'ionophore du calcium A23187, le peptide formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP), des lipopolysaccharides (LPS),... (WARD and al., 1984; BAXTER, 1983; BONNEY and al., 1984). La réponse obtenue peut varier fortement selon le stimulus.

## II. INITIATION DE L'ACTIVATION DES CELLULES INFLAMMATOIRES

---

Suite à la liaison d'un agent particulaire stimulant avec les récepteurs de surface du phagocyte, il apparaît chez ce dernier une augmentation de la fluidité de la membrane plasmique qui est directement suivie par un changement du potentiel de membrane. Ce changement du potentiel transmembranaire a pour origine un transfert rapide de cations divalents ( $\text{Ca}^{++}$ ) de l'extérieur de la cellule ou de sites de stockage situés sur la membrane plasmique vers des sites de liaison intracellulaire. Après cette activation suit un temps de latence, puis les cellules génèrent les radicaux  $\text{O}_2 \cdot (-)$ , transforment l'acide arachidonique en divers métabolites et secrètent des enzymes lysosomiaux (WEISSMAN, 1980). Le stimulus initial mobiliserait donc le  $\text{Ca}^{++}$  vers l'intérieur de la cellule et celui-ci agirait alors sur les différents sites d'activation que sont :

- la NADPH oxydase : production d' $\text{O}_2 \cdot (-)$
- la phospholipase  $\text{A}_2$  : libération de l'acide arachidonique
- la lipoxygénase : production de leucotriènes
- l'adenylate cyclase : production d'AMPc
- la dégranulation : fusion du lysosome avec le phagosome qui requiert du  $\text{Ca}^{++}$

(BRAQUET et BRAQUET, 1983).

### III. FORMATION DES RADICAUX LIBRES

---

La poussée d'activité respiratoire fournit une série d'agents oxygénés hautement réactionnels qui sont utilisés par le phagocyte comme agents microbicides et bactéricides (BABIOR, 1978).

La grande réactivité de ces radicaux conduit aussi à une destruction des tissus avoisinant leur site de production.

#### Biosynthèse

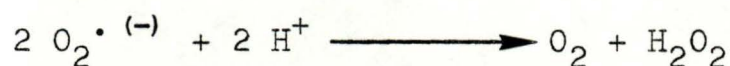
---

L'augmentation de la consommation d' $O_2$  lors de la poussée d'activité respiratoire s'explique en grande partie par la formation de radicaux superoxydes :

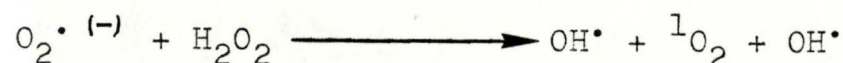


La NADPH oxydase, qui est l'enzyme clé dans cette réduction partielle de l'oxygène, se localise sur la membrane externe des phagocytes. Suite à l'endocytose, cette enzyme se retrouve à l'intérieur du phagosome où elle y déverse ses  $O_2^{\cdot (-)}$ . La voie du glucose-6-phosphate va donc être activée pour régénérer le NADPH utilisé pour la production des  $O_2^{\cdot (-)}$ .

ROOT et METCALF (1977) ont montré que 80 % de ces  $O_2^{\cdot (-)}$  se transforment en  $H_2O_2$  par dismutation.



Les radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$  et  $H_2O_2$  ne sont pas les deux seuls agents microbicides : ils peuvent réagir ensemble pour former d'autres agents très réactionnels, comme le radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ )



On constate qu'il y a donc une interaction entre les phénomènes liés à la poussée d'activité respiratoire et que dans cette perspective, la NADPH oxydase y joue un rôle prépondérant.

#### IV. FORMATION DES LEUCOTRIENES (LT)

---

##### IV.1. Structure et biosynthèse des leucotriènes

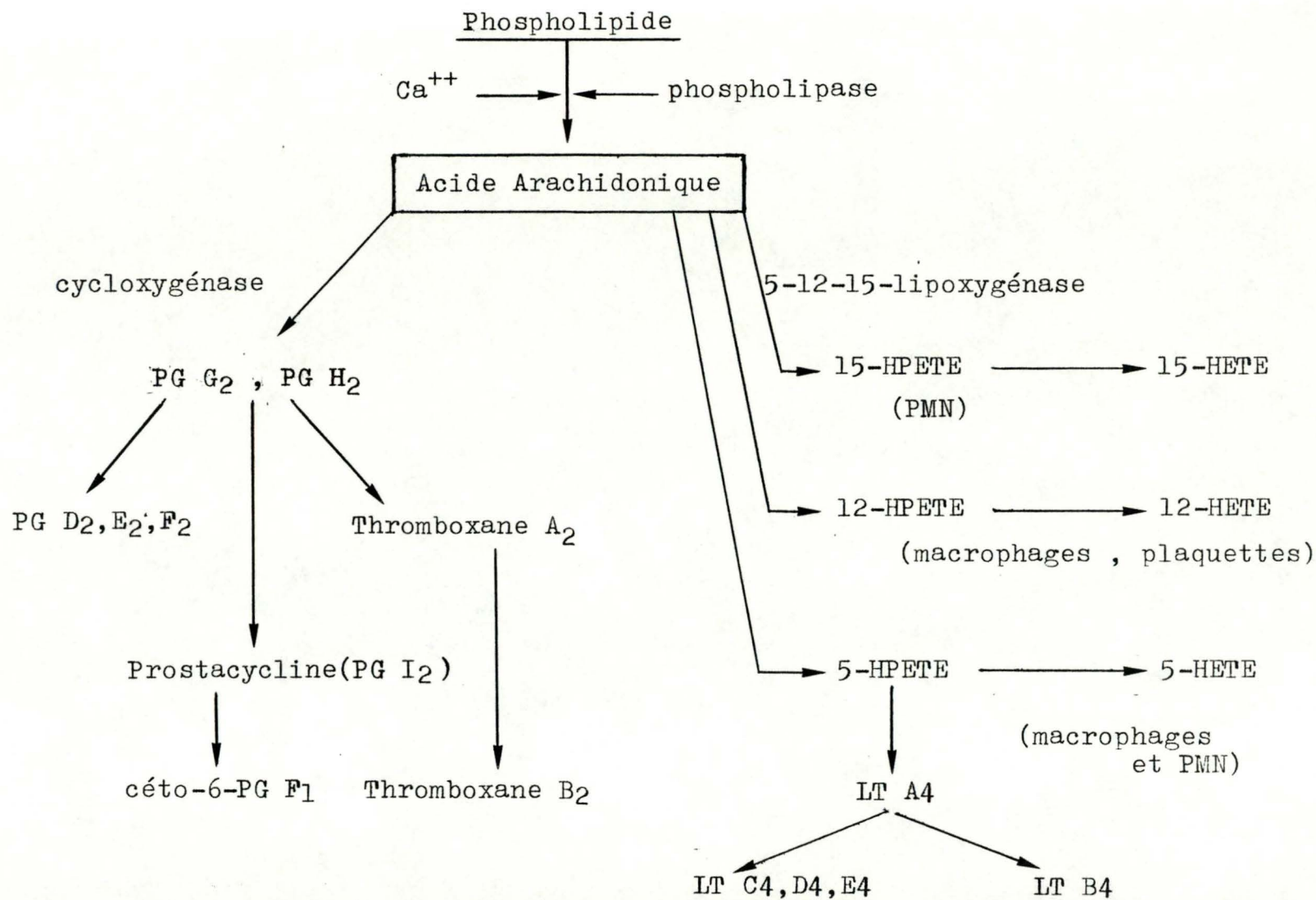
Les prostaglandines (PG) et les LT sont synthétisés à partir d'un précurseur commun, l'acide arachidonique, qui n'existe pas à l'état libre dans la cellule mais sous forme estérifiée dans les phospholipides membranaires. C'est une phospholipase, activée par le  $Ca^{++}$ , qui libère l'acide gras insaturé (BONNEY and al., 1984).

Les deux types d'enzymes clé responsables des deux voies métaboliques portant de l'acide arachidonique sont, d'une part, les lipoxigénases pour les LT, et d'autre part, la cycloxygénase pour les PG.

La Fig. 1 illustre le schéma général du métabolisme de l'acide arachidonique par la cycloxygénase et par les trois types connus de lipoxigénases.

Le terme leucotriène a été formé à partir des mots leucocyte et triène, désignant respectivement la cellule d'origine de ces substances et leur caractéristique structurale, c'est-à-dire les trois doubles liaisons conjuguées que l'on retrouve dans leur formule chimique (Fig. 2).

L'oxygénation de l'acide arachidonique en son dérivé 5-hydroperoxyde (5-HPETE) par la 5-lipoxigénase, puis transformé en leucotriène A<sub>4</sub>, sont les premières réactions dans la synthèse des principaux LT. Le 5-HETE est le produit de la réduction du 5-HPETE par les peroxydases. Le LTA<sub>4</sub>, qui est une substance instable (époxyde), constitue la molécule clé de la voie des leucotriènes. Son groupement époxyde peut subir une attaque nucléophile de l'eau. Cette réaction peut être catalysée enzymatiquement



**Fig.1:** Schéma général du métabolisme de l'acide arachidonique (d'après Borgeat et al., 1983); HPETE: acide hydroxy eicotétraénoïque; HETE: acide hydroxy eicotétraénoïque.

par une hydrolase pour donner naissance au  $\text{LTB}_4$ , mais elle peut se faire aussi non enzymatiquement pour former deux groupes d'isomères : deux 5,12-dihydroxyacides stéréo-isomères du  $\text{LTB}_4$  et deux 5,6 dihydroxyacides. Le groupement époxyde du  $\text{LTA}_4$  peut également être attaqué par le glutathion pour former enzymatiquement le  $\text{LTC}_4$ . L'acide glutamique (acide aminé constituant le glutathion) du  $\text{LTC}_4$  peut être éliminé pour former le  $\text{LTD}_4$  qui, à son tour, peut perdre la glycine pour former le  $\text{LTE}_4$  (BORGEAT et al., 1983; HANSSON et al., 1983). La Fig. 2 illustre la cascade de l'acide arachidonique initié par la 5-lipoxygénase.

#### IV.2. Activité biologique des LT

- 1) Les leucotriènes  $\text{C}_4$ ,  $\text{D}_4$  et  $\text{E}_4$  constituent les SRS-A (Slow reacting substances of anaphylaxis).

Les SRS-A jouent un rôle important dans l'asthme et l'allergie (BACH, 1984; BORGEAT et al., 1983) :

- ce sont des bronchoconstricteurs extrêmement puissants;
- ils stimulent la production et le transport de mucus dans les poumons;
- ils augmentent la perméabilité des petits vaisseaux;
- ils excitent les terminaisons nerveuses de la peau.

- 2) Le  $\text{LTB}_4$  joue un rôle important dans la réaction inflammatoire (SMITH, 1983) :

- il stimule la mobilité et l'aggrégation des leucocytes;
- il stimule la dégranulation des cellules inflammatoires;
- il possède un pouvoir chémo-tactique vis-à-vis des leucocytes;
- il stimule l'adhésion des cellules inflammatoires à l'endothélium vasculaire et stimule leur migration à travers la paroi des petits vaisseaux sanguins.
- il augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins.

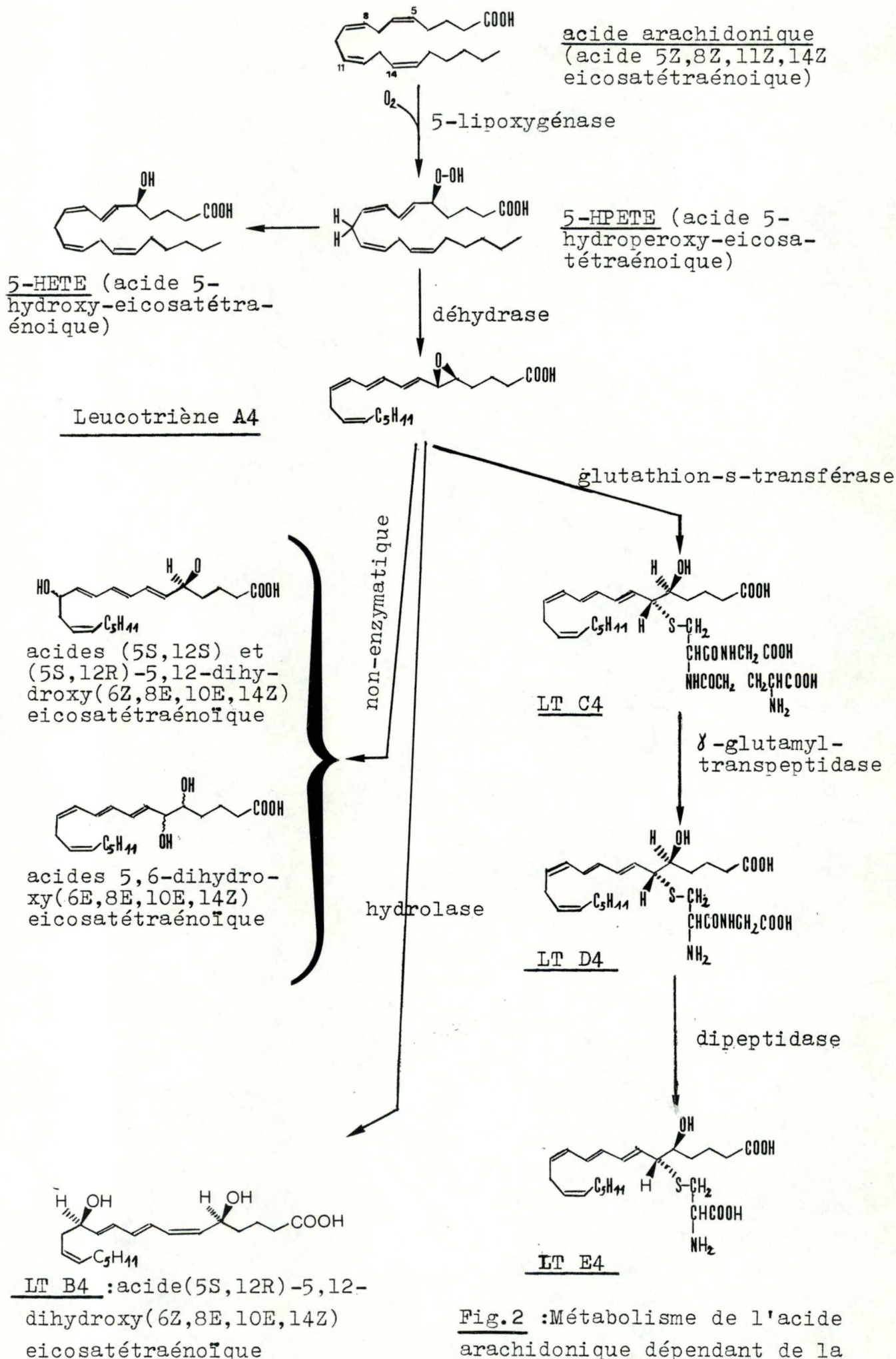


Fig.2 :Métabolisme de l'acide arachidonique dépendant de la 5-lipoxygénase(d'après Hansson,83)

## V. BUT DU TRAVAIL

---

L'étude des processus inflammatoires se réalise de plus en plus au niveau cellulaire et moléculaire. Dans cette introduction, nous avons décrit les différents phénomènes cellulaires qui ont lieu lors de l'activation des phagocytes. Nous avons d'ailleurs plus particulièrement développé deux voies métaboliques, à savoir la production de leucotriènes et la production d'espèces oxygénées hautement réactionnelles. Ces molécules sont aujourd'hui bien connues et on sait qu'elles interviennent dans les processus inflammatoires. Mais nos connaissances sont bien faibles en ce qui concerne les mécanismes de régulation de leur synthèse, et en ce qui concerne les interactions de ces molécules, d'une part avec les divers types de cellules inflammatoires, et d'autre part avec les différents phénomènes cellulaires qui ont lieu lors de l'activation des phagocytes.

Pourtant, ce problème revêt une importance considérable car beaucoup de problèmes liés notamment aux allergies ou aux inflammations chroniques pourraient peut-être être envisagés différemment si l'on connaissait mieux les systèmes de régulation qui président au déroulement des processus inflammatoires.

Il n'est pas possible d'aborder d'emblée un problème aussi complexe, du fait des divers types de cellules qui sont impliquées et du grand nombre de molécules synthétisées. Nous avons donc choisi, dans ce mémoire, de travailler sur la synthèse des leucotriènes (LTB<sub>4</sub> et LTC<sub>4</sub>) et sur la synthèse de radicaux superoxydes en vue d'étudier la relation entre ces deux productions.

En effet, INGRAHAM (1982) et SMITH (1980), en utilisant des inhibiteurs de la lipoxigénase sur la production d'O<sub>2</sub><sup>•(-)</sup> et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par des macrophages, ont suggéré que la



voie de la lipoxigénase pourrait entraîner la production de radicaux libres.

D'autre part, certains auteurs (SUMIMOTO and al., 1984; PRESCOTT and al., 1984) ont démontré que le  $\text{LTB}_4$  pouvait induire la production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$  chez les leucocytes.

Nous avons aussi limité notre étude à deux types de cellules inflammatoires qui sont, d'une part, les macrophages péritonéaux de souris stimulés par le zymosan opsonisé (extraits de parois de levure entourés d'opsonines) et, d'autre part, des polymorphonucléaires neutrophiles de bovins stimulés par le zymosan opsonisé ou l'ionophore du calcium A23187.

## =====

## MATERIEL ET METHODES

=====

I. SOLUTIONS

- PBS : solution 0,9 % NaCl (Merck, Darmstadt) tamponnée à pH7,4 par 0,01 M en phosphate. *la solution est filtrée.*
- Milieu de culture RPMI 1640 (Eurobio, Paris).
- Thioglycolate (Merck, Darmstadt) : 2,5 % dilué dans le PBS, la solution est filtrée avant l'emploi.
- Lucigénine (Sigma Chemical Co., St Louis) :  $10^{-3}$  M dans du PBS, conservée à l'abri de la lumière.
- Zymosan opsonisé : zymosan A (à partir de la levure *S. Cerevisae*; Sigma Chemical Co., St Louis) est incubé durant 30 min. à 37° C dans le PBS (4 mg/ml). Le zymosan est centrifugé (1500 RPM , 5 min.) et resuspendu dans du sérum bovin (8 mg/ml) durant 30 min. à 37° C. Le zymosan maintenant opsonisé est lavé une fois avant d'être définitivement resuspendu dans le PBS à une concentration de 4 mg/ml.
- Ionophore du calcium A23187 (Sigma Chemical Co., St Louis); solution à 1,7 mg/ml éthanol.
- $\text{CaCl}_2$  : solution 0,2 M dans de l'eau distillée.
- Prostaglandine  $\text{B}_2$  (Sigma Chemical Co., St Louis) : solution à 0,33 mg/ml éthanol.

## II. PREPARATION DES CELLULES

### A. Macrophages péritonéaux de souris

#### 1. Type de cellules récoltées dans la cavité intrapéritonéale

L'injection de thioglycolate dans la cavité intrapéritonéale provoque l'accumulation de cellules phagocytaires et stimule ces dernières.

Vingt-quatre heures après l'injection, on récolte principalement de cette cavité des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNL); appelés "24 h PEC" (PEC : Peritoneal exudate cells) (MULLER-PEDDINGHAUS , 1984). Nonante-six heures (4 jours) après l'injection, on y récoltera principalement des macrophages et quelques lymphocytes : ces cellules sont appelées "96 h PEC".

#### 2. Prélèvement et préparation des macrophages (96 h PEC)

- 0,6 ml de thioglycolate (2,5 %) est injecté dans la cavité intrapéritonéale d'une souris N.M.R.I.
- L'animal est sacrifié 4 jours plus tard en séparant la tête du corps pour éviter un afflux sanguin dans la cavité abdominale.
- Le cadavre est fixé sur une planche à dissection. La peau de l'abdomen est incisée et décollée de la membrane sous-jacente.
- Un petit orifice est pratiqué dans le péritoine pour procéder, à l'aide d'une pipette pasteur, au lavage de la cavité intrapéritonéale.  
Ce lavage est réalisé en rinçant 3 à 4 fois la cavité avec 6 ml de milieu de culture (à 37° C) RPMI 1640 contenant 20 % de sérum de veau foetal.
- La suspension cellulaire (6 ml) est ensuite récupérée et placée dans un tube préalablement refroidi à 0° C, afin

d'éviter l'adhésion des macrophages sur les parois.  
 Les cellules seront conservées dans ces conditions  
 jusqu'au moment de leur utilisation.  
 La quantité de cellules dans la suspension est estimée  
 par comptage à l'hémocytomètre.

## B. Leucocytes polymorphonucléaires de bovin

### Purification et préparation des leucocytes

#### a) Solutions :

- .....
- N.P. : NaCl 0,7 % tamponnée à pH7 par 0,0 132 M en  
 phosphate.  
 N.N.P. : NaCl 2,7 % tamponnée à pH7 par 0,0 132 M en  
 phosphate.  
 E.N.P. : 1,5 % EDTA dans la solution N.P.

#### b) Méthode :

- .....
- Placer, dans 6 bouteilles de centrifugation de 250 ml,  
 10 ml de solution ENP et 100 ml de sang bovin.
  - Centrifuger durant 20 min. à 2000 RPM et 20° C au rotor  
 JA14 (Beckman J-21 B).
  - Enlever le surnageant contenant les plaquettes et la  
 couche blanchâtre de monocytes et lymphocytes qui re-  
 couvre le culot de globules rouges.
  - Un choc hypotonique pour lyser les globules rouges est  
 réalisé comme suit :
    - . ajouter aux globules rouges 100 ml d'eau distillée et  
 remuer durant 30 sec.
    - . 50 ml de solution N.N.P. sont alors ajoutés pour réta-  
 blir l'isotonicité.
  - Centrifuger durant 20 min à 1100 RPM et 20° C au rotor  
 JA14 (Beckman J-21 B).

- Enlever le surnageant contenant les globules rouges lysés.
- Le culot (PMNL) est resuspendu dans 10 ml de solution N.P.
- Rassembler le contenu de chaque récipient dans une seule bouteille.
- Centrifuger durant 20 min. à 1100 RPM et 20° C au rotor JA14 (Beckman J-21 B).
- Enlever le surnageant.
- Un second choc hypotonique est réalisé pour lyser les derniers globules rouges :

. ajouter au culot 50 ml d'eau distillée et agiter pendant 30 sec.

. ajouter 25 ml de solution N.N.P. pour rétablir l'isotonicité.

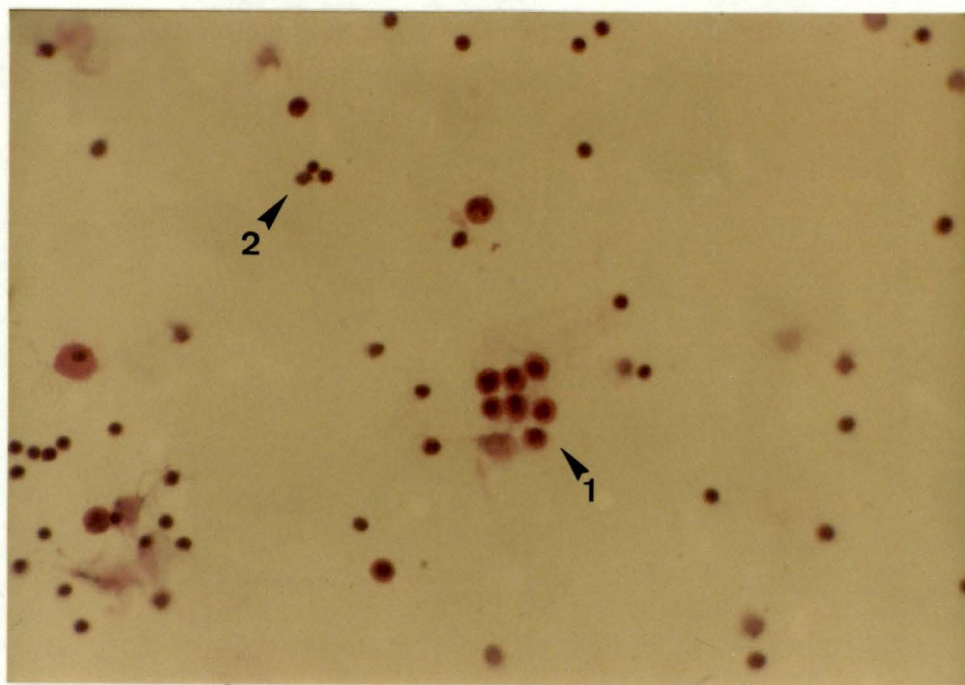
- Centrifuger durant 20 min. à 1100 RPM et 20° C au rotor JA14 (Beckman J-21 B).
  - Le culot de PMN purifiés est resuspendu dans le milieu d'incubation : milieu de culture RPMI 1640, contenant 20 % de sérum de veau foetal.
- Les cellules sont conservées dans ce milieu à 0° C, jusqu'au moment de leur utilisation.
- Une estimation de la concentration des cellules est réalisée par comptage à l'hémocymètre.

C. Identification des cellules récoltées dans la suspension finale

Macrophages péritonéaux de souris (96 H PEC)

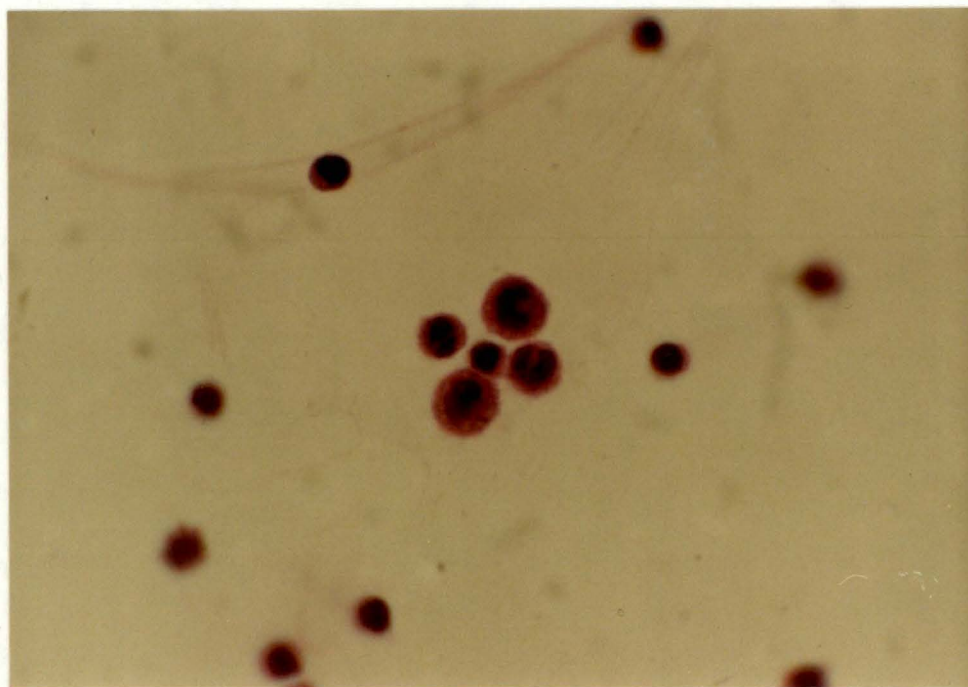
Une goutte de la suspension finale est étalée sur une lame porte-objet et ensuite colorée à l'hémalum-érythrosine.

L'observation de ce frottis de cellules au microscope nous apprend que la suspension contient  $\pm 47\%$  de macrophages et  $\pm 53\%$  de lymphocytes. Aucun polymorphonucléaire n'a été aperçu.



Coloration : hémalum-érythrosine; grossissement : 460 X

1. amas de macrophages
2. lymphocytes



Coloration : hémalum-érythrosine; grossissement : 1150 X

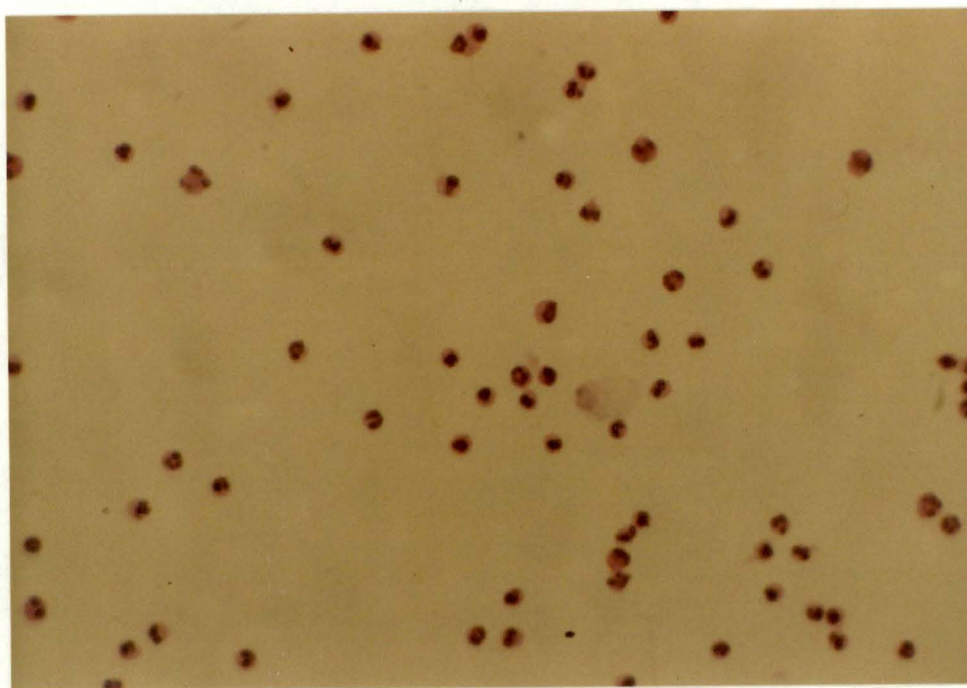
On peut observer des macrophages au centre de la photo :  
grosses cellules avec noyau réniforme.

Les lymphocytes sont les petites cellules dont le no-  
yau occupe la quasi-totalité du cytoplasme.

Polymorphonucléaires neutrophiles isolés du sang de bovins

Une goutte de la suspension finale a été étalée sur une lame porte-objet et ensuite colorée à l'hémalum-érythrosine.

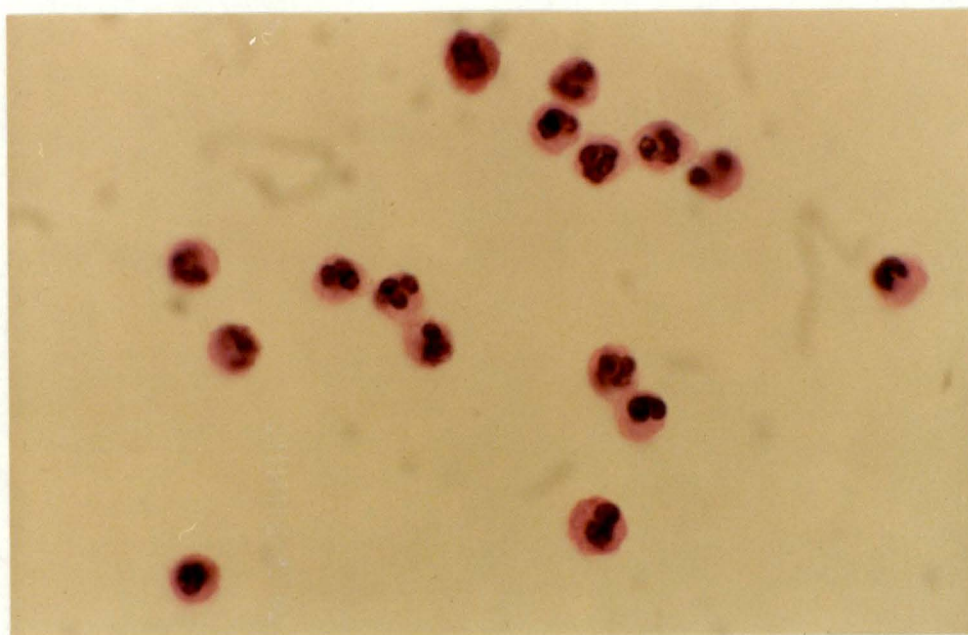
Nous constatons, suite à l'observation au microscope de ce frottis, que cette suspension de cellules contient essentiellement des polymorphonucléaires.



Coloration : hémalum-érythrosine; grossissement : 460 X

On observe une grosse majorité de polymorphonucléaires (noyau polylobé).





Coloration : hémalum-érythrosine; grossissement : 1150 X

On distingue bien le noyau polylobé des cellules.

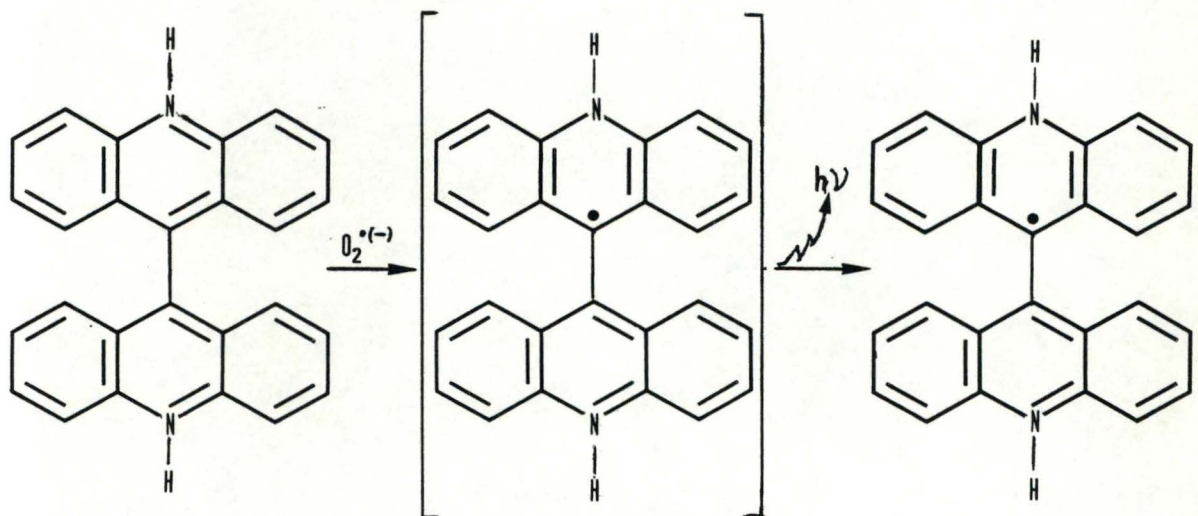
### III. DOSAGE DES $O_2^{\cdot(-)}$ : METHODE DE LA CHEMOLUMINESCENCE (CL)

#### III.1. Principe général

La chémoluminescence (CL) est une émission de lumière émise par une molécule "amplificatrice". Cette technique est utilisée, par exemple, pour la détection et le dosage de dérivés oxygénés ( $O_2^{\cdot(-)}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  et  $^1O_2$ ).

La molécule amplificatrice réagit avec ces dérivés réactionnels qui sont émis par les cellules lors de la poussée d'activité respiratoire. Elle est excitée et, lors de sa déexcitation, elle émet un photon qui peut être détecté par un photomètre.

Pour doser les radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$ , on utilise la "lucigénine" qui est une molécule amplificatrice réagissant principalement exclusivement avec ce radical (ALLEN, 1981) :



10,10'-diméthyl-  
bis-9,9'-biacri-  
dium nitrate  
(lucigénine).

radical diméthyl  
biacridium nitra-  
te excité

radical diméthyl  
biacridium nitra-  
te stable

### III.2. Dosage

Le dosage est réalisé à 37° C sur un photomètre (biocounter Lumac M 2010, Schoesberg, Netherlands). Une agitation régulière est maintenue dans la cuvette pendant l'expérience, afin d'obtenir des résultats reproductibles.

#### Stimulation des macrophages (96 h PEC) par le zymosan opsonisé

- Placer dans la cuvette du photomètre :
  - . 345  $\mu$ l de suspension contenant les macrophages (concentration finale :  $1 \cdot 10^6$  cellules/ml);
  - . 55  $\mu$ l de lucigénine  $10^{-3}$  M (concentration finale :  $10^{-4}$  M);
  - . 55  $\mu$ l de PBS contenant la molécule à tester (le contrôle reçoit 55  $\mu$ l de PBS ne contenant pas de molécule active).
- Laisser incuber dans la cuvette durant 10 min. à 37° C.
- A la dixième minute, ajouter dans le test 100  $\mu$ l de zymosan opsonisé 4 mg (concentration finale : 0,72 mg/ml).

Le test a un volume final de 555  $\mu$ l.

#### Stimulation des PMN de bovin par le zymosan opsonisé

La méthode est identique à celle utilisée pour les macrophages stimulés par le zymosan. La concentration finale en cellules est de  $3,5 \cdot 10^6$  cellules/ml.

Stimulation des PMN de bovin par l'ionophore du calcium A23187

- Placer dans la cuvette du photomètre :
  - . 435  $\mu$ l de suspension contenant les cellules (concentration finale :  $3,5 \cdot 10^6$  cellules/ml);
  - . 55  $\mu$ l de lucigénine  $10^{-3}$  M (concentration finale :  $10^{-4}$  M)
  - . 7  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  0,04 M (concentration finale en tenant compte du calcium déjà présent dans le milieu de culture RPMI 1640 : 0,75 mM)
  - . 55  $\mu$ l de PBS contenant la molécule à tester.
- Laisser incuber la cuvette durant 10 min. à 37° C.
- A la dixième minute, ajouter dans le test 3  $\mu$ l d'ionophore du calcium A23187 (concentration finale :  $10 \mu\text{M}$  (5  $\mu\text{g/ml}$ )).

Le test a un volume final de 555  $\mu$ l.

III.3. Calcul et présentation des données

La chémoluminescence "naturelle" des phagocytes est faible. Celle-ci est donnée par le nombre de photons émis avant d'ajouter l'agent activateur (zymosan ou ionophore). Lorsqu'on ajoute l'activateur, nous observons une période de latence de 60 sec. avant une montée spectaculaire de la chémoluminescence qui atteint un optimum au bout de quelques minutes.

Les Fig. 3a et 3b montrent l'évolution de la chémoluminescence au cours de l'expérience pour les 3 types de stimulation. De telles courbes sont établies en prenant, toutes les minutes, la valeur de la chémoluminescence en coups par minute (CPM). La prise des mesures débute avec l'ajout de l'activateur aux cellules et s'arrête 5 min. après avoir atteint le sommet de la courbe.

L'aire d'intégration de la courbe permet d'évaluer avec

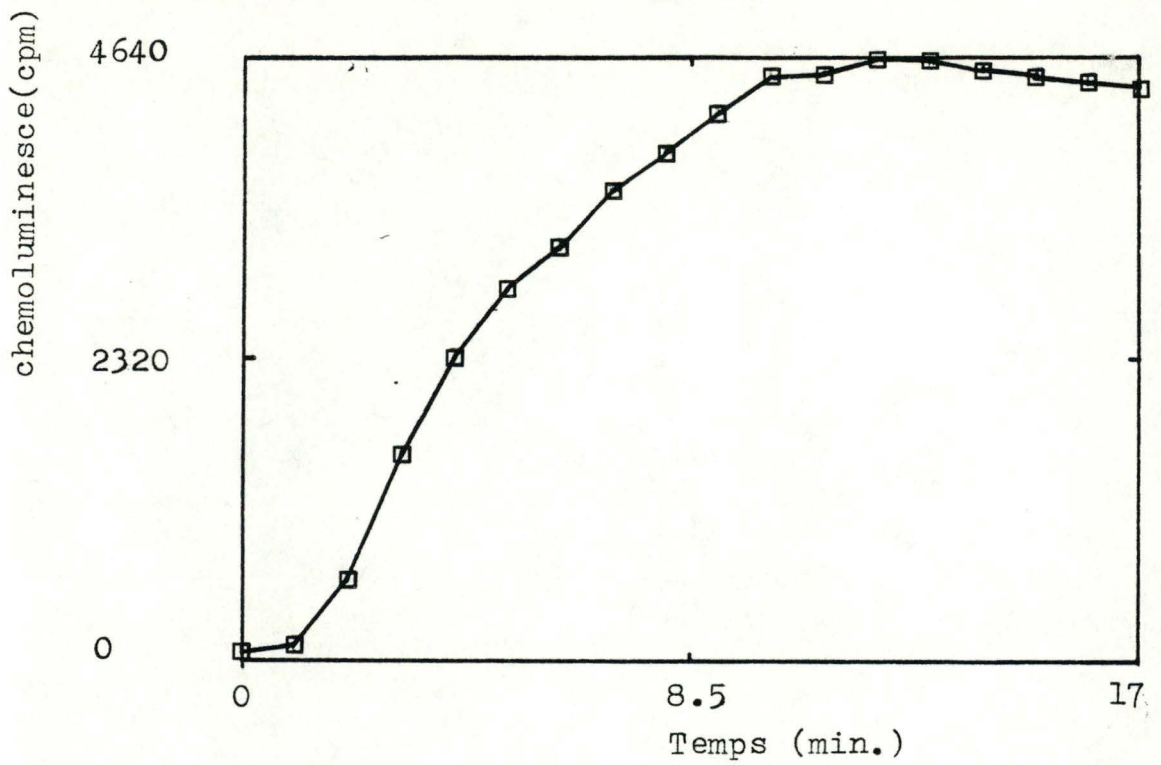


Fig. 3a : évolution au cours du temps de la chémoluminescence des macrophages ( $1.10^6/ml$ ) stimulés par le zymosan opsonisé.  
CPM = coups par minute.

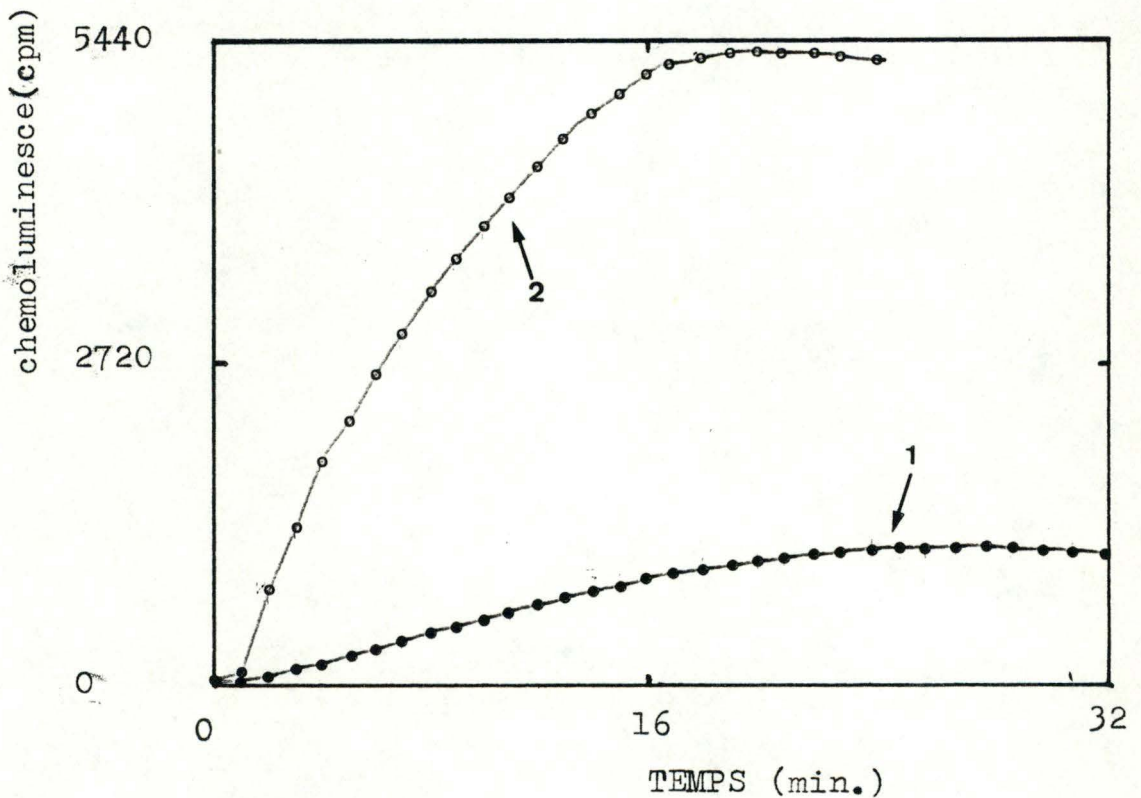


Fig. 3b : évolution au cours du temps de la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore (1) ou par le zymosan opsonisé (2). La concentration finale en PMN était de  $3,5.10^6/ml$ .  
CPM : coups par minute.

précision l'ampleur de la production de chémoluminescence par les cellules activées.

$\frac{RLU \times \text{min.}}{100}$  = aire d'intégration de la courbe à partir de l'activation des cellules par le stimulateur jusqu'à la 5ème minute qui suit le sommet de la courbe. On divise par 100 pour travailler avec des valeurs manipulables. R.L.U. (relative light units) = moyenne des points mesurés (CPM) toutes les minutes (MULLER-PEDDINGHAUSE, 1984).

#### IV. DOSAGE DES LEUCOTRIENES (LT)

##### A. Incubation des cellules

##### 1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé

- Placer, dans un tube de centrifugation, 4 ml de milieu RPMI 1640 contenant les macrophages (concentration finale : 1 à  $1,5 \cdot 10^6$  cellules/ml.
- Ajouter dans le tube 550  $\mu$ l de PBS contenant la molécule à tester.
- Incuber le test 10 min. à 37° C.
- Ajouter 1 ml de zymosan opsonisé à 4 mg/ml (concentration finale : 0,72 mg/ml) et incuber le test durant 90 min. à 37° C.
- Stopper la réaction en centrifugeant le tube à 1500 RPM, 5 min.
- Le surnageant contenant les leucotriènes est récupéré pour l'extraction.

##### 2. PMNL bovins stimulés par le zymosan opsonisé

- Placer dans un tube de centrifugation 8 ml de milieu RPMI 1640 contenant les PMNL (concentration finale :  $35 \cdot 10^6$  cellules/ml.

- Ajouter dans le tube 1 ml de PBS contenant la molécule à tester.
- Incuber le test 10 min à 37° C.
- Ajouter 2 ml de zymosan opsonisé à 40 mg/ml (concentration finale : 7,2 mg/ml) et incuber durant 20 min. à 37° C.
- Ajouter à la fin de l'incubation 8  $\mu$ l de prostaglandine B<sub>2</sub> ( $1,8 \cdot 10^{-7}$  g.) comme standard interne.
- Stopper la réaction en centrifugeant les cellules à 1500 RPM, 5 min.
- Récupérer le surnageant contenant les leucotriènes.

### 3. PMNL bovins stimulés par ionophore du calcium

- Placer dans un tube de centrifugation 8 ml de milieu RPMI 1640 contenant des PMNL (concentration finale :  $3,5 \cdot 10^6$  cellule/ml).
- Ajouter 1 ml de PBS contenant la molécule à tester et 18  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M (concentration finale en CaCl<sub>2</sub>, en tenant compte du calcium déjà présent dans le milieu RPMI 1640 : 0,75 mM).
- Incuber le test 10 min. à 37° C.
- Ajouter 27  $\mu$ l d'ionophore de calcium (concentration finale : 10  $\mu$ M) et incuber le test 20 min. à 37° C.
- Ajouter, à la fin de l'incubation, 8  $\mu$ l de prostaglandine B<sub>2</sub> ( $1,8 \cdot 10^{-7}$  g.) comme standard interne.
- Stopper la réaction en centrifugeant 5 min. à 1500 RPM.
- Récupérer le surnageant contenant les leucotriènes.

### B. Extraction et purification des leucotriènes

Les surnageants contenant les leucotriènes sont extraits sur des petites colonnes contenant de la silice sur laquelle sont fixées des chaînes de 18 atomes de carbone. Ce matériel constitue une phase hydrophobe retenant les leucotriènes; elle permet d'éliminer de l'échantillon les composés polaires. On obtient ainsi un extrait partiellement purifié plus approprié à l'analyse par HPLC.

Colonnes Octadecyl C<sub>18</sub> de 3 ml (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg).

### 1. Préparation des colonnes

Le fabricant conseille de conditionner la colonne avant son utilisation :

- La colonne est lavée 3 fois avec 3 ml de méthanol.
- Le méthanol est chassé de la colonne par 3 x 3 ml de milieu RPMI 1640.

### 2. Extraction des leucotriènes

- Le surnageant contenant les leucotriènes est passé sur la colonne.
- Les composés les plus polaires sont éliminés par 4 x 3 ml d'eau distillée.
- Les leucotriènes sont élués par 500  $\mu$ l de méthanol.

### C. Détection et dosage des leucotriènes : analyse par HPLC

L'appareil HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) est un appareil Kontron HPLC system 600; il est équipé d'une colonne de type phase inverse Nova Pak C<sub>18</sub> (Millipore, Waters Associates, Milford).

La phase mobile utilisée est composée de :

- 67 % méthanol
- 33 % eau
- 0,1 % acide acétique
- 0,1 % EDTA
- PH 6 (mis à pH avec NH<sub>4</sub>OH 10 N).

Elle est filtrée sur filtre millipore de 0,22  $\mu$  et dégazée sous vide avant l'emploi.

L'éluution des échantillons est réalisée avec un débit



de 0,8 ml/min.

Les leucotriènes sont détectés spectrophotométriquement à 280 nm au moyen d'un détecteur U.V à longueur d'onde variable (Spectro Monitor III, LDC / Milton Roy).

Un enregistreur-intégrateur (Varian Y 270) fournit le chromatogramme et calcule la surface des pics et le temps de rétention des composés élués.

#### 1. Leucotriènes produits par les PMN

La Fig. 4 est un exemple de chromatogramme obtenu après synthèse de leucotriènes par des PMN de bovin stimulés par ionophore. On a montré (LENOIR, 1983) que les deux 5,12-dihydroxyacides isomères du leucotriène B<sub>4</sub> précèdent de quelques minutes l'élution de celui-ci. La prostaglandine B<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>) qui est utilisée comme standard interne sort en premier lieu.

#### 2. Leucotriènes produits par les macrophages intrapéritonéaux

Les macrophages intrapéritonéaux produisent du leucotriène C<sub>4</sub> (SCOTT et al., 1983; ROUZER et al., 1980).

La Fig. 5 est un exemple de chromatogramme obtenu lors de la synthèse de leucotriènes par des macrophages péritonéaux de souris stimulés par le zymosan opsonisé.

Le LTC<sub>4</sub>, plus polaire que le LTB<sub>4</sub>, a un temps de rétention plus court que ce dernier (Fig. 4). Il n'est pas possible ici d'utiliser la PGB<sub>2</sub> car son temps de rétention est proche de celui du LTC<sub>4</sub>.

Notons que, comme c'était la première fois au laboratoire que l'on mettait en évidence le leucotriène C<sub>4</sub>, nous avons réalisé quelques essais afin de vérifier que ce pic produit par les macrophages stimulés correspondait bien au LTC<sub>4</sub>.

Tout d'abord, afin de vérifier qu'il s'agissait d'un pic de leucotriène, nous avons incubé les macrophages avec différentes concentrations en acide nordihydroguaiarétique

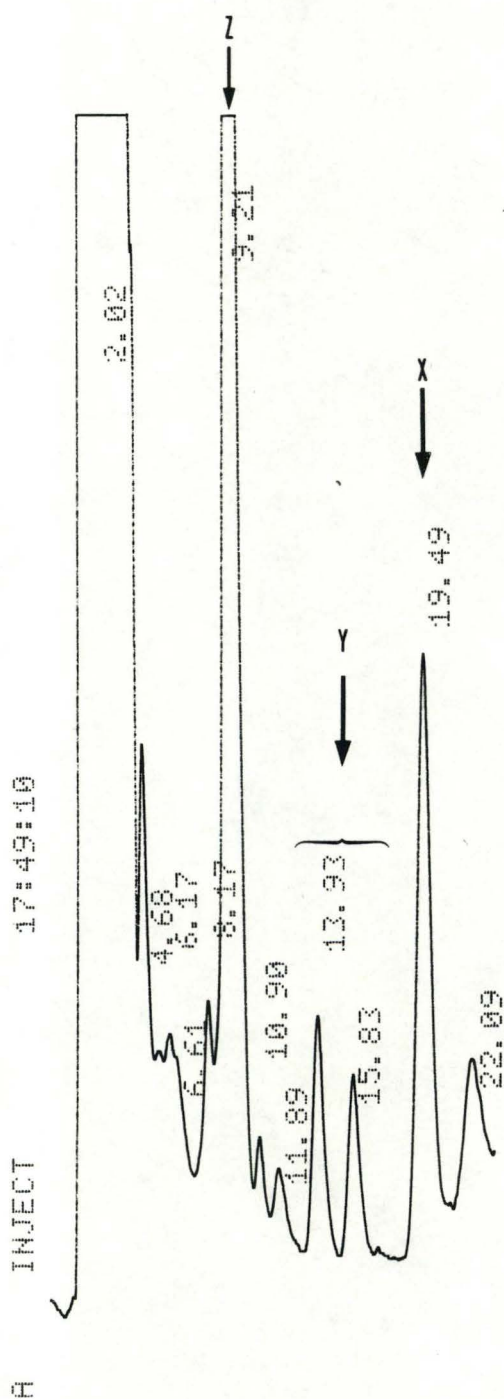


Fig. 4 :

Exemple de chromatogramme obtenu après synthèse de  $LTB_4$  par les PMN stimulés par l'ionophore du calcium.

Nous avons en X : le pic de  $LTB_4$ ; en Y : les pics des deux isomères du  $LTB_4$ ; en Z : le pic du standard interne ( $PGB_2$ ).

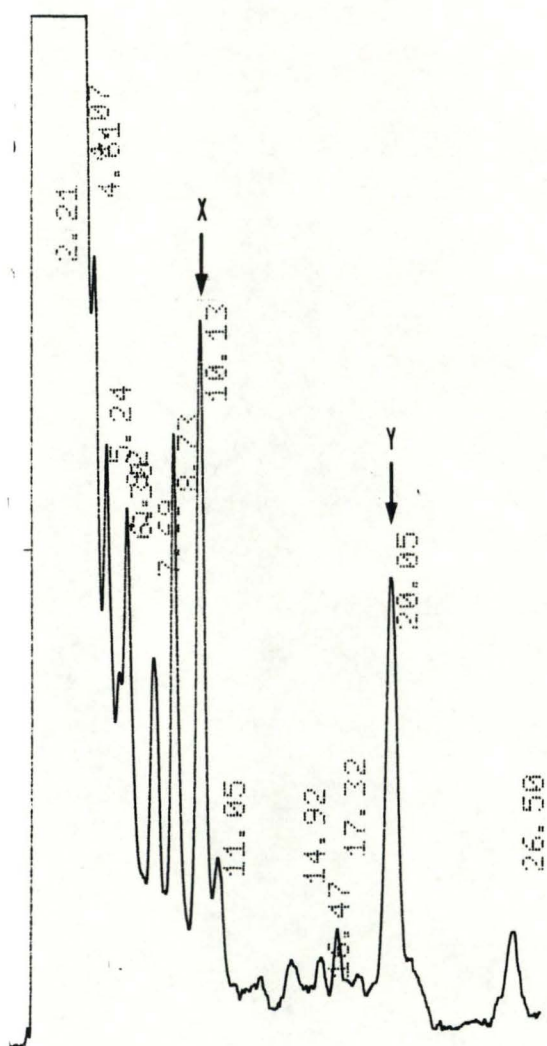


Fig. 5 :

Exemple de chromatogramme obtenu après synthèse de LT par les macrophages péritonéaux stimulés par le zymosan opsonisé.

En X : le pic de leucotriène;  
 en Y : composé non identifié.

(puissant inhibiteur de la lipoxygénase) et nous avons constaté que ce pic était inhibé (Fig. 20).

Ce leucotriène a été identifié au LTC<sub>4</sub> en constatant qu'il avait le même temps de rétention que celui d'un étalon de LTC<sub>4</sub> (fourni par le Dr. RAKACH, Merk Frosst, Canada).

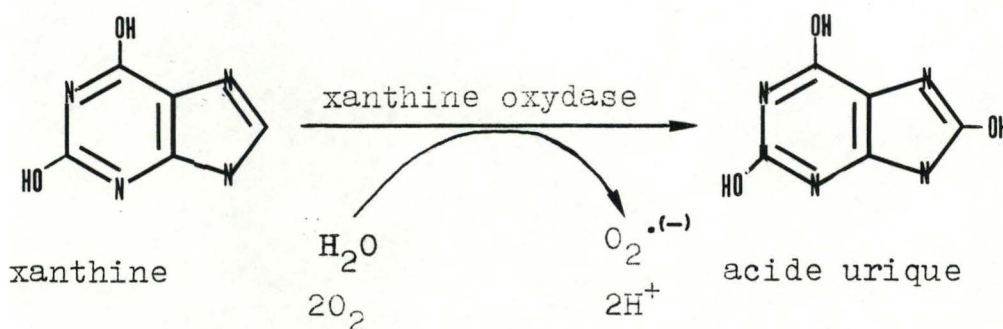
Nous avons également injecté sur la colonne HPLC l'échantillon mélangé à l'étalon : on a constaté que le pic présumé de LTC<sub>4</sub> et le pic étalon co-migrait sur la colonne. Notons enfin que le pic Y, bien qu'ayant un temps de rétention fort proche de celui du LTB<sub>4</sub> ne correspond pas à ce composé : en effet, il ne co-migre pas avec du LTB<sub>4</sub> synthétique ni avec du LTB<sub>4</sub> produit par les PMN de bovins.

#### D. Calcul de l'activité

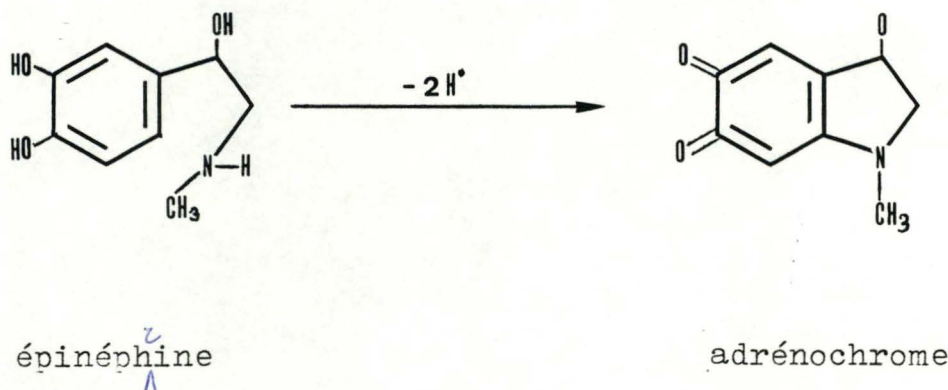
L'activité de la 5-lipoxygénase des PMN est obtenue en faisant le rapport entre la surface du pic de leucotriène B<sub>4</sub> et la surface du pic de la prostaglandine B<sub>2</sub> d'un même chromatogramme. Pour les macrophages, l'activité de la 5-lipoxygénase est obtenue directement en mesurant la surface du pic du leucotriène C<sub>4</sub>.

#### V. SYSTEME XANTHINE-XANTHINE OXYDASE POUR LA PRODUCTION DES RADICAUX SUPEROXYDES

La xanthine en présence de xanthine oxydase se transforme en acide urique en produisant des radicaux O<sub>2</sub><sup>•(-)</sup>.



La production d' $O_2 \cdot (-)$  est mesurée par l'augmentation d'absorbance de l'adrénochrome à 480 nm. L'adrénochrome provient de l'oxydation par les  $O_2 \cdot (-)$  de l'épinéphrine qui est ajoutée au système xanthine-xanthine oxydase.



### Solution

- Tampon TRAP (Merck, Darmstadt) (Triéthanolaminohydrochloride) 20 mM, PH 9 contenant du sucrose 0,25 M et de l'EDTA 2 mM.
- Xanthine (Sigma Chemical Co., St Louis) 0,1 M solubilisée dans l'eau par quelques gouttes de NaOH concentré.
- Xanthine oxydase (Sigma) 20 U/ml.
- Epinéphrine (Sigma) 0,1 M dans HCl 0,2 N.

### Dosage et calcul

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

La mesure est faite à 25° C à 480 nm avec une lecture de

référence à 575 nm.

Placer dans la cuvette : - 1 ml de tampon TRAP  
- 10  $\mu$ l de xanthine  
- 10  $\mu$ l d'épinéphrine  
- 2  $\mu$ l de xanthine oxydase

La pente, représentant l'augmentation d'absorbance au cours du temps, correspond à la production de base en  $O_2^{\cdot(-)}$  par la xanthine oxydase.

On peut alors ajouter dans la cuvette 100  $\mu$ l d'éthanol contenant la molécule à tester. La pente obtenue représente le test.

Le rapport entre les deux pentes permet de calculer le pourcentage d'activation ou d'inhibition de la molécule (une correction doit être apportée pour tenir compte de la dilution de la xanthine oxydase).

=====

RESULTATS ET DISCUSSION

=====

I. MISE AU POINT DES DOSAGES

I.1. Mise au point du dosage des radicaux superoxydes par chémoluminescence

I.1.1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé

I.1.1.1. Influence de la concentration en lucigénine

Dans le but d'optimiser le dosage, nous avons incubé les cellules avec des concentrations croissantes en lucigénine.

La Fig. 6 montre qu'après stimulation des macrophages avec le zymosan, la chémoluminescence atteint un optimum pour une concentration en lucigénine proche de  $10^{-4}$  M.

Au-dessus de cette valeur, la lucigénine semble avoir un effet inhibiteur, vraisemblablement dû à un effet de "quenching".

Pour la suite des expériences, nous utiliserons une concentration en lucigénine de  $10^{-4}$  M.

I.1.1.2. Influence de la concentration en zymosan opsonisé

Nous avons opsonisé du zymosan avec différents sérums provenant de diverses espèces (bovin, humain, souris, lapin). Chaque type de zymosan a été testé sur la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$  par les macrophages. Pour des raisons d'efficacité et de facilité, nous avons choisi, par la suite, d'utiliser du zymosan opsonisé par du sérum de bovin; celui-ci donne en effet une très bonne

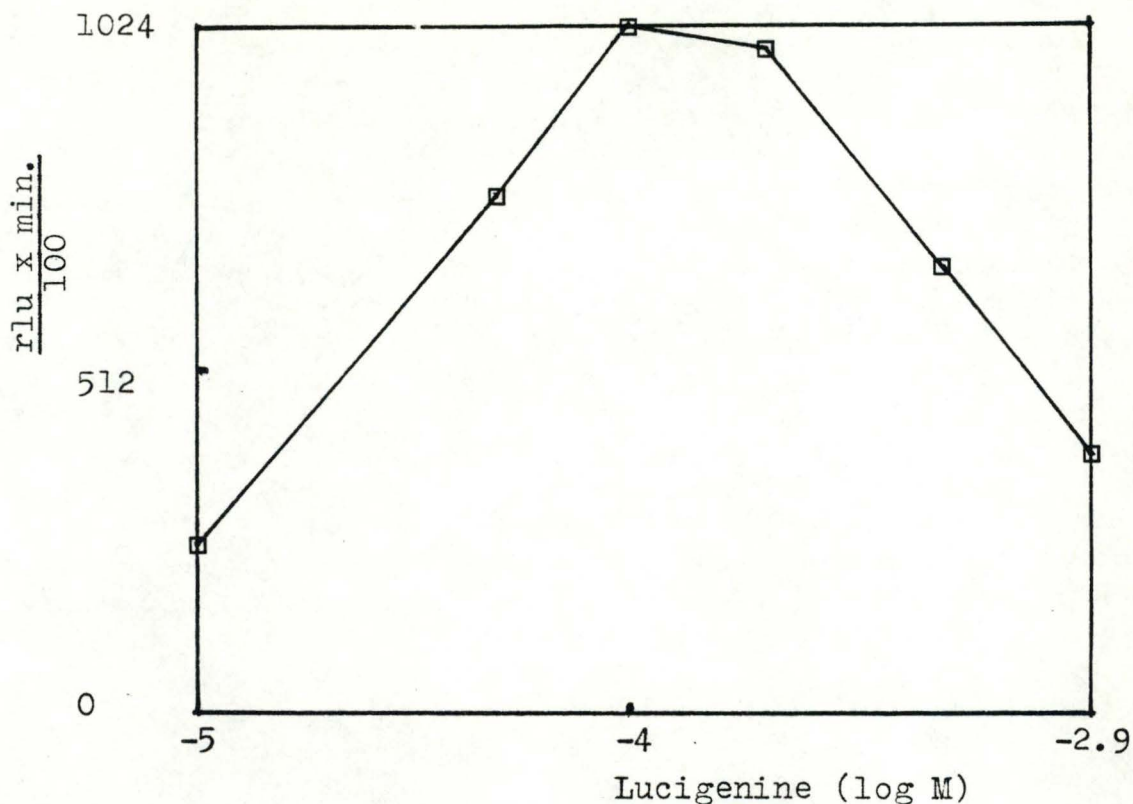


Fig. 6 : influence de la concentration en lucigénine sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  par les macrophages stimulés par le zymosan.

$\frac{RLU \times \min}{100}$  = aire d'intégration situé sous la courbe d'activation.

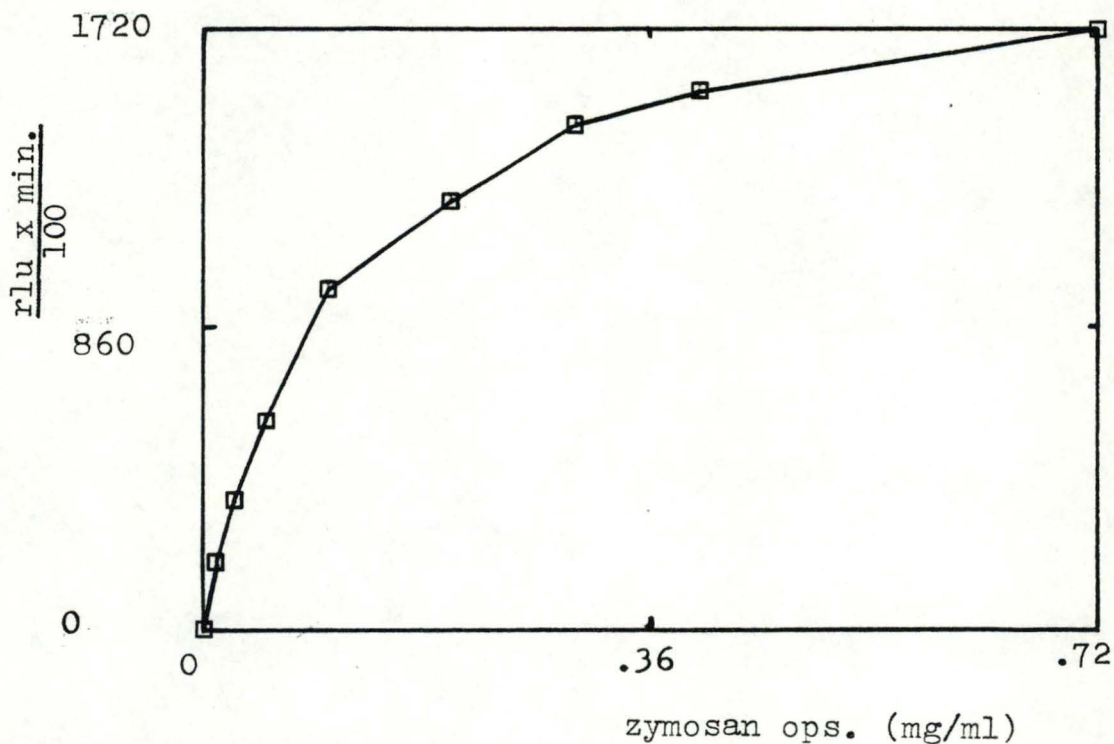


Fig. 7 : influence de la concentration en zymosan opsonisé sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  par les macrophages péritonéaux murins.

$\frac{RLU \times \min}{100}$  = aire d'intégration située sous la courbe d'activation



stimulation des cellules et est disponible en grande quantité.

L'influence de la concentration de ce stimulateur sur la chémoluminescence des macrophages est représentée à la Fig. 7. On constate une courbe typique de saturation qui atteint probablement son maximum lorsque les cellules sont saturées en particules ingérées (la phagocytose est un phénomène saturable).

Dorénavant, nous utiliserons une concentration en zymosan opsonisé qui correspond à la valeur obtenue au plateau, c'est-à-dire à 0,72 mg/ml.

#### I.1.1.3. Influence de la concentration en macrophage

Sur la Fig. 8, nous observons une relation linéaire entre la concentration en macrophages et la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$ .

Cette droite d'étalonnage nous indique, d'une part, que la chémoluminescence mesurée est bien proportionnelle à la quantité d' $O_2 \cdot (-)$  produite par les cellules et, d'autre part, que même pour des concentrations de  $2 \cdot 10^6$  cellules/ml, la lucigénine et le zymosan sont encore en excès.

Pour la suite des expériences, nous devons choisir une concentration en macrophages qui se situe sur la droite d'étalonnage et **quine** soit pas trop élevée pour éviter un sacrifice trop grand de souris, mais suffisante malgré tout pour permettre une mesure sensible de la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$ . Cette concentration est choisie à  $1 \cdot 10^6$  cellules/ml.

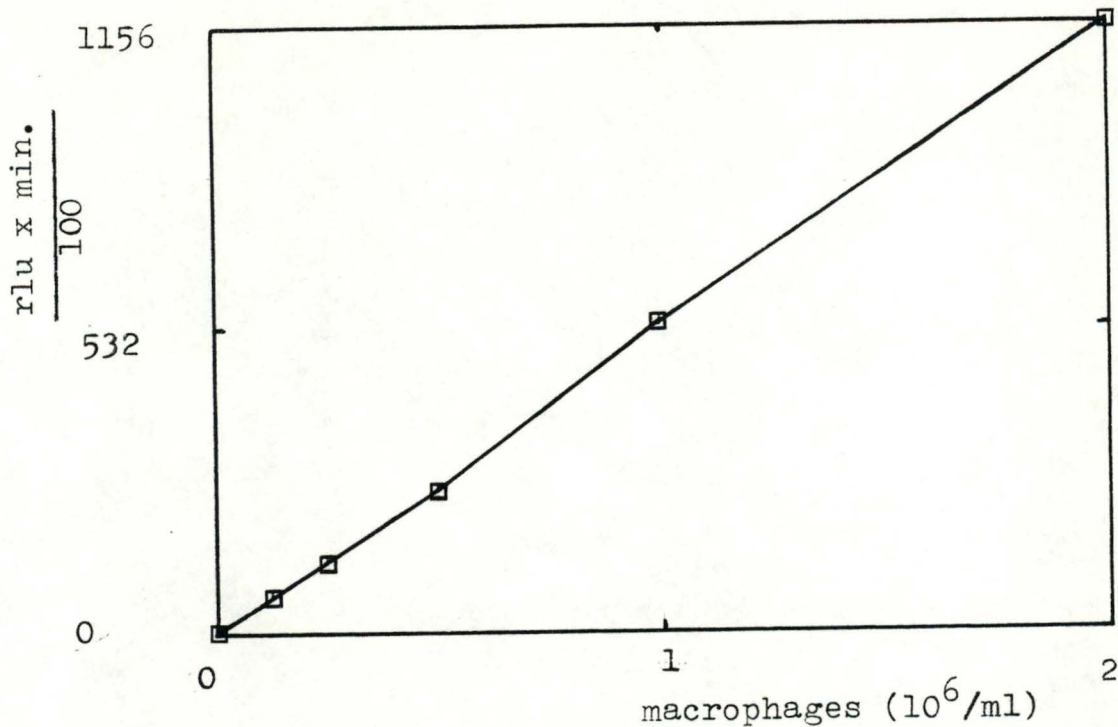


Fig. 8 : influence de la concentration en macrophages (96 H PEC), stimulés par le zymosan opsonisé, sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$ .

$\frac{RLU \times \text{min}}{100}$  = aire d'intégration située sous la courbe d'activation.

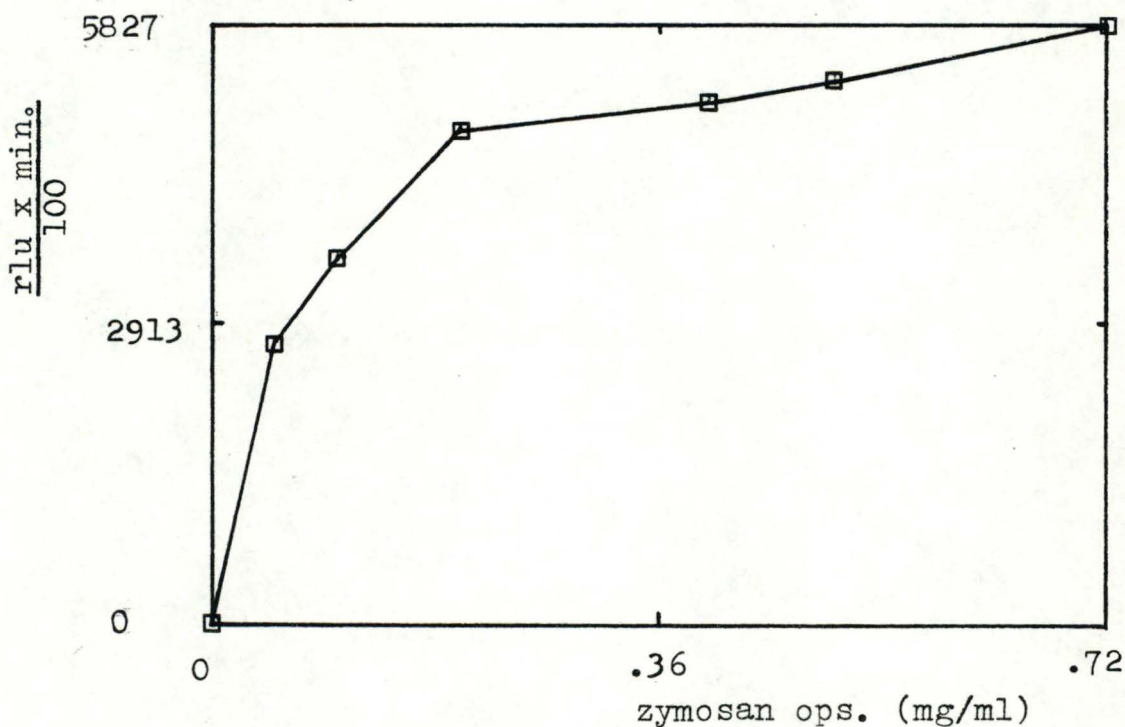


Fig. 9 : influence de la concentration en zymosan sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  par les PMN bovins.

$\frac{RLU \times \text{min}}{100}$  = aire d'intégration sous la courbe d'activation.

### I.1.2. PMN stimulés par le zymosan opsonisé

#### I.1.2.1. Influence de la concentration en zymosan opsonisé

La Fig. 9 nous montre que la production d' $O_2 \cdot (-)$  par les PMN stimulés avec des concentrations croissantes en zymosan opsonisé suit également une loi de saturation.

La concentration à laquelle nous travaillerons dorénavant est fixée à une valeur du plateau, c'est-à-dire à 0,72 mg/ml.

#### I.1.2.2. Influence de la concentration en PMN

Ici aussi, comme pour les macrophages, une relation linéaire et proportionnelle existe entre la concentration en cellules et la production d' $O_2 \cdot (-)$  (Fig. 10).

La concentration en PMN pour le dosage sera dorénavant fixée à  $3,5 \cdot 10^6$  cellules/ml. Cette valeur se situe sur la droite d'étalonnage et cela nous permet donc d'évaluer quantitativement la production d' $O_2 \cdot (-)$  par ces cellules.

### I.1.3. PMN stimulés par l'ionophore du calcium A23187

Le zymosan opsonisé, qui est constitué de parois de levures entourés d'opsonines, agit comme un stimulateur "naturel", tandis que l'ionophore du calcium stimule le phagocyte de manière "artificielle" en mobilisant le  $Ca^{++}$  vers des sites d'activations intracellulaires (voir point II dans Introduction).

Contrairement au zymosan, l'ionophore ne stimule qu'une partie des systèmes qui produisent des  $O_2 \cdot (-)$  (SMITH and al., 1980). Cela explique pourquoi la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore est nettement plus

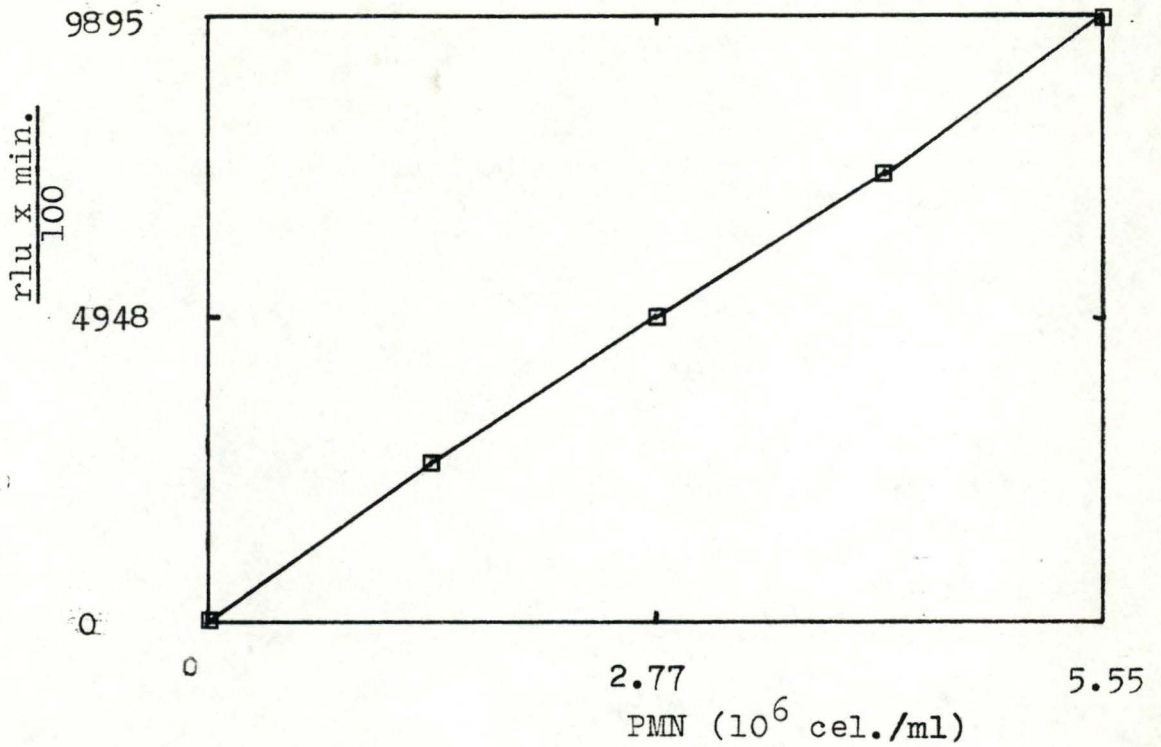


Fig. 10 : influence de la concentration en PMN (stimulés par le zymosan) sur la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$ .

$\frac{RLU \times \text{min}}{100} = \text{aire d'intégration sous la courbe d'activation.}$

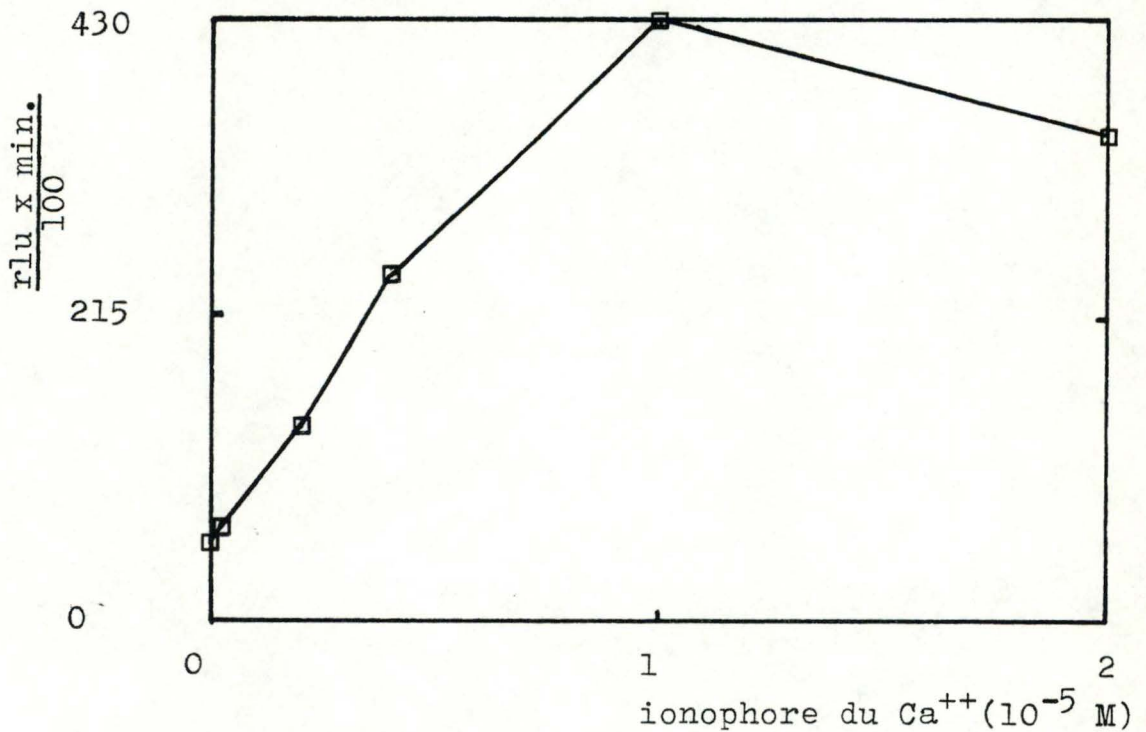


Fig. 11 : influence de la concentration en ionophore du calcium sur la production des radicaux  $O_2 \cdot (-)$  par les PMN bovins.

$\frac{RLU \times \text{min}}{100} = \text{aire d'intégration sous la courbe d'activation}$

faible que celle des PMN activés par le zymosan.

Cette faible production d' $O_2^{\cdot(-)}$  induite par l'ionophore nous oblige à optimiser au maximum tous les paramètres intervenant dans le dosage.

#### I.1.3.1. Influence de la concentration en ionophore A23187

Sur la Fig. 11, nous observons que la chémoluminescence augmente de manière linéaire avec la concentration en ionophore et cela jusqu'à atteindre un optimum qui se situe à  $10 \mu M$ . Au-delà de cette concentration, l'ionophore semble avoir un effet inhibiteur.

Pour la suite des expériences, la concentration en ionophore sera donc fixée à  $10 \mu M$  ( $5 \mu g/ml$ ).

Signalons que cette concentration est celle qui est utilisée par certains auteurs (CHANG, 1984; LENOIR, 1983) pour stimuler les leucocytes à produire du leucotriène  $B_4$ .

#### I.1.3.2. Influence de la concentration en calcium

Si nous incubons les cellules avec des concentrations croissantes en  $Ca^{++}$ , nous observons (Fig. 12), après stimulation des PMN avec l'ionophore, une rapide augmentation de la chémoluminescence jusqu'à un optimum atteint pour une concentration en  $Ca^{++}$  de  $0,75 mM$ . Au-delà de cette valeur, le calcium a un effet inhibiteur.

$0,75 mM$  sera la concentration dorénavant utilisée pour le dosage.

#### I.1.3.3. Influence de la concentration en acide arachidonique (A.A.)

Pour augmenter la production de  $LTB_4$  par les PMN stimulés par ionophore du calcium, on peut ajouter au milieu

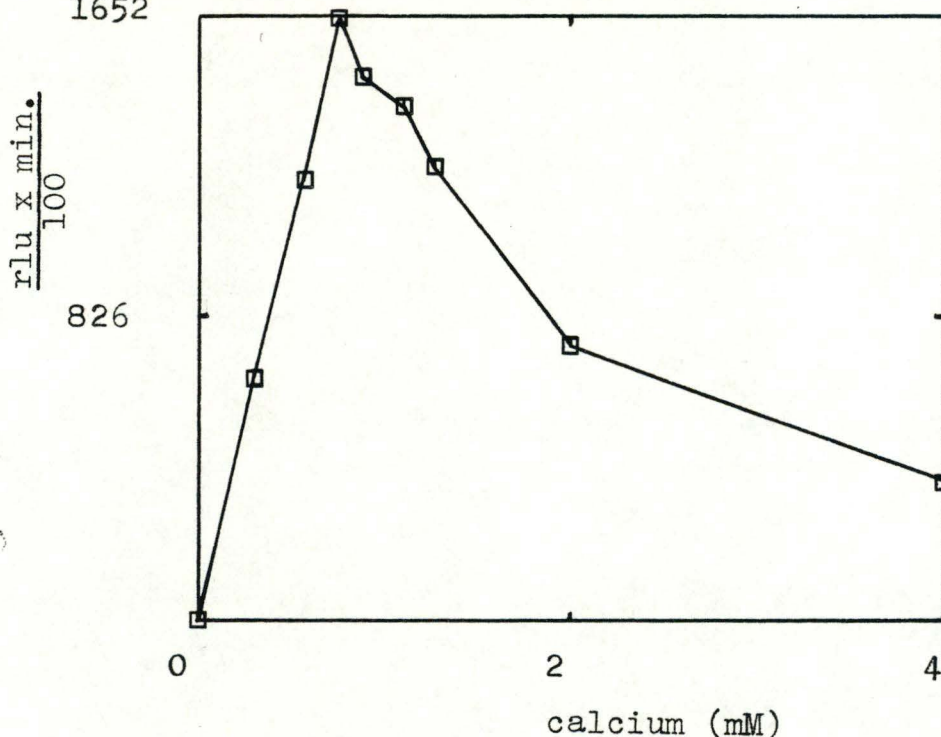


Fig. 12 : influence de la concentration en calcium sur la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore du calcium.

$\frac{RLU \times \text{min}}{100}$  = aire d'intégration sous la courbe d'activation.

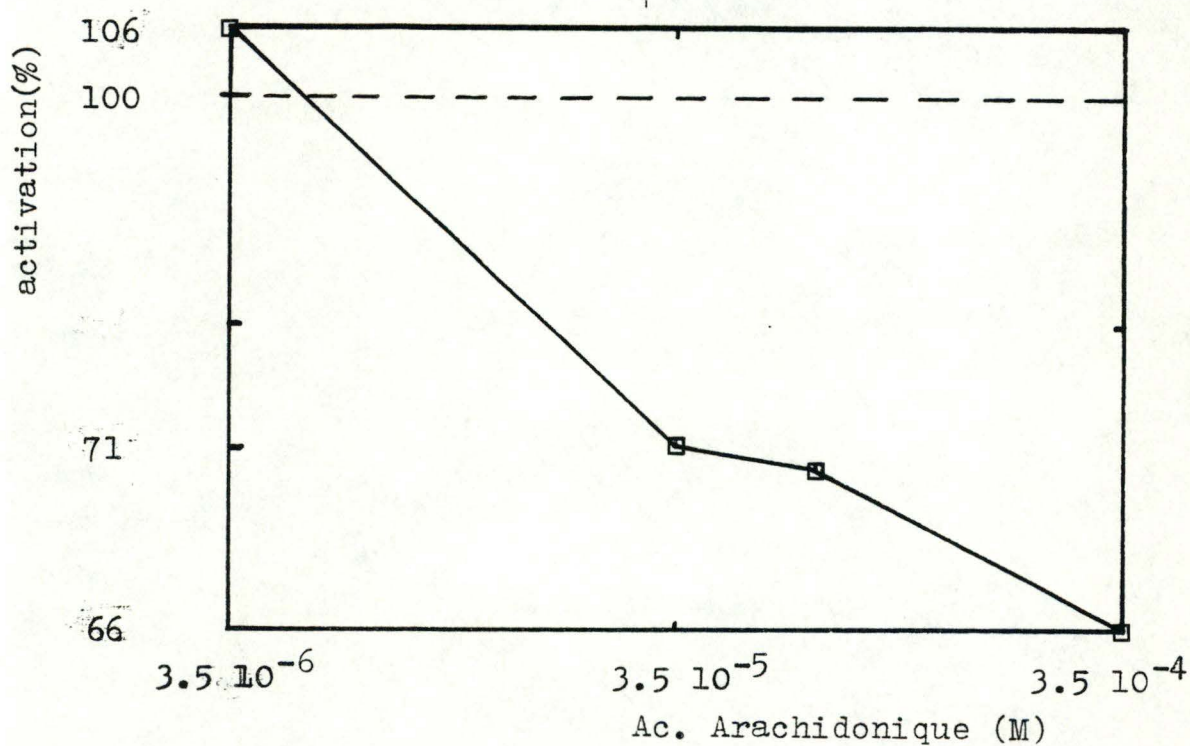


Fig. 13 : influence de la concentration en acide arachidonique exogène sur la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore du calcium.

Le contrôle ne contenant pas d'A.A. est posé comme étant 100 % d'activité.

d'incubation de l'acide arachidonique (A.A.) exogène.

Comme il est essentiel, pour la suite des expériences, que la production de LT se réalise dans les mêmes conditions que la production de radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$ , il nous est apparu nécessaire de tester l'effet de l'A.A. sur la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore.

Cet effet est présenté à la Fig. 13. Le contrôle ne contient pas d'A.A. et son activité est posée à 100 %. Nous constatons un effet inhibiteur aux concentrations habituellement utilisées dans la littérature pour accroître la production de  $LTB_4$ , c'est-à-dire à  $3,5 \cdot 10^{-5}$  et au-delà.

Donc, l'A.A. ne sera pas utilisé dans ce dosage puisqu'il en diminue la sensibilité; de même, il ne sera pas utilisé non plus dans la production de  $LTB_4$ , étant donné que nous voudrions travailler dans les mêmes conditions pour les deux tests.

#### I.1.3.4. Influence de la concentration en cellules

La relation entre la concentration en PMN et la production de radicaux superoxydes est linéaire, comme nous le montre la Fig. 14.

La concentration choisie pour les dosages futurs est fixée à  $3,5 \cdot 10^6$  cellules/ml.

#### I.2. Mise au point du dosage des leucotriènes

Pour pouvoir comparer l'activité de la voie des leucotriènes avec l'activité de la synthèse des radicaux superoxydes, il était essentiel que la production de ces deux médiateurs se réalise dans les mêmes conditions d'incubation.

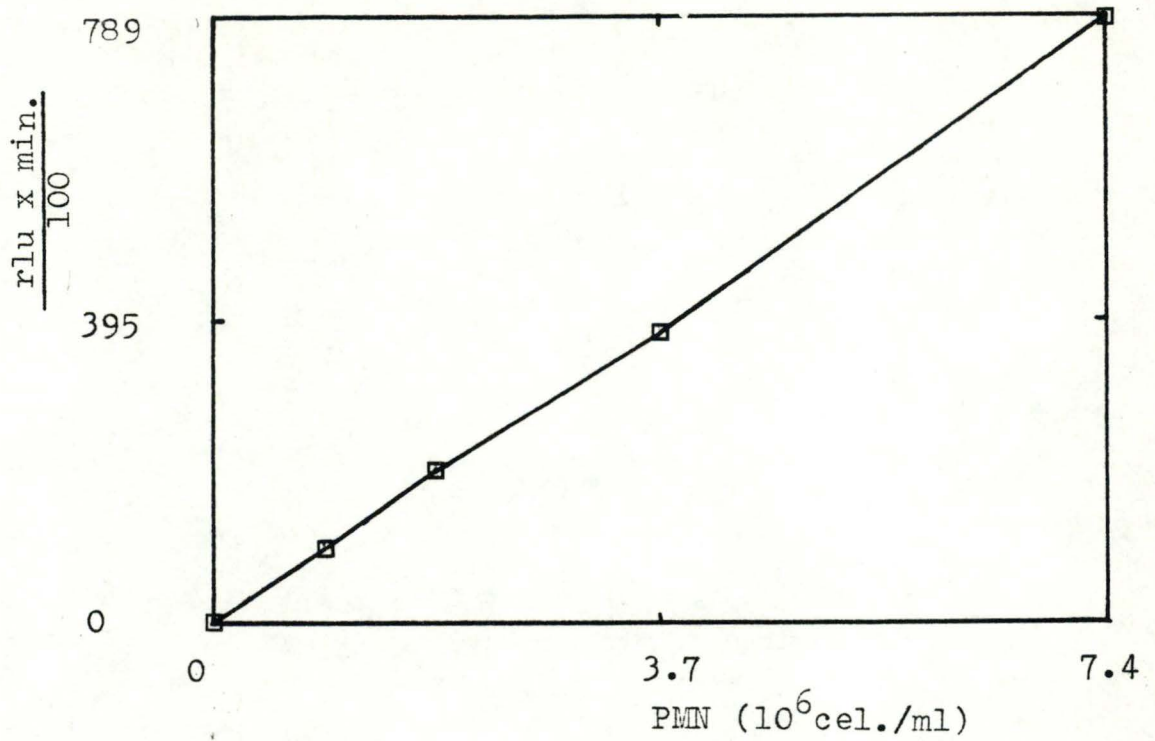


Fig. 14 : influence de la concentration en PMN (stimulés par l'ionophore du calcium) sur la chémoluminescence.

$\frac{RLU \times \text{min}}{100} = \text{aire d'intégration sous la courbe d'activation.}$

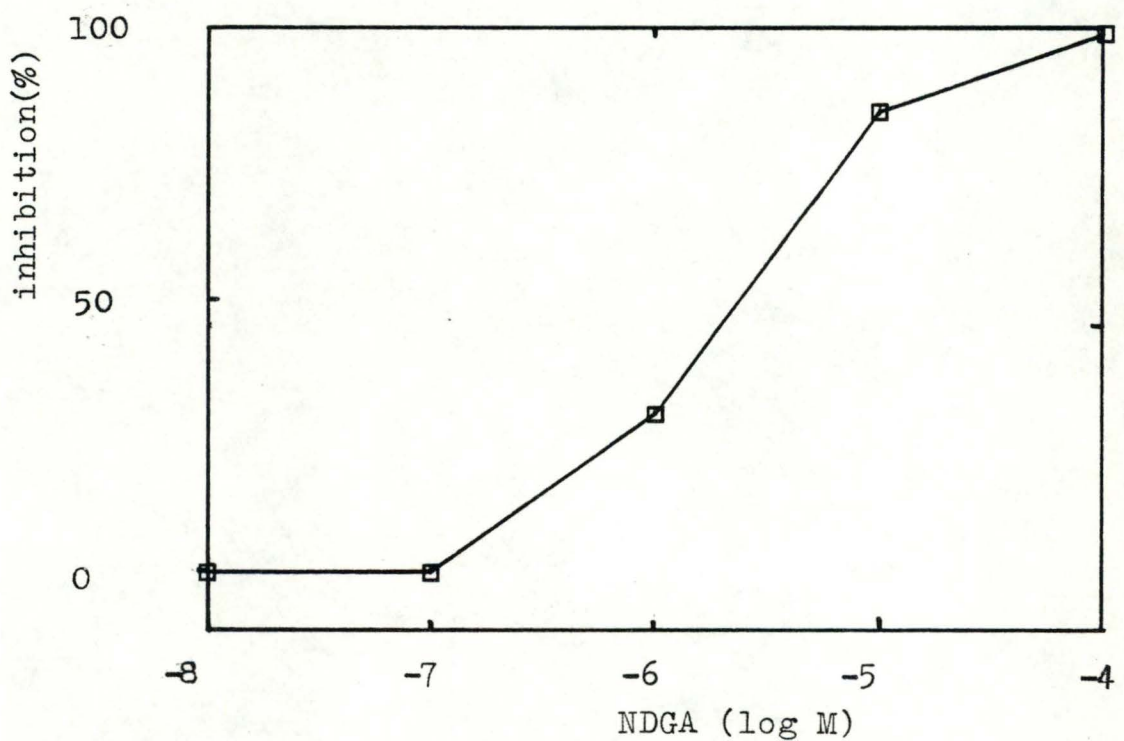


Fig. 15 : effet du NDGA sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  par les macrophages stimulés par le zymosan.

Le contrôle ne contenant pas de NDGA est posé égal à 0 % d'inhibition.



Donc, pour la production des leucotriènes, nous utiliserons les conditions qui ont été mises au point pour la chémoluminescence, c'est-à-dire même milieu d'incubation, même concentration en cellules, en zymosan ou en ionophore, et même temps de préincubation. La seule chose qui reste à optimiser sera le temps d'incubation des cellules avec le stimulateur.

Les Fig. 24, 26 et 28 dans le paragraphe V nous montrent la cinétique de production des LT par les différentes cellules avec lesquelles on travaille.

Le temps d'incubation optimum est fixé pour la suite des expériences à :

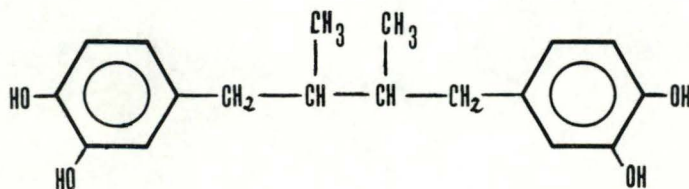
- 90 min. pour les macrophages stimulés par zymosan;
- 20 min. pour les PMN stimulés par zymosan ou par ionophore.

## II. EFFETS D'INHIBITEURS DE LA CYCLOXYGENASE ET DE LA LIPOXYGENASE SUR LA PRODUCTION D' $O_2^{\cdot -}$

### II.1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé

#### II.1.1. Effet de l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) sur la production d' $O_2^{\cdot -}$

NDGA (Sigma , St Louis) :



(4,4'-(2,3-diméthyl-1,4-butanédiyl)-bis[1,2-benzenediol 1] )

Le NDGA est un puissant inhibiteur de la 5-lipoxygénase et un inhibiteur plus modéré de la cycloxygénase (SALARI and al., 1984; CHANG and al., 1984, BONNEY and al., 1984).

Son effet, à différentes concentrations, sur la chémoluminescence des macrophages, est représenté à la Fig. 15. Le contrôle ne contenant pas de NDGA est posé à 0 % d'inhibition.

On constate que le NDGA a un effet inhibiteur sur la chémoluminescence à partir de  $10^{-7}$  M pour atteindre 100 % d'inactivation à  $10^{-4}$  M.

Signalons que cet inhibiteur n'a pas d'effet sur la viabilité ni sur la phagocytose des macrophages (CHANG and al., 1984). Cependant, le NDGA pose un problème pour l'interprétation des résultats, car c'est un agent antioxydant, c'est-à-dire qu'il peut jouer le rôle d'inactivateur du radical superoxyde.

L'effet inhibiteur que l'on a mesuré à la Fig. 15 est donc peut-être un effet direct du NDGA sur le radical superoxyde. Pour nous en assurer, nous avons testé l'effet antioxydant du NDGA sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  par le système xanthine-xanthine oxydase (Fig. 16). Le contrôle ne contenant pas de NDGA est posé comme 0 % d'inhibition.

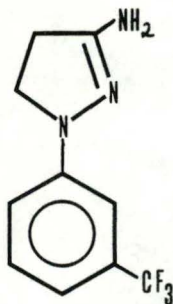
Apparemment, le NDGA a bien un effet direct d'inactivation du radical superoxyde. On constate cependant que cet effet, qui augmente avec la concentration en antioxydant, ne dépasse pas les 27 % d'inhibition de la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$ , à une concentration de  $10^{-4}$  M, pour laquelle un effet inhibiteur de 100 % était obtenu sur la chémoluminescence des macrophages (Fig. 15).

En conclusion, l'inhibition des voies métaboliques de l'A.A. apparaît bien avoir un effet sur le métabolisme de l'activation de l'oxygène; cependant, avant d'en être

certain, il est opportun de tester un autre inhibiteur.

II.1.2. Effet du BW755C sur la production d' $O_2^{\cdot -}$

BW755 C :



[3-amino-1-(m(trifluorométhyl)-phényl)-2-pyrazoline ]

Cette molécule est un bon inhibiteur de la 5-lipoxygénase et de la cycloxygénase (SALARI and al., 1984). Elle n'a pas d'effet significatif sur la viabilité et sur la phagocytose des cellules (CHANG and al., 1984).

Sur la Fig. 17, nous observons effectivement que la BW755C a un effet inhibiteur sur la chémoluminescence des macrophages qui commence à  $10^{-5}$  M et qui atteint son maximum pour une concentration de  $10^{-3}$ .

Le NDGA et le BW755C sont tous deux inhibiteurs à la fois de la voie des LT et des PG. Pour discerner le rôle de chacune de ces deux voies métaboliques dans la chémoluminescence des macrophages, il était nécessaire de tester l'influence d'une molécule qui inhibe exclusivement une seule de ces deux voies métaboliques de l'A.A.

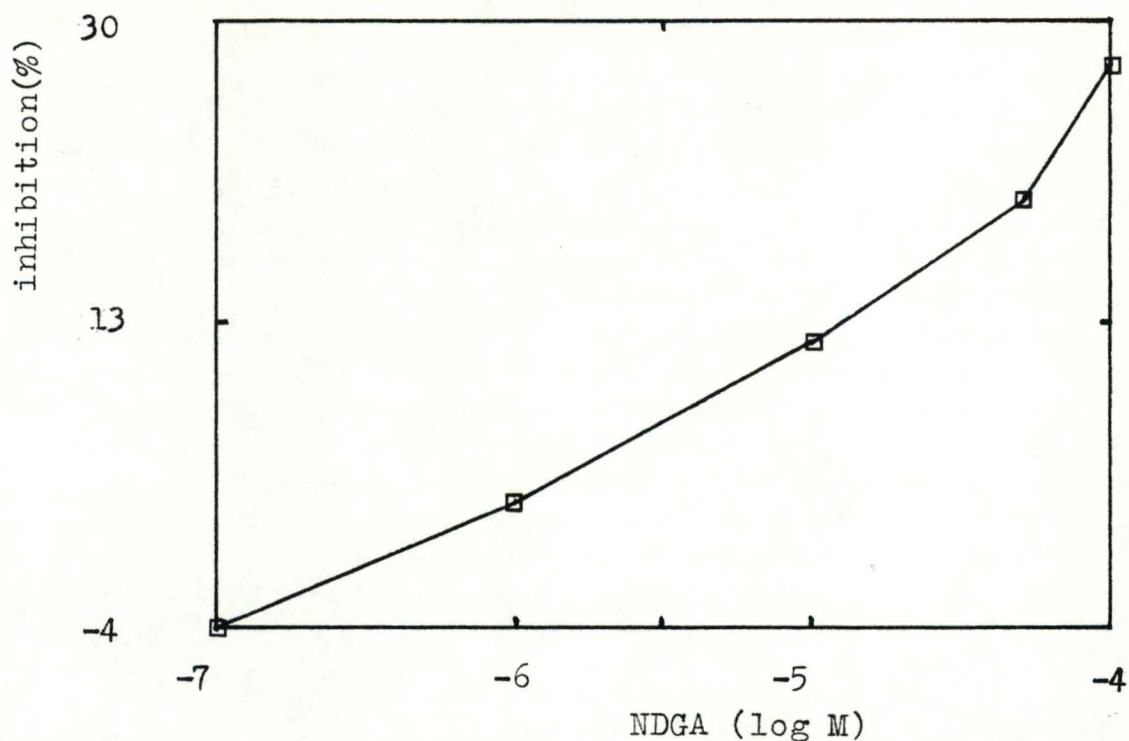


Fig. 16 : effet anti-oxydant du NDGA sur la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$  par le système xanthine-xanthine oxydase.

La production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$  par le contrôle qui ne contient pas de NDGA est posée égale à 0 % d'inhibition.

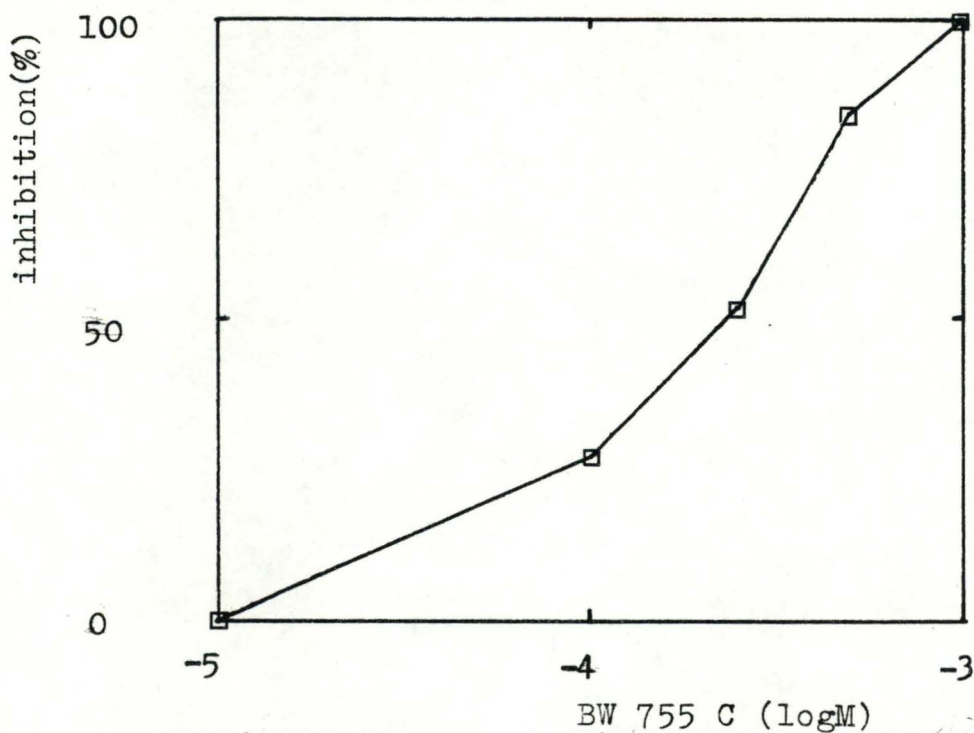
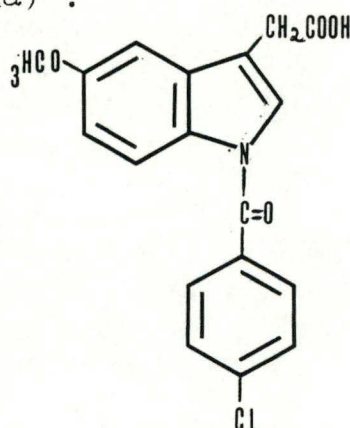


Fig. 17 : effet du BW755C sur la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$  par les macrophages stimulés par le zymosan opsonisé.

Le contrôle ne contenant pas de BW755C est posé égal à 0 % d'inhibition.

### II.1.3 Effet de l'indométhacine sur la production d' $O_2^{\cdot(-)}$

Indométhacine(Sigma) :



(1-(p-chloroben-  
zoyl) -5-méthoxy-  
2-méthylindole-  
3-acétic acid)

L'indométhacine est le plus sélectif et le plus puissant inhibiteur de la cycloxygénase (SALARI, 1984; ...). Elle entre en compétition avec l'A.A. pour le site d'action de la cycloxygénase et cause une inactivation irréversible de l'enzyme (LANDS and al., 1983). Certains auteurs (CHANG and al., 1984; BAUD, 1983) ont montré que cette molécule n'avait aucun effet sur la viabilité et la phagocytose des cellules.

Nous avons représenté à la Fig. 18, l'effet de cette molécule sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  par les macrophages stimulés par zymosan. L'indométhacine a un léger effet stimulateur aux très faibles concentrations ( $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M). Par contre, à  $10^{-4}$  M, elle a un léger effet inhibiteur de 12 %. Signalons que son effet inhibiteur sur la cycloxygénase des macrophages de souris est proche de 100 % à  $10^{-6}$  M (CHANG and al., 1984).

#### Discussion

.....

Puisque les molécules qui inhibent simultanément les deux voies métaboliques de l'A.A. inactivent aussi la production d' $O_2^{\cdot(-)}$ , alors que l'inhibition exclusive de la voie des PG n'a pas d'effets sur la chémoluminescence, on peut suggérer que la voie de la lipoxygénase

entraîne la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$ . Cette hypothèse pourrait aussi expliquer l'effet stimulateur de l'indométhacine sur la chémoluminescence des macrophages (Fig. 18a); cet effet stimulateur est également observé par SMITH et al. (1980).

Nous savons que l'indométhacine est un puissant inhibiteur de la cycloxygénase à des concentrations allant de  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M (CHANG and al., 1984), alors que nous observons à ces concentrations un effet activateur sur la chémoluminescence. Nous proposons deux hypothèses pouvant rendre compte de cette observation :

- 1) Lorsque la cycloxygénase est inhibée, l'A.A., substrat commun à la voie des PG et à la voie des LT, est sans doute plus disponible pour la lipoxygénase, ce qui provoque une augmentation de la production de LT qui peut s'accompagner d'une augmentation de la formation de radicaux  $O_2 \cdot (-)$ , si les deux productions sont effectivement liées.
- 2) La  $PGE_2$  inhibe la voie de la lipoxygénase, d'une part en inhibant les phospholipases, et d'autre part elle active la production d'AMPc, ce qui réprime la voie des LT (SMITH and al., 1980; HAM and al., 1983). Donc, une inactivation de la cycloxygénase doit faire augmenter la production de LT et de là expliquer l'augmentation de la production d' $O_2 \cdot (-)$ .

Remarque : nous avons testé l'indométhacine sur la production de  $LTB_4$  par les PMN stimulés par l'ionophore du calcium, comme nous le montre la Fig. 18b.

Nous constatons un effet stimulateur pour des concentrations en indométhacine allant de  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M. Cette stimulation est du même ordre que celle obtenue par cet inhibiteur sur la chémoluminescence (Fig. 18a). Cette expérience démontre bien, comme nous venons de le suggérer, que l'inhibition de la cycloxygénase augmente la production de LT, et elle argumente donc les deux explications hypothétiques que nous venons de décrire ci-dessus pour comprendre l'effet stimulateur de l'indométhacine sur la chémoluminescence

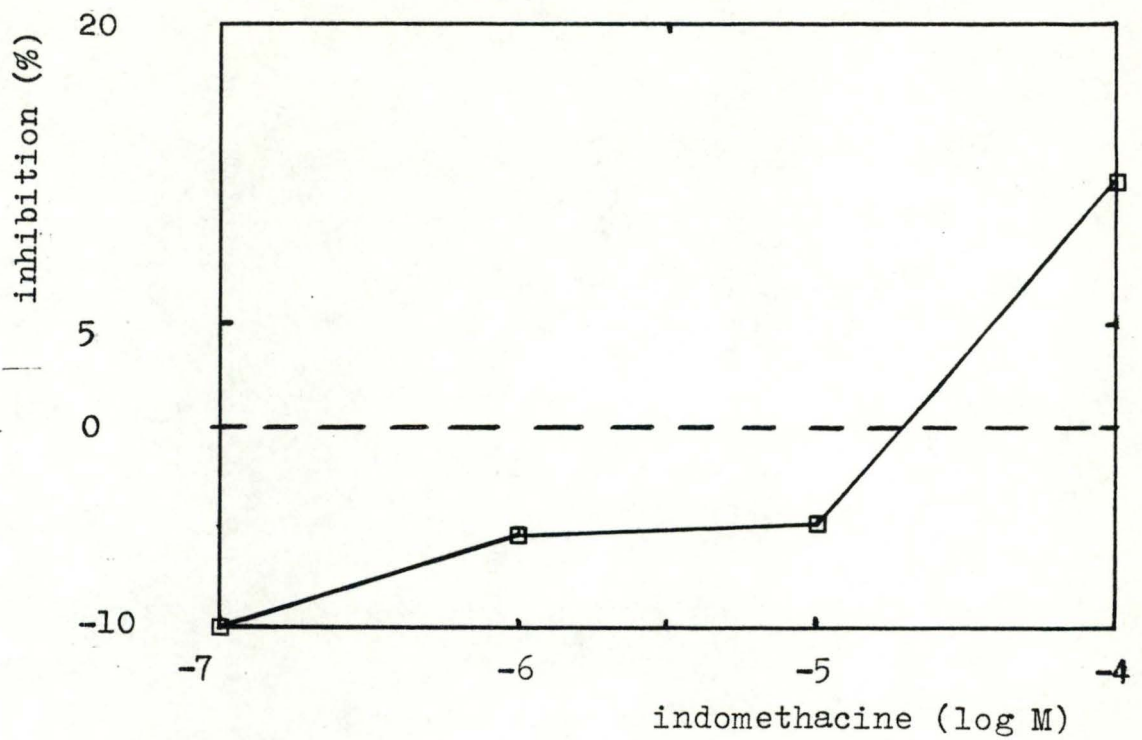


Fig. 18a : effet de la concentration en indométhacine sur la chémoluminescence des macrophages stimulés par le zymosan opsonisé. Le contrôle ne contient pas d'indométhacine et il est considéré comme 0 % d'inhibition.

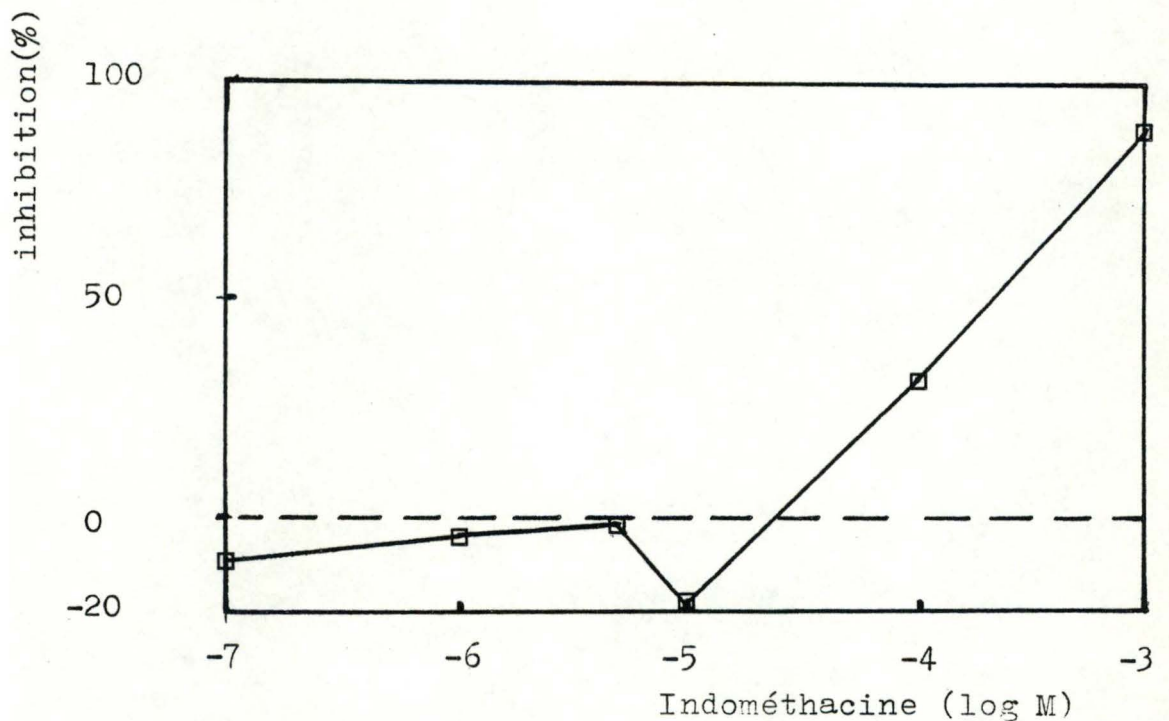


Fig. 18b : effet de l'indométhacine sur la production de  $LTB_4$  par les PMN stimulés par l'ionophore du  $Ca^{++}$ .

Le contrôle ne contient pas d'indométhacine et il est posé égal à 0 % d'inhibition.

## II.2. PMN stimulés par l'ionophore A23187

Il était également intéressant de voir si ces résultats utilisant les inhibiteurs de la lipoxycgénase (BW755C et NDGA) sur la chémoluminescence pouvaient être reproduits sur un autre type de cellules inflammatoires, tels les PMN stimulés par un autre activateur, l'ionophore du calcium A23187.

La Fig. 19 nous montre l'effet de ces deux inhibiteurs sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$  par les PMN stimulés par ionophore du calcium.

Le NDGA a un effet inhibiteur qui commence à  $10^{-7}$  M et qui augmente rapidement en fonction de la concentration. L'effet est maximal à  $10^{-4}$  M.

La BW755C, à  $10^{-3}$  M, inhibe de 94 % la chémoluminescence; elle n'a plus d'effet à  $10^{-6}$  M.

Chez les PMN, on constate donc également que le métabolisme de l'A.A. est lié à la production des  $O_2^{\cdot (-)}$ .

Signalons que ces deux courbes d'inhibition se localisent dans des zones de concentration très proches de celles occupées par les courbes d'inactivation du BW755C et du NDGA sur les macrophages stimulés par le zymosan opsonisé (Fig. 15 et 16).

## III. EFFETS DES INHIBITEURS DE LA LIPOXYGENASE SUR LA PRODUCTION DE LEUCOTRIENES

Nous avons testé l'effet des inhibiteurs de la lipoxycgénase (NDGA et BW755C) sur la production des leucotriènes, afin de connaître exactement leur effet inhibiteur dans nos conditions de travail et pouvoir établir une relation possible avec les tests de chémoluminescence.



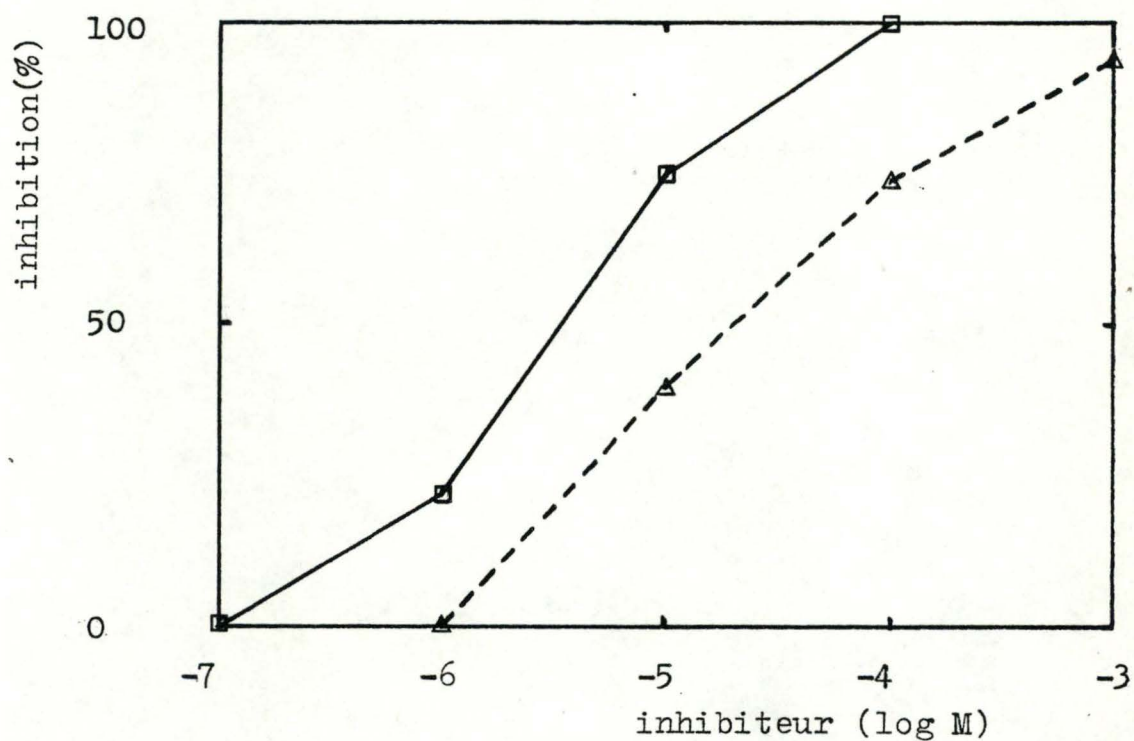


Fig. 19 :

□ — — — □ effet du NDGA sur la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore.

△ - - - - △ effet du BW755C sur la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore.

Le contrôle ne contenant pas d'inhibiteur est posé égal à 0 % d'inhibition.

### III.1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé

#### Effet du NDGA sur la production de LTC<sub>4</sub>

Nous avons représenté à la figure 20 la courbe d'inhibition par le NDGA de la production de LTC<sub>4</sub> par les macrophages (courbe en pointillés).

Nous observons une inhibition croissante de l'activité de la 5-lipoxygénase en fonction de la concentration croissante en NDGA; les 100 % d'inhibition sont atteints à 10<sup>-5</sup> M. Afin de comparer cet effet à celui obtenu sur la chémoluminescence, nous avons reproduit dans ce graphique la courbe d'inhibition obtenue à la figure 15 (courbe en trait continu). Nous constatons que les deux courbes d'inhibition présentent un parallélisme certain et que l'inhibition des deux processus est réalisée aux mêmes concentrations. Cette figure semble donc être suffisamment éloquente pour confirmer que l'inhibition de la chémoluminescence est liée à celle de la lipoxygénase.

Nous avons évidemment essayé de tester l'effet du BW755C sur la production du LTC<sub>4</sub>, mais nous n'avons pas pu obtenir de résultats car le BW755C, présent en trop grande quantité, perturbe le dosage du LTC<sub>4</sub> par HPLC.

### III.2. PMN stimulés par l'ionophore du Ca<sup>++</sup>

#### III.2.1. Effet du NDGA sur la production de LTB<sub>4</sub>

Nous avons représenté sur la Fig. 21 la courbe d'inhibition de la production du LTB<sub>4</sub> par le NDGA (courbe en pointillés) et nous avons superposé la courbe d'inhibition de la chémoluminescence décrite à la Fig. 19 (courbe en trait continu). Nous observons une

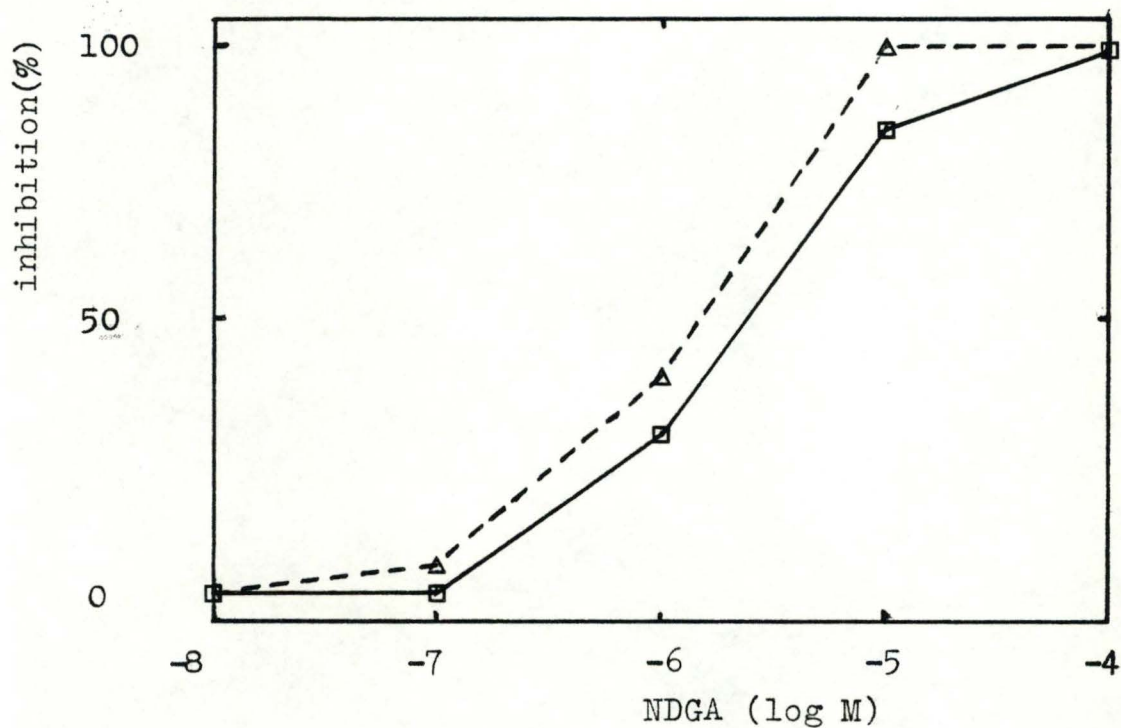


Fig. 20 :

□ — □ effet du NDGA sur la chémoluminescence des macrophages stimulés par le zymosan.

△ — — — △ effet du NDGA sur la production du LTC<sub>4</sub> par les macrophages stimulés par le zymosan.

Le contrôle ne contenant pas de NDGA est posé égal à 0 % d'inhibition.

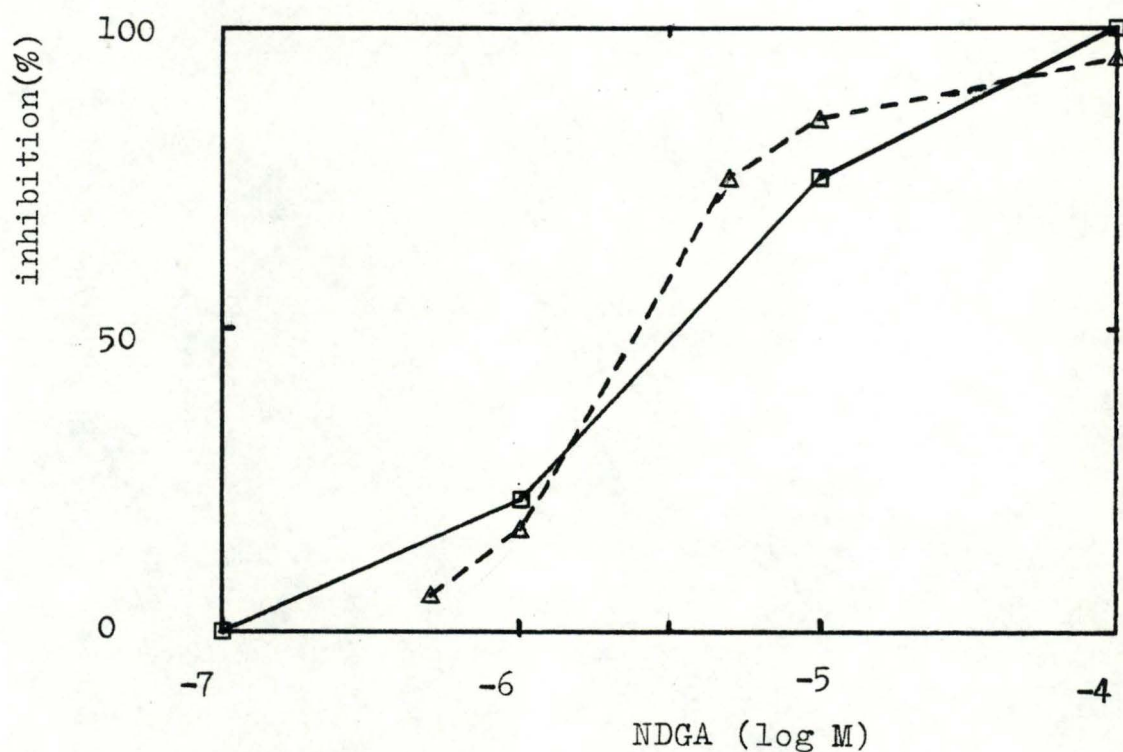


Fig. 21 :

- — — — □ effet du NDGA sur la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore du calcium.
- △ — — — △ effet du NDGA sur la production de LTB<sub>4</sub> par les PMN stimulés par l'ionophore.

Le contrôle ne contenant pas de NDGA est posé égal à 0 % d'inhibition.

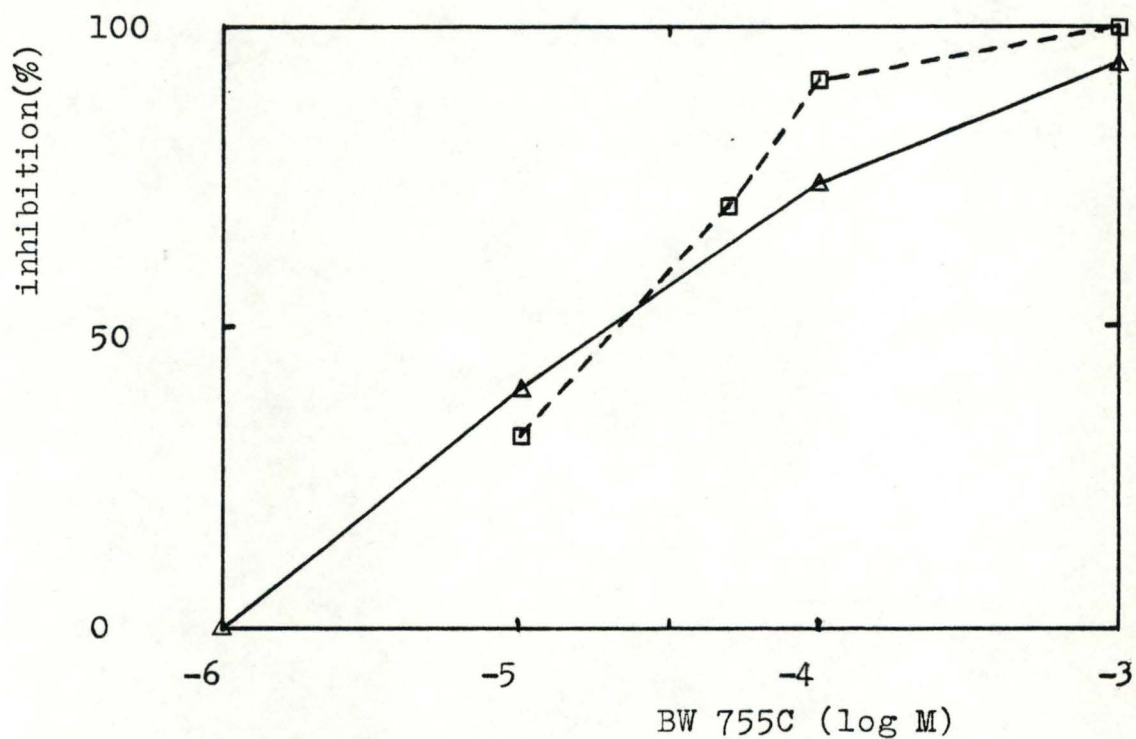


Fig. 22 :

□-----□ effet du BW755C sur la production de LTB<sub>4</sub> par les PMN stimulés par l'ionophore du Ca<sup>++</sup>.

△———△ effet du BW755C sur la chémoluminescence des PMN stimulés par l'ionophore du Ca<sup>++</sup>.

Le contrôle ne contenant pas de NDGA est posé égal à 0 % d'inhibition.

inhibition croissante de l'activité de la lipoxycgénase dans une zone de concentration allant de  $10^{-7}$  M à  $10^{-4}$  M. Ici aussi, les deux courbes d'inhibition se trouvent localisées dans une même zone de concentration et présentent une très grande similitude de comportement.

### III.2.2. Effet du BW755C sur la production de LTB<sub>4</sub>

Sur la Fig. 22, nous avons représenté la courbe d'inhibition de l'activité de la 5-lipoxycgénase par le BW755C (courbe en pointillés) et nous avons repris la courbe d'inhibition de la chémoluminescence établie antérieurement (Fig. 19) (courbe en trait continu).

On peut remarquer l'inhibition croissante de la production de LTB<sub>4</sub> en fonction de la concentration croissante en BW755C. Ici aussi, les deux courbes d'inhibition se localisent dans une même zone de concentration en inhibiteur.

En conclusion, ces courbes d'inhibition des LT et des radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$ , qui sont étroitement proches l'une de l'autre, nous indiquent que l'inhibition de la chémoluminescence paraît bien être liée à celle de la production de leucotriènes; cette conclusion renforce l'observation faite au paragraphe II, à savoir que la voie de la lipoxycgénase pourrait entraîner la production des radicaux superoxydes.

## IV. EFFETS DES METABOLITES DE LA 5-LIPOXYGENASE SUR LA PRODUCTION D' $O_2^{\cdot (-)}$ PAR LES MACROPHAGES

Suite aux résultats que nous venons d'obtenir et pour mieux comprendre la relation qui existait entre la voie des LT et la production des radicaux superoxydes,

il nous a paru intéressant de tester directement l'effet de quelques métabolites de la 5-lypoxygénase sur la chémoluminescence des macrophages. En effet, la première explication à envisager était de vérifier si les métabolites de cette voie pouvaient initier directement ou indirectement la production des radicaux  $O_2 \cdot (-)$ .

Les métabolites ont été testés sur les macrophages de deux manières différentes :

- 1) Ils ont été mis en présence de cellules au repos, afin de vérifier un éventuel effet de stimulation sur la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$ .
- 2) Ils ont aussi été testés sur les cellules activées par le zymosan pour voir dans quelle mesure ils pourraient augmenter la chémoluminescence induite par le zymosan (le contrôle ne contient pas de métabolite et son activité est posée à 0 %).

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

| Métabolites                                | Métabolites testés comme stimulateurs de la chémoluminescence | Métabolites testés en présence de zymosan opsonisé |
|--|---|--|
| LTB <sub>4</sub><br>1,1.10 <sup>-6</sup> M | Pas d'effet   | 0 % d'activation                                   |
| LTC <sub>4</sub><br>1,6.10 <sup>-6</sup> M | Pas d'effet significatif                                      | 0 % d'activation                                   |
| 1,6.10 <sup>-7</sup> M                     | —   | 0 % d'activation                                   |
| 5-HETE<br>4,3.10 <sup>-7</sup> M           | Pas d'effet significatif                                      | } léger effet inhibiteur ( $\pm$ 6 %)              |
| 4,3.10 <sup>-8</sup> M                     | —   |  |
| 4,3.10 <sup>-9</sup> M                     | —   |  |

## Discussion

La conclusion la plus simple de ces résultats est de dire que ces métabolites de la 5-lipoxygénase n'ont pas un effet direct sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$ .

Cependant, plusieurs critiques peuvent être faites à cette expérience qui nous obligent à nuancer fortement cette conclusion. Par exemple :

- les métabolites testés ont été placés dans le milieu d'incubation et ils n'ont peut-être pas atteint leur cible à l'intérieur de la cellule.
- les LT, produits par la cellule stimulée par le zymosan, sont peut-être en quantité suffisante pour induire la chémoluminescence, et donc l'apport supplémentaire de métabolites exogènes ne modifie pas la stimulation. Dans le but de vérifier cette explication, nous avons stimulé des macrophages avec du zymosan en présence de NDGA ( $10^{-4}$  M) et en présence de  $LTC_4$  ( $1,1 \cdot 10^{-6}$  M). Dans ces conditions, les cellules sont activées mais elles ne peuvent pas produire de LT endogènes. On constate que le  $LTC_4$  ajouté aux cellules n'a pas eu d'effet sur la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  par rapport au contrôle qui ne contenait pas ce métabolite. Donc, si les LT peuvent entrer dans la cellule, l'explication de la saturation de la cellule par les LT endogènes n'est pas vérifiée.
- un seul type de LT n'est peut-être pas suffisant pour entraîner la chémoluminescence; il est peut-être nécessaire d'en ajouter plusieurs et ce dans des proportions adéquates. Afin de répondre à cette objection, nous avons réalisé l'expérience suivante :



- nous avons stimulé des macrophages à produire des LT;
- après centrifugation des cellules, nous avons récupéré le surnageant, qui contient le mélange de LT et nous y avons resuspendu des macrophages frais;
- nous avons alors regardé si ce mélange de métabolites de la 5-lipoxygénase stimulait la chémoluminescence des macrophages au repos, ou s'il augmentait la production de radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$  par ces cellules activées par le zymosan. Aucun effet significatif n'a été enregistré.

En conclusion, les métabolites de la 5-lipoxygénase ne semblent pas être des médiateurs intracellulaires qui initient directement la production des radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$  (résultats confirmés par d'autres auteurs (PALMBLAD and al., 1981)). Nous resterons cependant prudents dans nos conclusions, puisque nous ne savons pas si les LT exogènes peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule.

Remarque :

Certains auteurs (SERHAN and al., 1982; SUMIMOTO and al., 1984) montrent que le  $LTB_4$  aurait le même effet que l'ionophore du calcium sur les PMN, en stimulant une très petite production de radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$ .

Nous avons testé le  $LTB_4$  comme stimulateur de la chémoluminescence sur les PMN mais nous n'avons jamais obtenu de réponse. Par contre, l'ionophore du calcium stimule bien la production de radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$  (Fig. 3b).

Il faut apporter deux observations : la première, c'est que, contrairement à ces auteurs, nous n'avons pas incubé nos cellules en présence de cytochalasine B, molécule qui semble seulement prolonger la production de radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$ . La deuxième observation, c'est que nous utilisons la chémoluminescence comme méthode de dosage des radicaux  $O_2^{\cdot (-)}$ , tandis que ces auteurs utilisent pour ce dosage la réduction du cytochrome C par les

radicaux  $O_2 \cdot (-)$ . Or, cette dernière méthode n'est pas spécifique des radicaux  $O_2 \cdot (-)$ .

## V. ETUDE CINÉTIQUE DE LA PRODUCTION DES LT ET DES

### RADICAUX $O_2 \cdot (-)$

Toujours dans le but de mieux comprendre la relation qui semble exister entre la voie de la lipoxygénase et celle de la production d' $O_2 \cdot (-)$ , nous avons comparé, pour les deux types de cellules étudiées, la cinétique de production des LT avec celle de la production des radicaux  $O_2 \cdot (-)$ .

#### V.1. Macrophages stimulés par le zymosan opsonisé

##### Cinétique de production du $LTC_4$ : Fig. 23

Au temps zéro minute, on détecte déjà une faible quantité de leucotriène présent dans les cellules.

Une fois le zymosan placé dans le milieu, la quantité de  $LTC_4$  augmente de manière linéaire en fonction du temps jusqu'à atteindre un plateau aux environs de la 90ème minute. Par la suite, la quantité de  $LTC_4$  diminue, diminution probablement due à son inactivation et à son catabolisme.

##### Cinétique de production des radicaux $O_2 \cdot (-)$ : Fig. 24

La courbe en trait continu a été établie en suivant la valeur de la chémoluminescence en CPM au court du temps d'incubation.

On constate qu'après un temps de latence très court, la production de radicaux  $O_2 \cdot (-)$  augmente rapidement jusqu'aux environs de la 12ème minute. Au-delà, cette production diminue lentement pour revenir à une valeur proche du contrôle après 120 minutes.

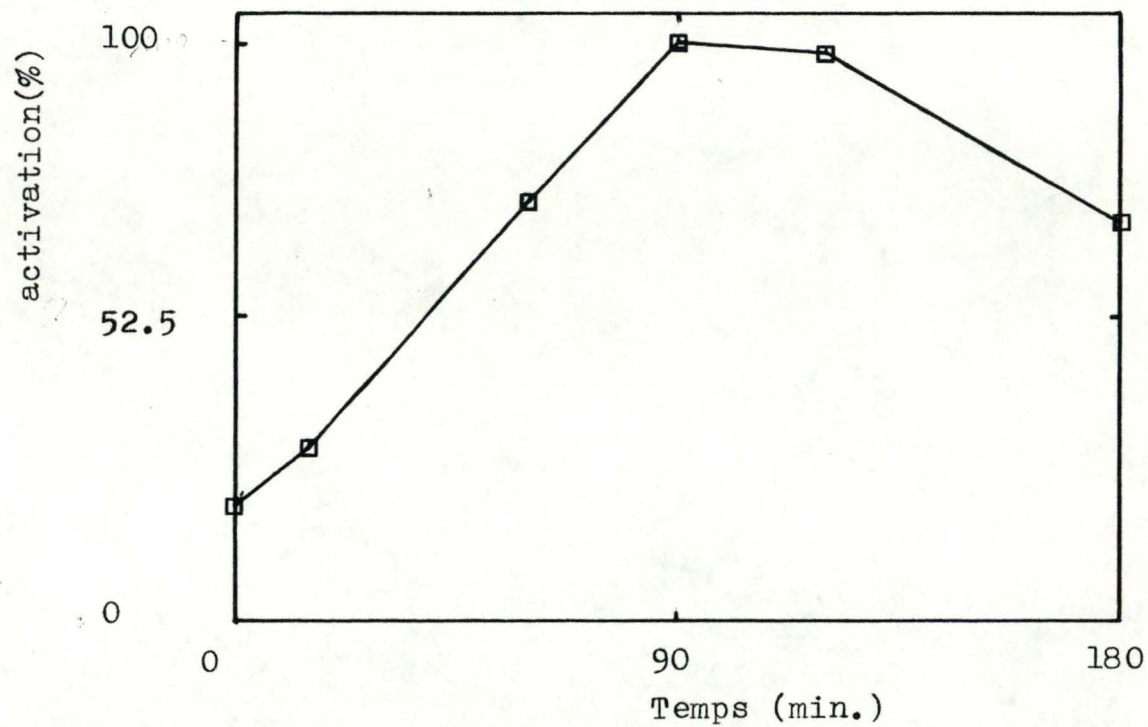


Fig. 23 : cinétique de production du  $LTC_4$  par les macrophages stimulés par le zymosan opsonisé.  
Les 100 % d'activité correspondent au contrôle.  
Celui-ci est incubé pendant 90 minutes.

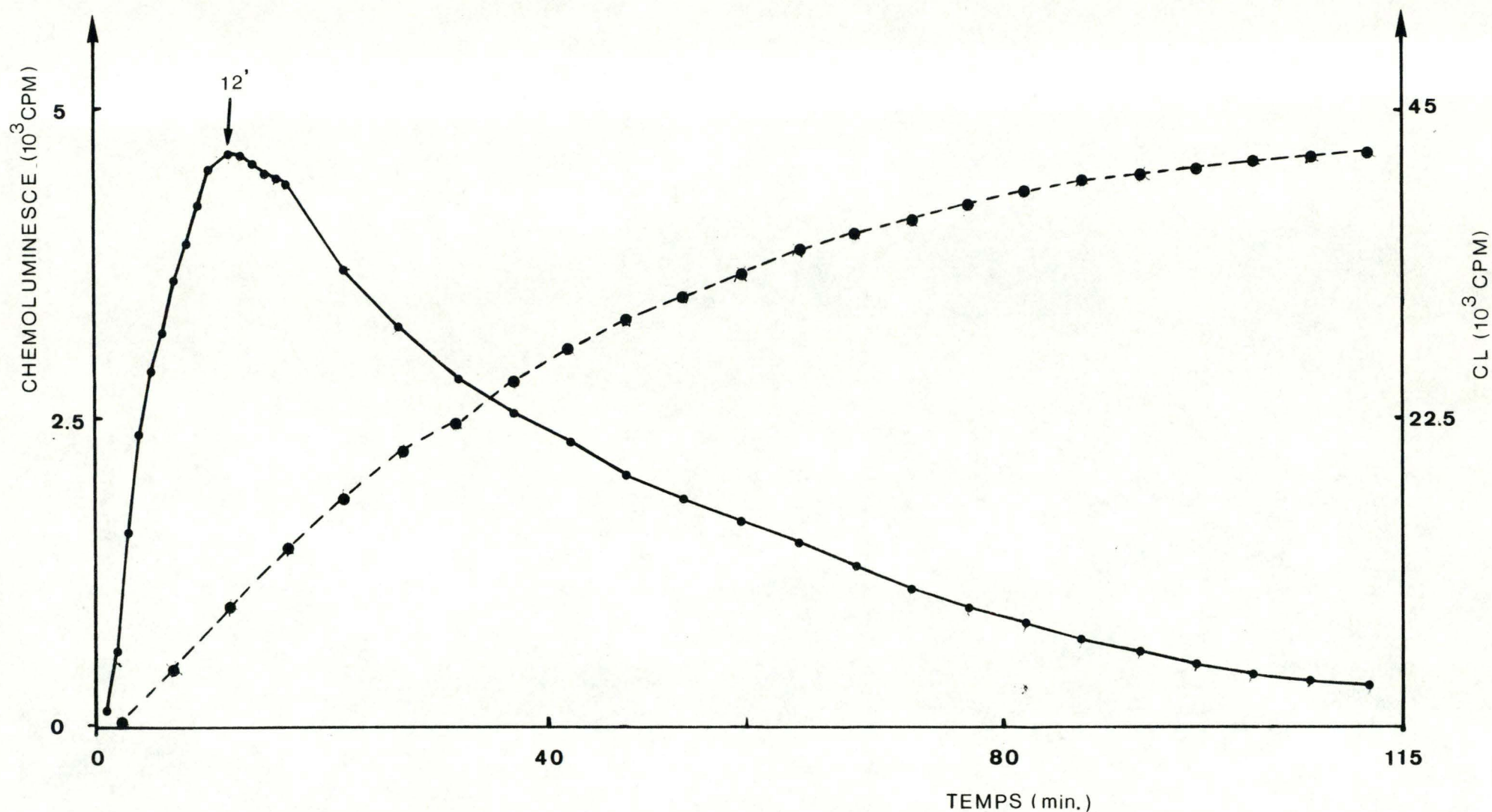


Fig. 24 : ●—● production de radicaux  $O_2^{\cdot -}$  (—) par les macrophages stimulés par le zymosan opsonisé.

●---● quantité de radicaux  $O_2^{\cdot -}$  (---) qui s'accumuleraient dans le milieu. (CL=chémoluminescence)  
 CPM = coups par minute.

La courbe en pointillés a été établie en cumulant les valeurs (en CPM) de la chémoluminescence enregistrées toutes les 5 minutes. Cette courbe représente donc la quantité de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  qui s'accumuleraient dans le milieu s'ils étaient stables. Nous pouvons donc comparer cette courbe avec celle obtenue pour la production des leucotriènes (Fig. 23).

## V.2. PMN stimulés par l'ionophore du calcium A23187

### Cinétique de production du $LTB_4$ : Fig. 25

La production de  $LTB_4$  est très importante dès les premières minutes qui suivent l'addition de l'ionophore. Ensuite, cette production diminue et s'arrête dans les environs de la 15ème minute.

### Cinétique de production des radicaux $O_2^{\cdot(-)}$ : Fig. 26

La courbe en trait continu est établie en suivant, au cours du temps, la chémoluminescence produite par les PMN. La courbe en traits pointillés est établie en cumulant les valeurs de la chémoluminescence, enregistrées toutes les 10 minutes.

Nous constatons qu'après un temps de latence de l'ordre de la minute, la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  augmente très rapidement jusqu'à la 27ème minute, pour ensuite diminuer lentement et s'arrêter au-delà de la 250ème minute.

## V.3. PMN stimulés par le zymosan opsonisé

### Cinétique de production du $LTB_4$ : Fig. 27

La production de  $LTB_4$  par les PMN stimulés par le zymosan est environ 50 fois plus faible que celle des PMN stimulés par l'ionophore du calcium.

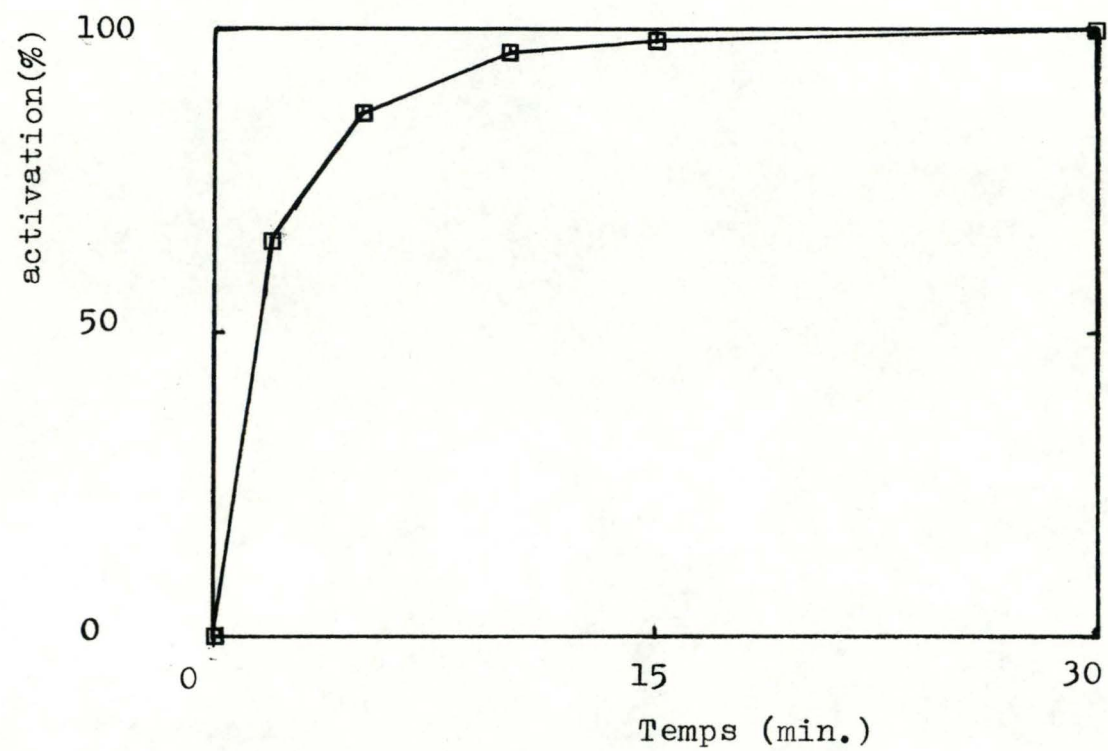


Fig. 25 : cinétique de production des  $LTB_4$  par les PMN stimulés par l'ionophore. Les 100 % d'activité correspondent au tube incubé pendant 30 minutes.

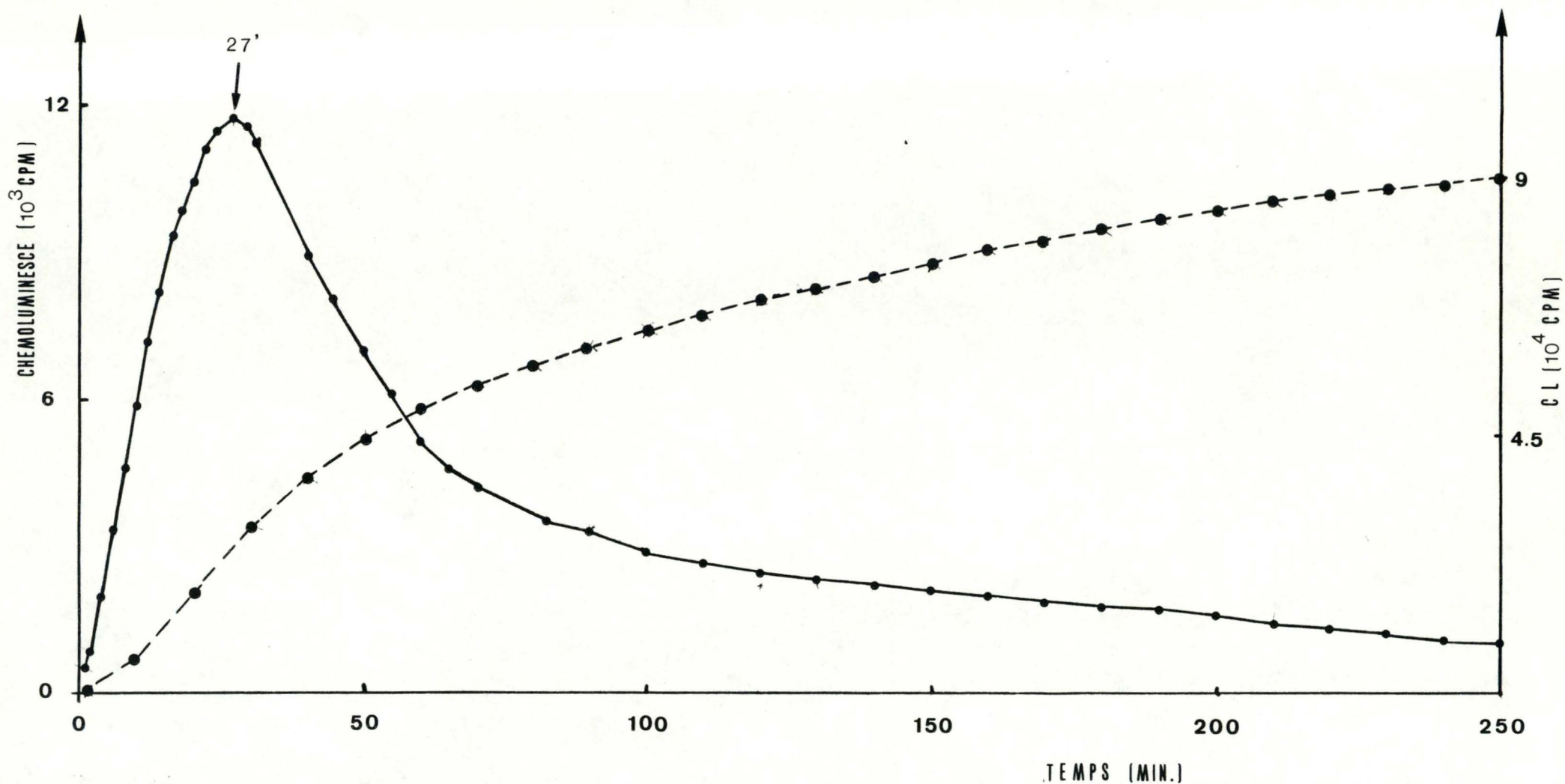


Fig. 26 : ●—● production de radicaux  $O_2^{\cdot -}$  (—) au cours du temps par des PMN stimulés par l'ionophore du calcium.

●---● quantité de radicaux  $O_2^{\cdot -}$  (---) qui s'accumuleraient dans le milieu (CL=chémoluminescence)  
 CPM = coups par minute

Au temps zéro minute, on détecte déjà une certaine quantité de leucotriènes dans le milieu de préincubation. Cette quantité représente une proportion importante par rapport aux LT produits lors de la stimulation des cellules; cela s'explique par le fait que le zymosan est un très faible stimulateur de la production de  $\text{LTB}_4$  par les PMN.

Une fois le zymosan ajouté dans le milieu d'incubation, la quantité de  $\text{LTB}_4$  augmente pour atteindre un plateau après 15 minutes environ.

#### Cinétique de production des radicaux $\text{O}_2^{\cdot -}$ : Fig. 28

Pour établir cette cinétique, on utilise la même méthode que pour les PMN stimulés par l'ionophore.

Après un temps de latence court (de l'ordre de la minute), la production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$  augmente rapidement jusqu'à la 20ème minute pour ensuite diminuer lentement et s'arrêter après environ 220 minutes.

#### V.4. Discussion

##### Comparaison entre les différentes cellules et entre les différents agents d'activation

###### . Chémoluminescence

Quantitativement, la production de radicaux superoxydes par les PMN stimulés par l'ionophore, est nettement plus faible que celle des PMN stimulés par le zymosan (Fig. 3b). Qualitativement cependant, ces deux productions sont assez proches en ce sens que leurs cinétiques d'activation sont très semblables et que la chémoluminescence s'arrête dans les deux cas après 220-250 minutes environ (Fig. 26 et 28). La cinétique de la chémoluminescence des macrophages a une allure assez semblable à celle des PMN, mais elle se déroule plus rapidement et s'arrête au bout de 120 minutes (Fig. 24).



. Production des leucotriènes  
 .....

Contrairement à la chémoluminescence, la production de  $\text{LTB}_4$  par les PMN stimulés par l'ionophore est environ cinquante fois plus importante que celle des PMN stimulés par le zymosan. Mais, comme pour la chémoluminescence, la cinétique de ces deux productions sont très semblables, avec une forte production au cours des premières minutes et un arrêt après 15 minutes (Fig. 25 et 27).

Les macrophages, par contre, ont un comportement très différent, puisque la production se déroule de manière régulière pendant 90 minutes avant de s'arrêter (Fig. 23).

Comparaison entre production des LT et production des radicaux

Pour les macrophages, on constate que la production des  $\text{LTC}_4$  s'arrête pratiquement au même moment que la production de radicaux superoxydes. On peut donc ici entrevoir une relation entre ces deux phénomènes.

Par contre, chez les PMN, qu'ils soient stimulés par l'ionophore ou par le zymosan, la production de  $\text{LTB}_4$  s'arrête au bout d'une quinzaine de minutes, tandis que la production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$  prend fin plus ou moins quatre heures après sa mise en route.

Ces observations excluent donc l'hypothèse d'une intervention directe et immédiate des  $\text{LTB}_4$  dans la production des radicaux superoxydes chez les PMN.

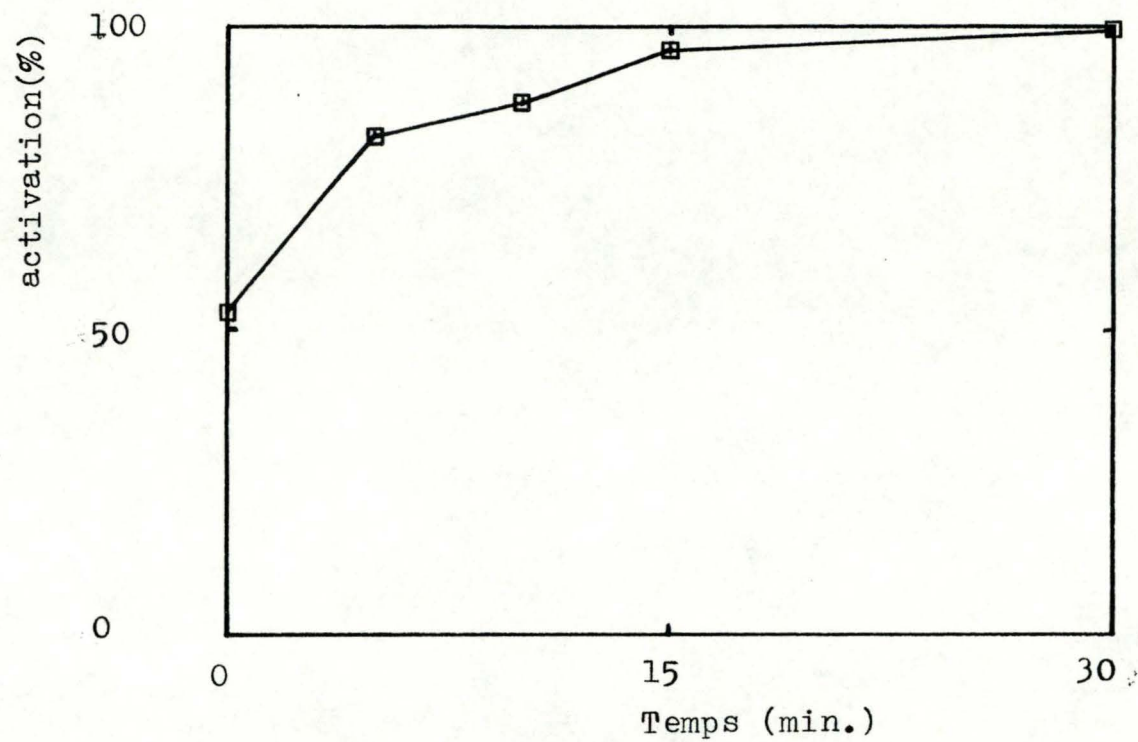


Fig. 27 : production de LTB<sub>4</sub> au cours du temps par les PMN stimulés par le zymosan opsonisé. Les 100 % d'activité correspondent au tube incubé pendant 30 minutes.

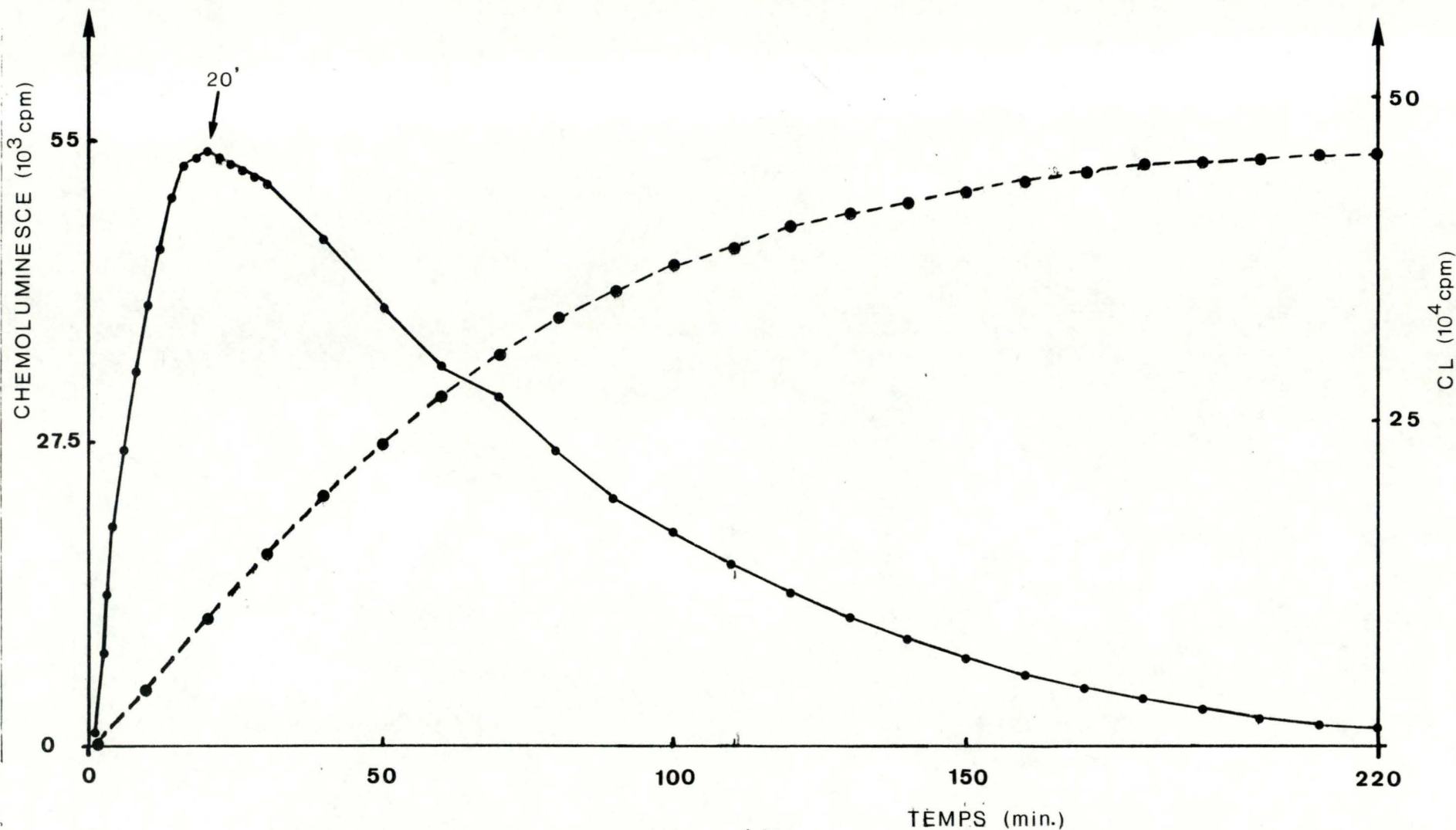


Fig. 28 : ●—● production de radicaux  $O_2^{\cdot -}$  (←) au cours du temps par des PMN stimulés par le zymosan opsonisé.

● - - - ● quantité de radicaux  $O_2^{\cdot -}$  (←) qui s'accumuleraient dans le milieu.  
 (CL = chémoluminescence) CPM = coups par minute

=====  
 CONCLUSION  
 =====

L'effet des inhibiteurs du métabolisme de l'acide arachidonique sur la production de radicaux superoxydes par les macrophages et les PMN nous indique clairement qu'il y a une relation entre la voie de la lipoxygénase et la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$ . Par contre, la voie de la cycloxygénase semble moins importante à cet égard, puisque l'indométhacine n'inhibe pas cette production aux concentrations où elle bloque la synthèse des prostaglandines.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la production de leucotriènes  $B_4$  et  $C_4$  par les PMN et les macrophages respectivement. En effet, les PMN ne produisent pas de  $LTC_4$ , tandis que les macrophages ne produisent pas de  $LTB_4$ . Il existe donc dès le départ une difficulté liée à l'impossibilité d'assigner à un médiateur de structure bien précise un rôle de déclencheur de la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$ . Les études cinétiques de la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  et de leucotriènes confirment la conclusion tirée des expériences d'incubation des cellules en présence des leucotriènes : les leucotriènes  $B_4$  et  $C_4$  ne seraient pas utilisés par les cellules comme des substrats alimentant de façon continue la machinerie de production des radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$ . Cette conclusion n'exclut pas cependant la possibilité que l'activation de la lipoxygénase puisse déclencher la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  sans faire intervenir l'un ou l'autre des leucotriènes "finaux" : en effet, nous ignorons l'effet d'autres métabolites issus de l'activité de la 5-lipoxygénase comme le 5-HPETE ou le leucotriène  $A_4$ . Ces composés ont une durée de vie très courte mais pourraient néanmoins déclencher la production

de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$ . Celle-ci continuerait sur sa lancée, indépendamment de la voie des leucotriènes, ce qui expliquerait que les cinétiques de production ne correspondent pas toujours. La relation entre la voie de la 5-lipoxygénase et la production de radicaux superoxydes semble donc complexe et pourrait relever d'interactions d'une très grande finesse dont l'étude biochimique est malaisée. Rappelons cependant que cette comparaison entre l'activité de la voie des leucotriènes et la production des radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  a été réalisée dans le cadre plus général d'une étude sur la relation entre la voie des leucotriènes et le phénomène d'activation des cellules inflammatoires. Le phénomène de dégranulation qui se déroule parallèlement à la production de radicaux  $O_2^{\cdot(-)}$  semble lui aussi dépendre de l'activité de la 5-lipoxygénase. La comparaison entre les 3 phénomènes pourrait peut-être permettre de préciser l'importance de la voie de la 5-lipoxygénase dans l'activation des cellules inflammatoires. Du point de vue pratique, la connaissance des mécanismes régissant l'ensemble de ces processus serait extrêmement utile. Par exemple, il serait intéressant de savoir s'il est possible d'inhiber spécifiquement l'un ou l'autre de ces phénomènes sans arrêter l'ensemble du processus d'activation. On songe plus particulièrement aux effets délétères que peuvent entraîner l'excès de radicaux libres ou d'enzymes lysosomiaux sur les tissus sains.

+++++

=====

## BIBLIOGRAPHIE

=====

- ALLEN R.C. (1981)  
Lucigenin chemiluminescence.  
In : De Luca M.A. et Mc Elroy W.D. (eds) :  
Bioluminescence and chemiluminescence. Basic  
chemistry and analytical applications.  
Academic press, New-York, 63-73.
- BABIOR B.M. (1978)  
Oxygen-dependent microbial killing by phago-  
cytes (First of two parts).  
Medical Progress, 298, n° 12, 659-668.
- BACH M.K. (1984)  
Prospects for the inhibition of leukotriene  
synthesis.  
Biochemical pharmacology, 33, n° 4, 515-521.
- BAUD L., HAGEGE J., SROER J., RONDEAU E., PEREZ J.  
and ARDAILLOU R. (1983)  
Reactive oxygen production by cultured rat  
glomerular mesangial cells during phagocytosis  
is associated with stimulation of lipoygenase  
activity.  
The Rockefeller University press, 158,  
1836-1852.
- BAXTER M.A., LESLIE R.G.Q. and REEVES W.G. (1983)  
The stimulation of suproxide anion production  
in guinea-pig peritoneal macrophages and  
neutrophils by phorbol myristate acetate,  
opsonized zymosan and IgG2-containing soluble  
immune complexes.  
Immunology, 48, 657-665.

- BONNEY R.J. and HUNES J.L. (1984)  
Physiological and pharmacological regulation  
of prostaglandin and leukotriene production  
by macrophages.  
Journal of leukocyte biology, 35, 1-10.
- BORGEAT P., FRUTEAU DE LACLOS B., CRASTES DE PAULET A.  
et MACLOUF J. (1983)  
La biochimie des leucotriènes.  
In : Biochimie de l'inflammation chez Masson,  
40-60.
- BORGEAT P., FRUTEAU DE LACLOS B., MACLOUF J. (1983)  
New concepts in the modulation of leukotriene  
synthesis.  
Biochem. pharmacol., 32, n° 3, 381-387.
- BRAQUET P. et BRAQUET M. (1983)  
Phagocytose et stimulation des processus d'oxy-  
dation cellulaire des macrophages.  
In : Biochimie de l'inflammation chez Masson,  
67-92
- CHANG J., SKOWRANCK M.D., CHERNEY M.L. and LEWIS A.J. (1984)  
Differential effects of putative lipxygenase  
inhibitors on arachidonic acid metabolism in  
cell free and intact cell preparation.  
Inflammation, 8, n° 2, 143-155.
- HAM E.A., SODERMAN D.D., ZANETTI M.E., DOUGHERTY H.W.,  
Mc CAULEY E. and KUEHL F.A. (1983)  
Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4  
from activated neutrophils.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4349-4353.

- HANSSON G., MALMSTEN C. and RADMARK O. (1983)  
The leukotrienes and other lipooxygenase products.  
In : Prostaglandins and related substances,  
Elsevier Science publishers, 127-169.
- INGRAHAM L.M., WEENING R.S., CLARKE M.F., BOXER L.A.  
and BAEHNER R.L. (1982)  
Relation of respiratory burst and arachidonate  
metabolism during phagocytosis by guinea-pig  
alveolar macrophages.  
J. Lab. Clin. Med., 99, n° 6, 908-916.
- LANDS W.E.M. and HANEL A.M. (1983)  
Inhibitors and activators of prostaglandin  
biosynthesis.  
In : Prostaglandins and related substances.  
Elsevier Science publishers, 203-223.
- LENOIR G. (1983)  
Dosage des leucotriènes par HPLC et effet de  
quelques molécules radicophiles sur la produc-  
tion du LTB<sub>4</sub> par des leucocytes.  
Rapport de recherche.
- METZ S.A., HALL M.E. and MURPHY R.C. (1982)  
Rapid extraction of leukotrienes from biologic  
fluids and quantitation by high-performance  
liquid chromatography.  
Journal of chromatography, 233, 193-201.
- MULLER-PEDDINGHAUSE R. (1984)  
In vitro determination of phagocyte activity  
by luminol and lucigenin-amplified chemilu-  
minescence.  
Int. J. Immunopharmac., 6, n° 5, 455-466.



- PALMBLAD J., MALMSTEN C.L., UDEN A.M., RADMARK O.,  
ENGSTEDT L. and SAMUELSSON B. (1981)  
Leukotriene B4 is a potent and stereospecific  
stimulator of neutrophil chemotaxis and  
adherence.  
Blood, 58, n° 3, 658-661.
- PRESCOTT S.M., ZIMMERMAN G.A. and SEEGER (1984)  
Leukotriene B4 is an incomplete agonist for  
the activation of human neutrophils.  
Biochemical and biophysical research communi-  
cation, 122, n° 2, 535-541.
- ROUZER C.A., SCOTT W.A. and COHN Z.A. (1980)  
Mouse peritoneal macrophages release leuko-  
triene C in response to a phagocytic stimulus.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, n° 8, 4928-4932.
- SALARI H., BRAQUET P. and BORGEAT P. (1984)  
Comparative effects of indomethacin, acetylenic  
acids, 15-HETE, nordihydroguaiaretic and  
BW755C on the metabolism of arachidonic in  
human leukocytes and platelets.  
Prostaglandins, leukotrienes and medicine,  
13, 53-60.
- SCOTT A.W., ROUZER C.A. and COHN Z.A. (1983)  
Leukotriene C release by macrophages.  
Federation proceedings, 42, n° 1, 129-133.
- SERHAN C.N., RADIN A., SMOLEN J.E., KORCHAK H. and  
al. (1982)  
Leukotriene B4 is a complete secretagogue  
in human neutrophils : a kinetic analysis.  
Biochem. and biophys. research communications,  
107, n° 3, 1006-1012.

- SMITH R.L. and WEIDEMANN (1980)  
Reactive oxygen production associated with arachidonic acid metabolism by peritoneal macrophages.  
Biochem. and Biophysical research communications, 97, n° 3, 973-980.
- SMITH M.J.H. (1983)  
Les leucotriènes et l'inflammation.  
In : Biochimie de l'inflammation chez Masson, 98-106.
- SUMIMOTO H., TAKESHIGE K. and MINAKAMI S. (1984)  
Superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by leukotrienes B4.  
Biochim. et Biophysica acta, 803, 271-277.
- WARD P.A., SWLAVIK M.C. and JOHN K.J. (1984)  
Rat neutrophil activation and effects of Lipoxygenase and Cyclooxygenase inhibitors.  
A.J.P. 116, n° 2, 223-233.
- WEISSMANN G. (1980)  
Prostaglandins in acute inflammation.  
Current Concepts (Upjohn).
- WILLOUGHBY D.A. (janvier 1978)  
L'inflammation.  
La Recherche, 9, n° 85, 28-36.